



Laboratorio Itinerante BIOLOGIA

Gli enzimi di restrizione: "Le forbici del DNA"



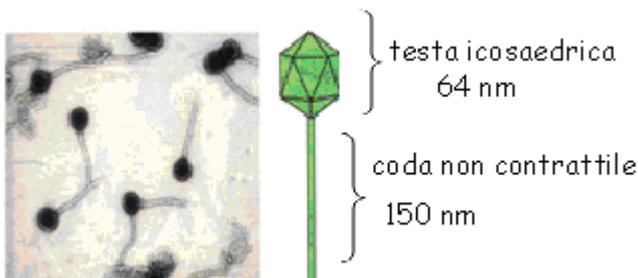
GUIDA PER L'INSEGNANTE

IL FAGO LAMBDA

Il batteriofago lambda (fago λ) è il principale protagonista dei due laboratori

- Costituisce il DNA stampo per il laboratorio della "PCR"
- Si digerisce il suo DNA con enzimi di restrizione nel laboratorio "Le forbici del DNA"

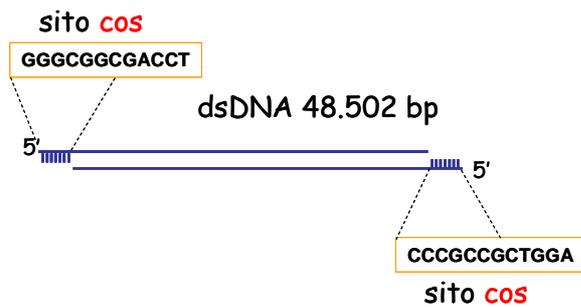
Il fago λ è un organismo relativamente semplice costituito da una testa icosaedrica contenente il DNA spiralizzato e da una coda che permette il riconoscimento del batterio, il posizionamento del fago e l'inoculazione del DNA.



L'ospite batterico del fago lambda è *Escherichia.coli*. Il fago λ è innocuo per l'uomo e gli altri organismi eucarioti, e quindi costituisce un'ottima fonte di DNA per lo studio sperimentale.

Lambda è un fago temperato che può scegliere tra due stili di vita: moltiplicarsi all'interno del suo ospite e distruggerlo (**ciclo litico**) o inserire il proprio DNA nel cromosoma batterico e rimanere quiescente per diverse generazioni (**ciclo lisogeno**).

Il DNA di lambda è costituito da una molecola di DNA lineare di 48.502bp a doppio filamento contenente a ciascuna delle estremità 5' una sequenza di 12 bp a singolo filamento complementari (sito COS).



ENZIMI DI RESTRIZIONE

SCOPO

L'attività si propone di sperimentare l'azione di alcuni degli enzimi di restrizione più usati nelle tecniche di biologia molecolare. Tali enzimi, capaci di tagliare il DNA a doppia elica in punti specifici, saranno utilizzati per digerire il genoma del fago lambda ottenendo frammenti che si visualizzeranno con la tecnica dell'elettroforesi.

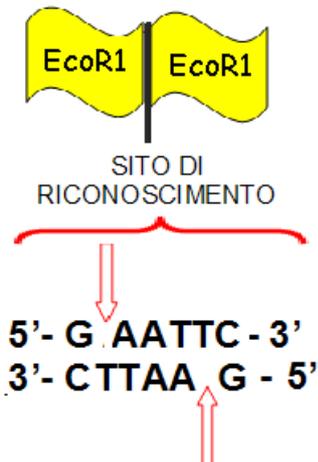
ENZIMI DI RESTRIZIONE

Gli enzimi di restrizione (endonucleasi di restrizione), scoperti all'inizio degli anni '70, sono enzimi che tagliano il DNA in punti specifici, diversi per ciascun enzima, permettendo così di frammentare il genoma in maniera precisa e riproducibile.

Senza la scoperta delle endonucleasi di restrizione NON esisterebbe il DNA ricombinante e tutte le tecnologie derivanti.

Questi enzimi sono stati scoperti nei batteri, dove svolgono un'azione distruttiva nei confronti di eventuale DNA estraneo. Tali enzimi riconoscono e tagliano la doppia elica del DNA in corrispondenza di specifiche sequenze palindromiche di DNA costituite da 4-8 paia di basi diverse per ciascun enzima. Per esempio, l'enzima *EcoRI* taglia il

DNA soltanto quando incontra la seguente sequenza di basi appaiate nella doppia elica del DNA:



Se si osserva con attenzione questa sequenza, la si legge in direzione 5' → 3', si nota che è la stessa su entrambi i filamenti: è una *palindrome*, come la frase «*ai lati d'Italia*». La maggior parte degli altri enzimi di restrizione lavora riconoscendo sequenze palindrome e operando un taglio «obliquo» nel filamento di DNA.

Gli enzimi di restrizione agiscono solo sul DNA estraneo e non tagliano mai il DNA della cellula batterica che li ha prodotti. Il batterio infatti protegge il proprio DNA con un meccanismo chiamato *metilazione*: alcuni enzimi aggiungono un gruppo metile (-CH₃) in tutti i punti del DNA batterico che potrebbero essere riconosciuti dagli enzimi di restrizione.

Oggi gli enzimi di restrizione possono venire isolati ed estratti dalle cellule batteriche che li producono per essere utilizzati in laboratorio come se fossero delle «*forbici biochimiche*». Infatti il DNA di qualsiasi organismo, se incubato in provetta con un enzima di restrizione, verrà tagliato in tutti i punti in cui è presente il relativo sito di restrizione (cioè una sequenza di basi specifica). Sono disponibili centinaia di enzimi di restrizione, purificati a partire da vari microrganismi. Perciò uno stesso campione di DNA può essere tagliato da più enzimi che

riconoscono siti di restrizione diversi. In questo modo i biologi molecolari possono scegliere con precisione chirurgica dove tagliare un campione di DNA optando tra molti siti diversi. I tratti di DNA che si ottengono sono chiamati *frammenti di restrizione*. Poiché le sequenze di riconoscimento non si presentano a intervalli regolari, i frammenti di restrizione hanno lunghezze diverse, ed è proprio grazie a questa variabilità che li possiamo separare per dimensione tramite la tecnica *dell'elettroforesi su gel di agarosio*. Tale operazione può servire sia a stabilire il numero dei singoli frammenti, con le rispettive dimensioni molecolari, sia a individuare e purificare un frammento di particolare interesse.

Nomenclatura degli enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione prendono il nome dai batteri che li producono. Per assegnare in modo chiaro ed univoco un codice ad un enzima di restrizione si è deciso che:

1. Le prime tre lettere, scritte in corsivo, sono prese dalla nomenclatura del batterio di origine.
2. Tipi differenti dello stesso organismo sono identificati da una quarta lettera minuscola.
3. Segue una lettera maiuscola o un numero, che identificano un ceppo particolare di quel batterio, ove fosse necessario.
4. Un numero romano indica l'ordine di scoperta, qualora dallo stesso batterio vengano isolati enzimi diversi.

Es: *EcoRI* (il primo enzima scoperto) proviene da *Escherichia coli*, ceppo RY13. Il numero presente sul nome indica che questo è stato il primo enzima di restrizione trovato in *E. coli*. *BamHI* è ottenuto da *Bacillus amyloliquefaciens* H, il numero indica che questo è stato il primo enzima di restrizione trovato in questo batterio. *HindIII* è ottenuto da *Haemophilus influenzae* Rd, il III indica che questo è stato il terzo enzima di restrizione isolato da *H. influenzae*.

Enzima	Organismo di origine	Sequenza consenso	Taglio
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5'---GAATTC---3' 3'---CTTAAG---5'	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'---AAGCTT---3' 3'---TTCGAA---5'	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'

Digestione con enzimi di restrizione

Per digerire il DNA del fago lambda si utilizzeranno gli enzimi di restrizione: *EcoRI* e *HindIII*

Poiché è nota la sequenza completa del genoma di questo fago (48502 paia di basi) si possono facilmente ricavare, in modo estremamente preciso, le dimensioni (in paia di basi) dei frammenti di restrizione che si ottengono in seguito a digestione con uno specifico enzima. Inoltre, è possibile usare il DNA del fago lambda come marcatore di peso molecolare per individuare la dimensione approssimativa di frammenti di DNA di dimensioni ignote tramite il confronto con il genoma di λ digerito (se composte da un numero simile di paia di basi i frammenti di DNA, visibili in seguito ad elettroforesi su gel di agarosio si fermeranno alla stessa altezza del gel). Prima che venissero messi in commercio dei marcatori di peso molecolare di riferimento noti come "*DNA ladder*" (uno di questi è presente nel laboratorio relativo alla elettroforesi) il DNA di lambda digerito con l'enzima *HindIII* veniva utilizzato come marcatore di peso molecolare.

Uso delle MICROPIPETTE

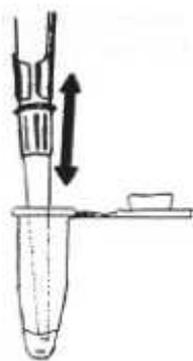
Le micropipette consentono di erogare con precisione piccoli volumi (microlitri) e sono progettate per essere utilizzate con puntali monouso. Prima di eseguire gli esperimenti si consiglia di familiarizzare gli studenti con pipettatrici automatiche. Potranno imparare esercitandosi a trasferire piccoli volumi (2-20 microlitri) di una soluzione colorata (bevande colorate, una soluzione di colorante alimentare o lo stesso *loading dye* fornito nel kit) da una provetta all'altra.

Ecco delle semplici e rapide indicazioni su come utilizzare micropipette:

1. Ruotare il selettore sulla micropipetta per impostare il volume desiderato.
2. Collegare un nuovo puntale alla micropipetta.
3. Premere lo stantuffo della micropipetta alla prima fermata
4. Inserire la punta della micropipetta nella soluzione da cui trasferire
5. Rilasciare lentamente lo stantuffo per prelevare il liquido.
6. Inserire la punta della micropipetta nella provetta desiderata.
7. Per trasferire il liquido premere lo stantuffo fino in fondo oltre la prima fermata. Assicurarsi di mantenere lo stantuffo premuto quando si solleva la punta della pipetta dalla provetta .
8. Estrarre la pipetta.

Durante le operazioni di prelievo e di erogazione del liquido occorre inoltre:

- Non toccare l'estremità del puntale con le dita. Ci sono proteasi e DNasi nel vostro sudore che possono contaminare e degradare i reagenti;
- tenere la micropipetta il più possibile verticale e al livello degli occhi in modo da poter vedere cosa si sta facendo;
- Aggiungere i reagenti sul fondo della provetta, non di lato (vedere figura);
- Assicurarsi che tutti i reagenti siano sul fondo del tubo e non sul lato; ed eventualmente fare in modo che si trovino sul fondo;
- Pipettare lentamente per evitare di contaminare la micropipetta;
- Cambiare i puntali SEMPRE, anche se il reagente è lo stesso



PROGETTAZIONE DELL'ESPERIMENTO

Poiché il successo di questo esperimento dipende dalle giuste quantità di reagenti nella miscela di reazione è opportuno che l'insegnante progetti insieme agli studenti la reazione e che insegni loro come pipettare piccole quantità (microlitri) di reagenti. Per la progettazione dell'esperimento è importante considerare le condizioni di reazione consigliate dalla ditta fornitrice dell'enzima e stabilire:

- **La quantità di DNA da utilizzare perché si ottengano frammenti visibili dopo colorazione del DNA.**

Il Dna fornito è 500 ng/ μ l e la colorazione con AzurA per rendere *visibile* il DNA è meno efficiente delle colorazioni che comunemente si utilizzano nei laboratori di ricerca. Occorre quindi utilizzare almeno 3-4 microgrammi(μ g) di DNA pari 6-8 μ l del DNA di lambda fornito.

- **La quantità di enzima.**

Gli enzimi sono molto concentrati (20 unità/ μ l). Si definisce "*unità*" la quantità di enzima in grado di tagliare 1 microgrammo (μ g) di DNA in un'ora. Quindi sarebbe più che sufficiente utilizzare 1 μ l di enzima. Tuttavia, poiché è difficile prelevare 1 μ l con le micropipette fornite nel Kit si consiglia di utilizzare 2 μ l di enzima

- **Volume finale della reazione.**

In genere si utilizza un volume finale di 20 μ l e una quantità inferiore di DNA, nel nostro caso già siamo ad un volume di 8-10 μ l e abbiamo una quantità *enorme* di DNA (3-4 μ g). La ditta consiglia di usare un volume finale di 50 μ l. Considerando che 10 vengono utilizzati per il caricamento del gel un volume finale di 50 μ l consente di ripetere fino a 5 volte l'esperimento di elettroforesi su gel di agarosio (Kit4). Il volume finale consigliato per ciascuna delle due digestioni è quindi di 50 μ l

- **La quantità di Buffer10X**

Ogni enzima lavora bene in un determinato Tampone (*Buffer*). La ditta fornitrice consiglia il buffer 2.1 per l'enzima *Hind*III (100% attività) e il buffer Eco specifico per l'enzima *Eco*RI. La quantità di Buffer10X dipende strettamente dal volume finale: per 50 μ l finali sono necessari 5 μ l buffer10X.

- **La quantità di acqua distillata sterile**

Viene stabilita alla fine in base al volume ottenuto dalla somma dei reagenti (X μ l) ed è pari a microlitri 50-X. Se si utilizzano 2 μ l di enzima, 6 μ l del Dna di lambda e 5 μ l di buffer10X occorrerà aggiungere **37 μ l** di acqua distillata sterile

GUIDA PER LO STUDENTE

In questa attività di laboratorio, il vostro compito sarà quello di

- tagliare (o digerire) il DNA del fago lambda (λ), un virus che infetta i batteri, in una serie di frammenti utilizzando gli enzimi di restrizione: *EcoRI* e *HindIII* (Il primo enzima taglia il materiale genetico in 5 frammenti mentre il secondo produce 7 frammenti)
- determinare le dimensioni dei frammenti di DNA ottenuti utilizzando una procedura nota come elettroforesi su gel di agarosio in grado separare e ordinare le molecole di DNA in base alle loro dimensioni.
- prevedere le dimensioni dei frammenti di restrizione analizzando la sequenza del genoma di lambda
- confrontare i vostri frammenti di DNA con i frammenti di dimensione nota presenti nel DNA ladder e con il risultato previsto

Materiali e reagenti per ciascun gruppo di 3-6 studenti

- 3 microprovette da 1,5 ml
- pipetta automatica 2-20 microlitri
- puntali per pipetta automatica 2-20 μ l
- DNA lambda* (**500 ng/ μ l**) (conservato nel freezer a -20°C)
- 1 microprovetta contenente acqua distillata sterile
- *EcoRI** 20 unità/ μ l (conservato nel freezer a -20°C)
- Buffer10X *EcoRI* (conservato nel freezer a -20°C)
- *HindIII**20 unità/ μ l (conservato nel freezer a -20°C)
- Buffer10X *EcoRI* (conservato nel freezer a -20°C)
- Un pennarello indelebile punta fine

* **Attenzione gli enzimi di restrizione e il DNA del fago lambda non vanno mai lasciati a temperatura ambiente: prelevarli dallo scomparto -20°C e metterli subito in un contenitore con ghiaccio**

I reagenti sono indicati nelle microprovette nel seguente modo



Avrete anche bisogno di

- un contenitore con ghiaccio in cui mettere i vari reagenti che devono essere utilizzati e alla fine rimessi a -20°C
- un bagno termostato a 37°C
- un galleggiante

Procedura di laboratorio

1) Mettere in ghiaccio tutti i reagenti: gli enzimi di restrizione (*EcoRI* e *HindIII* sono in soluzione di glicerolo e quindi non congelano), i tamponi 10X e il DNA di lambda (dopo rapido scongelamento a temperatura ambiente), la microprovetta contenente acqua distillata sterile.

Lasciarli in ghiaccio per tutto il periodo di allestimento delle reazioni

2) Etichettare quattro provette da 1,5 ml con le lettere E, H o L



digestione del DNA lambda con *EcoRI* (2 studenti)



digestione del DNA lambda con *HindIII* (2 studenti)



DNA lambda non tagliato (2 studenti)

3) Allestimento delle reazioni

Con la pipetta automatica da 2-20 microlitri prelevare i volumi (μl) indicati in tabella e introdurli nelle corrispondenti microprovette.

Reagenti	Microprovetta E	Microprovetta H	Microprovetta L
Acqua	37 μl	37 μl	44 μl
Tampone10X	5	5	NO
DNA Lambda	6 μl	6 μl	6 μl
<i>EcoRI</i>	2 μl	NO	NO
<i>HindIII</i>	NO	2 μl	NO
VolumeFinale	50μl	50μl	50μl

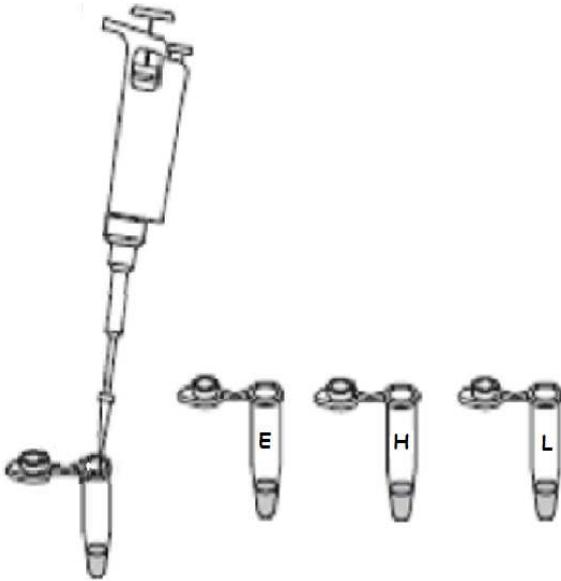
Ricordare che

Massa

Un microgrammo è la milionesima parte di un grammo
1000 microgrammi (μg) = 1 milligrammo(mg)
1000 milligrammi=1 grammo(g)

Volume

Un microlitro è la milionesima parte di un litro
1000 microlitri (μl) = 1 millilitro(ml)
1000 millilitri=1 litro (L)



Attenzione

*-Introdurre nelle microprovette i singoli reagenti secondo l'ordine della tabella (dall'alto verso il basso)
-Cambiare sempre il puntale ogni volta che si cambia tipo di reagente per evitare la contaminazione delle soluzioni madri (un tipo di enzima contaminato da un altro o da DNA oppure DNA contaminato da enzimi)*



È essenziale aggiungere la giusta quantità di liquido nelle microprovette e garantire un contenuto omogeneo. Quando si aggiunge un reagente mescolare pipettando accuratamente il liquido su e giù nella punta alcune volte.

- 4) Chiudere ogni tubo ermeticamente. Se possibile effettuare una breve centrifugata per depositare sul fondo tutti i reagenti
- 5) Porre i 3 tubi (anche il controllo L) in un supporto galleggiante e incubare a 37 °C, per 45-60 minuti.

Nota: Ogni tubo contiene 3 microgrammi di DNA di lambda e 40 "unità" di enzima di restrizione. Si definisce "unità" la quantità di enzima in grado di tagliare 1 μg di DNA in un'ora alla temperatura ottimale. Gli enzimi di restrizione previsti in questo kit EcoRI e HindIII funzionano bene a 37°C. La maggior parte degli enzimi

di restrizione lavorano a 37°C tuttavia, dopo diverse ore a tale temperatura, sono denaturati e l'attività enzimatica diminuisce

6) Trascorso tale tempo, bloccare la reazione ponendo i 3 tubi a 80°C per 20 minuti (la temperatura di denaturazione di *HindIII* è 65°C quella di *EcoRI* 80°C)

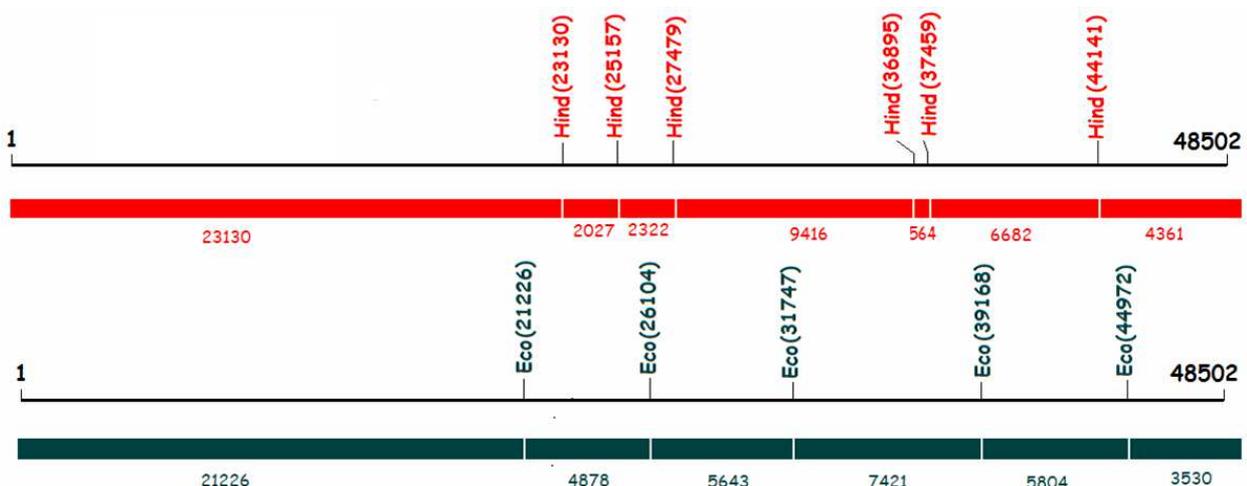
7) Conservare le tre provette in frigorifero sino al giorno in cui si farà la corsa elettroforetica per visualizzare i frammenti di DNA ottenuti dalla digestione enzimatica

Risultati Previsti

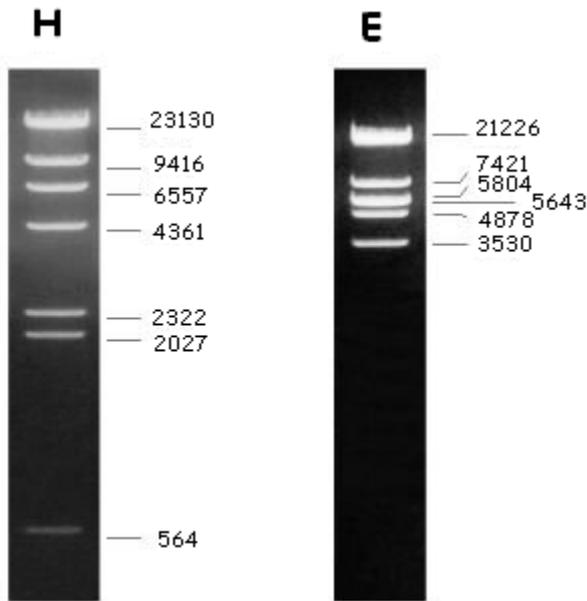
Nell'attesa della possibilità di effettuare l' elettroforesi su gel di agarosio gli studenti possono

- Con l'aiuto del professore di informatica cercare in banca dati la sequenza nucleotidica del DNA del fago lambda. Il genoma completo del fago lambda (48502 bp) è presente nel sito NCBI (codice accesso NC_001416.1). Ottenuta la sequenza possono cercare programmi di analisi per trovare sulla sequenza i siti di restrizione di *EcoRI* e *HindIII* e in base a questo verificare le dimensioni dei frammenti attesi. Possono inoltre cercare i siti per altri enzimi che tagliano il genoma di lambda e prevedere i frammenti attesi con altri specifici enzimi

- Costruire una mappa di restrizione come illustrato nella figura



Questo è il risultato previsto dopo la digestione del DNA del fago lambda.



Nota: Potete osservare che le bande di minori dimensioni sono meno visibili in quanto contengono meno DNA. Inoltre, le bande ottenute dalla digestione con l'enzima EcoRI di 5804 bp e 5643 bp anche in condizioni ottimali di corsa sono difficilmente distinguibili. Se la digestione non è stata completa, sul gel si potrebbero visualizzare una banda aggiuntiva di dimensioni pari alla somma di due frammenti contigui. (es la mancanza del taglio da parte dell'enzima HindIII in posizione 27479 bp comporta la comparsa di una banda extra di 11738)

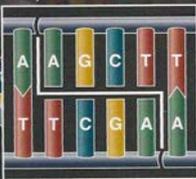
NEW Buffer Formulation



R0104S 070131215121

HindIII

S R0104S Lot: 0701312
10,000 units Exp: 12/15
20,000 units/ml Store at -20°C



NEW ENGLAND BioLabs, Inc.

HindIII

Features: Recombinant

Reaction Conditions:
NEBuffer 2.1, 37°C. Inactivate at 80°C for 20 min.

Standard Protocol:
Restriction Enzyme _____ 10 units (sufficient to digest all types of DNAs)
DNA _____ 1 µg
10X NEBuffer _____ 5 µl (1X)
Total Rxn Volume _____ 50 µl
Incubation Temperature _____ 37°C
Incubation Time _____ 60 min.

Buffer Performance:

NEBuffer	1.1	2.1	3.1	CutSmart
% Activity	25	100	50	50

Star activity may result from extended digestion.

For detailed product information, scan the code below or visit www.neb.com/R0104



For Research Use Only



NEW Buffer Formulation



R0101S 033151115112

EcoRI

S R0101S Lot: 0331311
10,000 units Exp: 11/15
20,000 units/ml Store at -20°C



NEW ENGLAND BioLabs, Inc.

EcoRI

Features: Recombinant, Time-Saver™

Reaction Conditions:
NEBuffer EcoRI, 37°C. Inactivate at 65°C for 20 min.

Time-Saver Protocol:
Restriction Enzyme _____ 1 µl
DNA _____ 1 µg
10X NEBuffer _____ 5 µl (1X)
Total Rxn Volume _____ 50 µl
Incubation Temperature _____ 37°C
Incubation Time _____ 5-15 min.
Can also be used overnight with no star activity.

Buffer Performance:

NEBuffer	1.1	2.1	3.1	CutSmart
% Activity	25	100*	50	50*

*May exhibit star activity in this buffer.

For detailed product information, scan the code below or visit www.neb.com/R0101



TIME-SAVER™ is a trademark of New England Biolabs, Inc.

For Research Use Only



Lambda DNA



N3011S 164140716071

1-800-632-7799
info@neb.com
www.neb.com

N3011S
250 µg Lot: 1641407 Exp: 7/16
500 µg/ml Store at -20°C

Description: Duplex DNA is isolated from bacteriophage lambda (cl857 ind 1 Sam 7). Lambda DNA is 48,502 base pairs in length.

Source: The phage is isolated from the heat-inducible lysogen *E. coli* λ cl857 S7. The DNA is isolated from the purified phage by phenol extraction and dialyzed against 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA.

Supplied in: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA.

Molecular Weight: 31.5 x 10⁶ daltons

Reference:

- Daniels, D.L. et al. (1983). Appendix II: Complete Annotated Lambda Sequence. In R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl and R.A. Weisberg (Eds.), *Lambda-II* (pp. 519-676). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Costo del materiale necessario per Digestione enzimatica

<i>Descrizione</i>	<i>N. catalogo</i>	<i>Costo</i>
Lambda DNA - 250 µg.	Cod.BN3011S	81,15
<i>EcoRI</i> *-10.000 units +tampone	Cod.BA0101S	43,24
<i>HindIII</i> * - 10.000 units +tampone.	Cod.BA0104S	41,18
Primo boil-proof microcentrifuge tubes 1,5 mlin re-sealable bags. 1000 pcs	Cod.ET3415	9,80
PRIMO gilson yellow beveled 2-200 ul Racked. 960 pcs	Cod.ECTY200RN	24,95
Pipetta meccanica monocanale Primo® 2 - 20ul.	Cod.ECP10020	78,00

Ditta fornitrice del materiale

EuroClone S.p.A

Via Figino, 20/22 -20016 Pero (MI) Italia

Tel + 39.02.38.19.51

Fax +39.02.38.10.14.65

I costi sono relativi all'offerta 185587 del 25/11/2014

NB gli enzimi* vanno trasportati a freddo e ci può essere un costo aggiuntivo