

Realizzare una PCR senza termociclatore

a cura di E. Scortecci e V. Soglio

Nei laboratori di biologia molecolare si possono ottenere molte copie di un frammento di DNA, es. di un gene, tramite una procedura chiamata Reazione a Catena della Polimerasi (PCR). Essa richiede l'utilizzo di un particolare strumento, il termociclatore, in grado di far variare ciclicamente la temperatura e i tempi per cui essa è mantenuta costante. Un'apparecchiatura di questo tipo è molto costosa e non è presente nei laboratori scolastici, ma usando dei bagnetti termostatici o dei blocchi termici è possibile realizzare una PCR 'casalinga'. Per la complessità della teoria che è alla base di questo esperimento, si consiglia di proporlo agli allievi delle ultime classi delle scuole secondarie di secondo grado.

Obiettivo

Amplificare un campione di DNA tramite una Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) senza usare il termociclatore.

Procedimento

Prima di iniziare l'esperimento è necessario scegliere quale DNA usare e quale suo frammento amplificare. I reagenti che consentono di delimitare la regione di DNA da copiare sono i primer, corte sequenze di DNA a singolo filamento. Essi appaiandosi alle regioni fiancheggianti il tratto di DNA di interesse consentono di amplificare solo quella specifica regione. La temperatura a cui avviene l'appaiamento dipende dalla sequenza nucleotidica dei primer, per questo motivo non è la stessa per tutte le reazioni di PCR. Un esempio di gene di interesse scientifico che si può scegliere per la reazione di PCR è il gene che codifica per l'actina.

1. Accendere i 3 bagnetti termostatici e impostare la temperatura nel primo a 94°C, nel secondo a T°C (temperatura di appaiamento dei primer scelti) e nel terzo a 72°C.¹
2. Verificare, con un termometro posizionato in ciascun bagnetto, che la temperatura rimanga costante per tutta la durata dell'esperimento.
3. In una provetta da 200 µl aggiungere nel seguente ordine:
 - 31 µl H₂O deionizzata sterile
 - 5 µl Soluzione tampone 10X specifica per l'enzima
 - 2 µl Primer Forward 10 µM
 - 2 µl Primer Reverse 10 µM
 - 5 µl dNTPs 5 mM
 - 1 µl Taq DNA polimerasi
 - 4 µl DNA
4. In una seconda provetta da 200 µl aggiungere tutti i componenti della miscela di reazione tranne il DNA. Questo campione rappresenterà il controllo negativo dell'esperimento.

¹ Nel caso in cui vengano usati blocchetti termici che ospitano provette più grandi di quelle da 200 µl, utilizzare come adattatori delle provette da 1 ml contenenti dell'acqua che servirà a mantenere costante la temperatura all'interno del tubo (vedi figura a lato).



Tempo previsto

3 ore

Materiali e reagenti

- ✓ Provette da 200 µl
- ✓ Acqua deionizzata sterile
- ✓ Soluzione tampone 10X specifica per la Taq DNA polimerasi
- ✓ Primer Forward 10 µM
- ✓ Primer Reverse 10 µM
- ✓ dNTPs: miscela dei 4 nucleotidi (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) tutti alla stessa concentrazione 5mM
- ✓ Taq DNA polimerasi (enzima)
- ✓ DNA da amplificare
- ✓ Olio minerale: prodotto specifico per la biologia molecolare
- ✓ Parafilm

Strumentazione

- ✓ 3 bagnetti termostatici o 3 blocchi termici
- ✓ 3 termometri
- ✓ 3 cronometri

5. A entrambe le provette aggiungere eventualmente 5 μ l di olio minerale che rimanendo in superficie evita l'evaporazione.
6. Sigillare le provette con il parafilm.
7. Procedere ripetendo per 30 volte il ciclo base illustrato di seguito.

Il ciclo base è costituito da 3 fasi (vedi figura sotto) ognuna caratterizzata da una ben precisa temperatura e una determinata durata:

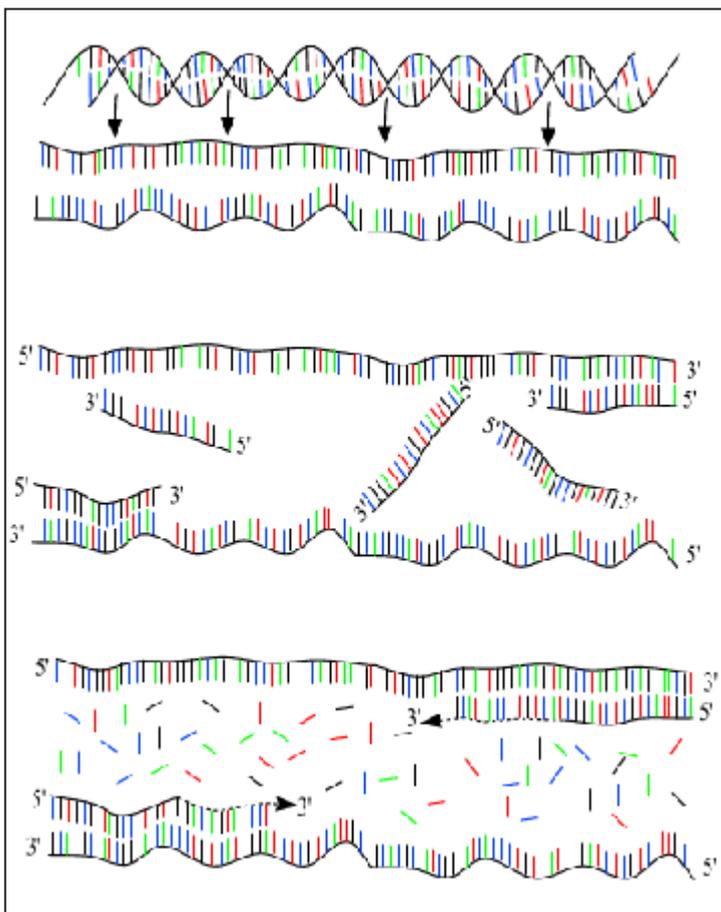
- Fase 1: immergere la provetta nel bagnetto a 94°C per 40 secondi
- Fase 2: trasferire la provetta nel secondo bagnetto a T°C e lasciarla immersa per 40 secondi
- Fase 3: trasferire la provetta nel bagnetto a 72°C e lasciarla immersa per 1 minuto

Per ripetere il ciclo trasferire di nuovo la provetta nel bagnetto a 94°C e continuare con le fasi 2 e 3. In totale il ciclo base va ripetuto 30 volte.

Affidare a uno studente il compito di trasferire la provetta da un bagnetto all'altro e consegnare i 3 cronometri a 3 diversi studenti incaricati di controllare l'esatta durata di ciascuna fase.

Osservazioni

Durante la fase 1, chiamata di denaturazione, i due filamenti di DNA si aprono. Nella seconda fase avviene l'appaiamento cioè l'ibridazione del DNA stampo con i primer, Forward e Reverse. Infine, nella fase 3 si ha l'estensione ovvero l'enzima DNA polimerasi si lega ed estende la catena di DNA a partire dai primer e usando come "mattoni" i nucleotidi liberi (dNTPs).



Fase 1: denaturazione del DNA a 94°C

Fase 2: appaiamento dei primer a T°C con le sequenze complementari sul DNA campione

Fase 3: estensione a 72 °C del filamento di DNA a partire dai primer

Credit: Andy Vierstraete 1999

È possibile visualizzare il risultato della PCR tramite un'elettroforesi su gel d'agarosio e successiva colorazione, vedi protocolli 'Una cella elettroforetica fatta a scuola' e 'Elettroforesi di DNA'.