

4° esercitazione: PCR - Polymerase Chain Reaction



Stabilità del DNA

Parametri intrinseci ed estrinseci che influiscono sulla stabilità



La tecnica si basa sulla possibilità di denaturare e rinaturare il DNA tramite la **temperatura**

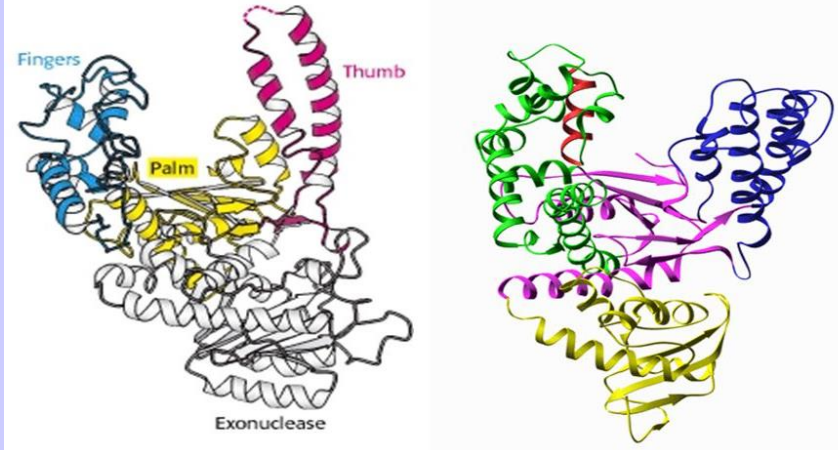
Tutto nasce dallo studio di un enzima del batterio termostabile *Thermus aquaticus*
(Kary Mullis, 1983)



TAQ polymerase!



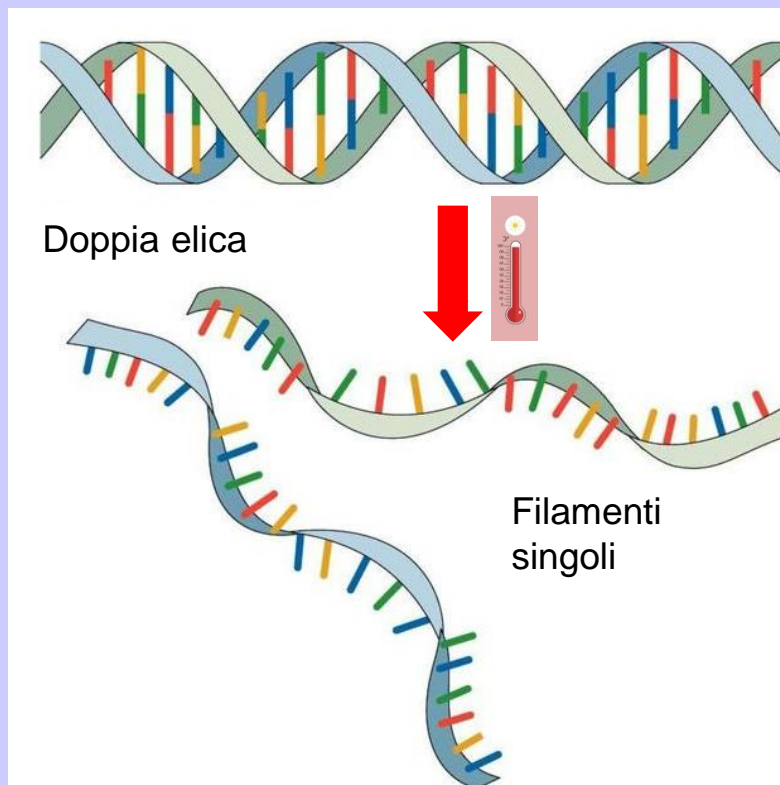
Thermus Aquaticus DNA polymerase



I vari passaggi della PCR

1. DENATURAZIONE del DNA STAMPO

Parametri intrinseci



I vari passaggi della PCR

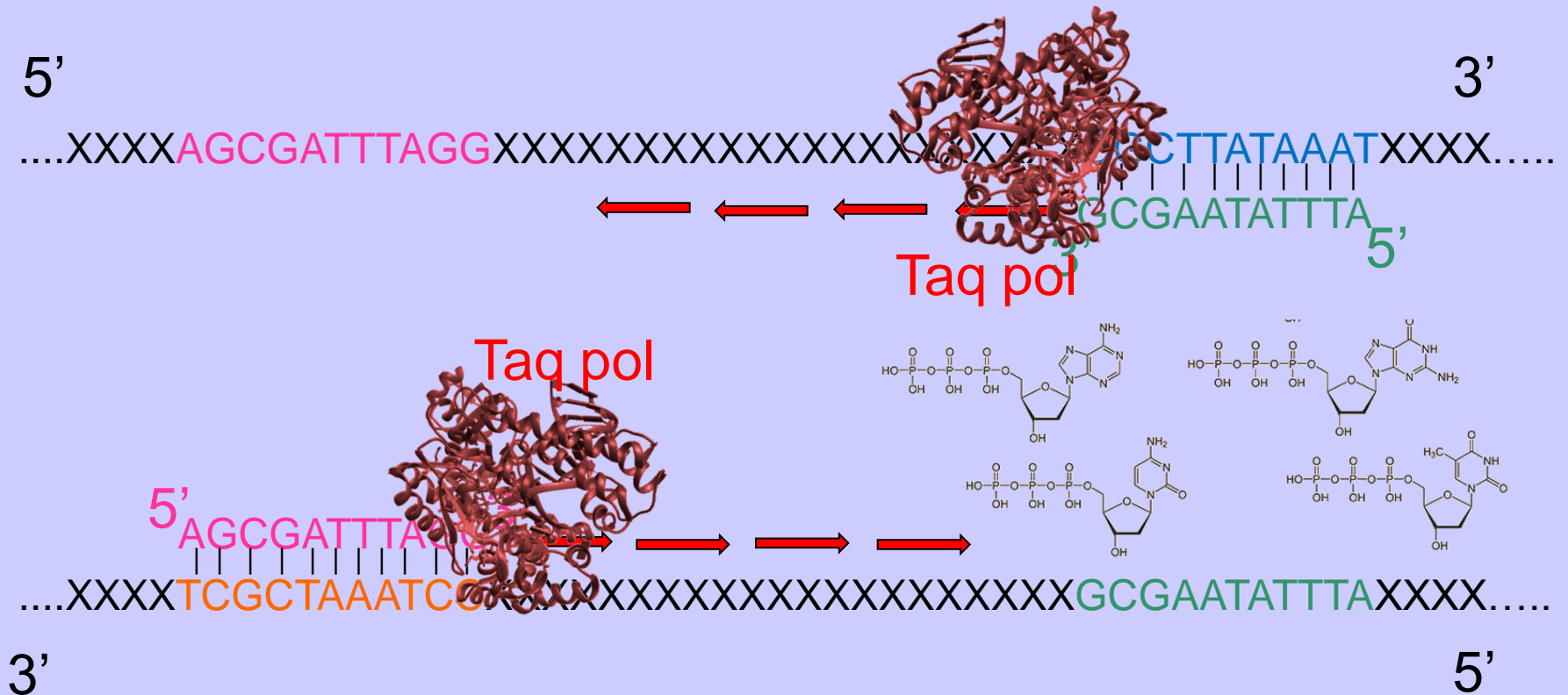
2. APPAIAMENTO dei PRIMERS (annealing)

PARAMETRI CHE
INFLUISCONO SU
QUESTO
PROCESSO



I vari passaggi della PCR

3. ALLUNGAMENTO



Le fasi della PCR

Assemblamento delle reazioni:

- buffer di reazione (Mg⁺⁺)
- Mix dei 4 deossinucleotidi trifosfato
- Taq polimerasi
- Primers 5' e 3' (FW & RE)
- Stampo DNA

MASTER MIX



denaturazione iniziale 94°C; 2'

ciclo

STEP 1: denaturazione 94°C; 1'÷3'

STEP 2: annealing 40°÷60°C; 1'÷3'

STEP 3: allungamento 72°C; 1'

allungamento finale 72°C; 3'

I cicli
vengono
ripetuti dalle
30 alle 40
volte

Il nostro esempio:

1)- 94°C; 2'

2)- 94°C; 1'

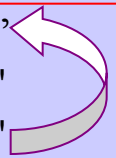
3)- 60°C; 1'

4)- 72°C; 2'

5)- 40 X

6)- 72°C; 10'

7)- 4°C ∞



L'esempio dell'amplificazione di una regione del genoma umano contenente le sequenze Alu

Si è visto che in parti non codificanti del genoma quali gli introni possono essere presenti delle sequenze a carattere ripetitivo la cui origine e funzione non è tuttora chiara

Queste sequenze sono chiamate Alu

AluI (*Arthrobacter luteus*) target site: -AG! CT-

Possono essere presenti o meno in lunghezza variabile nel genoma a seconda dell'individuo, pertanto sono molto utili per valutare il grado di relazione tra gli individui

L'esempio dell'amplificazione di una regione del genoma umano contenente le sequenze Alu

DNA genomico estratto

AGCGATTTAGG

GCGAATATTTA

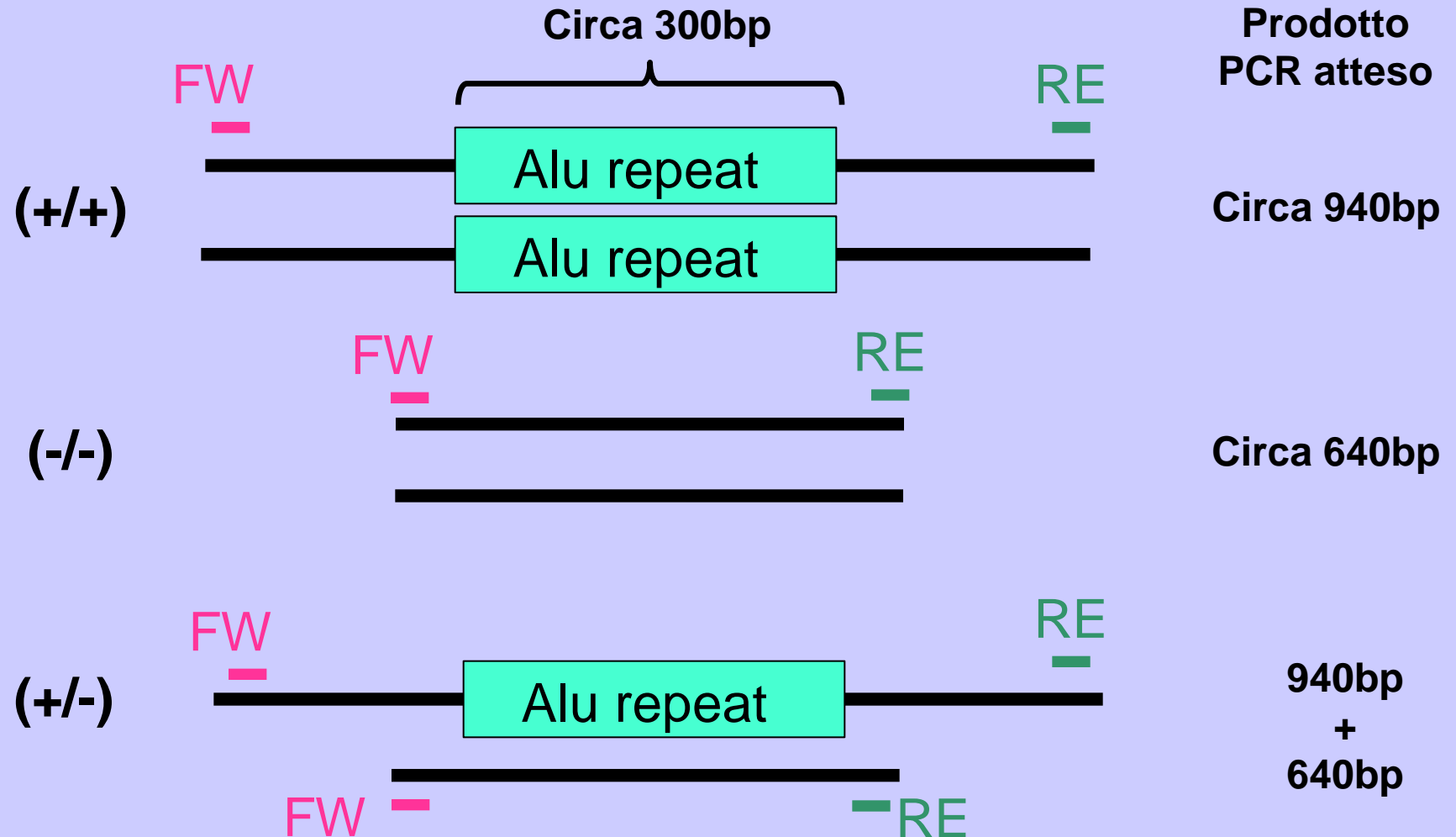


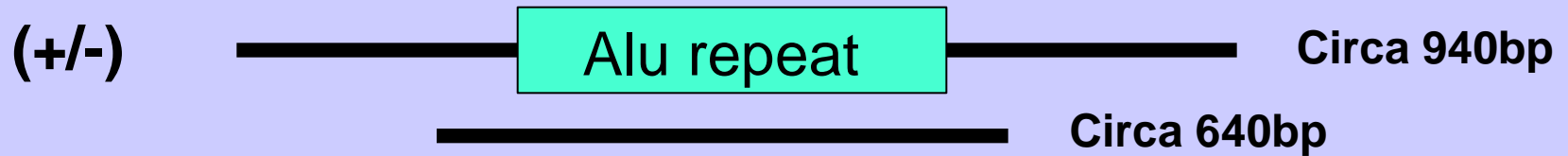
Sono state allestite 4 reazioni di controllo:

- ✓ senza DNA
- ✓ +/+
- ✓ +/-
- ✓ -/-



Nell'esperienza di laboratorio la coppia di primers addizionata alla master mix è specifica per una regione del cromosoma 16 che può contenere o meno una regione ripetitiva di circa 300bp che non è correlata né a patologie, né con la parentela tra gli individui





In questo caso, oltre ai duplex +/+ e -/- si possono formare dei duplex con forcine che daranno luogo a bande che migrano oltre le 1000bp

