

TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

PCR

Reazione a catena della polimerasi

PCR

Reazione a catena della polimerasi

INDICE

IMMAGINE IN COPERTINA

Spinning DNA generic model

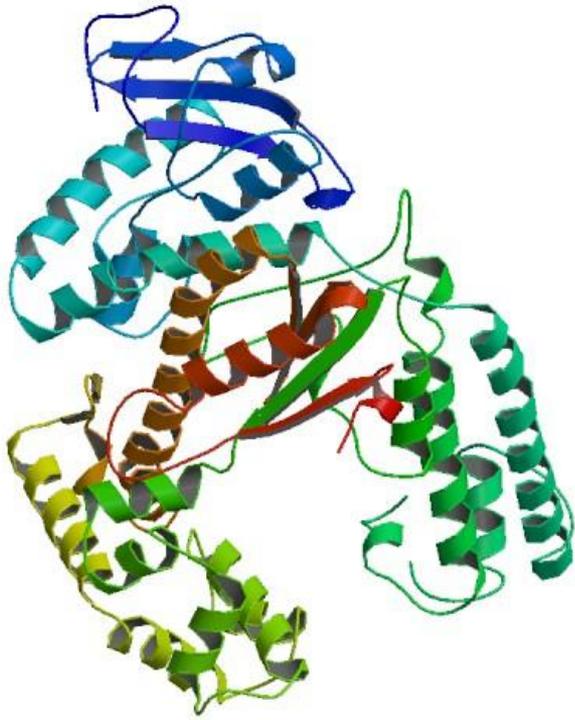
By USDA - [1], Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1724852>

[Che cosa è la PCR?](#)

[Descrizione della tecnica](#)

[Applicazione della PCR](#)



TechnologieSanitarie.it

CHE COSA È LA PCR?

CHE COSA È LA PCR?

PCR è l'acronimo di **Polymerase Chain Reaction**.

Vale a dire la reazione a catena della polimerasi.

La tecnica fu messa a punto da **Kary Mullis** (1944 - USA), scienziato statunitense che nel 1993 ottenne il premio Nobel per la chimica proprio per questo suo lavoro.



CHE COSA È LA PCR?

Vale la pena leggere la vita di questo scienziato straordinario ma anche ampiamente discusso per le sue posizioni spesso in aperto contrasto con quelle ufficiali del mondo scientifico.



CHE COSA È LA PCR?

Basti pensare al suo scetticismo sul riscaldamento globale, la diminuzione della fascia protettiva dell'ozono, la relazione tra HIV e AIDS.

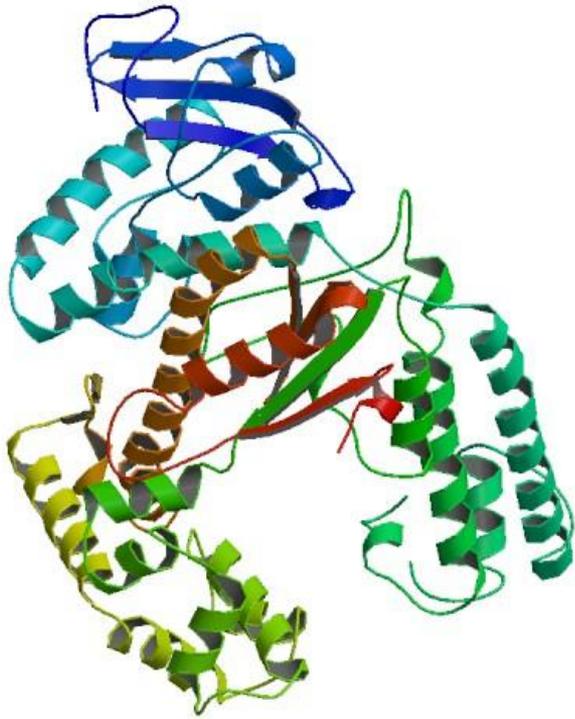
Ha inoltre ammesso che probabilmente è stato aiutato nelle ricerche sulla PCR dall'uso che faceva dell'LSD negli anni Sessanta e all'inizio degli anni Settanta.



CHE COSA È LA PCR?

La PCR è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di DNA in vitro di cui si conosce la sequenza nucleotidica iniziale e finale (**DNA bersaglio**).

Con questa tecnica si può partire con quantità infinitesimali di DNA (anche da una sola molecola) e ottenere μg di sostanza di primaria importanza per numerosi utilizzi.



tecnologieSanitarie.it

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

La PCR amplifica unicamente il DNA bersaglio.

Si inizia con un campione che contiene l'intero genoma e dopo poche ore si ottiene il prodotto voluto, purché si conosca esattamente la sequenza di basi alle estremità 3' dei due filamenti del DNA.

Avrete la risposta a molte domande che a questo punto sorgono spontanee mano a mano che ci addentreremo nell'argomento.

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

Cosa ci occorre per realizzarla? Abbiamo bisogno di:

- il DNA da amplificare
- i primers o inneschi (vale a dire oligonucleotidi costituiti da un minimo di 16 ad un massimo di 30 paia di basi che servono a far iniziare la sintesi di DNA in vitro)
- i nucleotidi necessari per le nuove molecole da formare
- una DNA polimerasi termostabile

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

La tecnica comprende tre fasi ed è in se stessa abbastanza semplice.

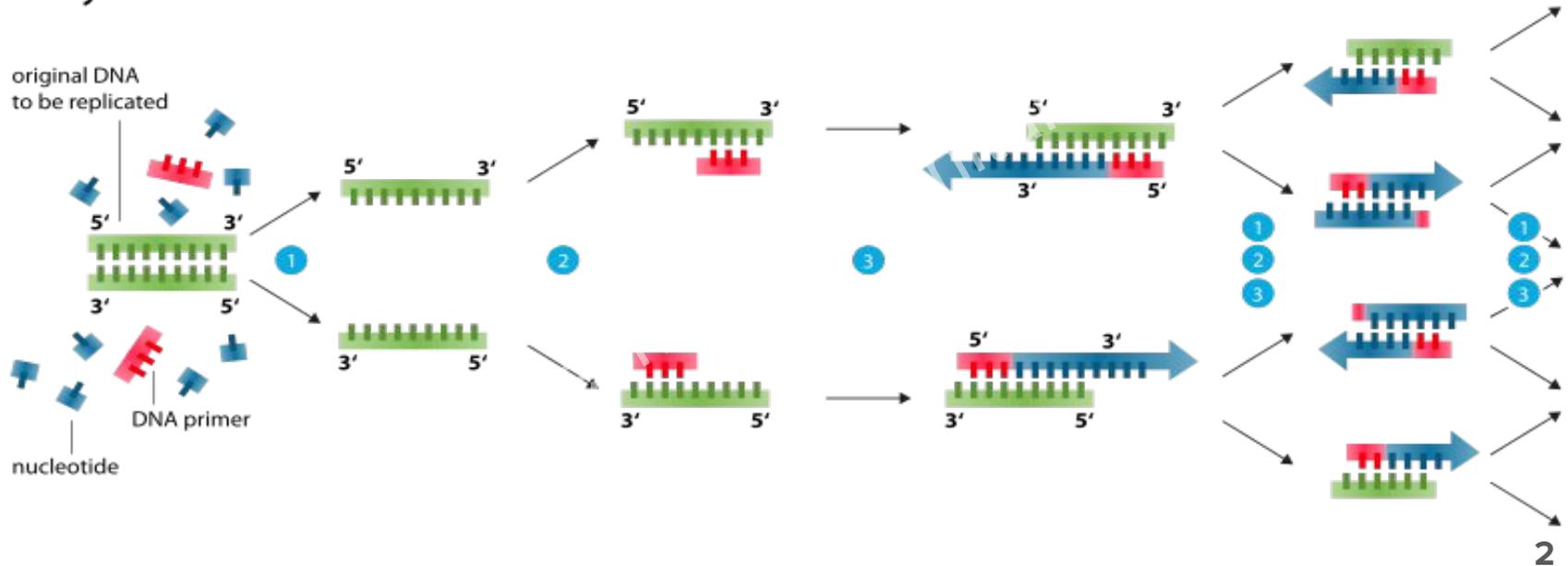
1. denaturazione (denaturation)
2. ibridazione (annealing)
3. estensione (elongation)

Può essere ripetuta per un massimo di 30-40 volte.

Partiamo con un'immagine riassuntiva nella slide successiva.

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

Polymerase chain reaction - PCR



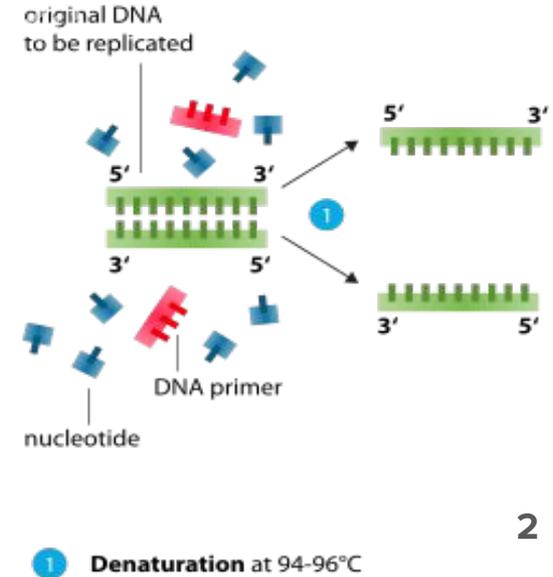
- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

Lo schema precedente è in inglese ma è molto chiaro.

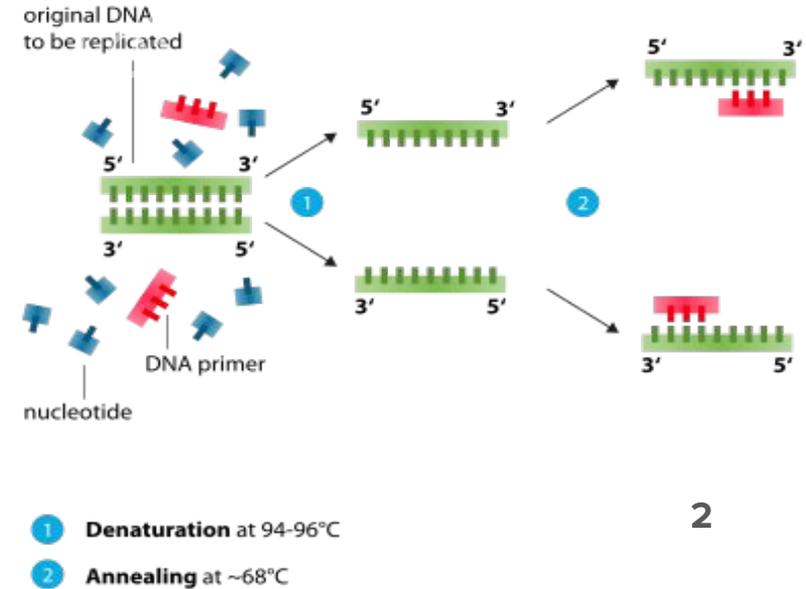
La fase 1. di denaturazione (denaturation) avviene a 94°C.

La temperatura è elevata perché i due filamenti del DNA bersaglio devono essere separati.



DESCRIZIONE DELLA TECNICA

Nella fase 2. di ibridazione (annealing) si agisce prima abbassando la temperatura. Il raffreddamento consente ai primer di appaiarsi in modo complementare alle estremità opposte (3') dei due filamenti.

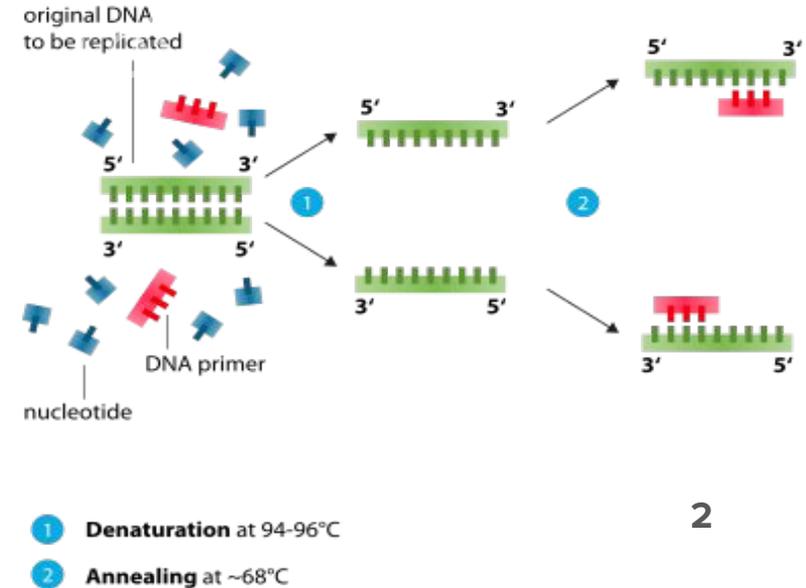


2

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

A questo punto vale la pena evidenziare la potenzialità della PCR. I primer utilizzati vengono sintetizzati in laboratorio.

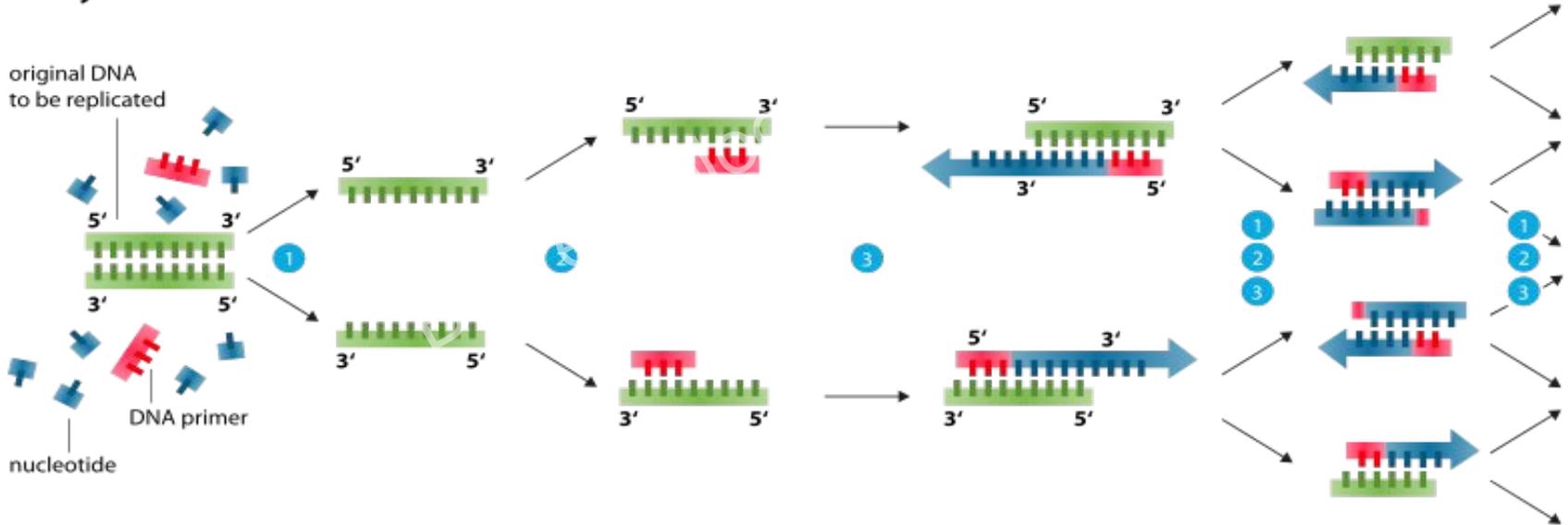
Se anche all'inizio viene usato l'intero genoma di un individuo, ci può essere una sola regione del DNA capace di legarsi ad entrambi questi primer.



DESCRIZIONE DELLA TECNICA

La fase 3, **estensione**, avviene ad una temperatura di 72°C.

Polymerase chain reaction - PCR



DESCRIZIONE DELLA TECNICA

L'allungamento della sequenza del DNA bersaglio avviene ad opera di una polimerasi. L'enzima deve essere termostabile. Per questo si ricorre alla **Taq polimerasi** ottenuta dal batterio Thermus aquaticus. I 72°C rappresentano la temperatura ottimale di azione di questo enzima.



Thermus aquaticus

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

L'allungamento del DNA cioè la sua polimerizzazione avviene secondo la direzione $5' \rightarrow 3'$. Ovviamente devono essere presenti, in numero adeguato, i nucleotidi necessari (dNTPs) per “costruire” i segmenti di DNA.



Provette per PCR, contenenti ognuna 100 μ l di miscela di reazione

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

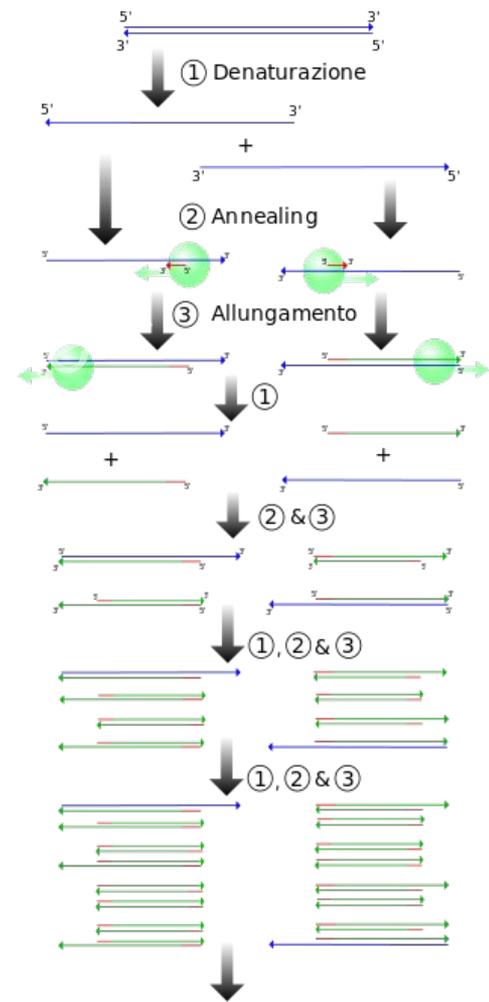
Una volta completato il ciclo si sottopone il tutto ad una nuova sequenza di denaturazione, ibridazione e allungamento e la si può ripetere per 30 - 40 volte.



Termociclatore
Strumento per il ciclo della PCR

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

Ogni ciclo dovrebbe raddoppiare il DNA iniziale e quindi la crescita dei segmenti di acido nucleico dovrebbe avvenire in modo esponenziale. Non sempre però la crescita si realizza con queste modalità ma tutto ciò non mette in discussione l'efficienza della PCR.



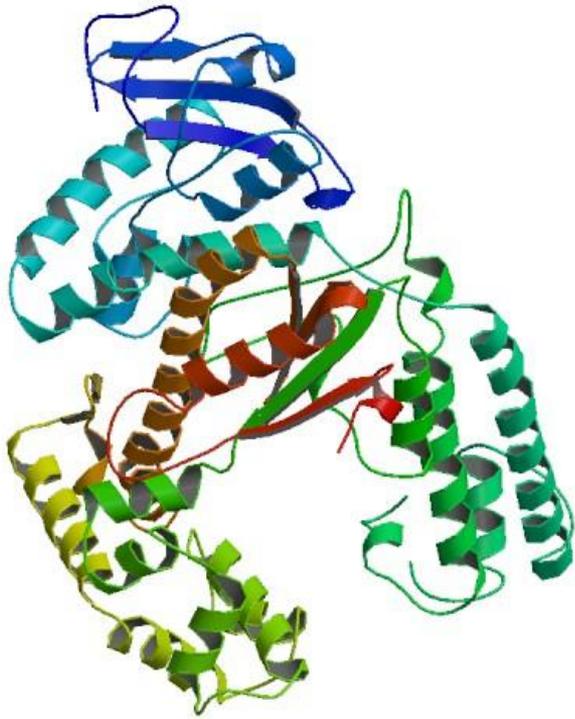
Crescita esponenziale dei segmenti prodotti

DESCRIZIONE DELLA TECNICA

Per completare la spiegazione occorre ricordare che in soluzione devono essere aggiunti anche un tampone per mantenere stabile il pH e ioni magnesio in opportuna quantità per ottimizzare l'attività della Taq polimerasi.



Altro modello di termociclatore



tecnologieSanitarie.it

APPLICAZIONI DELLA PCR

APPLICAZIONI DELLA PCR

Prima di valutare tutti i campi di applicazione della PCR è bene ricordare che si tratta di un metodo molto efficace, versatile, rapido e sensibile.

Nel giro di poco tempo ha sostituito nei laboratori di ricerca e diagnosi le tecniche tradizionali.



Termociclatore

APPLICAZIONI DELLA PCR

Isolamento di frammenti di DNA

Innanzitutto la PCR consente di lavorare con scarso materiale di partenza e questo vale per moltissime applicazioni, non solo per quanto stiamo esaminando in questa slide. Alcune analisi sul DNA non possono essere portate avanti senza averne una quantità sufficiente.

Basti pensare alla generazione di sonde di ibridazione per il Southern o il Northern blotting.

APPLICAZIONI DELLA PCR

Nell'isolamento di frammenti di DNA, la PCR può essere utilizzata:

- nel sequenziamento del DNA
- per isolare un gene di interesse e accelerare la tecnica del DNA ricombinante
- nel fingerprinting genetico

APPLICAZIONI DELLA PCR

Amplificazione e quantificazione del DNA

Ricordiamo qua l'uso in medicina legale quando i reperti sono in tracce ed è necessaria un'analisi del DNA sicura per l'accertamento delle responsabilità in un crimine o l'accertamento della paternità.

Le tecniche possono essere applicate anche a reperti con DNA molto vecchi (analisi di mummie, identificazione dei resti del re inglese Riccardo III, di uno tsar russo ... o di mammut)

APPLICAZIONI DELLA PCR

Applicazioni mediche

Bisogna prima di tutto ricordare i test genetici, in cui un campione di DNA viene analizzato per verificare eventuali malattie genetiche.

Questo può essere fatto sui futuri genitori per vedere se sono portatori sani. Oppure sui loro figli anche con test prenatali; in questo caso i campioni si ottengono mediante amniocentesi o villocentesi.

APPLICAZIONI DELLA PCR

La PCR può anche essere utilizzata come parte importante di un test per la tipizzazione tissutale, vitale nel trapianto di organi.

Molte forme di cancro implicano modifiche agli oncogeni. Utilizzando i test basati sulla PCR, la terapia a volte può essere personalizzata per il singolo paziente.

La PCR permette la diagnosi precoce di malattie maligne come la leucemia e linfomi.

APPLICAZIONI DELLA PCR

Applicazioni nelle malattie infettive

La PCR si è rivelata molto utile nella diagnosi di malattie anche da batteri e virus rispetto ai tradizionali metodi di laboratorio.

Prima di tutto perché permette l'identificazione di batteri anaerobi o a lenta crescita (producendo risultati in tempi più ristretti e quindi più utili per la scelta della giusta terapia). Inoltre consente l'identificazione di virus in colture cellulari.

APPLICAZIONI DELLA PCR

Tra i campi applicativi c'è da mettere in evidenza la diagnosi dell'infezione da HIV. Si sa che gli anticorpi contro il virus non sono presenti nelle prime settimane e gli anticorpi materni mascherano l'infezione nel neonato. Il test con la PCR è talmente sensibile da identificare un genoma virale tra 50.000 cellule ospiti. Pertanto la diagnosi può essere fatta più precocemente in tutti i casi, il sangue da donazione può essere testato velocemente e in modo più sicuro e soprattutto possono essere quantificati i trattamenti antivirali.

APPLICAZIONI DELLA PCR

Altra malattia in cui la PCR si è dimostrata molto utile è la tubercolosi.

Il microrganismo responsabile (*Mycobacterium tuberculosis*) non è sempre facilmente isolabile dai campioni e cresce lentamente. Questa metodica consente di rilevare l'agente eziologico sia vivo che morto e in tempi rapidi. Affiancando gli opportuni test per la resistenza agli antibiotici si possono prendere le decisioni terapeutiche più opportune per i singoli pazienti.

APPLICAZIONI DELLA PCR

Con la PCR si può monitorare la diffusione di malattie infettive tra gli animali domestici e selvatici e seguire la comparsa di nuove sub-specie virulente.

Applicazioni nel campo della ricerca

Nel campo della ricerca l'uso della PCR è veramente infinito e ha consentito e consente rapidi sviluppi in molti settori. Dal Progetto Genoma Umano fino alle ricerche filogenetiche e al clonaggio del DNA.

PHOTO CREDITS

IMMAGINE NELLE INTESAZIONI DI SEZIONE

Taq polimerasi <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

- 1** Di Dona Mapston - Cropped from Flickr image, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5533280>
- 2** By Enzoklop - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Commons -
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg#/media/File:Polymerase_chain_reaction.svg
- 3** Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=437283>
- 4** By Madprime - Own work. Licensed under CC0 via Commons -
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_tubes.png#/media/File:PCR_tubes.png
- 5** By Karl Mumm - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Commons -
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_masina_kasutamine.jpg#/media/File:PCR_masina_kasutamine.jpg
- 6** Di Nessun autore leggibile automaticamente. Alfredo presunto (secondo quanto affermano i diritti d'autore). - Nessuna fonte leggibile automaticamente. Presunta opera propria (secondo quanto affermano i diritti d'autore)., CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1970459>
- 7** Di Magnus Manske (talk) - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=233111>
- 8** "G-Storm thermal cycler" by Rror - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Commons -
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:G-Storm_thermal_cycler.jpg#/media/File:G-Storm_thermal_cycler.jpg