

### 3.2. Di poche copie di DNA a centinaia di migliaia

Benvenuti a una nuova puntata di questo entusiasmante tema. Ricordo che abbiamo visto nell'ultimo video come estrarre il DNA dalle cellule. Una delle più comuni applicazioni del DNA è la diagnosi, utilizzando una tecnica chiamata, reazione a catena della polimerasi, Polymerase Chain Reaction o PCR.

Si tratta di una tecnica molto sensibile. Usandolo, saremmo in grado di rilevare il proverbiale "ago in un pagliaio", e, parafrasando alcuni scienziati "fanno un mucchio di fieno con un ago". Questo è perché alcune molecole di DNA, come si vedrà, sarà moltiplicato milioni di volte. È una tecnica versatile, che ha molte applicazioni diverse; e veloce, ottenendo risultati entro poche ore.

Non tutti sono vantaggi. Lo svantaggio principale è probabilmente la possibilità di contaminazione con altri DNAs, dando risultati falsi positivi.

Facciamo una PCR nel nostro laboratorio virtuale per amplificare il nostro DNA. In primo luogo, prepareremo i reagenti. Vediamo che cosa abbiamo bisogno. Ah, sì, abbiamo bisogno di un paio di sequenze di 18-25 nucleotidi di lunghezza chiamato primer o oligonucleotidi. Questi sequenzi sono specifici per il DNA che si vuole amplificare. Abbiamo bisogno di due: uno senso e un altro antisenso, e ogni ibrido con uno dei fili del DNA in regioni separate tra 200 e 1500 nucleotidi.

Cos'altro abbiamo bisogno? Ah, abbiamo bisogno di dNTPs, cioè la deossi-ribonucleotidi ATP, CTP, GTP e TTP, che compongono il DNA.

Inoltre, ah, sì, abbiamo bisogno di un enzima, la DNA polimerasi, che è chiamato Taq, provenienti da un batterio molto resistente al calore chiamato *Thermus aquaticus*. La Taq sintetizza un filamento complementare alla catena del DNA.

Infine, abbiamo bisogno di un buffer con la concentrazione appropriata di magnesio; e non dimenticare di includere controlli positivi e negativi.

Combiniamo la quantità precisa in qualche piccolo Eppendorf tubi o in piastre multipozzetto, a seconda del numero di campioni. Useremo un dispositivo chiamato termociclatore, che possiamo programmare per cambiare temperature, seguendo una serie di tre fasi, che si ripetono circa 25 - 30 volte o cicli.

La prima fase è chiamata denaturazione e consiste nel sottoporre il campione di DNA a 94° e 95°C, per separare i due filamenti di DNA.

Una volta che sono separati si procede alla fase successiva, chiamata di ibridazione, che si verifica a temperature comprese tra 50 e 65°C, a seconda della sequenza degli iniettori. In questa fase si riconoscerà i primer per le specifiche sequenze di DNA, se esiste e si ibridano con loro. Ricorda che c'è uno per il filo positivo e l'altro, l'antisenso, per il filamento negativo.

Nell'ultima fase di estensione a 72°C, la polimerasi di Taq sta per aggiungere i dNTPs poi dove hanno ibridato il primer, estendendo il filamento del DNA tutta la strada alla fine. Così, torna ad essere una DNA double-stranded. Dopo questo, si ricomincia a 94°C o 95°C per denaturare il prodotto amplificato, che, come avrai notato, è raddoppiato. La maggior parte degli enzimi è inattivata a questa temperatura, ma come la Taq è ottenuto da un batterio resistente al calore, non è danneggiato con temperatura e non ha bisogno di essere aggiunta in ogni ciclo.

Il numero di molecole di DNA viene duplicato in ogni ciclo, quindi in teoria, dopo 20 cicli ottenuto più di 1 milione di copie del frammento originale, delimitate dal primer. Hai capito ora perché gli scienziati dicono che un mucchio di fieno possa essere ottenuta da un ago? Impressionante. Ora possiamo solo bisogno di visualizzare l'amplificazione, separa il risultato mediante l'elettroforesi su un gel dell'agarosi o da altre tecniche.

Nel seguente video vedremo diverse versioni della PCR e come quantificare la quantità di presente dell'acido nucleico. La ringrazio molto per la vostra attenzione.