

Lezione 7-8

Giovedì 18 Marzo 2010

aula 2 ore 9:00
corso integrato di Biologia Applicata (BU) ed
Ingegneria Genetica (BCM)

materiale del T-Rex system

pFRT/lacZeo = Flp-In target site vector for stable transfection of a cell line and creation of a Flp Recombination Target (FRT) site

pcDNA6/TR vector for constitutive expression of the TET repressor

pOG44 vector for transient expression of the Flp recombinase

pcDNA5/FRT/TO = inducible expression vector for cloning your gene of interest

pcDNA5/FRT/TO/CAT vector for positive control expressing the CAT gene (chloramphenicol acetyl transferase)

riepilogo

4 vettori +1:

1 per integrazione nella linea cellulare con FLP site

2 plasmide che esprime il repressore Tet O

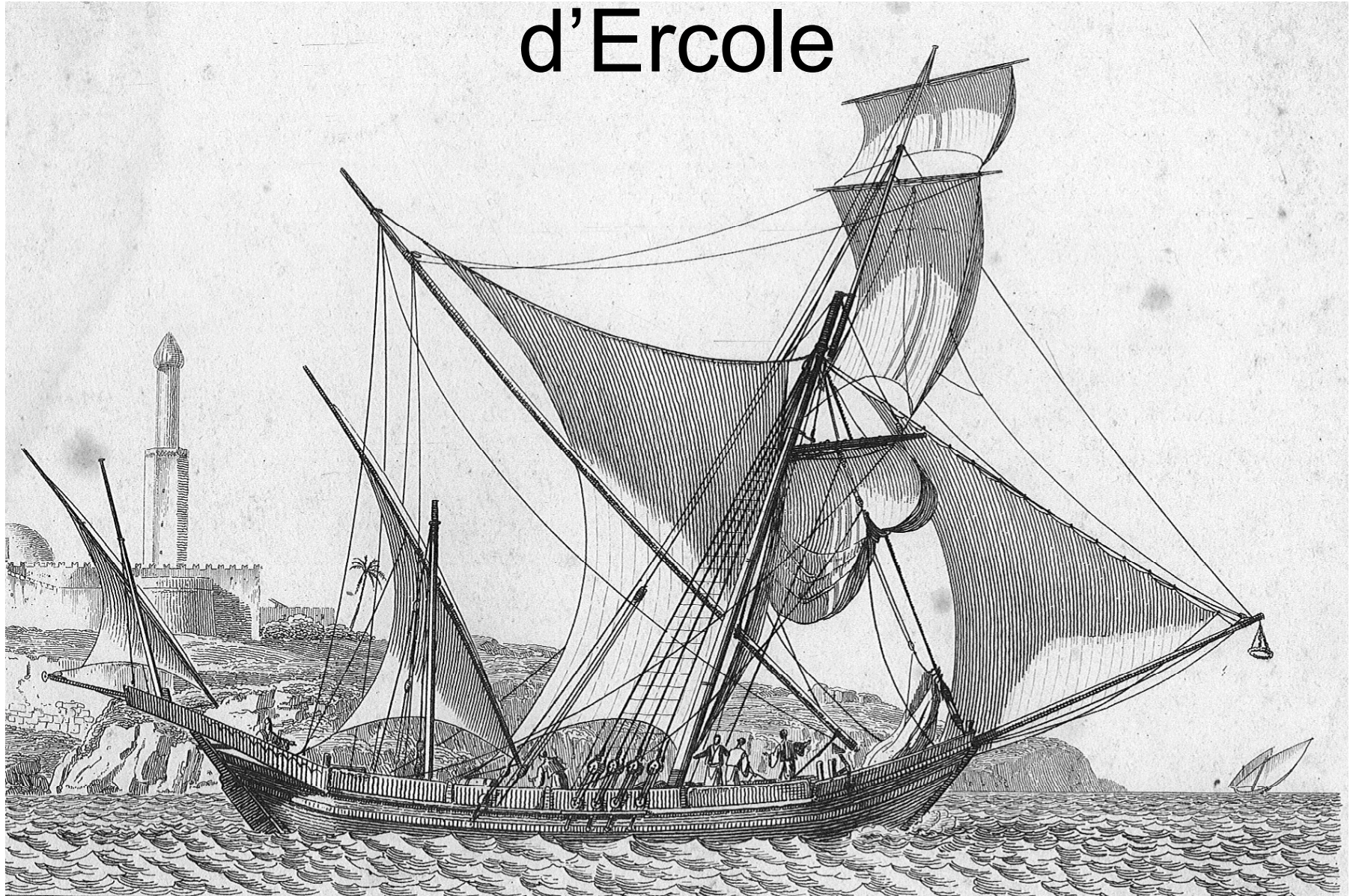
3 per far ricombinare nel sito FRT il gene d'interesse

4 trasfezione transiente per fare esprimere la ricombinase

5 di controllo della trasfezione per l'espressione di CAT

6 domande? avete capito tutti?

navigare oltre le colonne d'Ercole



cosa penserebbe Dante inf. c.XXVI

94, né dolcezza di figlio, né la pietà
del vecchio padre, né 'l debito amore
lo qual dovea Penelopé far lieta,

97, vincer potero dentro a me l'ardore
ch'i' ebbi a divenir del mondo esperto,
e de li vizi umani e del valore;

100, ma misi me per l'alto mare aperto
sol con un legno e con quella compagna
picciola da la qual non fui diserto.

133, quando n'apparve una montagna, bruna
per la distanza, e parvemi alta tanto
quanto veduta non avea alcuna.

136, Noi ci allegrammo, e tosto tornò in pianto,
ché de la nova terra un turbo nacque,
e percosse del legno il primo canto.

139, Tre volte il fé girar con tutte l'acque;
a la quarta levar la poppa in suso
e la prora ire in giù, com'altrui piacque,

142, infin che 'l mar fu sovra noi richiuso".

all'inferno i cattivi consiglieri

come si fa a giudicare se una ricerca è giusta o sbagliata dal punto di vista etico

è giusto che ci siano i comitati etici che però non possono giudicare sull'obiettivo di conoscenza della ricerca ma sulla eventuale procedura non etica e sulla eventuale strumentalità di quella conoscenza

per proseguire si deve conoscere la PCR:

la PCR è una derivazione o applicazione del sistema naturale della sintesi del DNA

in natura c'è solo la sintesi del DNA per duplicarlo prima della mitosi

questa tecnica amplifica quantità di DNA specifiche e limitate in lunghezza in maniera logaritmica raddoppiando il template ad ogni amplificazione

la PCR e le sue applicazioni

la tecnica in cosa consiste

PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica atta ad amplificare in provetta frammenti di DNA di cui siano note le due estremità. Inventata da Kerry Mullis nel 1983 (premio Nobel nel 1993), fu resa efficiente nel 1988 grazie all'uso dell'enzima Taq DNA polymerase del batterio *Thermus aquaticus*, resistente ad alte temperature. Questa tecnica è diventata indispensabile nella biologia per le tante applicazioni anche in medicina diagnostica. Con la PCR è possibile amplificare ed isolare uno specifico segmento di DNA (amplicone) dal genoma di specie viventi o da un DNA artificiale o clonato. Le dimensioni dell'amplicone possono variare da poche decine di paia di basi fino ad un massimo di 15-20 mila paia di basi (un cromosoma ha una lunghezza di milioni di paia di basi). L'amplificazione avviene grazie a cicli successivi di sintesi del segmento di DNA, delimitato da due *primers* o inneschi sintetici (frammenti a singola elica di DNA lunghi ~15-25 basi) complementari alle sue estremità.

come è la tecnica

amplificazione diretta: come si setta un protocollo

le fasi della PCR

temperature

durata e numero dei cicli

scelta dei primers

le basi della PCR

Polimerase Chain Reaction
reazione di polimerizzazione a catena

amplificazione esponenziale del DNA (di qualunque provenienza)

amplificazione in vitro del DNA tramite una DNA polimerasi

Come sintetizza la polimerasi

Ricordare per sempre:

Le polimerasi sintetizzano DNA o RNA in direzione $5' \rightarrow 3'$ a partire da un innesco $3'$ libero su un template.

Il DNA è una molecola a doppia elica, le due eliche sono antiparallele, la sintesi avviene sempre nella stessa direzione per ognuna delle eliche, quindi in verso opposto su ognuna di esse, ma sempre $5' \rightarrow 3'$

La polimerasi poiché sintetizza in direzione $5' \rightarrow 3'$ scorrerà sulla elica di DNA template in direzione $3' \rightarrow 5'$

La reazione a catena della DNA polimerasi

PCR “polymerase chain reaction”

Descrizione della tecnica, metodo, componenti, variabili, strumenti = termociclatori

Tecnica: amplificazione esponenziale a cicli successivi tramite DNA polimerasi (adesso e' termo resistente)

**DNA polimerasi di “thermophilus aquaticus” (Taq polimerasi)
- salto di qualita' del metodo, molto piu' efficiente.**

Le applicazioni si sono moltiplicate nella ricerca biologica e medica, nella diagnostica e medicina forense (legale)

Il principio sfrutta l'efficienza (velocita' di sintesi) della DNA polimerasi utilizzando due inneschi (primers) artificiali scelti dallo sperimentatore sulla sequenza da amplificare (modo esponenziale).

Come si fa la PCR, in cosa consiste

Reazione a Catena di Polimerizzazione RCP $\leftrightarrow$ PCR

- amplificazione tramite sintesi de-novo di nuovi filamenti di DNA da parte della DNA polimerasi di *Thermophilus aquaticus*
- definizione: reazione ad amplificazione esponenziale con un raddoppio teorico della quantità di DNA ad ogni ciclo di sintesi.

La DNA polimerasi di cosa ha bisogno ?

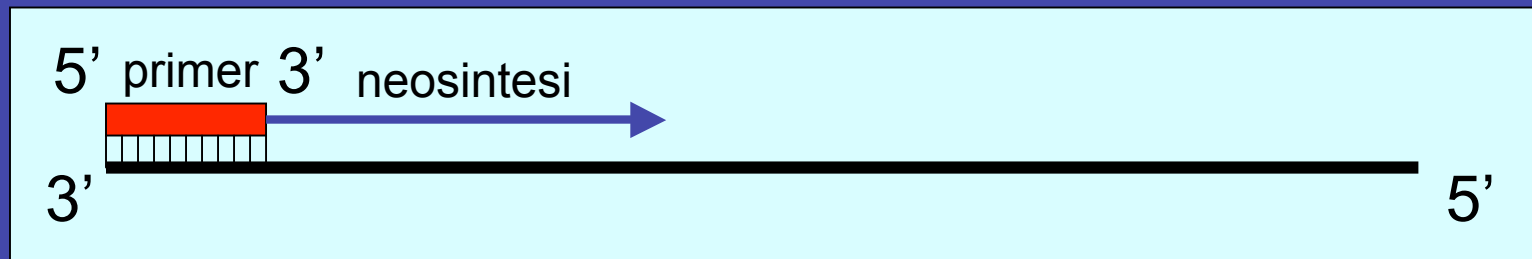
- del templatato denaturato a singolo filamento (forza replicativa?)
- dei primers (inneschi)
- dei nucleotidi per la sintesi
- del tampone
- del Magnesio

applicazione del sistema naturale

la sintesi del DNA è semiconservativa (duplicazione)

le DNA polimerasi e anche le RNA pol sintetizzano tutte sullo stesso modello di funzionamento:

con il verso 5'-3' su uno stampo (templato) antiparallelo 3'-5' partendo dal 3' libero di un innesco (primer) appaiato sul templato

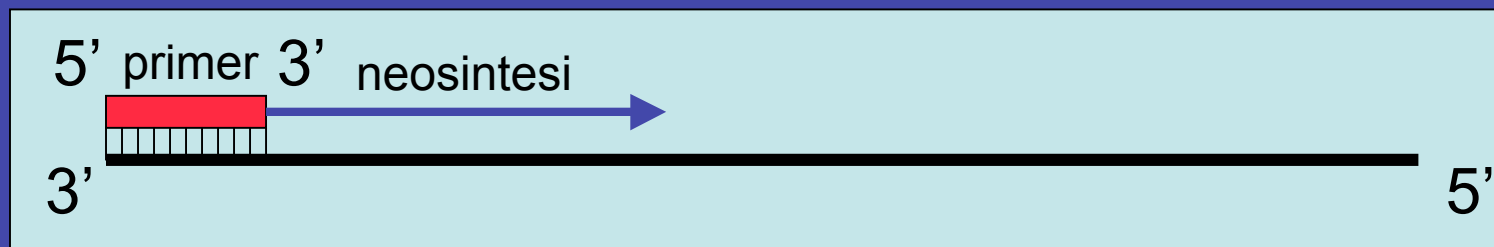


anche in vitro si può sfruttare il metodo naturale di sintesi

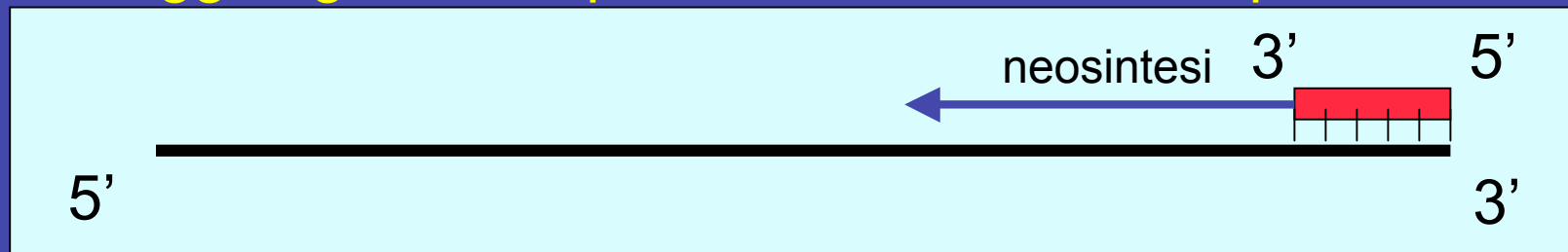
l'invenzione geniale

dalla amplificazione lineare a quella esponenziale:

la sintesi in vitro di DNA già era stata usata anche per le reazioni di sequenziamento, ma solo per una delle due eliche



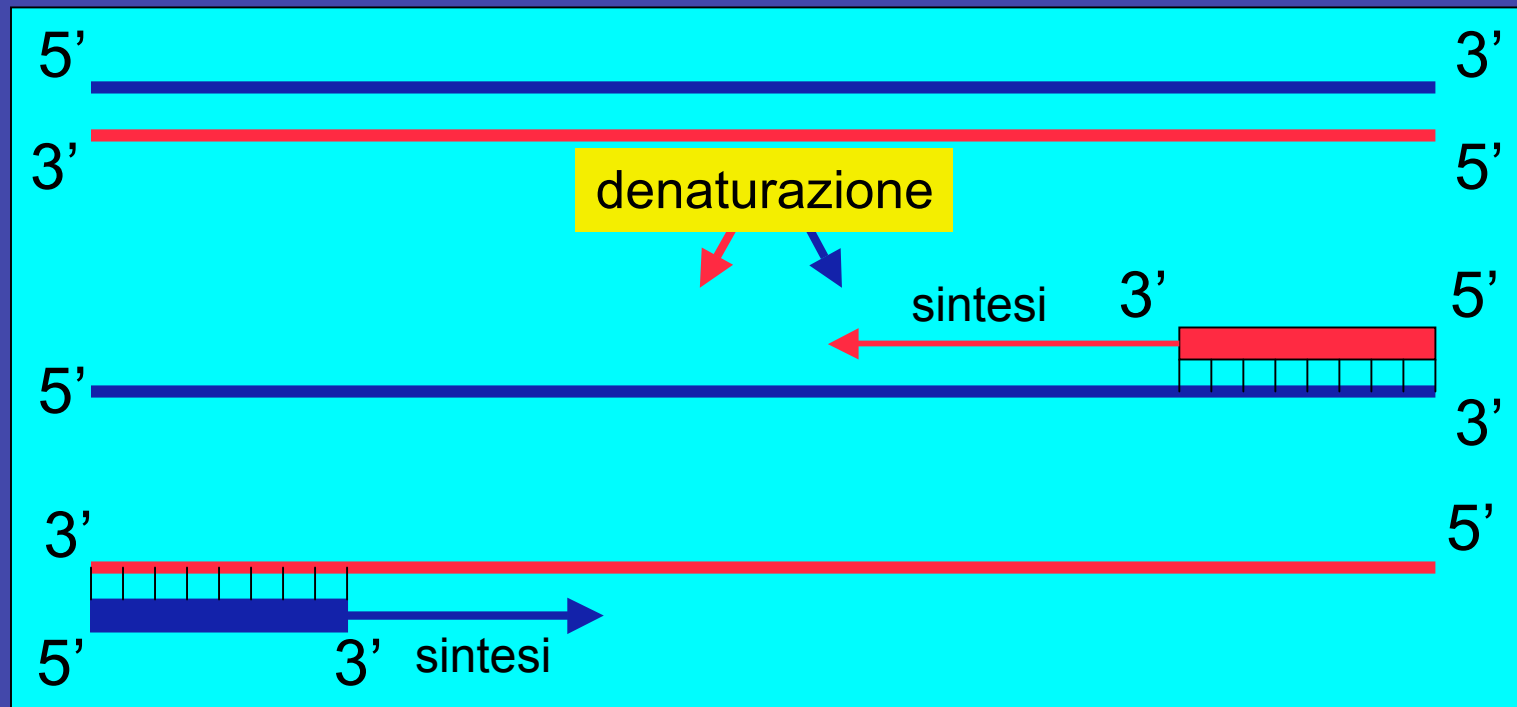
se aggiungiamo un primer sulla catena complementare:



otteniamo una amplificazione di tutte e due le eliche,
e poi ? se la reazione continua è esponenziale !

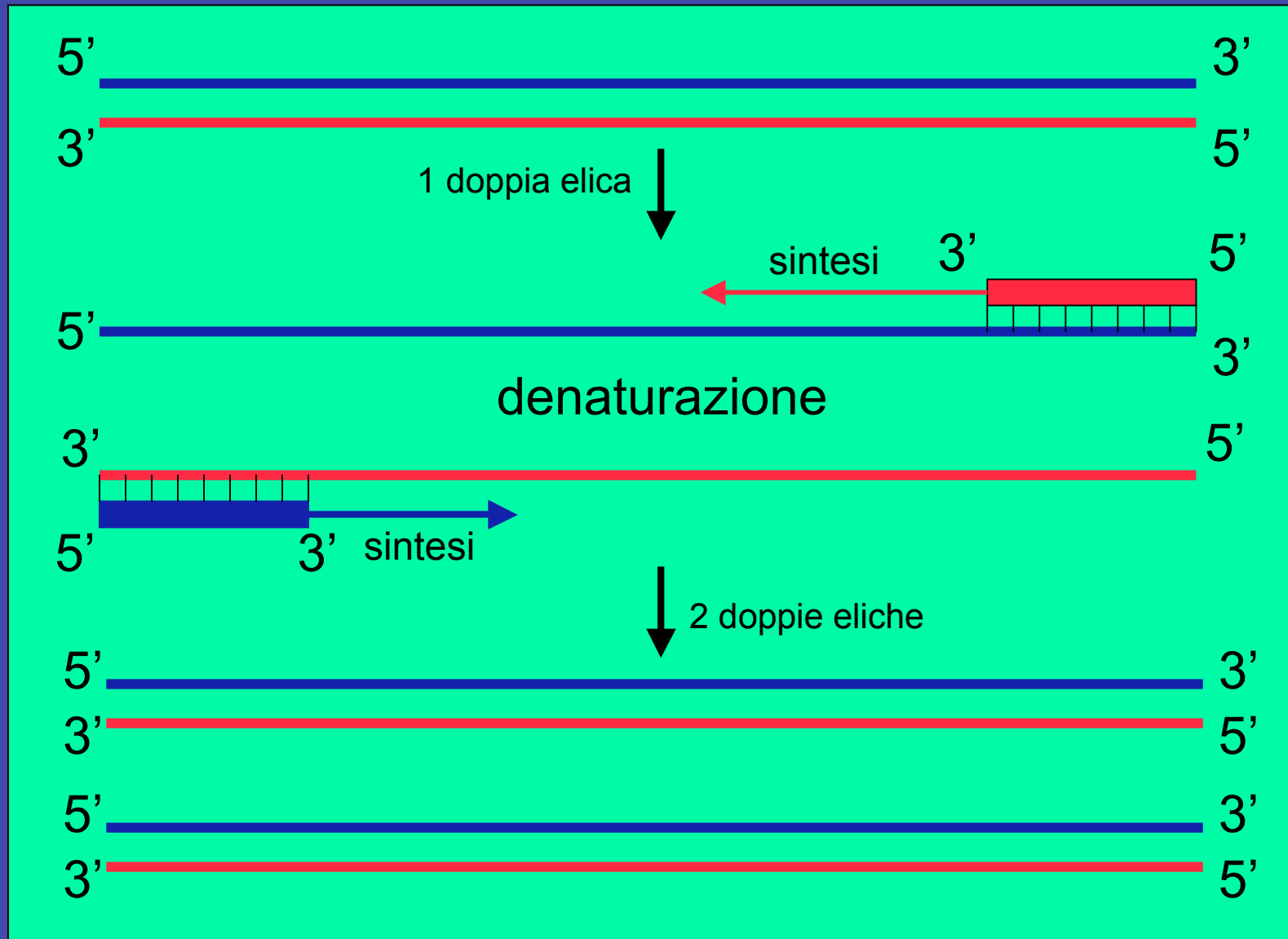
attenzione al verso dei primers

la doppia elica di DNA ha i due filamenti antiparalleli dovuti al sistema che è stato selezionato in origine con le polimerasi degli acidi nucleici che sintetizzano tutte nello stesso verso $5' \rightarrow 3'$ da un $3'$ libero e su un template $5' \rightarrow 3'$

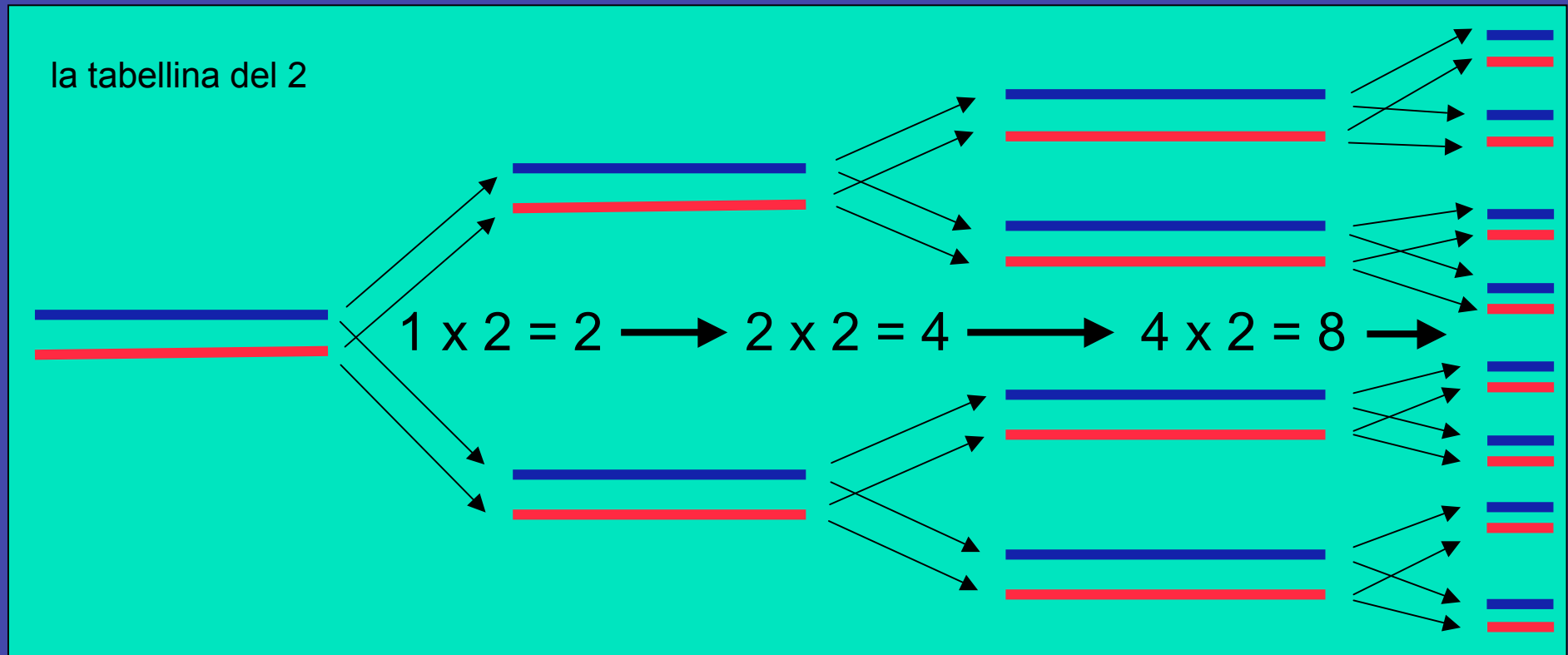


dopo la sintesi si otterranno 2 doppie eliche identiche alla prima

se la reazione in vitro continua

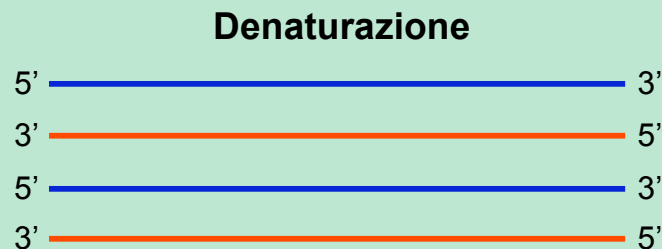
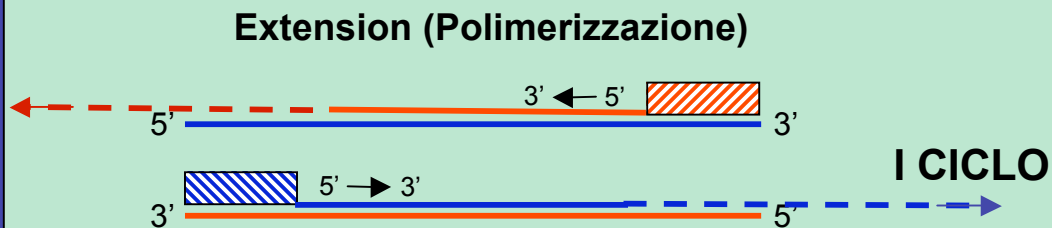
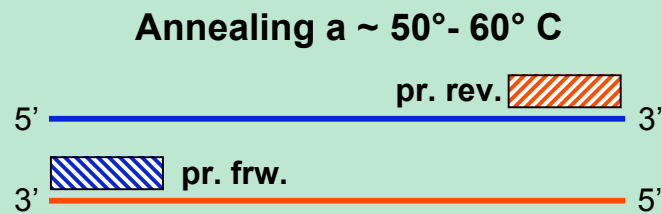
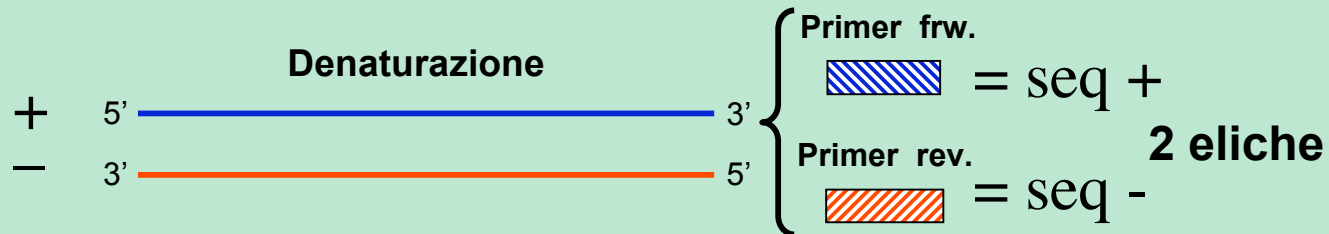


diventa una reazione esponenziale



ma come è possibile fare avvenire la reazione senza farla fermare ? da sola una doppia elica non si duplica se non si ha la separazione (denaturazione) delle due eliche neosintetizzate !

Il ciclo (non il velocipede)

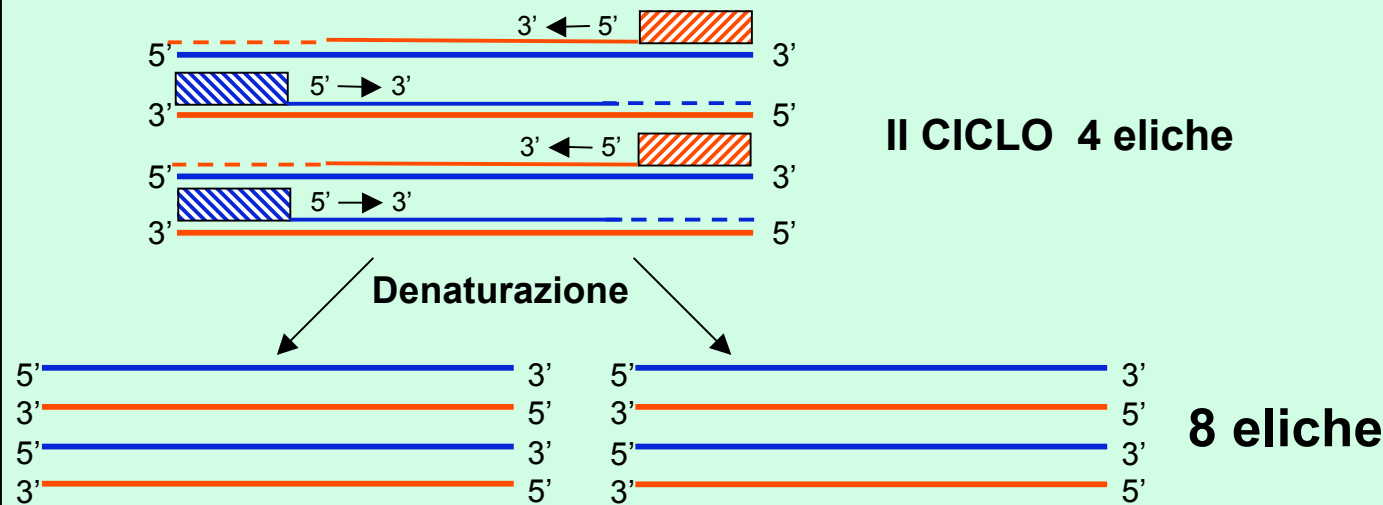


4 eliche



Ciclo continuo

Annealing Extension (Polimerizzazione)



III CICLO → **16 eliche** **IV ciclo** → **32 eliche.....**

La crescita e' esponenziale : teoricamente ad ogni ciclo un raddoppio di DNA, ma dipende dalla messa a punto del protocollo di reazione, molte variabili da ottimizzare

- senza contaminazioni amplificazione da quantita' minime di DNA (femtogrammi o singole cellule)

- genoma diploide → 2 doppie eliche di templatato in interfase

Le condizioni di reazione di ogni passaggio

vanno determinate per i tempi, temperature e quantita' (conc.) ogni ciclo = 3 passaggi (fasi)

I passaggio denaturazione (5-10 min. quella iniz. della reazione)

II passaggio appaiamento dei primers (annealing)

III passaggio di sintesi del DNA,
estensione del filamento di DNA a partire dai primers (inneschi)

Fine del ciclo

Alla fine dei cicli programmati viene fatta una estensione di 5 -10 min. per assicurare il completamento della sintesi di tutti i nuovi frammenti iniziati e non terminati

Le componenti per la reazione:

Volume di reazione: da 10 a 50 μl (max 100 μl) per una preparativa.

Il DNA (templato), abbastanza pulito, non deve essere purissimo, la quantità può essere molto poca, normalmente si usano 10-100 ng di un genoma eucariotico, più di 500 ng possono inibire la reazione

La Taq polimerasi, DNA polimerasi di “thermophilic eubacterium thermus aquaticus” resiste a 95°, frequenza di errore superiore a quelle di eucarioti, 26×10^{-6} , ora ce ne sono per diverse finalità, a basso tasso di errore = high fidelity 8.5×10^{-6} , e per frammenti lunghi genomici. Se ne usa da meno di 1U fino a 5 U, ma se si fanno molti cicli conviene spezzare la reazione in due fasi e riaggiungerla

dNTPs: conc. standard 100 μM per ognuno

Il tampone: sale di Tris, il Mg concentrazione empirica tra 0.5 mM e 4.5 mM, ogni Taq pol. ha un tampone con concentrazioni saline (buffer) ideali

I primers: scelti per funzionare in coppia, evitare GC ed AT finali, palindromi, sequenze complementari, devono avere T_m (melting) simili,

H₂O q.b. sterile incontaminata per arrivare al volume finale