

PCR

IL PCR È UNA TECNICA X OTTENERE MOLTE COPIE DI UNA SPECIFICA SEQUENZA DI DNA

SI UTILIZZA COMUNEMENTE LA SIGLA DEL PCR

per ESEMPIO

QUESTA TECNICA È IL PCR

I GENI OTTENUTI ATTRAVERSO LE COLTURE BATTERICHE DELLE LIBRERIE A cDNA DEVONO ESSERE TRASFERITI IN ALTRE CELLE X POTERNE SCOPRIRE LA FUNZIONE

REAZIONE A CATENA POLIMERASI

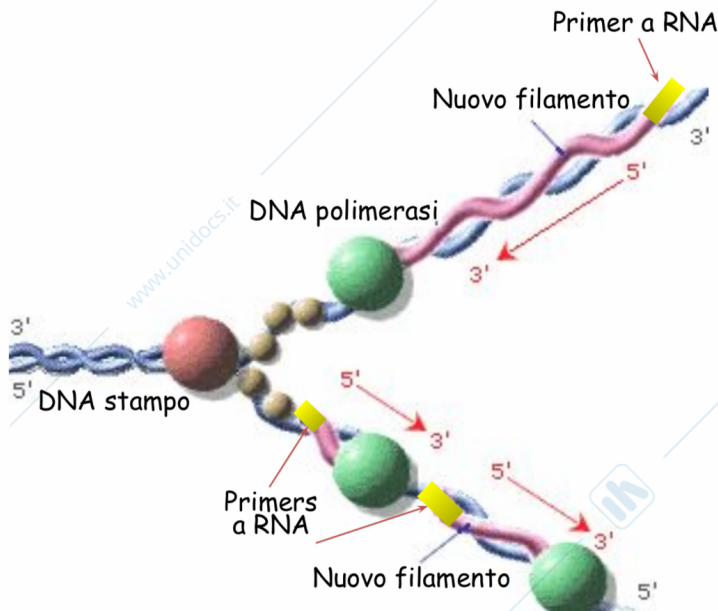
IN PARTICOLARE È IL MEZZO PER PRODURRE IN VITRO GRANDI QUANTITÀ DI UNA SPECIFICA SEQUENZA DI DNA ESTREMAMENTE COMPLESSO

IL PRINCIPIO A CUI SI ISPIRA LA PCR È LA

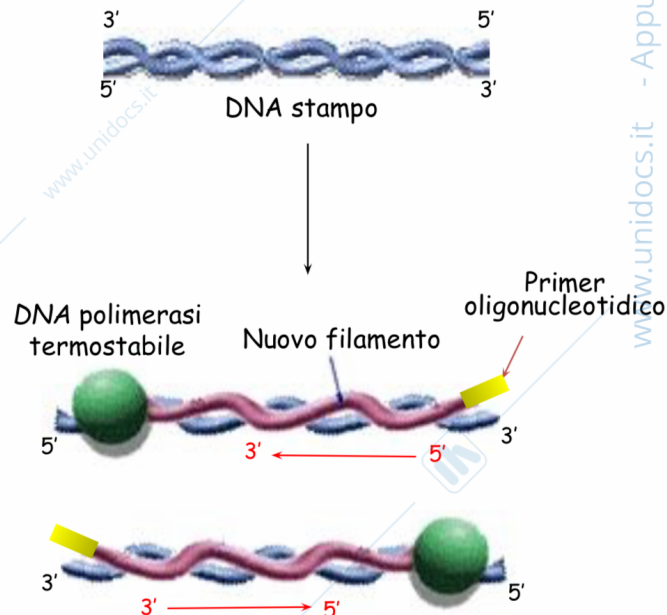
REPLICAZIONE DEL DNA

Il principio a cui si ispira la PCR è la replicazione del DNA:

REPLICAZIONE



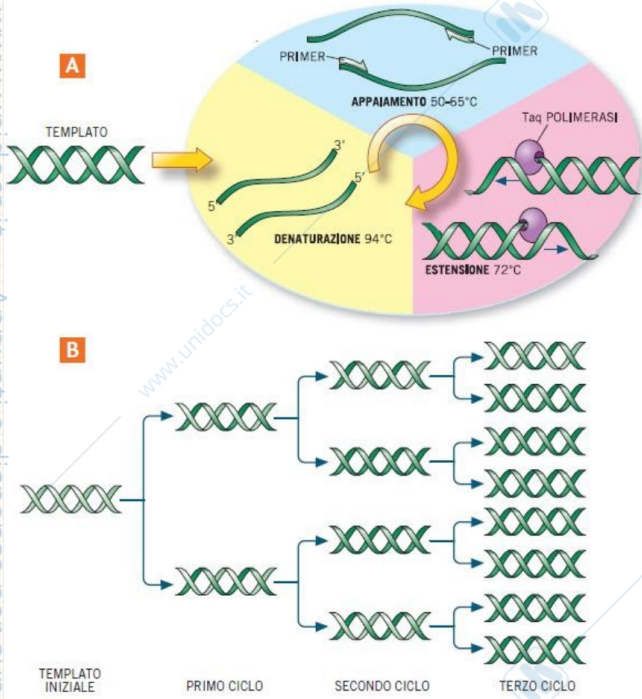
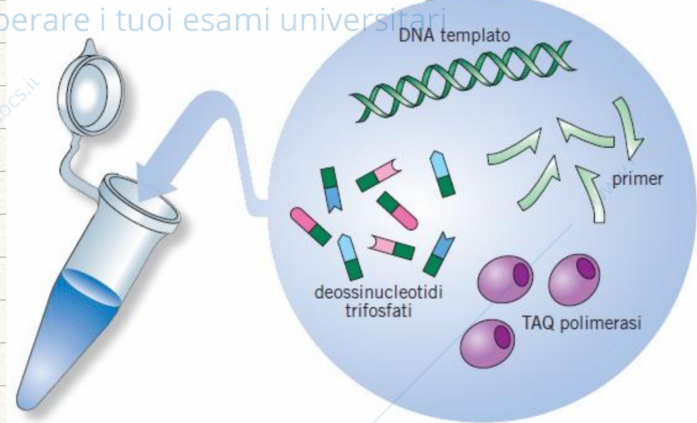
PCR



LA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI AMPLIFICA LA REAZIONE DI DUPLICAZIONE DEL DNA, UTILIZZANDO DNA POLIMERASI BATTERICHE TERMOSTABILI (SI UTILIZZA UN TERMOCICLATORE)

PER LA PCR SONO NECESSARI:

- UN TEMPLATO (DNA STAMPO)
- DUE PRIMER
- UNA MISCELA DI DESOSSINUCLEOTIDI TRIFOSFATI (dNTP)
- UNA DNA-POLIMERASI TERMOSTABILE (Taq-POLIMERASI)

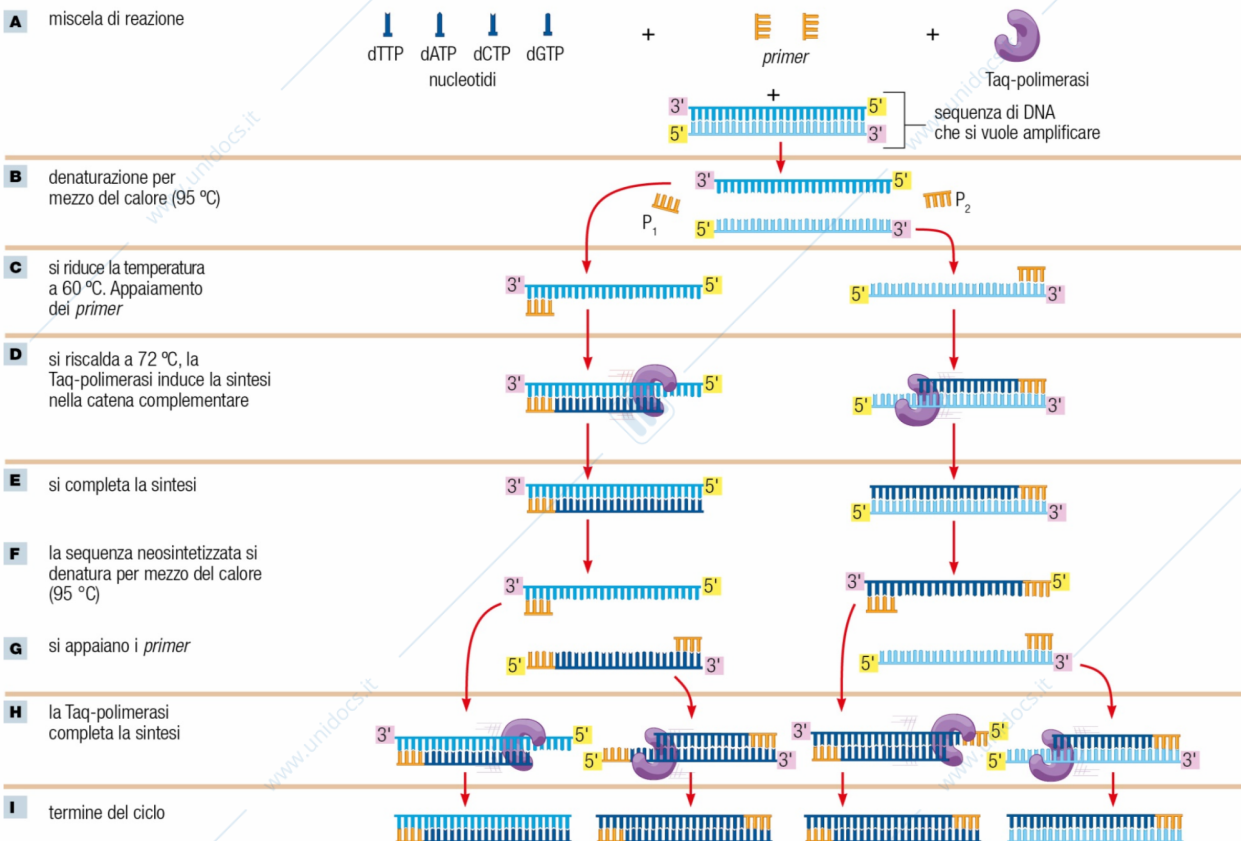


La PCR

LE TRE TAPPE DELLA PCR:

- **DENATURAZIONE** X SEPARARE LE DUE ELICHE DEL DNA (90°C)
- **APPAIAMENTO:** (ANELLING) DEI PRIMER CON LE SEQUENZE COMPLEMENTARI SUL DNA TEMPLATO
- **ESTENSIONE** UNA POLIMERASI TERMOSTABILE, SINTETIZZA NUOVI PICCOLI COMPLEM. 5'→3' AGGIUNGENDO I DESOSSINUCLEOTIDI TRIFOSFATI PRESENTI NELLA MISCELA DI REAZIONE

La PCR

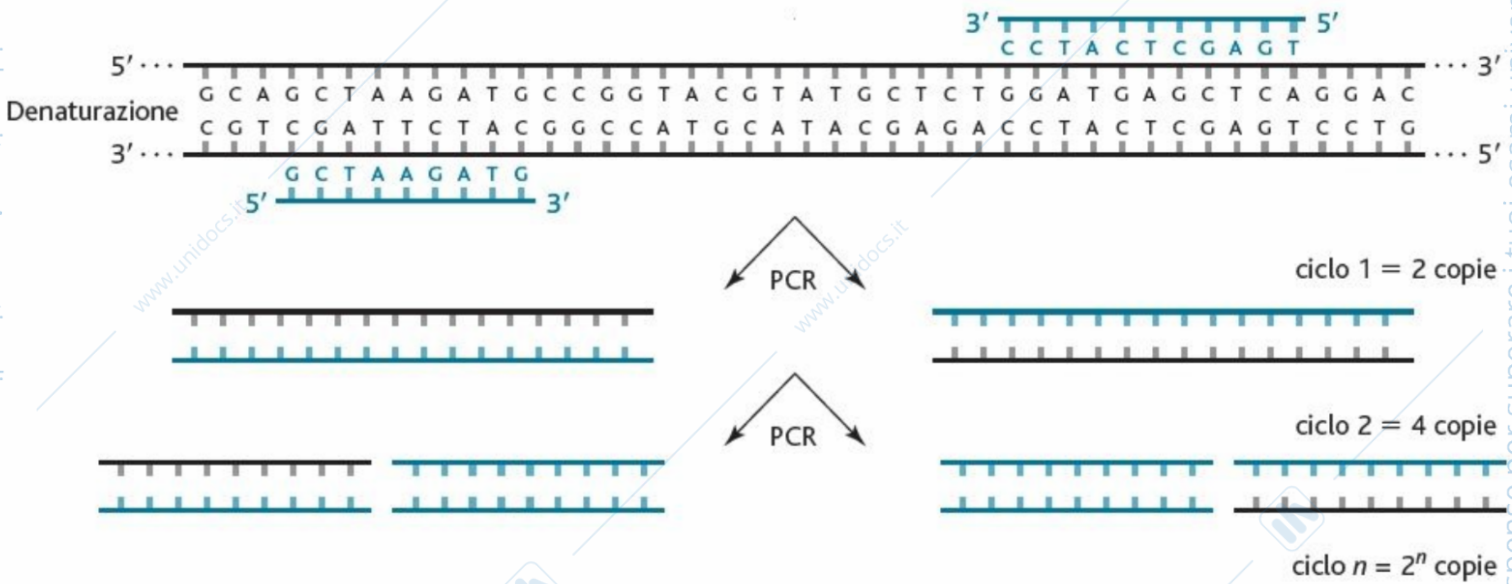


+ Nuovo Ciclo

CLONAGGIO DIRETTO DI UNA SEQUENZA GENICA: LA PCR (III)

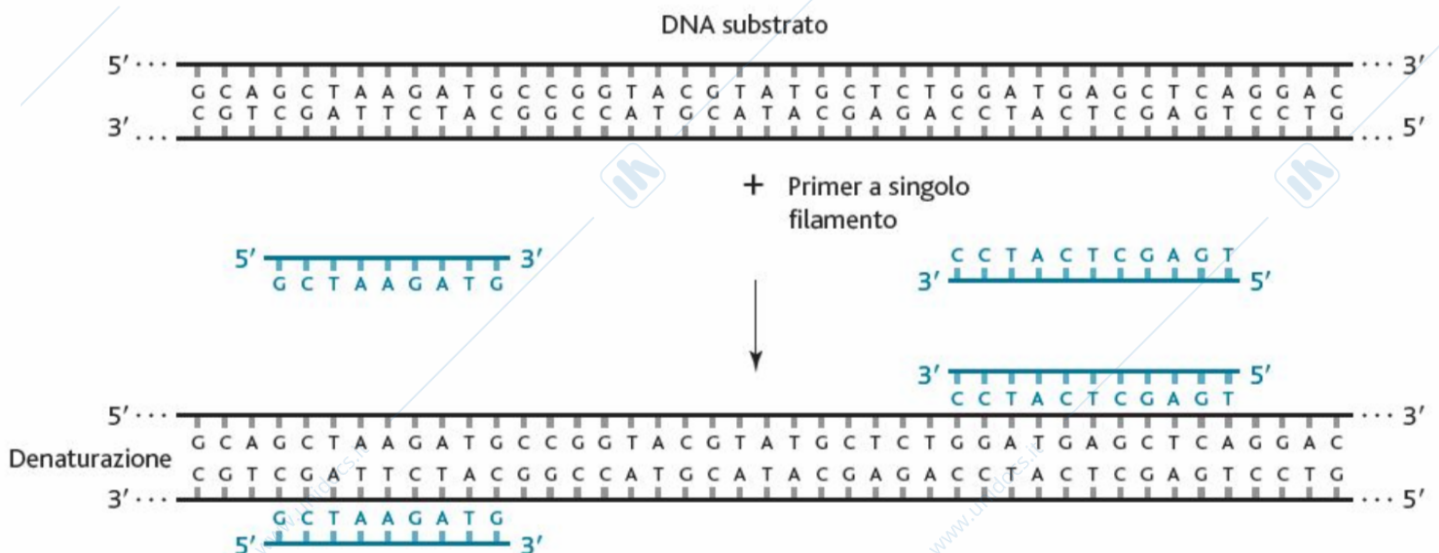
Attraverso **ripetuti cicli** di denaturazione, rinaturazione e polimerizzazione, la sequenza è amplificata **x ogni n ciclo di un fattore 2 miliardi in 31 cicli**

2×10^9 COPIE



APPLICAZIONI

La miscela del cDNA generata a partire dagli mRNA cellulari viene usata per una PCR. Gli endonucleotidi complementari all'inizio e alla fine del cDNA di interesse funzionano da **inneschi** x la reazione di polimerizzazione



CLONAGGIO DIRETTO DI UNA SEQUENZA GENICA: LA PCR (IV)

- UTILIZZANDO INNESCHI CHE CONTENGONO LE SEQUENZE DI TAGLIO PER ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE, LE COPIE DEL cDNA DI INTERESSE GENERATE X PCR POSSONO ESSERE DIRETTAMENTE INSERITE NEI VETTORI DI CLONAGGIO CON LA DNA LIGASI.

DNA tagliato con l'enzima di restrizione



Miscela con il vettore tagliato e unione con la ligasi

