

Esperienza 2: gli enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono delle proteine sintetizzate dai batteri per proteggersi dalle infezioni virali (batteriofagi). Questi enzimi tagliano il DNA virale in punti specifici. Questo meccanismo di resistenza ai batteriofagi, denominata restrizione, fu studiata da W. Arber all'Università di Ginevra negli anni '60. Egli ottenne, con D. Nathans e H. Smith, il premio Nobel di Medicina nel 1978 per la scoperta e le applicazioni degli enzimi di restrizione.

Soggetti: enzimi di restrizione, taglio del DNA, separazione grazie all'elettroforesi sul gel di agarosio, complessità dei genomi, carte di restrizione.

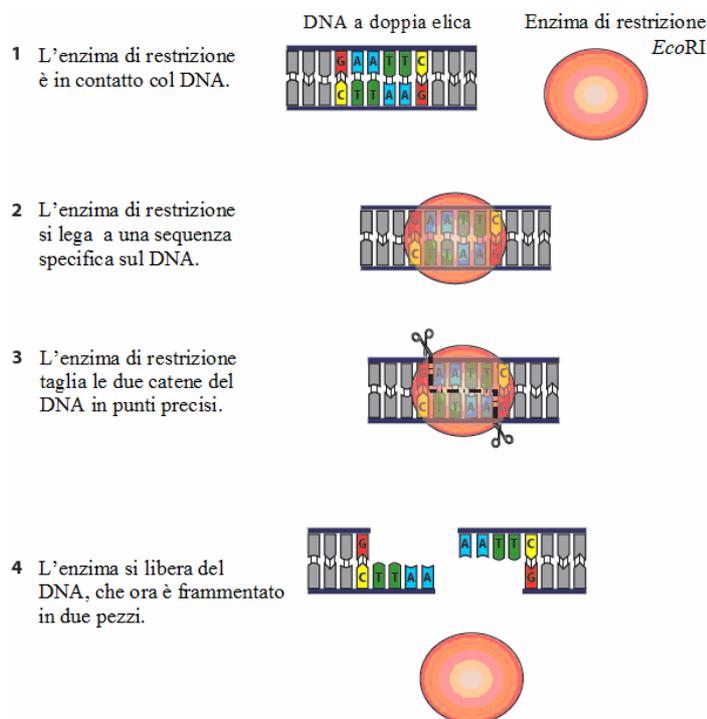
Introduzione

Quando i batteriofagi infettano un battere, esso inietta il suo DNA. Senza sistema di difesa adatto, i batteriofagi potrebbero riprodursi e dunque lisare il battere. Per resistere a questa infezione, il battere sintetizza gli enzimi di restrizione che frammentano il DNA virale sconosciuto. Parallelamente, il battere possiede delle metilasi, capaci di modificare (metilare) il loro DNA per non essere riconosciuti dagli enzimi di restrizione.

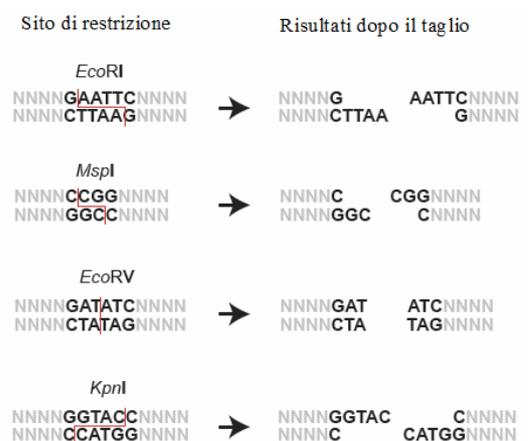
Oggi sono disponibili in commercio molte centinaia di enzimi di restrizione. Questi enzimi fanno parte degli strumenti (forbici molecolari) indispensabili ai biologi molecolari. Questi strumenti permettono di tagliare il DNA per isolare alcuni frammenti, per costruire delle carte genetiche (carte di restrizione), per creare delle nuove combinazioni di DNA, ecc. Gli enzimi di restrizione hanno permesso l'avvenimento della biologia molecolare.

Il nome di un enzima di restrizione indica la sua origine: *Sau3A* proviene da *Staphylococcus aureus* 3A, *BamHI* proviene da *Bacillus amyloliquefaciens* H, *EcoRI* proviene da *Escherichia coli*, *MspI* proviene da *Moraxella species*, *KpnI* proviene da *Klebsiella pneumoniae*. Questi enzimi riconoscono e tagliano delle sequenze di nucleotidi molto specifiche chiamate siti di restrizioni. Questi siti sono solitamente palindromici, sarebbe a dire che essi sono composti di sequenze nucleotidiche identiche sulle due catene, ma con orientazioni antiparallele.

Schema rappresentante il taglio delle due catene di DNA fatto dall'enzima *EcoRI*.



Esempio di taglio fatto da diversi enzimi di restrizioni.



A dipendenza del numero di nucleotidi riconosciuti, l'enzima di restrizione taglia il DNA più o meno frequentemente. Per esempio, per questa esperienza, utilizzeremo due enzimi diversi che riconoscono rispettivamente 4 e 6 nucleotidi: *MspI* (CCGG) e *BamHI* (GGATCC). Mediamente questi due enzimi tagliano il DNA tutte le 256 (4⁴) e 4096 (4⁶) paia di basi. Le estremità dei

frammenti ottenuti possono essere formate da due catene di lunghezza uguale, chiamate estremità piatte (blunt ends) o presentare una catena più lunga dell'altra. In questo caso le estremità sono chiamate estremità coesive (sticky ends). Il modo di tagliare dipende dall'enzima di restrizione.

L'esperienza

Il DNA usato in questa esperienza è quello dei plasmidi che utilizziamo nel nostro laboratorio. I plasmidi sono dei DNA circolari, relativamente piccoli. Il plasmide pUC19 conta circa 2600 nucleotidi. Esso serve da “vettore” per clonare dei geni. Il plasmide pUC19-TIF1 contiene in più un frammento di DNA di lievito di circa 5800 pb (paia di basi). Per avere un paragone, il DNA del batteriofago λ (lambda) è più grande (circa 50'000 pb, 50 kpb), il cromosoma di un battere (*Escherichia coli*) contiene 3'500'000 pb (3'500 kpb), il genoma del lievito (2 x 16 cromosomi) contiene 2 x 14'000'000 pb (14'000 kpb) e i 2 x 23 cromosomi di un essere umano contengono 2 x 3'000'000'000 pb (6'000'000 kpb). In lunghezza, ciò corrisponde a 1,4 mm per il cromosoma batterico, 4,3 mm per i cromosomi del lievito e 2 m per i cromosomi umani.

Schema dell'esperienza:

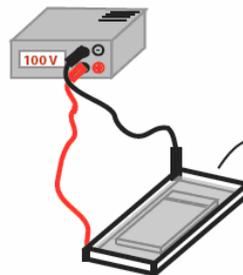
1 Il DNA è mescolato con un enzima di restrizione. Gli eppendorf sono allora incubati a 37°C per permettere il taglio del DNA.



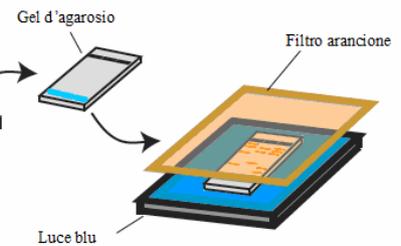
2 I campioni sono posati su gel di agarosio.



3 Un campo elettrico permette di far migrare e separare i frammenti di DNA.



4 Alla fine della migrazione, il gel di agarosio è posato sulla luce blu. Un filtro arancione permette di visualizzare i frammenti di DNA. Il gel può così essere fotografato.



Protocollo

Siccome pipettare è difficile e impiega molto tempo, è meglio che 4 gruppi digeriscano il plasmide pUC19 (eppendorf 1, 2, 3) e gli altri 4 gruppi digeriscano il plasmide pUC19-TIFI (eppendorf 4, 5, 6).

1) Digestione:

- Numerare 6 eppendorf.
- Aggiungere gli elementi come descritto nella tabella qui sotto (i volumi sono in μl).

| | H ₂ O | pUC19 | pUC19-TIF1 | Tampon de digestion 10x | BamHI | MspI |
|--------|------------------|-------|------------|-------------------------|-------|------|
| tube 1 | 12.5 | 1 | - | 1.5 | - | - |
| tube 2 | 11.5 | 1 | - | 1.5 | 1 | - |
| tube 3 | 8.5 | 4 | - | 1.5 | - | 1 |
| tube 4 | 12.5 | - | 1 | 1.5 | - | - |
| tube 5 | 11.5 | - | 1 | 1.5 | 1 | - |
| tube 6 | 8.5 | - | 4 | 1.5 | - | 1 |

Attenzione: lasciare gli enzimi sul ghiaccio e usare una punta nuova ogni volta che si pipetta.

- Mescolare pipettando 3-4 volte.
- Incubare la reazione a 37°C 30-60 minuti.

A ogni tappa è possibile congelare le reazioni e continuare l'esperienza la volta seguente.

2) Preparazione del gel di agarosio:

Durante la digestione, preparare il gel d'agarosio. Questo gel è una matrice che permette di separare le molecole di DNA in un campo elettrico in base alla taglia. I frammenti piccoli migrano più velocemente di quelli grandi. La concentrazione di agarosio si sceglie in funzione della taglia dei frammenti da separare. Per questa esperienza, utilizziamo un gel a 1,5% d'agarosio.

- Pesare 1,05 g d'agarosio e metterlo in un erlenmeyer da 250 ml.
- Aggiungere 70 ml di tampone per elettroforesi (TBE 1x).
- Fare bollire (forno a microonde, placca riscaldante o becco Bunsen).
- Lasciare raffreddare il liquido (a circa 60°C).
- Mettere i guanti di protezione.
- Aggiungere 7 μl di SYBR-safe (intercalante che permette di visualizzare il DNA) e mescolare agitando l'erlenmeyer.
- Versare l'agarosio nella vaschetta preparata con un pettine per formare i pozzetti (attenzione, se l'agarosio è troppo caldo, il contenitore dell'elettroforesi si deforma!).

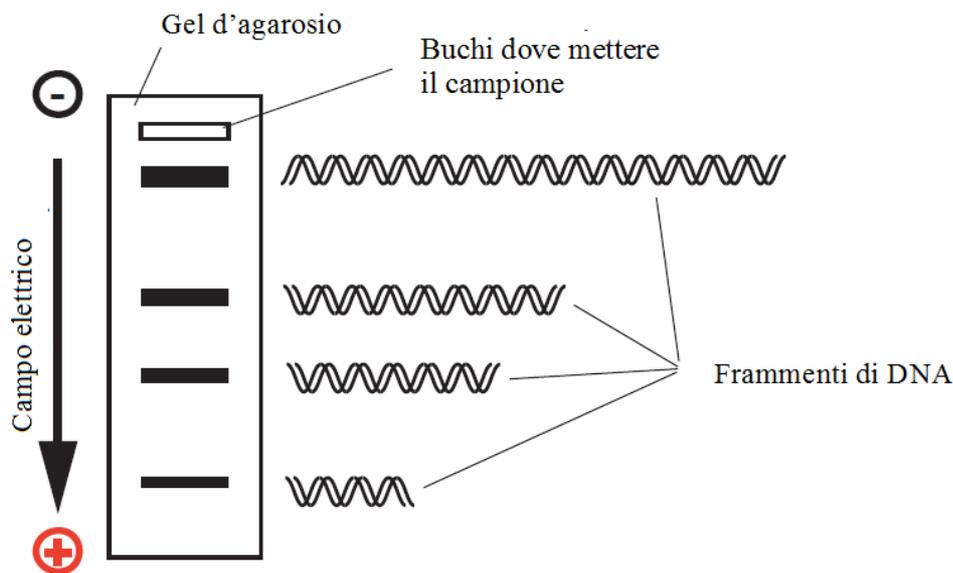
Le vaschette per l'elettroforesi possiedono dei piccoli blocchi in plexiglas per proteggere gli elettrodi. Spesso i contenitori sono deformati e i blocchi non entrano più. Basta dunque tagliare, dopo solidificazione, una piccola lamella d'agarosio in alto e in basso per liberare gli elettrodi.

- Quando il gel è freddo e solido, aggiungere un tampone d'elettroforesi (TBE 1x) nel contenitore.

- Mettere i guanti e togliere delicatamente il pettine.

3) Migrazione dei campioni sul gel d'agarosio:

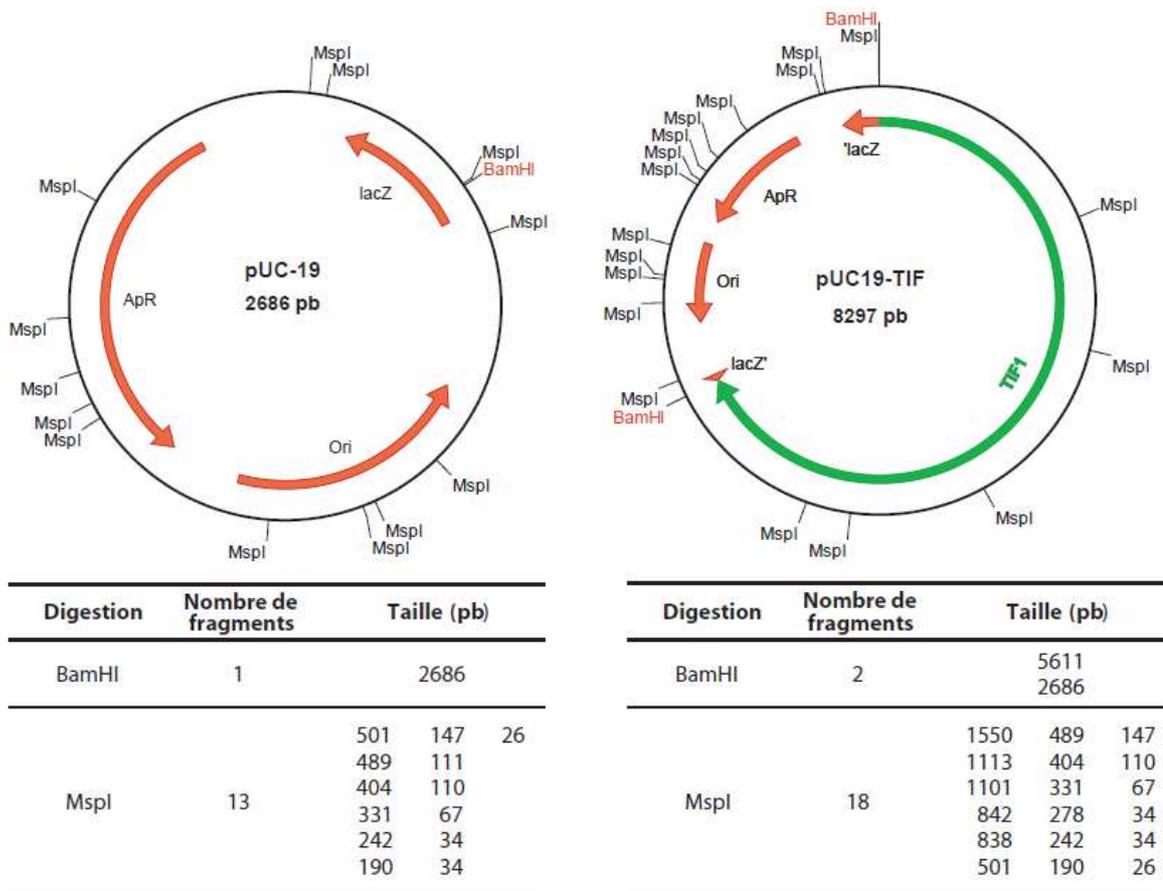
- Recuperare gli eppendorf.
- Aggiungere 2 μ l di tampone di caricamento (blu). Questa soluzione densa permette di depositare correttamente i campioni nei pozzetti. Essa contiene un colorante blu che serve a seguire la migrazione dei campioni durante l'elettroforesi.
- Caricare il gel mettendo 5 μ l di marcatore nel primo pozzetto e 17 μ l di digestione negli altri pozzetti.
- Accendere il trasformatore. Le molecole di DNA sono caricate negativamente dai gruppi fosfati. (Attenzione alla polarità: la migrazione si fa dal nero al rosso!).



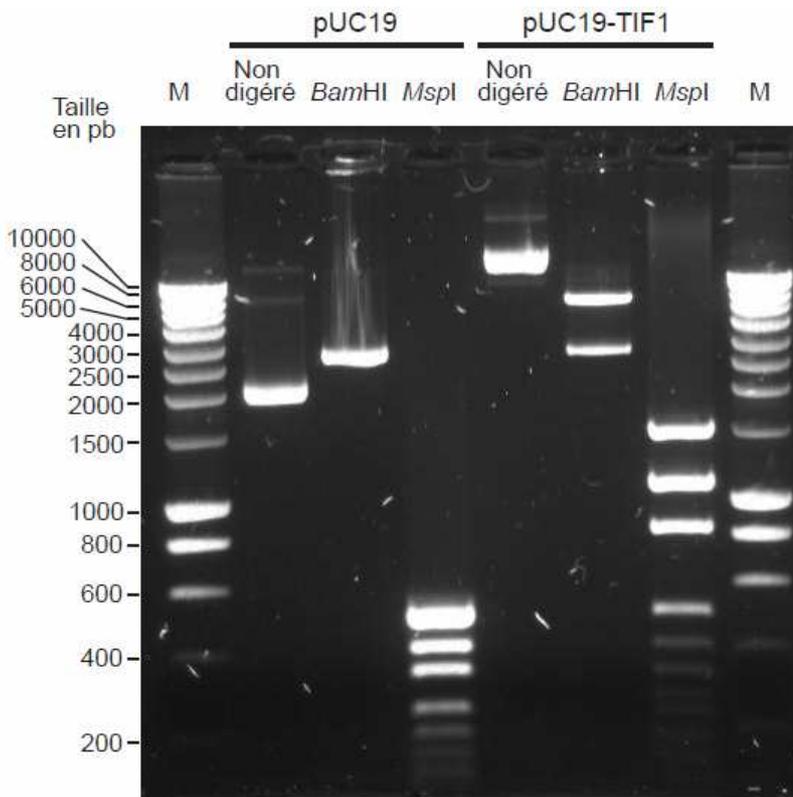
- Far migrare a 100V.
- Fermare il trasformatore quando il blu di migrazione arriva a circa 1 cm dal fondo del gel.
- Mettere i guanti e prendere il gel. Disporre sulla lampada blu e mettere sopra il filtro arancione per visualizzare i frammenti di DNA.
- Fare una foto.

4) Analisi dei risultati:

- Osservare le carte di restrizione.
- Osservare i frammenti ottenuti. Localizzarli sulla carta di restrizione. Alcuni hanno una taglia troppo simile per essere separati sul gel d'agarosio. I frammenti troppo piccoli non sono visibili sul gel a 1,5% d'agarosio.
- I plasmidi non digeriti hanno delle forme particolari che non migrano come il DNA lineare.



Carte di restrizione dei plasmidi pUC19 e pUC19-TIFI (per i siti *MspI* e *BamHI*). Il numero e la taglia dei frammenti ottenuti dopo la digestione con gli enzimi di restrizione sono indicati nella tabella. Nel plasmide pUC19-TIFI, un frammento *BamHI*, contenente il gene TIFI del lievito, è stato inserito nel sito *BamHI* del plasmide pUC19. (ApR: gene di resistenza all'antibiotico ampicillina ; Ori: origine di replicazione del plasmide ; lacZ: parte alfa del gene batterico lacZ, codante per la β -galattosidase. La funzione del gene lacZ è spiegata nell'esperienza di clonaggio). Nel plasmide pUC19-TIF, il frammento del lievito (TIF) è inserito nel gene di lacZ. È per questo motivo che il gene lacZ è separato in due parti (lacZ' e 'lacZ). Questo gene non è dunque più funzionale nel plasmide pUC19-TIFI.



Esempio di un risultato:

M: marcatore della taglia. I plasmidi pUC19 e pUC19-TIFI, digeriti o no con gli enzimi di restrizione *Bam*HI o *Msp*I sono stati separati sul gel d'agarosio. Da notare che i plasmidi digeriti hanno delle forme particolari che non migrano come il

Materiale

- Pipette automatiche (P20) e punte.
- Pipette automatiche (P200) e punte.
- Eppendorf.
- Apparecchio per l'elettroforesi.
- Blocco di riscaldamento.
- Tampone per elettroforesi (TBE 1x).
- Agarosio.
- Soluzione di SYBR-safe.
- Enzima di restrizione *Bam*HI.
- Enzima di restrizione *Msp*I.
- Tampone di restrizione 10x.
- Tampone di caricamento.
- DNA pUC19.
- DNA pUC19-TIFL.
- Marcatore della taglia.
- Acqua sterile.
- Propipette.

Stoccaggio del materiale:

Gli enzimi di restrizione sono stoccati in congelatore (-20°C). Gli eppendorf sono messi sul ghiaccio per il prelevamento durante l'esperienza e sono messi in congelatore dopo averli usati. Solo gli eppendorf di digestioni che contengono il DNA e l'enzima (o il DNA solo) sono incubati a 37°C.

Il SYBR-Safe è stoccato in frigo (4°C). Bisogna toglierlo dal frigo circa 30 minuti prima dell'utilizzazione così la soluzione sarà ben solubile.

Il marcatore, il tampone di restrizione 10x e il tampone di caricamento sono stoccati in congelatore (-20°C), decongelati e tenuti a temperatura ambiente durante l'esperienza.

Il DNA è tenuto in congelatore (-20°C), decongelato e tenuto a temperatura ambiente e rimesso a -20°C dopo l'utilizzazione.

Il resto del materiale può essere tenuto a temperatura ambiente.