



Il metodo scientifico è stato inventato da Galileo Galilei. Il metodo proposto era basato su alcune fasi.

Nel 1944 due scienziati avevano dimostrato il principio trasformante

Nel 1952 altri due dimostrarono che il dna era la macromolecola contenente il materiale genetico (marcatura metabolica)

Nel 1953 Watson e crick descrivono la struttura molecolare del dna. La struttura suggerisce un possibile meccanismo di copiatura e un mese dopo ne pubblicano un altro dove ipotizzano un possibile meccanismo di replicazione del dna ->il legame ad idrogeno che tiene unite le due catene nucleotidiche si rompe, le due catene si separano e ogni catena funge da stampo per la sintesi di un nuovo filamento e il risultato è che le due molecole che si generano dopo la replicazione sono costituite da un filamento nuovo e uno vecchio

Nel 1956 kornberg afferma che per la replicazione del dna era necessario: 4 desossiribonucleotidi trifosfati, la dna polimerasi e il dna stampo.

Ci si pone domande su come la replicazione fosse: semiconservativa, conservativa o dispersiva?

-Secondo Watson e crick era semi conservativa:

-Secondo Stent era conservativa: i due filamenti del dna parentale fungevano da stampo ma una volta sintetizzati quelli nuovi, i filamenti parentali si univano nuovamente e quelli neosintetizzati formavano una doppia elica fra di loro.

-Secondo Delbruck invece era dispersiva: il dna parentale veniva frammentato in piccoli pezzi che servivano poi da stampo per un nuovo filamento, i frammenti di dna nuovo e vecchio venivano poi uniti fra di loro creando delle molecole ibride. In cui pezzi di dna parentale e neosintetizzato si

!!!Ad oggi è possibile affermare che la replicazione è semiconservativa!!!

1)Distinguere il dna parentale da quello neosintetizzato

->Prima di tutto i due scienziati decisero di marcare il dna parentale con azoto 15 (perchè sapevano che il dna era fatto di basi azotate e che quindi il dna conteneva azoto)

2)Quale sistema biologico utilizziamo?

->Un batterio (Escherichia coli) perché a differenza delle cellule eucariotiche la replicazione è rapida. Si coltivano facilmente e hanno un tempo di duplicazioni di 20 minuti.

Come la coltivo:

*da una cultura liquida: il medium, ricca di nutrienti, viene incubato a 37 gradi in un incubatrice overnight (in agitazione) in cui inserisco i batteri, il giorno successivo il medium è opaco

*da una cultura solida: il medium è lo stesso ma ci aggiungo l'agar agar che lo solidifica su un supporto rigido. Il supporto viene messo in incubatrice nelle stesse condizioni.

La crescita può essere alterata dalle condizioni ambientali: temperatura (a 37 gradi la replicazione è al massimo della velocità), concentrazione salina, il ph, i nutrienti (se è minimo: acqua, glucosio, azoto e sali minerali)

Come generare una cultura di coli contenente azoto pesante?

-> attraverso la marcatura metabolica: nella cultura inserisco solo azoto pesante ottenendo così dna pesante. Se avessi inserito azoto leggero (N14) avrei ottenuto dna leggero.

Hershey e Chase nella prima marcatura metabolica hanno dovuto utilizzato il fosforo perchè l'azoto era contenuto anche nelle proteine e per di più avevano bisogno un isotopo radioattivo che durasse nel tempo (il massimo dell'azoto è di 9 secondi).

3)Come separiamo il dna pesante dal dna leggero?

->1 elettroforesi: tecnica che separare i frammenti di dna base della loro dimensione. Questa tecnica però non è adatta, perchè la lunghezza sarà uguale, quella che cambia è la densità.

->2 centrifugazione su gradiente di cloruro di cesio: le molecole vengono separate sulla base della loro densità. Il cloruro di cesio è un sale che ad alte densità e dopo un lungo periodo di centrifugazione crea un gradiente all'interno della provetta. Se ad una soluzione molto concentrata di cloruro di cesio aggiungo le

particelle, quest'ultime si vanno a posizionare a diverse altezze della provetta a seconda della loro densità, avranno una posizione che coincide con la densità del cloruro di cesio.

-> nell'esperimento di Meselson e Stahl posso vedere le due bande in un punto preciso della provetta che mostra la densità dei due tipi di dna

Alla prima coltura contenete solo azoto pesante l'analisi del dna ha mostrato solo quello pesante, a questo punto la cultura è stata trasferita in una contenete azoto leggero e si è analizzato il dna a seguito di una sola generazione:

-> se la replicazione del dna fosse stata conservativa avrei notato due bande nella provetta: una a densità "leggera" e una a densità "pesante"

-> se la replicazione fosse stata semiconservativa o dispersiva avrei ottenuto una provetta con una sola banda a metà tra le due precedenti (densità leggere e pesante).

A questo punto effetto una seconda generazione per capire se è semiconservativa o dispersiva:

-> se fosse semiconservativa otterrei due bande una a metà (come quella della prima generazione) e una più leggera (data dalla replicazione dell'elica leggera della prima generazione)

-> se fosse dispersiva opterei una banda sola ma ancora più leggera di quella intermedia ottenuta in precedenza

Loro cosa ottengono?

Loro vedono una provetta contenete due bande e quindi si ha avuta la certezza che la replicazione era semiconservativa