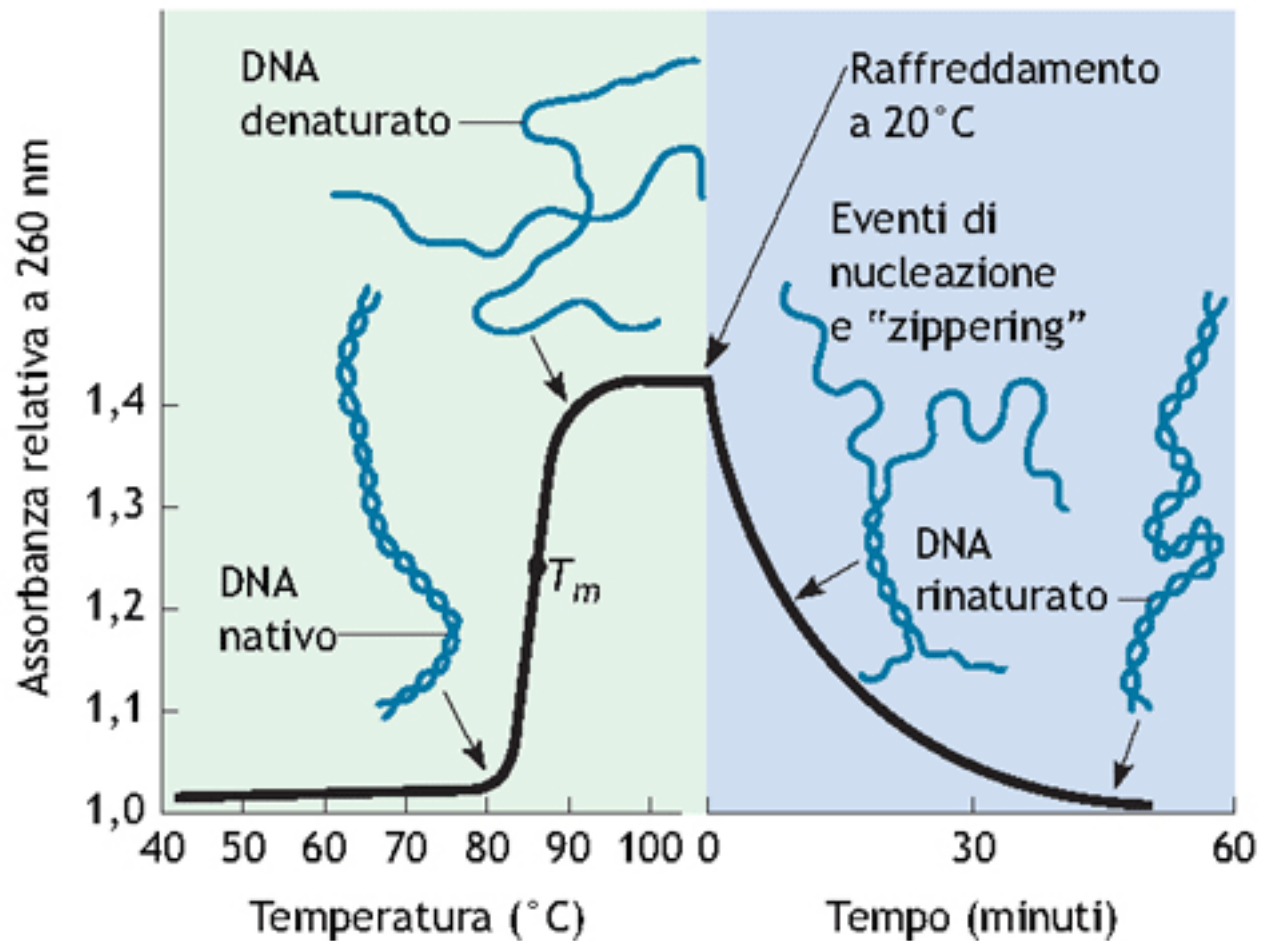
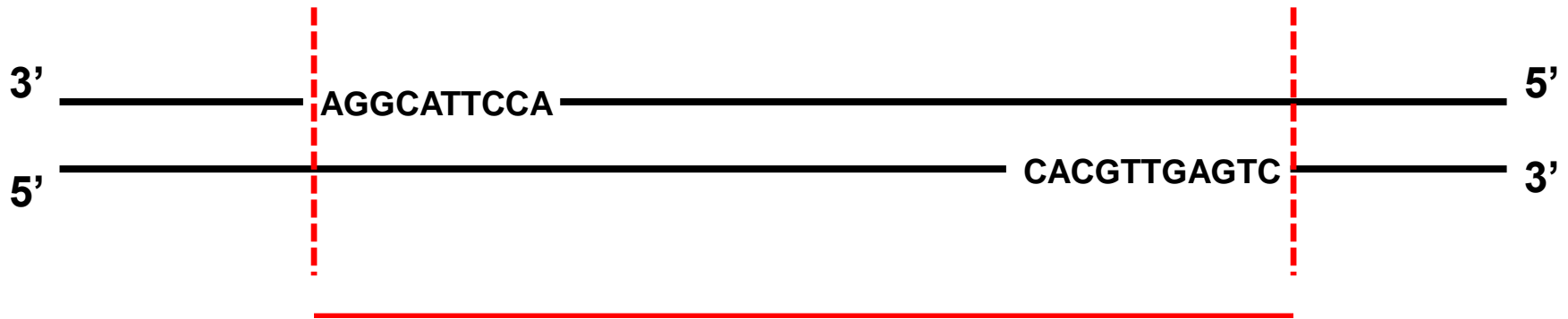


Reazione di polimerizzazione a
catena del DNA (PCR)

Una caratteristica peculiare del DNA: denaturazione e rinaturazione

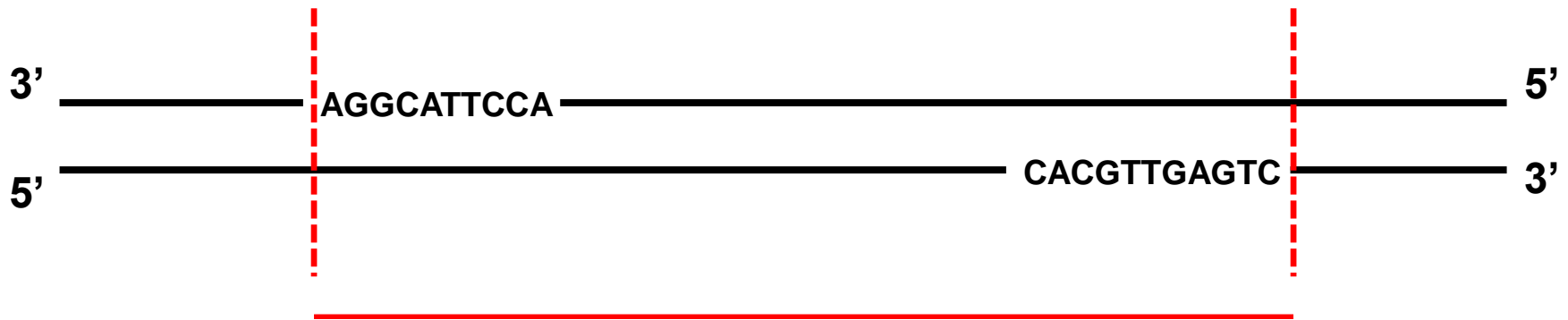


Supponiamo di voler amplificare una specifica regione del DNA



Si puo' fare con la PCR

Supponiamo di voler amplificare una specifica regione del DNA

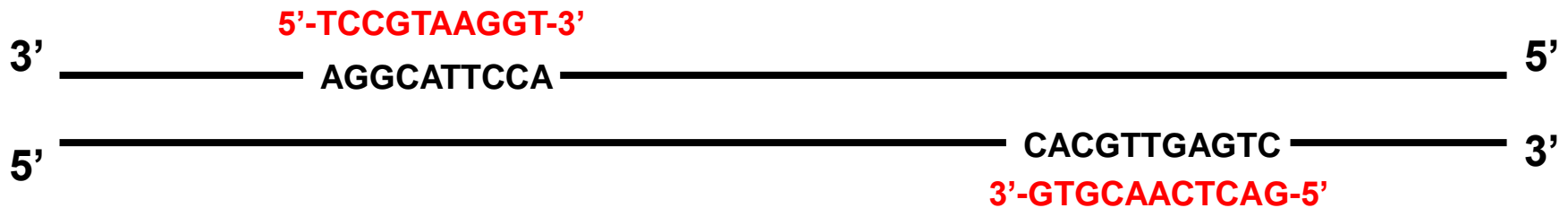


È necessario conoscere la sequenza nucleotidica della regione da amplificare



Sintesi dei primers

Supponiamo di voler amplificare una specifica regione di DNA



È necessario conoscere la sequenza nucleotidica della regione da amplificare



Sintesi dei primers

Le 3 fasi della PCR

1. Denaturazione
2. Annealing dei primers
3. Elongazione



Ciclo di PCR

I protagonisti della PCR

-DNA da amplificare

- **primers** (devono avere una lunghezza di circa 21 nucleotidi)

- **Taq polimerasi** è una DNA polimerasi, proveniente dall'organismo termofilo *Thermus aquaticus*. Ha una temperatura ottimale di 75-80 °C.

1. Denaturazione

90°C

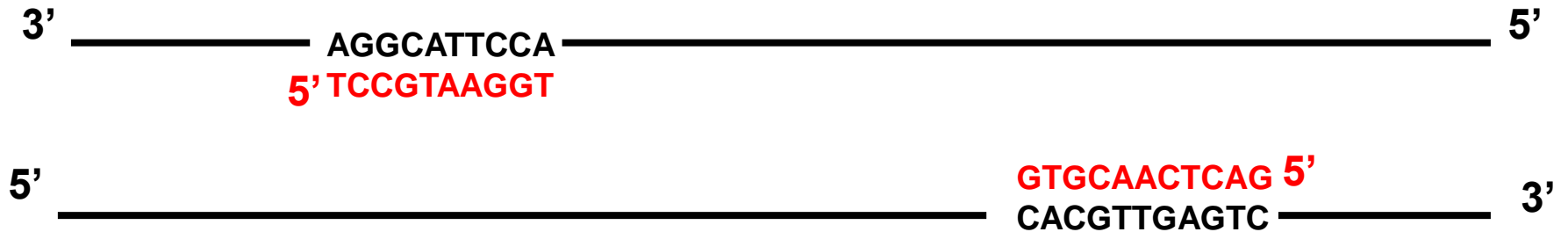
i 2 filamenti del DNA si separano



2. Annealing

50°C - 62°C

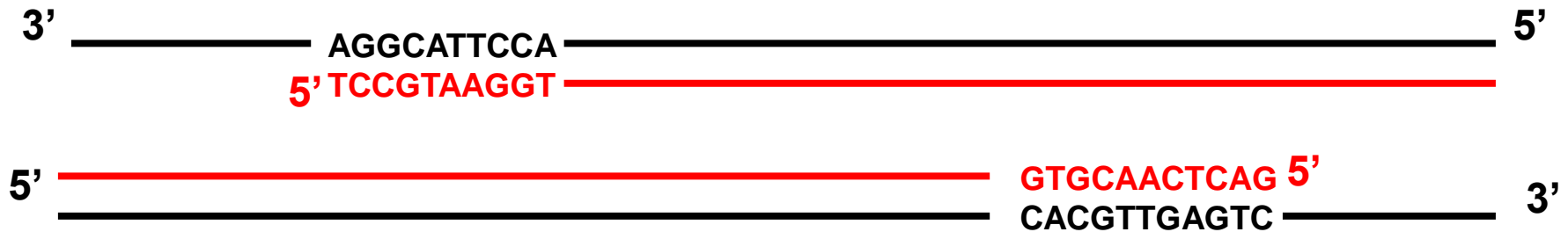
Ogni primer si lega alla regione complementare del DNA



Elongazione

72°C

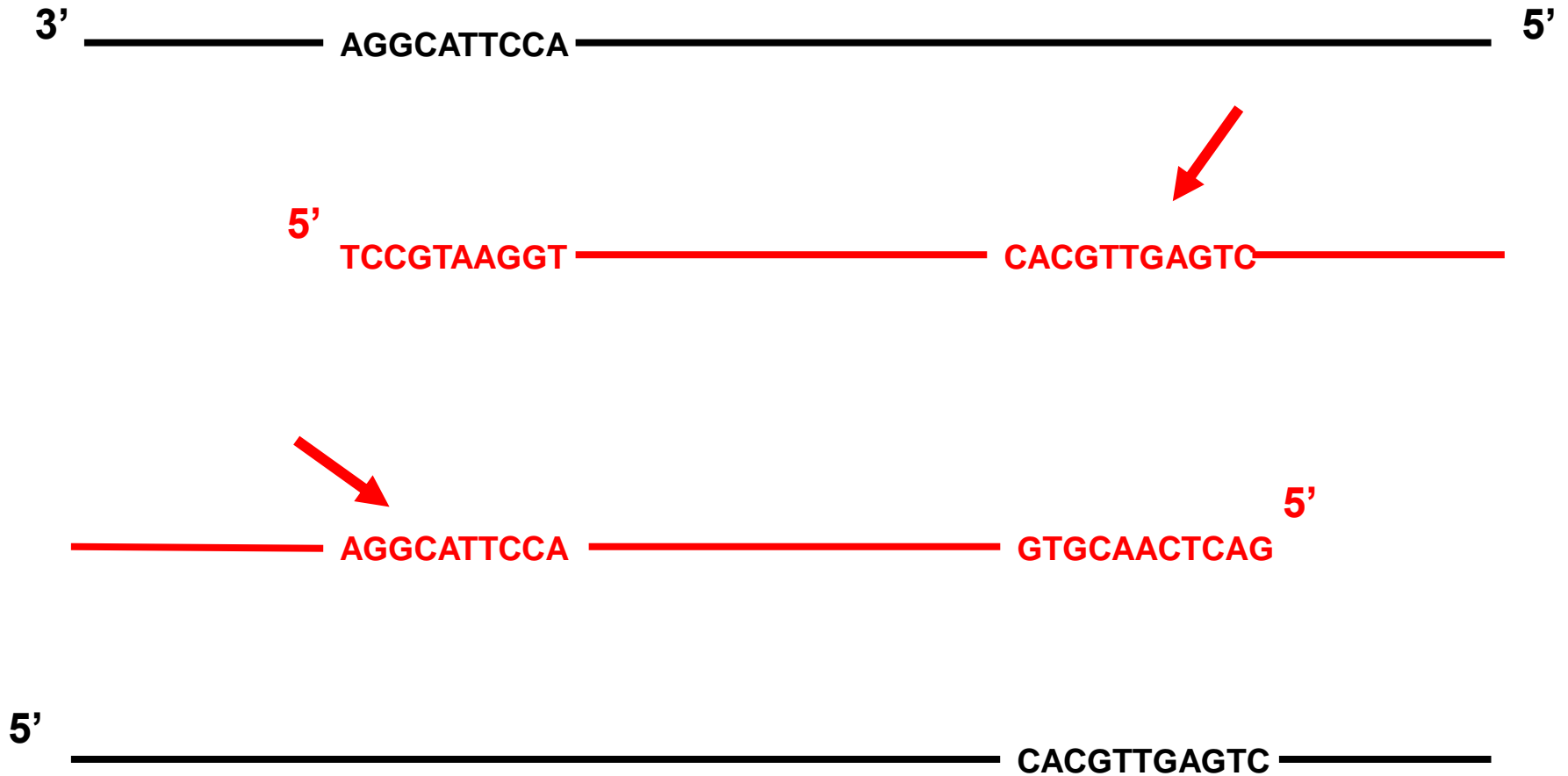
la Taq polimerasi sintetizza il nuovo filamento a partire dal primer



Fine del primo ciclo di PCR

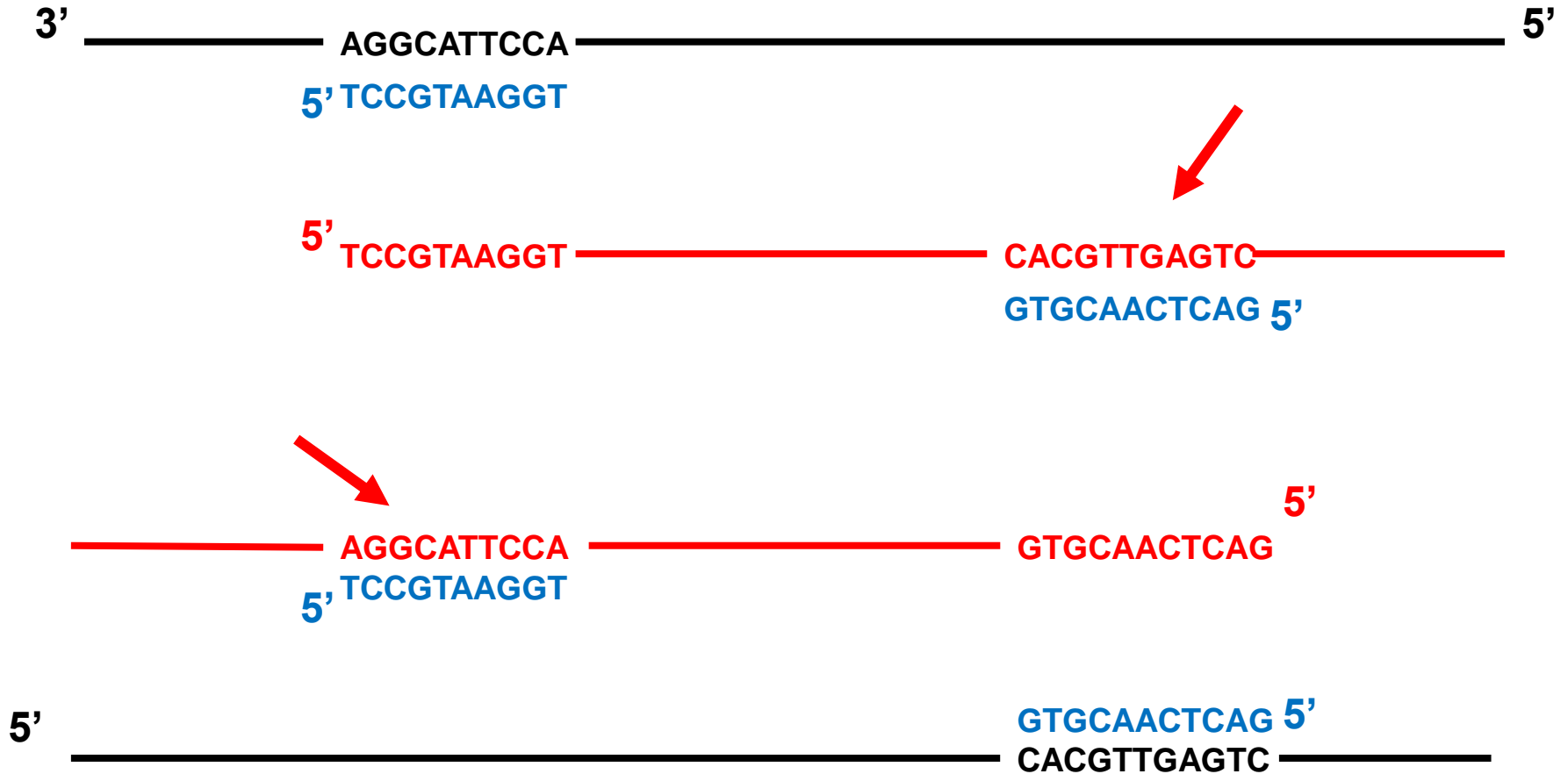
2° ciclo di PCR

1. Denaturazione



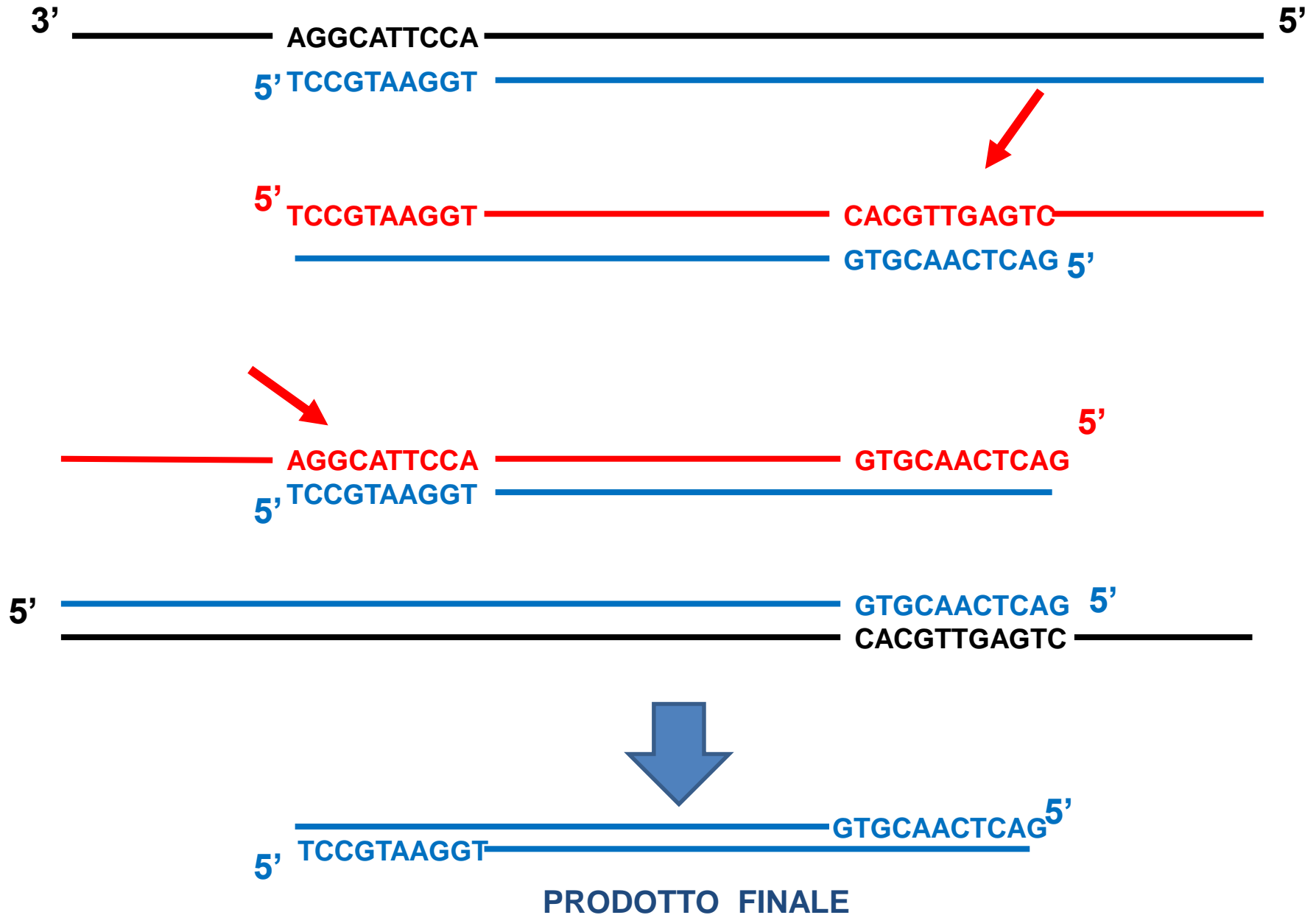
2° ciclo di PCR

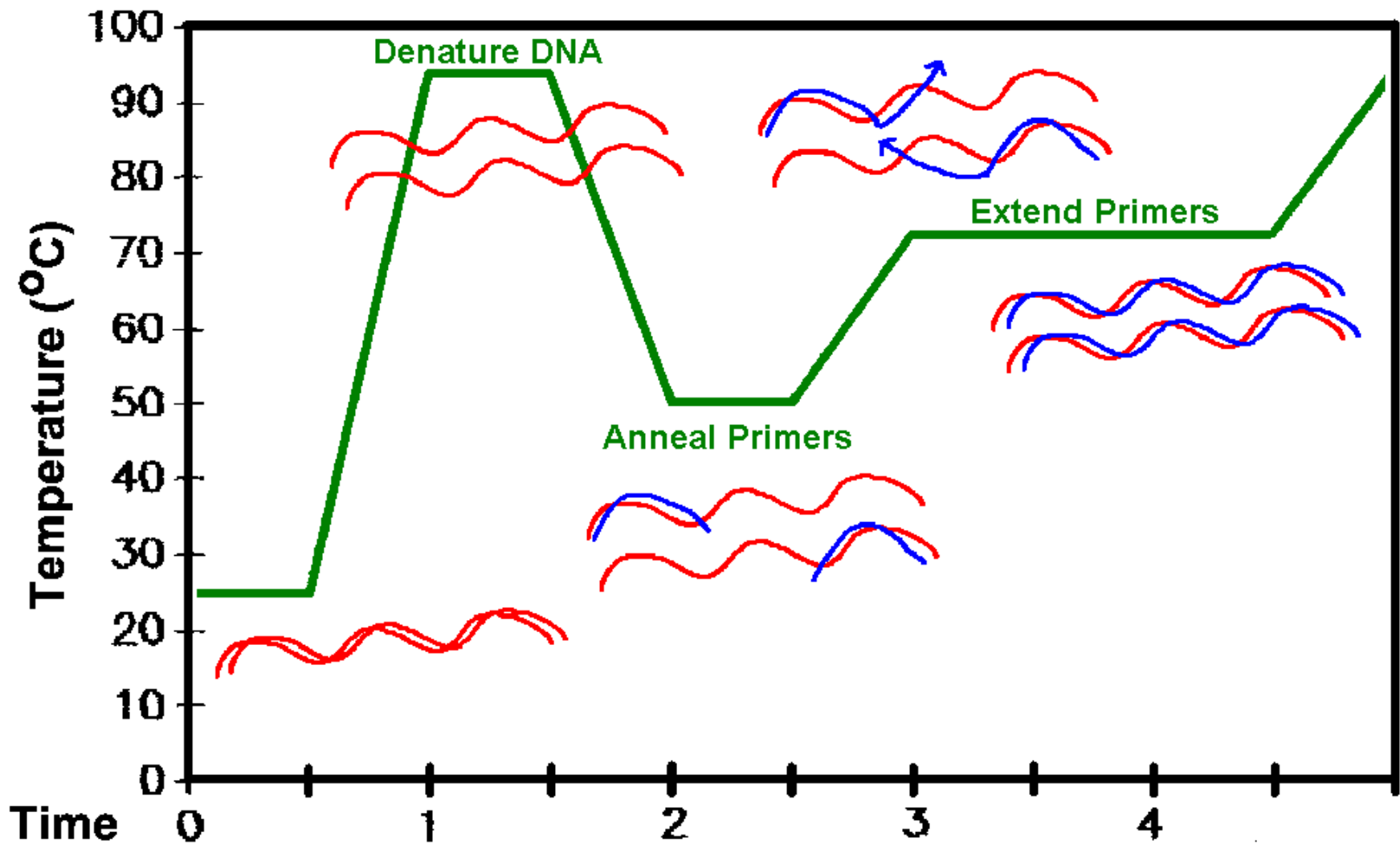
2. Annealing



2° ciclo di PCR

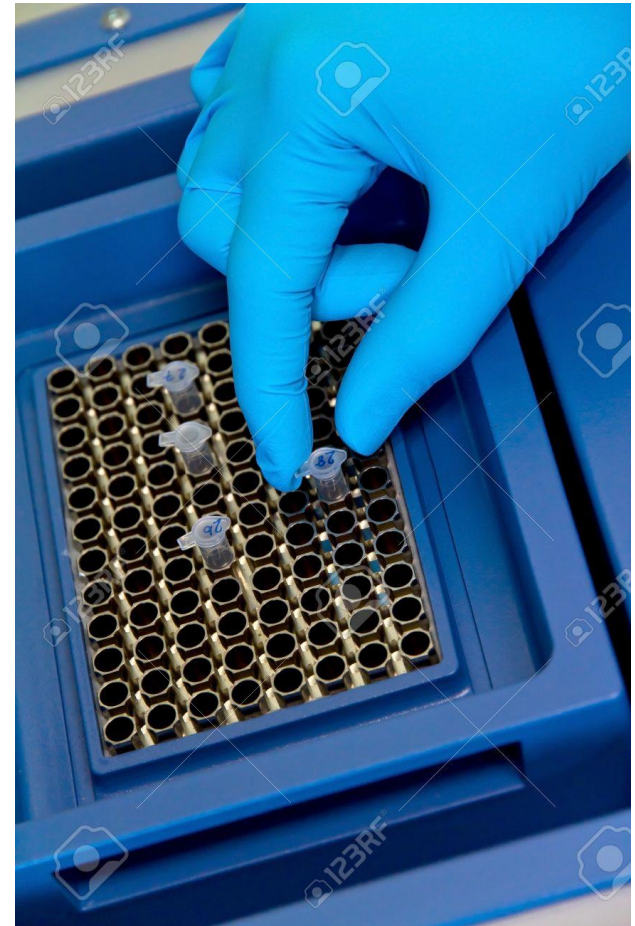
3. Elongazione

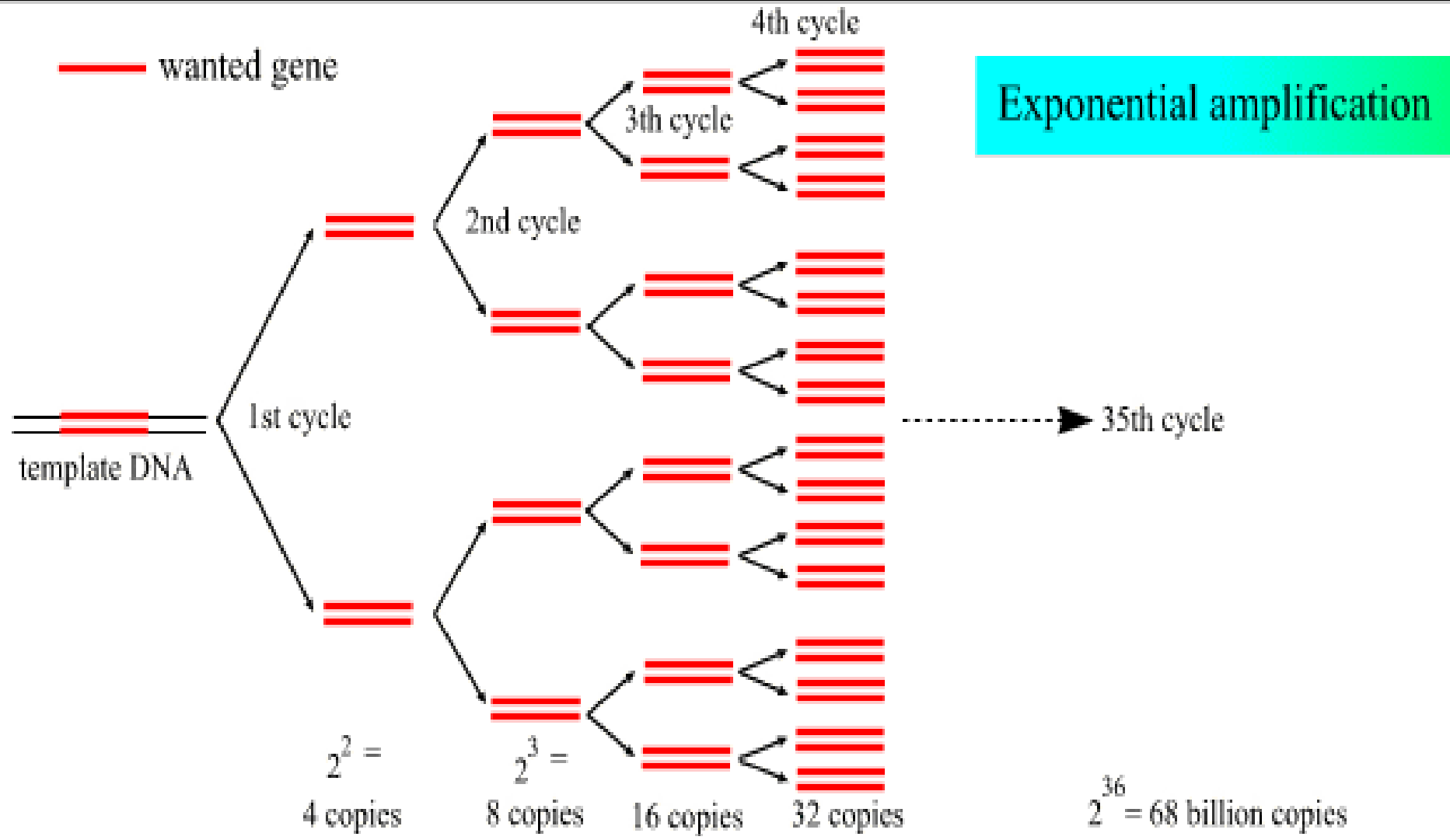




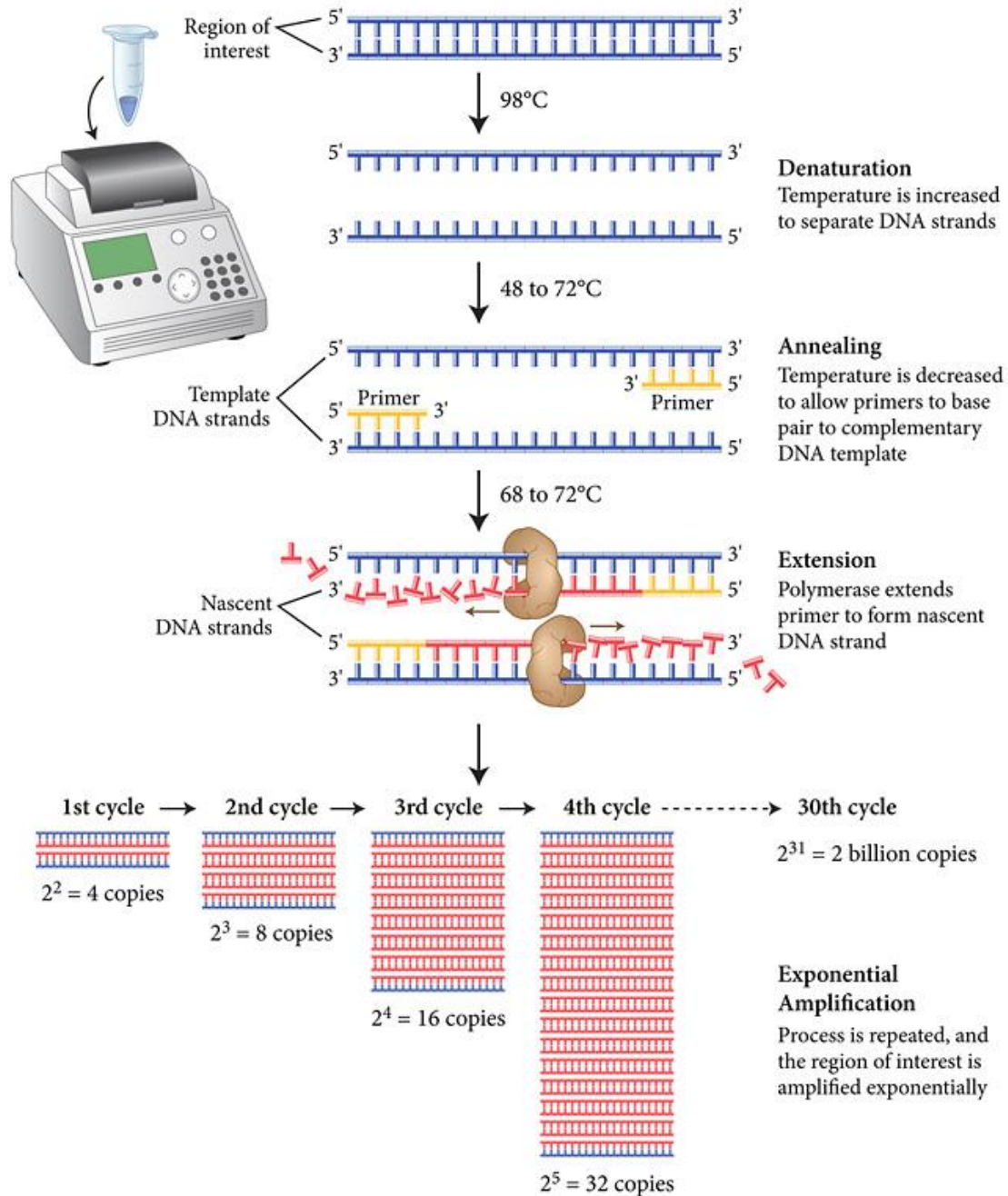
Taq-polimerasi: a 100° è parzialmente denaturata ma reversibilmente

PCR machine





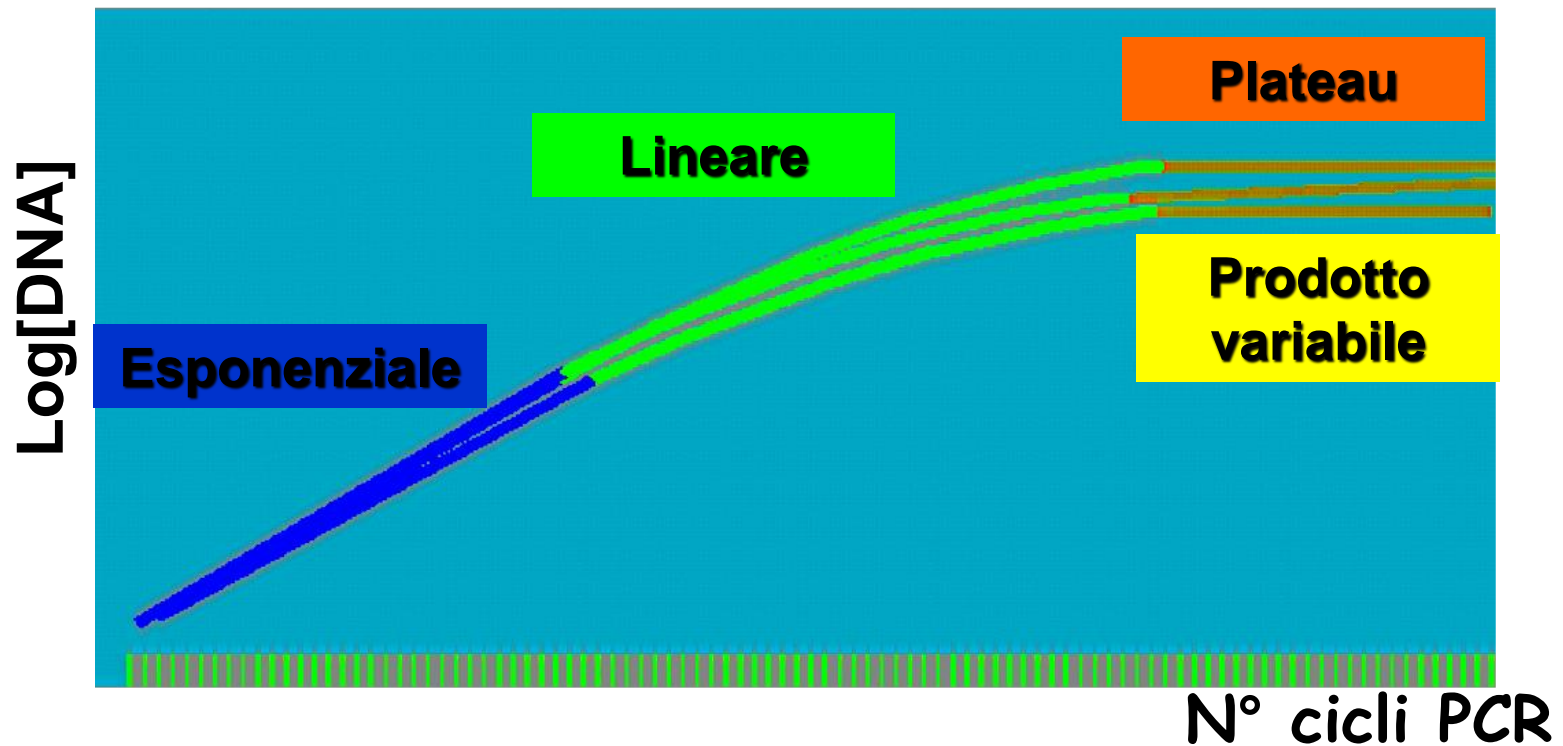
(Andy Vierstraete 1999)



Polymerase Chain Reaction

- Resa teorica: 2^n

$P=(2)^n$ Il prodotto (P) incrementa esponenzialmente con il numero di cicli di PCR (n)



Polymerase Chain Reaction

Resa effettiva: **effetto plateau**

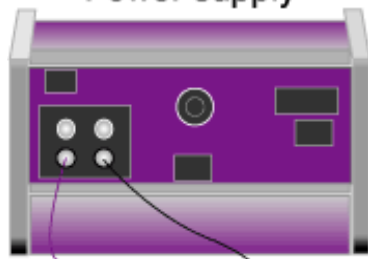
Il processo di duplicazione non procede "all'infinito", è limitato da:

- attività della Taq polimerasi
- quantità dei reagenti (primers, deossiribonucleotidi)

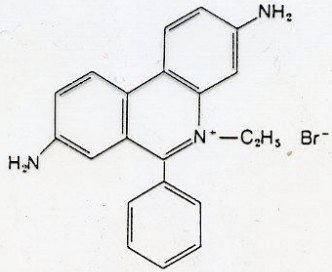
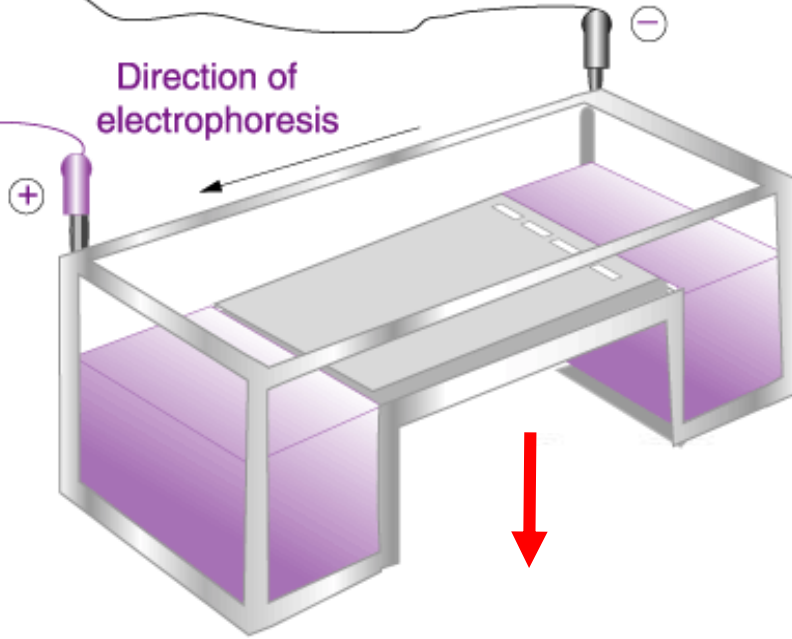
Raggiunto il plateau non si osserva più un incremento nei prodotti

Power supply

Analisi del prodotto di PCR



Direction of electrophoresis



Bromuro di etidio

