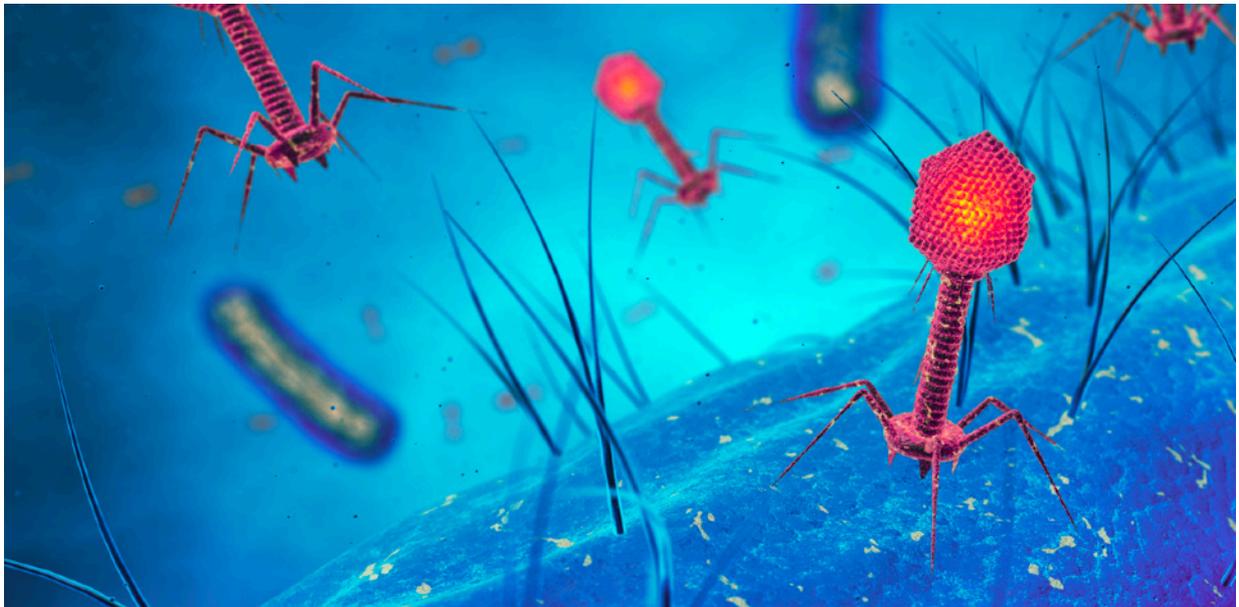




PCR 101 : Amplificazione dal Genoma del fago lambda
Guida per lo studente

Cat# M6001 & M6002

Version 081321-IT



Indice

Sicurezza in laboratorio	2
Domande per la discussione di gruppo	3
Introduzione alla PCR e al genoma a fago lambda	4-8
Domande pre-Lab	9-11
Procedure sperimentali	12-13
Analisi dei dati	14
Domande e analisi post-Lab	15
Appendice A - Risorse consigliate	16
Appendice B - Glossario PCR	17
Appendice C - Background sull'elettroforesi su gel	19

Ce Una copia cartacea del foglio di lavoro dello studente è inclusa in questo MiniLab. La versione digitale a colori del foglio di lavoro per gli studenti è disponibile all'indirizzo www.theminione.eu

Questo MiniLab contiene abbastanza materiale per far eseguire esperimenti a **10 gruppi** di studenti

Sicurezza in laboratorio

1. Prestare attenzione quando si riscaldano o si fondono i reagenti.
2. Prestare attenzione quando si lavora con apparecchiature elettriche.
3. Guanti e protezione per gli occhi devono essere usati ogni volta come una buona pratica di laboratorio.
4. Lavarsi sempre accuratamente le mani dopo aver maneggiato materiali biologici o reagenti.
5. Seguire tutte le precauzioni di sicurezza descritte nella scheda di sicurezza per i reagenti.
6. Gli elementi del termociclatore PCR, compresa la piastra di PCR e il coperchio riscaldato, possono essere estremamente caldi. Prestare attenzione quando si aggiungono o si tolgono le provette dalla macchina.

Obbiettivi

In questo pratico MiniLab gli studenti esplorano le basi della Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) utilizzando il genoma del batteriofago Lambda, un classico sistema modello per la genetica molecolare. Gli studenti useranno la PCR per amplificare tre segmenti del genoma del Fago Lambda utilizzando tre diversi set di primer e utilizzeranno le sequenze del genoma fornite e le sequenze di primer per prevedere la dimensione dei frammenti. Gli studenti testeranno le loro previsioni eseguendo i prodotti delle reazioni di PCR su un gel di Agarosio.

Introduzione alla PCR e al Genoma del Fago Lambda

Questo laboratorio vi introdurrà a uno dei concetti più potenti della biologia molecolare moderna, una rivoluzione che negli ultimi 30 anni ha trasformato la diagnostica medica, la medicina legale, la scienza ambientale e altre discipline della vita. Con la padronanza della Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) avrete le chiavi per sviluppare i vostri esperimenti di biologia molecolare e il background necessario per comprendere nuove tecnologie sempre più complesse.

La tecnologia PCR affronta due grandi sfide della biologia molecolare: come amplificare il DNA e come mirare a sequenze specifiche per l'amplificazione. In primo luogo, il DNA che gli scienziati vogliono analizzare è spesso raccolto in quantità estremamente basse (per esempio, una singola goccia di sangue da una scena del crimine). Per avere quantità di DNA utilizzabili dobbiamo fare molte copie usando il DNA originale come modello. In secondo luogo, tra l'intero genoma dobbiamo trovare solo la parte che vogliamo analizzare, sia che si tratti di un gene che causa una malattia o di una sequenza che può aiutare a identificare una specie. Non è una cosa da poco, visto che il genoma umano è lungo più di 3 miliardi di coppie di basi (bp) e spesso siamo interessati a regioni di lunghezza inferiore a 300 bp

Fermati e pensa

Come possiamo trovare una regione specifica del genoma tra tre miliardi di coppie di basi? Per avere un po' d'ispirazione, guardate il vostro modello di replicazione del DNA

La storia della PCR

Come per molte idee nel campo delle biotecnologie, la natura ci fornisce la maggior parte degli strumenti di cui abbiamo bisogno. Ogni volta che una cellula si divide fa due repliche dell'intero genoma con l'aiuto di enzimi specializzati. Il fenomeno dell'accoppiamento di base complementare dovrebbe darvi un indizio su come si può mirare a una regione specifica. Alla fine degli anni '70, Frederick Sanger ha sviluppato un metodo per copiare il DNA in vitro utilizzando brevi pezzi di DNA chiamati primer per avviare la replicazione ad opera di una DNA Polimerasi, simile ai primer ad RNA nel vostro modello di replicazione del DNA cellulare. Un primer artificiale usato nel metodo Sanger ha una sequenza che gli permette di legarsi in un solo punto della sequenza di DNA target.

Fermati e pensa

Pensi che sia possibile che un primer si leghi a più di un punto del genoma? È più probabile per i primer lunghi o per i primer corti?

Utilizzando un solo DNA primer, il metodo Sanger può produrre una sola copia del bersaglio alla volta. Nel 1983 Kary Mullis ha proposto una modifica a questo metodo in cui un secondo primer viene utilizzato per avviare la replicazione utilizzando la prima copia come modello. Ricordiamo che il DNA ha una struttura antiparallela in cui un filamento scorre in direzione opposta rispetto al secondo filamento. Per utilizzare la prima copia come target per la replicazione, il secondo primer aggiunto da Mullis doveva avviare la replicazione nella direzione opposta, quindi un primer è chiamato il primer **in avanti** e l'altro è chiamato l'**inverso**. Con la sequenza originale e la sua copia che servono come modelli, vengono prodotte due copie invece di una. Inoltre, queste due copie possono essere utilizzate come modelli in un secondo ciclo di copiatura, che produce quattro copie. Dopo ogni fase, o ciclo, il numero di copie è raddoppiato.

In più cicli, vengono generate miliardi di copie della sequenza di DNA tra i due primer. Questo metodo è chiamato **Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)** – “Polimerasi” per via dell'enzima che viene utilizzato per copiare il DNA e “Reazione a Catena” perché i prodotti di un ciclo servono come modelli per il successivo ciclo di copiatura. Questa tecnologia rapida ed efficiente per la generazione di quantità utilizzabili di DNA ha fatto vincere a Mullis il premio Nobel per la chimica. La prima applicazione della PCR fu un test per l'anemia falciforme.

Fermati e pensa

A partire da una singola copia, quante copie vengono prodotte dopo due cicli di PCR? Tre? Scrivete il numero di copie prodotte nei primi dieci cicli. Vi viene in mente una funzione matematica che descriva l'aumento del numero di copie con il numero di cicli? Perché la PCR viene spesso chiamata amplificazione del DNA?

Come funziona la PCR

Invece di cercare di ricreare l'intricato macchinario biochimico della cellula in una provetta, gli scienziati si affidano al calore per controllare le varie fasi della reazione PCR. Affinché il DNA possa essere copiato, le basi nucleotidiche devono essere esposte, il che significa che il DNA a doppio filamento deve essere separato in singoli filamenti. Ricordiamo che il calore applicato ad un cubetto di ghiaccio indebolisce i legami a idrogeno tra le molecole di acqua e provoca una transizione di fase verso l'acqua liquida. Allo stesso modo, il calore applicato al DNA a doppio filamento indebolisce i legami a idrogeno tra le basi causando la separazione dei filamenti in DNA a singolo filamento. Come per il ghiaccio, questo è a volte chiamato scioglimento, ma è comunemente chiamato denaturazione. In un ciclo di PCR la **denaturazione** viene eseguita a 90-98°C per 5-30 secondi. Questa temperatura è appena sotto il punto di ebollizione dell'acqua.

Una volta che il DNA modello è stato separato in singoli filamenti, la temperatura viene abbassata per incoraggiare i primer a legarsi alle loro sequenze target. Proprio come nell'analogia con l'acqua, una temperatura più bassa favorisce la formazione di legami a idrogeno tra le molecole, in questo caso tra il primer e il DNA modello. Questo passaggio, chiamato **ricottura**, si verifica

tipicamente tra 45 e 65°C per 5-30 secondi. La temperatura e la durata ideale della fase di ricottura dipendono dalle sequenze dei primer utilizzati. Deve essere abbastanza bassa tale da permettere la formazione di legami a idrogeno siano tra il primer e la sequenza complementare specifica, ma non così basso da portare alla formazione di un legame non specifico, o casuale, tra primer e modello.

Fermati e pensa

I primer lunghi o i primer corti richiedono una temperatura di ricottura più bassa per legarsi alle loro sequenze complementari?

Proprio come nel vostro modello di replicazione del DNA cellulare, la DNA Polimerasi utilizzata nella PCR si lega al complesso primer-templato e comincia ad aggiungere nucleotidi (dNTPs) all'estremità 3' del primer. Questo passaggio, chiamato **estensione**, si traduce in una nuova copia legata al modello come DNA a doppio filamento. La durata della fase di estensione dipende dalla lunghezza del segmento di DNA che viene copiato e può durare dai 5 secondi ai 5 minuti.

A questo punto potreste aver notato un problema - la DNA Polimerasi, su cui si basa l'intero processo di PCR, è un enzima proteico che ha bisogno di una struttura tridimensionale molto specifica per copiare il DNA.

Chiunque abbia rotto un uovo in una padella saprà cosa fa il calore elevato alle proteine!

Nei primi giorni della PCR, la Polimerasi fresca veniva aggiunta alla provetta di reazione ad ogni ciclo per sostituire la Polimerasi che era stata distrutta dalla fase di denaturazione. Dover aprire la provetta e aggiungere nuovo enzima fino a 30 cicli era costoso, inefficiente e aumentava le possibilità di contaminare la reazione. L'innovazione che avrebbe eliminato questi ostacoli proveniva da una fonte insolita - il Parco Nazionale di Yellowstone.

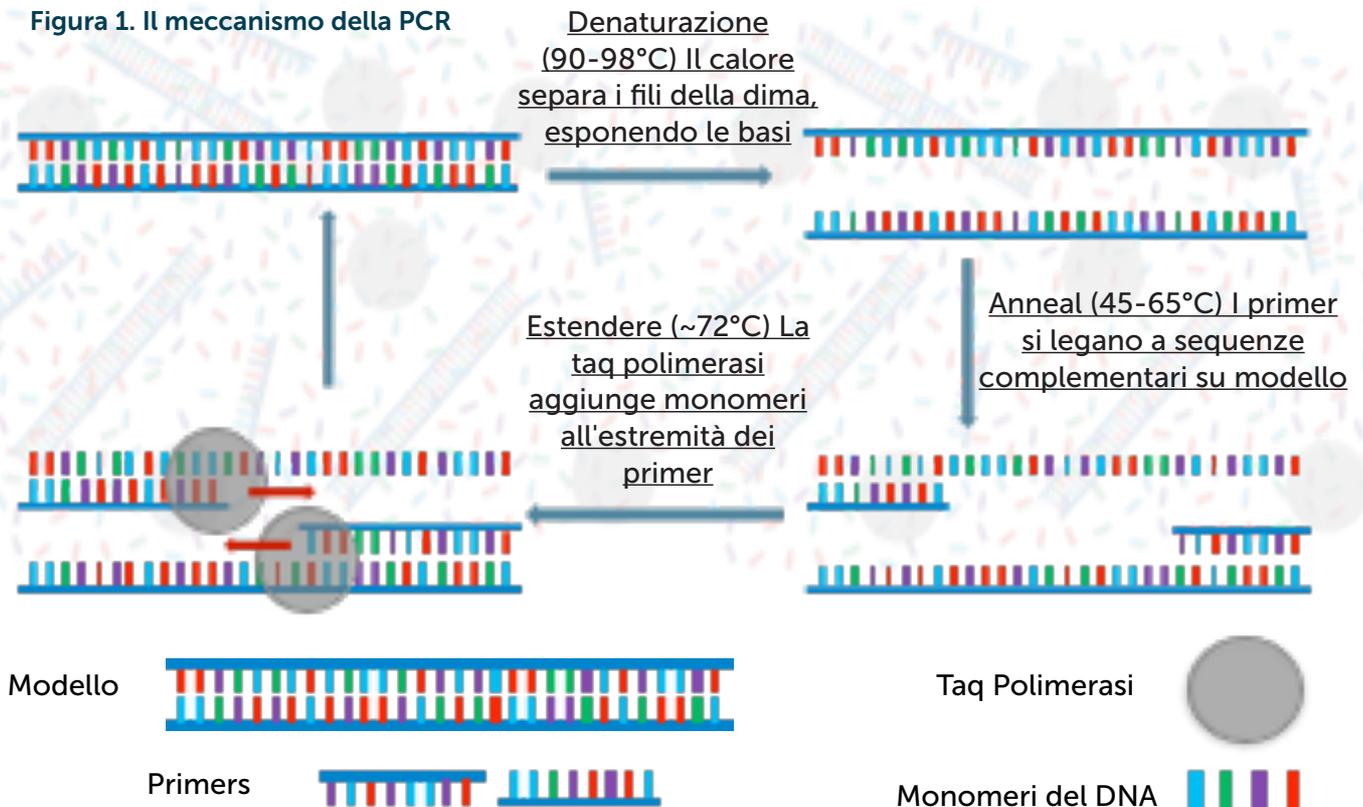
Negli anni '70 gli scienziati avevano isolato una specie di batterio chiamato *Thermus aquaticus* da una sorgente calda a Yellowstone. Il *T. aquaticus* prospera a 75-80°C e può sopravvivere a temperature molto più elevate. I suoi enzimi sono altrettanto tolleranti al calore. L'E. coli, la fonte originale della Polimerasi utilizzata nella PCR, prospera a 37,5°C, la stessa temperatura dell'intestino dei mammiferi. Poiché la biochimica del DNA è simile in tutto l'albero della vita, la Polimerasi del *T. aquaticus* (chiamata Taq Polimerasi) può sostituire la Polimerasi dell'E. coli nella PCR, con la modifica che la fase di estensione viene eseguita a 70-75°C.

Questa innovazione ha fatto sì che la PCR diventasse uno strumento onnipresente, economico ed efficiente. Le reazioni possono essere impostate una sola volta, sigillate all'interno di un tubo e inserite in un termociclatore automatico. Il termociclatore (o macchina per PCR) è uno strumento specializzato che modifica accuratamente e rapidamente la temperatura della provetta tra la denaturazione, la ricottura e l'estensione. Dopo 20-40 cicli di queste tre temperature, si possono produrre trilioni di copie del prodotto di DNA desiderato. Il DNA amplificato può essere analizzato con elettroforesi su gel alla fine dell'esperimento, o rilevato, mentre si sta formando, utilizzando attrezzature più avanzate.

Fermati e pensa

La PCR può utilizzare gli stessi nucleotidi utilizzati dalla cellula?

Figura 1. Il meccanismo della PCR



Sommario - Diventare un Pro PCR

Progettare una reazione PCR efficiente e specifica è un'abilità che i ricercatori sviluppano con l'esperienza. Anche le temperature e la durata di ogni fase del protocollo di PCR devono essere scelte con attenzione. Alcuni step sono standard per tutte le reazioni mentre altre devono essere ottimizzate per ogni reazione.

Diversi fattori contribuiscono al successo o al fallimento di una reazione di PCR. I primer devono essere attentamente progettati in modo da essere specifici per la sequenza target. Se esistono sequenze complementari ai primer in altre parti del genoma si può finire con prodotti multipli, o con nessun prodotto. La temperatura di ricottura deve essere accuratamente selezionata per favorire il legame specifico del primer al target. pH e concentrazione di Mg^{2+} devono essere attentamente controllati per la massima attività della DNA Polimerasi. Infine, anche piccole concentrazioni di contaminanti possono interferire con la PCR, causando il completo fallimento della reazione.

In questo laboratorio esamineremo come diversi primer vengono utilizzati per amplificare diversi segmenti di un singolo genoma. Vi verranno forniti tre diversi set di primer che mirano a diverse sequenze del Genoma del Fago Lambda. Dalle sequenze di primer e dalla sequenza del Genoma del Fago si possono prevedere le dimensioni dei segmenti che saranno amplificati. Verificherete la vostra previsione eseguendo la PCR con i diversi set di primer e analizzerete i risultati con l'elettroforesi su gel di agarosio.

Prendetevi un momento per ripensare all'introduzione e usate la vostra nuova comprensione della PCR per riempire i dettagli mancanti delle due tabelle riassuntive:

Tabella 1. Reagenti richiesti per la PCR	
1	Taq Polimerasi
2	Modello Del DNA
3	Avanti primer
4	Primer invertito
5	Nucleotidi (o dNTP)
6	Mg ²⁺ (necessario per la funzione della Polimerasi)
7	Tampone (per mantenere un pH costante)

Tabella 2. Protocollo per Cicli PCR - Valori tipici			
# Cicli	Nom del passo	Temperatura	Tempo
20-40	Denaturazione	94-98°C	5 à 30 sec.
	Ricottura	45-65°C	5 à 30 sec.
	Estensione	70-75°C	5 sec - 5 min

Il Fago Lambda

Il **batteriofago** lambda, o **fago lambda**, è un virus che infetta *Escherichia coli* (*E. coli*), una specie di batterio comune nell'intestino dei mammiferi. Il fago si attacca all'esterno della cellula batterica e inietta il suo genoma nel citoplasma. Il fago può quindi entrare nel ciclo litico o lisogeno. Nel ciclo litico il genoma viene replicato all'interno della cellula ospite e i geni vengono espressi. I prodotti genici si assemblano poi in particelle di fago che vengono rilasciate quando la cellula ospite si lisa. Nel ciclo lisogeno il genoma fago si ricombina con il genoma ospite integrandosi nel cromosoma batterico. In questa fase, viene chiamato **profago** e viene replicato ogni volta che il genoma ospite si replica. In determinate condizioni ambientali il profago viene tagliato fuori dal genoma ospite e può entrare nel ciclo litico.

Dalla sua scoperta nel 1950 il fago lambda è stato intensamente studiato come modello per la genetica molecolare di base e per le sue applicazioni nella biotecnologia. Gli esperimenti con il fago hanno portato a importanti scoperte in campi come il ripiegamento delle proteine, la regolazione genetica e la biochimica degli enzimi. La capacità del fago di iniettare il suo DNA nelle cellule batteriche e di ricombinarsi con il genoma dell'ospite lo ha reso un prezioso strumento per la modifica dei genomi dei batteri.

Il genoma del fago lambda è di 48.502 bp di DNA lineare a doppio filamento, che codifica oltre mille proteine. La relativa semplicità e accessibilità di questo genoma lo rendono un eccellente strumento per esplorare le tecniche biochimiche di base, compresa la PCR.

Domande ed Esercizi pre-Lab

1. Usando quello che avete appena appreso sulla PCR, modificate il vostro diagramma di replicazione del DNA nella cellula per mostrare il meccanismo di replicazione del DNA durante una reazione di PCR.
2. La PCR si rivolge ad una regione specifica del genoma per la copiatura. Quale reagente nella reazione di PCR la rende specifica per una regione piuttosto che per un'altra? Come si ottiene questa specificità?
3. Al termine dei cicli di PCR, si corrono i prodotti su un gel per determinare la dimensione del frammento copiato. A parte la banda corrispondente a questo frammento, quali altre bande si possono vedere sul gel?
4. A volte, dopo aver eseguito una reazione di PCR, non si vedono bande sul gel. Indicare tre motivi per cui questo potrebbe accadere.

5. Cosa vi aspettereste che succeda se i primer fossero lasciati fuori dalla vostra reazione di PCR?

6. Perché organismi semplici come il Fago Lambda e il suo ospite sono utili in biologia molecolare?

7. Nella pagina successiva troverete una sequenza di DNA corrispondente ad una regione del Genoma del Fago Lambda e le sequenze delle tre coppie di primer che useremo. Utilizzando queste informazioni e la vostra conoscenza della PCR, registrate le dimensioni dei frammenti che saranno amplificati con ogni coppia di primer nella Tabella 3.

8. La velocità di copiatura della Polimerasi FastTaq che utilizzerete in questo laboratorio è di 100 bp/sec. Utilizzando le lunghezze dei frammenti che avete determinato nella domanda 7, calcolate il tempo minimo di estensione richiesto per ogni ciclo. (Suggerimento: eseguite questo calcolo per il frammento più lungo che avete trovato nella domanda 7).

Genoma del Fago Lambda - Parziale (535 bp)

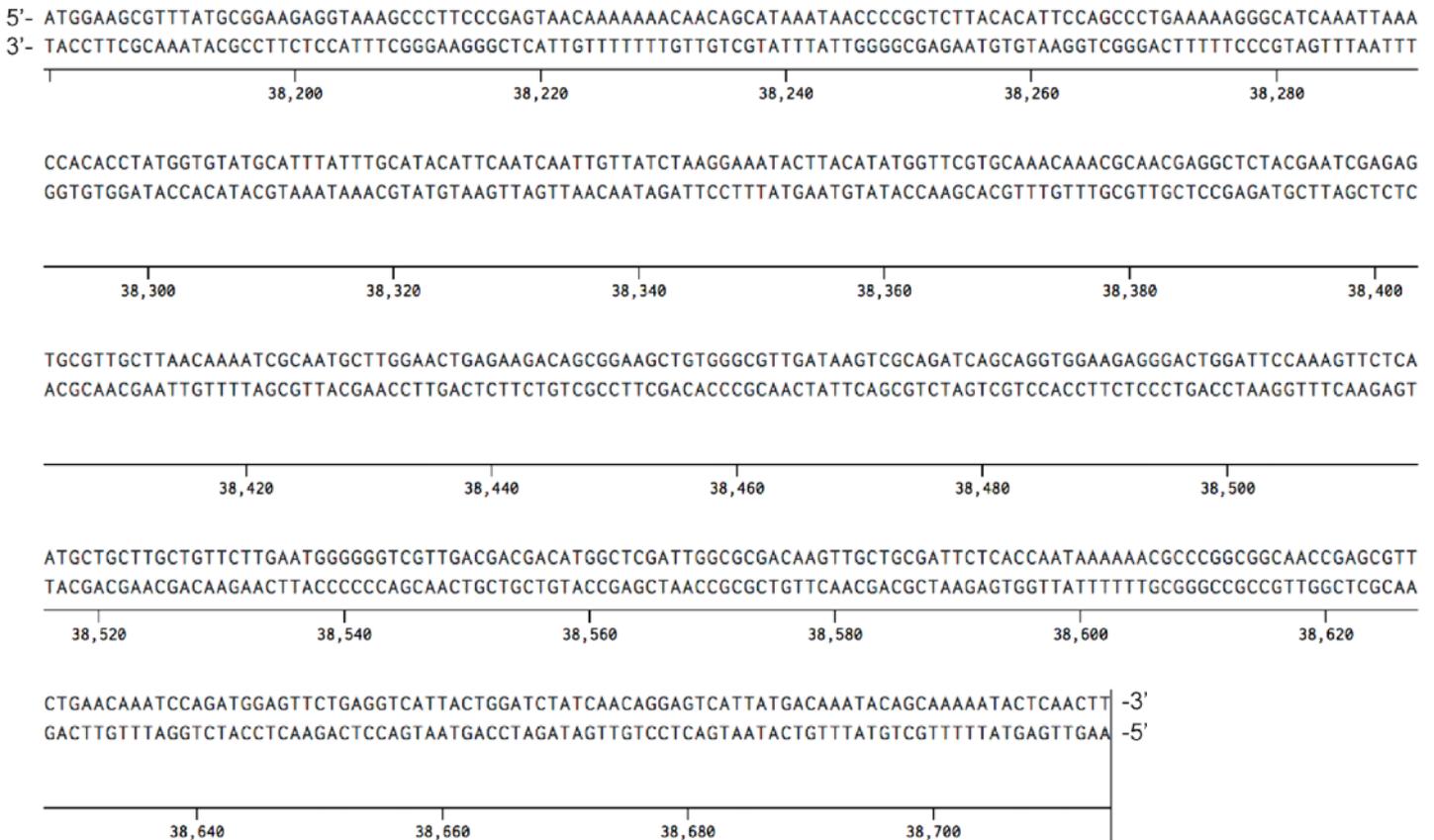


Tabella 3. Sequenze dei primer in Avanti e Invertito

	Primer in Avanti	Primer invertito	Lunghezza del frammento (bp)
Set di primer 1	5'-GAAGCGTTTATGCGGAAGAG-3'	5'-CGTTGCGTTTGTGTTGCAC-3'	
Set di primer 2	5'-GAAGCGTTTATGCGGAAGAG-3'	5'-ACCTGCTGATCTGCGACTTA-3'	
Set di primer 3	5'-GAAGCGTTTATGCGGAAGAG-3'	5'-TGA CTCCTGTTGATAGATCCAGT-3'	

Procedure sperimentali

Oggi imposterete le reazioni di PCR con tre serie di primer che mirano a tre regioni del Genoma del Fago Lambda insieme a una reazione di controllo. Oltre ai set di primer e al DNA del Fago Lambda, vi verrà fornita una FastTaq MasterMix, che contiene una speciale Taq DNA Polimerasi a copia rapida, il tampone PCR, ioni Mg²⁺ e dNTPs (monomeri del DNA). Seguite il protocollo riportato di seguito per preparare i campioni e impostare la macchina PCR.

1. Etichettare la parte superiore e laterale di quattro provette PCR a parete sottile con le proprie iniziali e P1, P2, P3 e -C, per i tre set di primer e un controllo negativo (nessun primer). Questi set di primer sono gli stessi che avete usato per i vostri calcoli nella domanda 7 del Pre-Lab.
2. Aggiungere i reagenti a ciascuna provetta secondo la tabella 4. Pipettare i reagenti direttamente sul fondo delle provette PCR e cercare di evitare di creare bolle.

Tabella 4. Impostazioni per PCR	TUBO			
	P1	P2	P3	-C
FastTaq DNA Polimerasi 2x MasterMix (µL)	10	10	10	10
DNA Genomico Lambda (µL)	5	5	5	5
Miscela di primer(µL)	5 (PS1)	5 (PS2)	5 (PS3)	5 (H ₂ O)
Volume totale (µL)	20	20	20	20

3. Se ci sono alcuni reagenti attaccati ai lati delle provette girare brevemente con una centrifuga per raccogliere tutto il liquido sul fondo della provetta. Se non è disponibile una centrifuga, toccare il fondo della provetta sul banco. Colpire delicatamente la provetta con il dito per assicurarsi che i reagenti siano ben miscelati e che non ci siano bolle intrappolate sul fondo della provetta.
4. Accendere il termociclatore MiniOne® PCR e posizionare le provette nei pozzetti sulla piastra di alluminio. Seguire le istruzioni della Guida introduttiva per programmare i parametri del termociclatore (Tabella 5) sull'applicazione MiniOne PCR da cellulare/tablet e avviare il protocollo di PCR.

Tabella 5. Protocollo ciclico per la PCR del Genoma del Fago Lambda			
# Cicli	Nome della Fase	Temperatura	Tempo
20	Denaturazione	94°C	5 secondes
	Ricottura	54°C	5 secondes
	Estensione	72°C	5 secondes

5. Monitorare l'andamento del protocollo PCR con il grafico in tempo reale dell'applicazione PCR MiniOne da cellulare/tablet.
6. Quando il protocollo PCR è completo, rimuovere le provette dal termociclatore. I campioni possono essere utilizzati immediatamente per l'elettroforesi su gel o conservati in frigorifero per una notte.
7. Preparare i campioni per l'elettroforesi su gel aggiungendo 5 μL di 5x Loading Dye ad ogni campione (Tabella 6). Picchiettare con il dito per miscelare. Se necessario, centrifugare o battere sul banco per portare tutto il liquido sul fondo della provetta.

Tabella 6. Preparare i campioni per l'analisi del gel		
Campione	Aggiungi Colorante 5x	Carica su gel
Marcatore MiniOne	-----	10 μL
Tubo P1	5 μL	10 μL
Tubo P2	5 μL	10 μL
Tubo P3	5 μL	10 μL
Tubo -C	5 μL	10 μL

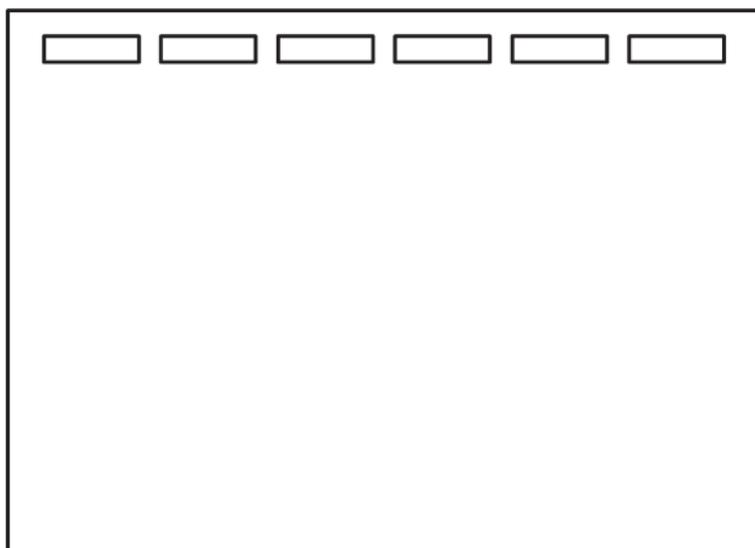
8. Colate il 2% di Agarosio GreenGel utilizzando il supporto per colata MiniOne. Utilizzare il lato del pettine a 6 pozzetti.
9. Dopo che il gel si è solidificato (~10 minuti), rimuovere accuratamente il pettine e seguire le istruzioni per impostare la camera di elettroforesi MiniOne.
10. Versare il tampone da un lato del serbatoio in modo da togliere l'aria presente sotto la vaschetta del gel, creando un sfondo uniforme, senza bolle d'aria intrappolate, per una chiara immagine dei risultati.
11. Caricare 10 μL di ogni campione e il marcatore MiniOne nei pozzetti, tenendo traccia del posizionamento utilizzando la Tabella 7.
12. Far scorrere il gel per 20 minuti o fino a quando le bande non si sono chiaramente separate. Documentate i risultati con il cellulare o la macchina fotografica e incollate un'immagine del vostro gel nel vostro quaderno di laboratorio.

Foglio di lavoro per la raccolta dei dati

Tabella 7. Registrare il campione caricato in ogni corsia

Pozzetto	1	2	3	4	5	6
Campion						

Dopo aver completato l'analisi dell'elettroforesi su gel dei vostri prodotti PCR, abbozzate i risultati finali sul diagramma sottostante, oppure incollate un'immagine del vostro gel:



Domande e analisi post-Lab

1. Le dimensioni delle bande del Marker MiniOne sono: 100, 300, 500, 1000, 2000 bp. Stimare le dimensioni delle bande nelle corsie PCR confrontandole con la corsia del Marker MiniOne. Le vostre stime sono coerenti con le dimensioni che avete previsto nell'esercizio pre-lab? Se non lo sono, cosa pensi che rappresenti la differenza?
2. Avete osservato altre bande sul gel oltre ai prodotti PCR previsti?
3. Il tubo C è un controllo negativo (-), sono stati deliberatamente tralasciati i primer per dimostrare uno dei requisiti per una reazione di PCR di successo. Un altro controllo negativo comune nelle reazioni di PCR è un "controllo senza templatato" in cui viene aggiunta acqua al posto del DNA del templatato. Qual è lo scopo di un controllo negativo "no templatato"?
4. Quali differenze vi aspettereste di vedere nel vostro gel se programmate 30 cicli invece di 20?
5. Questo protocollo utilizza una Polimerasi ad alta velocità che può copiare il DNA a 100 bp/sec. Cosa vi aspettereste di vedere sul vostro gel se avete programmato un tempo di estensione di 2 secondi invece di 5 secondi?
6. Bonus: Una reazione multiplex si ha quando più coppie di primer sono combinate nella stessa provetta per amplificare più regioni genomiche contemporaneamente. Pensa che le coppie di primer utilizzate in questo laboratorio possano essere utilizzate per amplificare tutti e tre i frammenti nella stessa provetta? Perché o perché no?

Appendice A - Risorse consigliate

Il "DNA Learning Center del Cold Spring Harbor Laboratory" dispone di una serie di eccellenti risorse sul DNA e le biotecnologie che sono utili per comprendere il background di questo laboratorio:

- Animazione del metodo Sanger per copiare il DNA : <https://www.dnalc.org/view/15479-Sanger-method-of-DNA-sequencing-3D-animation-with-narration.html>
- Animazione interattiva e grafico dell'amplificazione esponenziale del DNA tramite PCR: <https://www.dnalc.org/view/15924-Making-many-copies-of-DNA.html>
- Un video che illustra il meccanismo della PCR utilizzando modelli molecolari 3D: <https://www.dnalc.org/view/15475-The-cycles-of-the-polymerase-chain-reaction-PCR-3D-animation.html>

"Scitable by Nature Education" è anche una risorsa utile per una varietà di argomenti di biologia molecolare:

- Introduzione di base alla replicazione del DNA cellulare : <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cells-can-replicate-their-dna-precisely-6524830>
- Una spiegazione più dettagliata del meccanismo molecolare : <https://www.nature.com/scitable/topicpage/major-molecular-events-of-dna-replication-413>

Qui potete saperne di più sul Fago Lambda e la sua storia in biologia molecolare:

- Murray, N. E., Gann, A. (2007) What has phage lambda ever done for us ? Current Biology, 17 (9), R305-R312.

Appendice B - Glossario PCR

TERMINE	DEFINIZIONE
CICLO	Un ciclo si riferisce ad un ciclo di denaturazione, ricottura e fasi di estensione della reazione PCR. Il numero di cicli necessari per una particolare reazione dipenderà dalla quantità di DNA di partenza e dalla quantità di DNA si vuole produrre. Con un'alta concentrazione iniziale, 20-25 cicli sono sufficienti per produrre abbastanza DNA da visualizzare su un gel. Se la concentrazione iniziale è bassa o sono necessarie grandi quantità di prodotto, si possono usare 35-40 cicli.
DENATURAZIONE	La denaturazione utilizza l'alta temperatura per rompere i legami tra le basi su filamenti opposti. Il DNA a doppio filamento è diviso in DNA a singolo filamento che espone le basi in modo che possano essere copiate. Le impostazioni tipiche sono 90-98°C per 5-30 secondi per ciclo.
dNTPs	Nucleotidi, i blocchi molecolari del DNA.
ENZIMA	Un enzima è un catalizzatore biologico che accelera una reazione chimica senza modificare i prodotti o essere consumato dalla reazione. La maggior parte degli enzimi sono proteine e controllano una vasta gamma di reazioni nelle cellule, dalla copia del DNA all'estrazione di energia dagli alimenti.
ESTENSIONE	A circa 70°C la Polimerasi si mette al lavoro e inizia ad aggiungere nucleotidi (dNTPs) all'estremità 3' dei primer ricotti, copiando il filo complementare. Le impostazioni tipiche sono 72°C per 5 secondi - 5 minuti per ciclo.
ESTENSIONE FINALE	In alcuni protocolli viene utilizzata un'ulteriore fase di estensione. Questo assicura che la Polimerasi possa aggiungere le coppie finali di base all'estremità dei filamenti, cosa necessaria in alcune applicazioni. La durata tipica è di 2-10 minuti.
DENATURAZIONE INIZIALE	Quando si copia una porzione di DNA genomico, è spesso utilizzata una fase iniziale di denaturazione per assicurarsi che i lunghi filamenti di DNA siano completamente separati e liberati dalle proteine legate prima dell'inizio del ciclo termico. Le impostazioni tipiche sono 90-96°C per 30 secondi-10 minuti.
MONOMERO	Una molecola che può essere legata con altre molecole simili per formare un polimero
POLIMERO	Una molecola che consiste di molte unità simili legate tra loro.
PRIMERS	Brevi pezzi di DNA con sequenze complementari alle sequenze che affiancano la regione da copiare. I primer sono progettati specificamente per ogni reazione di PCR tenendo conto di molte variabili, tra cui la lunghezza, il contenuto di nucleotidi e le caratteristiche strutturali. Molti strumenti informatici sono disponibili per assistere nella progettazione dei primer.

Appendice B - Glossario PCR

TERMINE	DEFINIZIONE
PRIMERS	Brevi pezzi di DNA con sequenze complementari alle sequenze che affiancano la regione da copiare. I primer sono progettati specificamente per ogni reazione di PCR tenendo conto di molte variabili, tra cui la lunghezza, il contenuto di nucleotidi e le caratteristiche strutturali. Molti strumenti informatici sono disponibili per assistere nella progettazione dei primer.
RICOTTURA	Quando la temperatura di una reazione PCR viene abbassata, brevi pezzi di DNA, chiamati primer, si legano a specifiche sequenze all'interno del genoma che mirano a questa regione da copiare. La temperatura di ricottura è specifica per i primer utilizzati nella reazione. Le impostazioni tipiche sono 45-65°C per 5-30 secondi per ciclo.
TAMPONE	Un sale che aggiunto alla soluzione acquosa aiuta a mantenere un pH costante. I tamponi sono essenziali nella PCR perché la funzione della DNA Polimerasi è sensibile alle variazioni di pH.
TEMPLATO	DNA contenente la sequenza che sarà copiata in una reazione di PCR. Può essere un breve frammento o un intero genoma.
TERMOCICLATORE	Chiamato anche macchina di PCR, un termociclatore è uno strumento che modifica automaticamente la temperatura della reazione di PCR secondo un programma impostato dall'utente. Esso riscalda e raffredda la reazione tra la denaturazione, la ricottura e le temperature di estensione per un determinato numero di cicli.

Appendice C: Background sull'elettroforesi su gel

L'Elettroforesi su gel è una tecnica utilizzata in molti settori della scienza per analizzare i componenti di miscele chimiche complesse. Miscele di DNA, RNA, proteine o coloranti possono essere separate nei loro singoli componenti in base alle dimensioni molecolari e alla carica elettrica utilizzando una matrice di separazione all'interno di un campo elettrico.

Il gel utilizzato nell'elettroforesi su gel è un groviglio di polimeri che formano una matrice tridimensionale con pori pieni d'acqua attraverso la quale migrano le molecole. Una maggiore densità di polimeri crea pori più piccoli. Come i fori di un setaccio o di un colino, la dimensione dei pori deve avere una dimensione simile alle molecole da separare. I gel possono essere prodotti da sostanze diverse a seconda dell'applicazione. Uno dei materiali più comunemente usati ed efficaci è l'agarosio, un polimero estratto dalle alghe marine. I gel di Agarosio si formano versando l'Agarosio fuso in un vassoio dove raffreddandosi si solidificherà nella forma desiderata. Nell'agarosio fuso viene inserito un pettine che viene poi rimosso una volta che esso si sarà solidificato così da creare dei pozzetti in cui verranno caricati i campioni.

Dopo che il gel si è solidificato, viene posto in un tampone elettricamente conduttivo tra elettrodi paralleli positivi ((+) anodo) e negativi ((-) catodo) Tra gli elettrodi viene applicata una tensione che crea un campo elettrico uniforme all'interno del gel. Le molecole nei pozzetti cominciano a muoversi sotto l'influenza del campo elettrico: le molecole caricate positivamente migrano verso il (-) catodo e le molecole caricate negativamente migrano verso l'anodo (+).

La velocità di movimento di una molecola in un campo elettrico è determinata dalla forza della sua carica elettrica rispetto al suo peso molecolare. Questa è quantificata come il rapporto tra la carica e la massa. La velocità di movimento all'interno di un gel è anche influenzata dalla dimensione della molecola rispetto ai pori del gel. I polimeri nel gel sono come un percorso ad ostacoli: le molecole più piccole si muovono facilmente attraverso i pori, viaggiando più velocemente e più lontano rispetto alle molecole grandi e ingombranti. Tuttavia, una molecola grande può muoversi più velocemente attraverso un gel rispetto a una molecola più piccola quando la forza della sua carica rispetto alla sua massa è significativamente più alta. La forma può anche influenzare il modo in cui una molecola si muove attraverso il gel. Le molecole lunghe simili a spaghetti si muovono più lentamente delle molecole compatte, che scivolano facilmente attraverso i pori. Molecole della stessa dimensione, forma e carica si muoveranno insieme e formeranno una banda distinta. Se nel campione sono presenti più tipi o dimensioni di molecole, si separeranno l'una dall'altra e ciascuna di esse formerà una banda distinta.



 theminione.com

 (858) 684-3190

 info@theminione.com

FastTaq, GreenGel, and PrepOne are trademarks of Embi Tec. GelGreen is a trademark of Biotium. MiniOne is a registered trademark of C.C. IMEX. Patents Pending.