

# La reazione a catena della polimerasi (PCR)

di Ofelia Leone e Vincenzo Mandarino

La Polymerase Chain Reaction (PCR) o reazione di amplificazione a catena è una tecnica che permette di amplificare una specifica sequenza di DNA milioni di volte in poche ore. La tecnica è stata inventata nel 1983 da Kary Mullis che ricevette per questo il premio Nobel per la chimica 10 anni dopo.

La PCR sta rivoluzionando molte aree della ricerca in genetica, quali la diagnosi delle malattie genetiche, la genetica forense, lo studio dei genomi e dell'evoluzione molecolare.

In una cellula che sta per dividersi, la **replicazione (duplicazione)** del DNA implica una serie di reazioni mediate da enzimi specifici, che portano alla formazione di una copia fedele dell'intero genoma.

Uno dei passaggi essenziali di questo processo è la formazione di un **innesco** (in inglese **primer**) per l'attacco dell'**enzima DNA polimerasi**, la quale poi produce il nuovo filamento di DNA, complementare a quello preesistente.

La sintesi consiste nel concatenamento dei nucleotidi a partire da **precursori** liberi.

La **PCR** consiste nella ripetizione **in provetta** di questi passaggi per numerosi cicli.

**Gli elementi essenziali della reazione, ovvero:**

- **i primer**
- **i precursori**
- **l'enzima DNA polimerasi**
- **il DNA da duplicare**

**devono essere introdotti nella reazione dallo sperimentatore.**

Durante la PCR, per separare le molecole del DNA in singoli filamenti, si aumenta la temperatura e delle brevi sequenze di DNA sintetizzato artificialmente a singolo filamento (20-30 nucleotidi) vengono usate come primers. Due diverse sequenze di primers sono utilizzate per permettere l'amplificazione della **regione bersaglio**; un primer è complementare a un filamento di DNA all'inizio della regione bersaglio; un secondo primer è complementare all'altro filamento, alla fine della regione bersaglio.

Per effettuare una reazione di PCR, una piccola quantità di DNA contenente il bersaglio è aggiunta a una provetta con una soluzione che contiene:

- la DNA polimerasi,
- i piccoli primers oligonucleotidici,
- i 4 dideossinucleotidi che servono per costruire il DNA,
- il cofattore  $MgCl_2$ .

La miscela di PCR è sottoposta a una serie di cicli ripetuti che consistono in:

- **Denaturazione del DNA** in singoli filamenti (94-96°C)
- **Ibridazione (annealing)** dei primers alla loro sequenza complementare, ad entrambe le estremità delle sequenze (50-65°C)
- **Estensione** di ciascuno dei due filamenti di DNA a partire da ogni primer, mediante l'enzima DNA polimerasi (72°C)

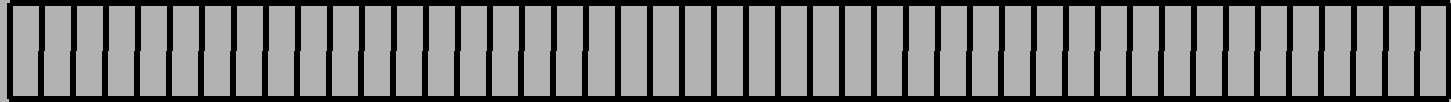
Man mano che l'amplificazione procede, la sequenza di DNA compresa tra i 2 primer raddoppia dopo ogni ciclo.

Dopo 30 cicli si ottiene un'amplificazione teorica di un fattore di un **1.000.000.000**.

Due importanti innovazioni hanno reso possibile l'automazione della PCR.

È stata isolata una **DNA polimerasi termoresistente** dal batterio *Thermus aquaticus*. Questo enzima detto "**Taq**" **DNA polimerasi**, resta attivo nonostante i ripetuti aumenti di temperatura nei vari cicli;

Sono state inventate delle macchine (**DNA thermalcycler**) nelle quali un computer controlla i ripetuti cambiamenti di temperatura richiesti per la PCR.



molecola di DNA da esaminare



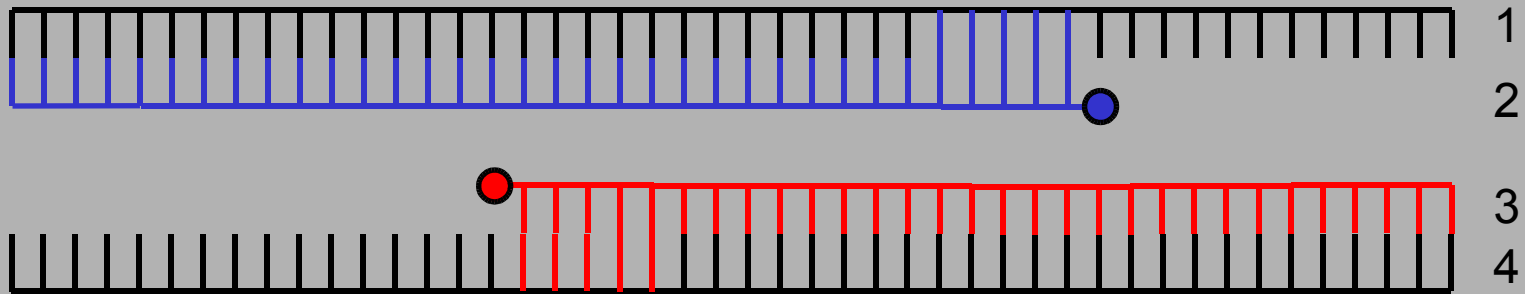
denaturazione del DNA in singoli filamenti (94-96°C)



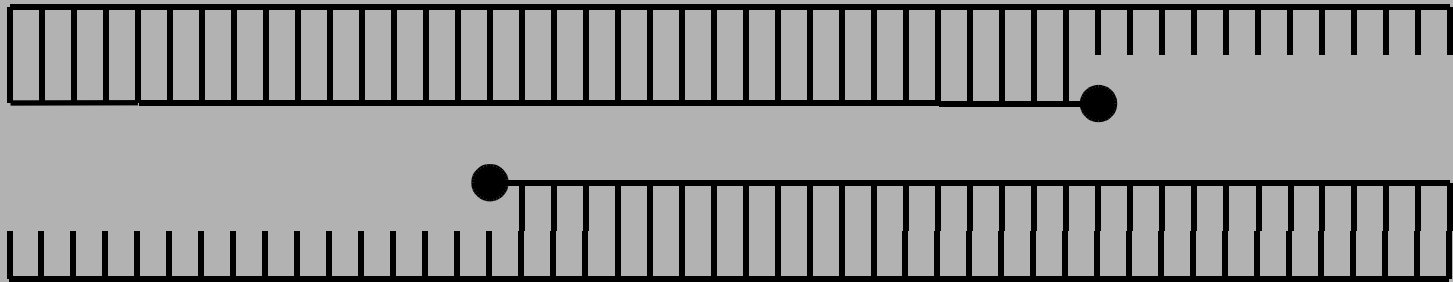
ibridazione (annealing) dei primers (50-65°C)

estensione dei filamenti di DNA mediante l'enzima DNA polimerasi

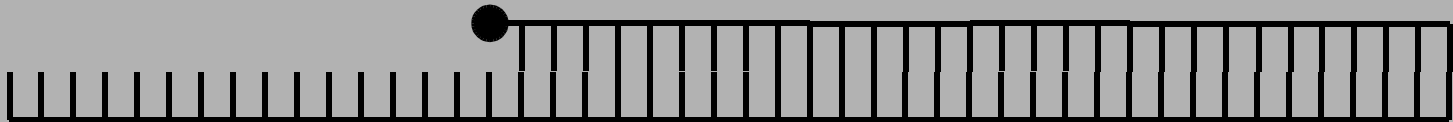


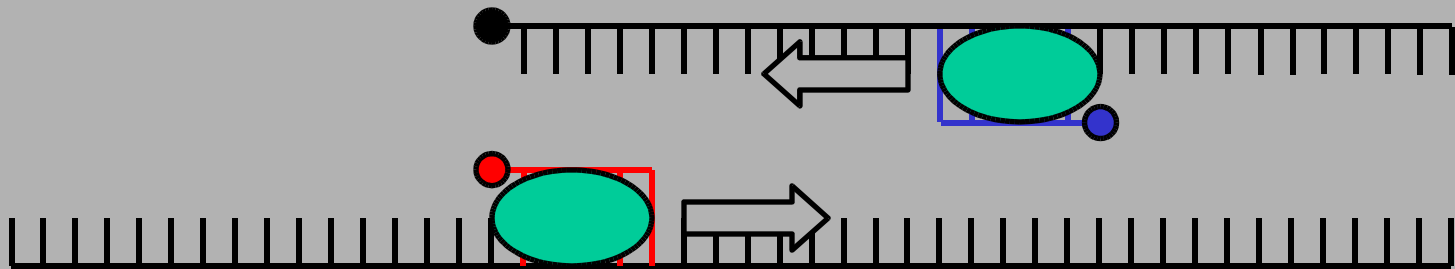
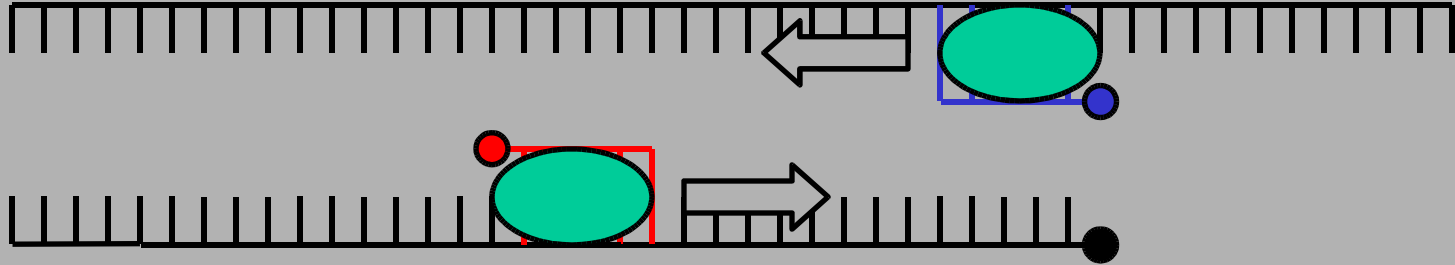


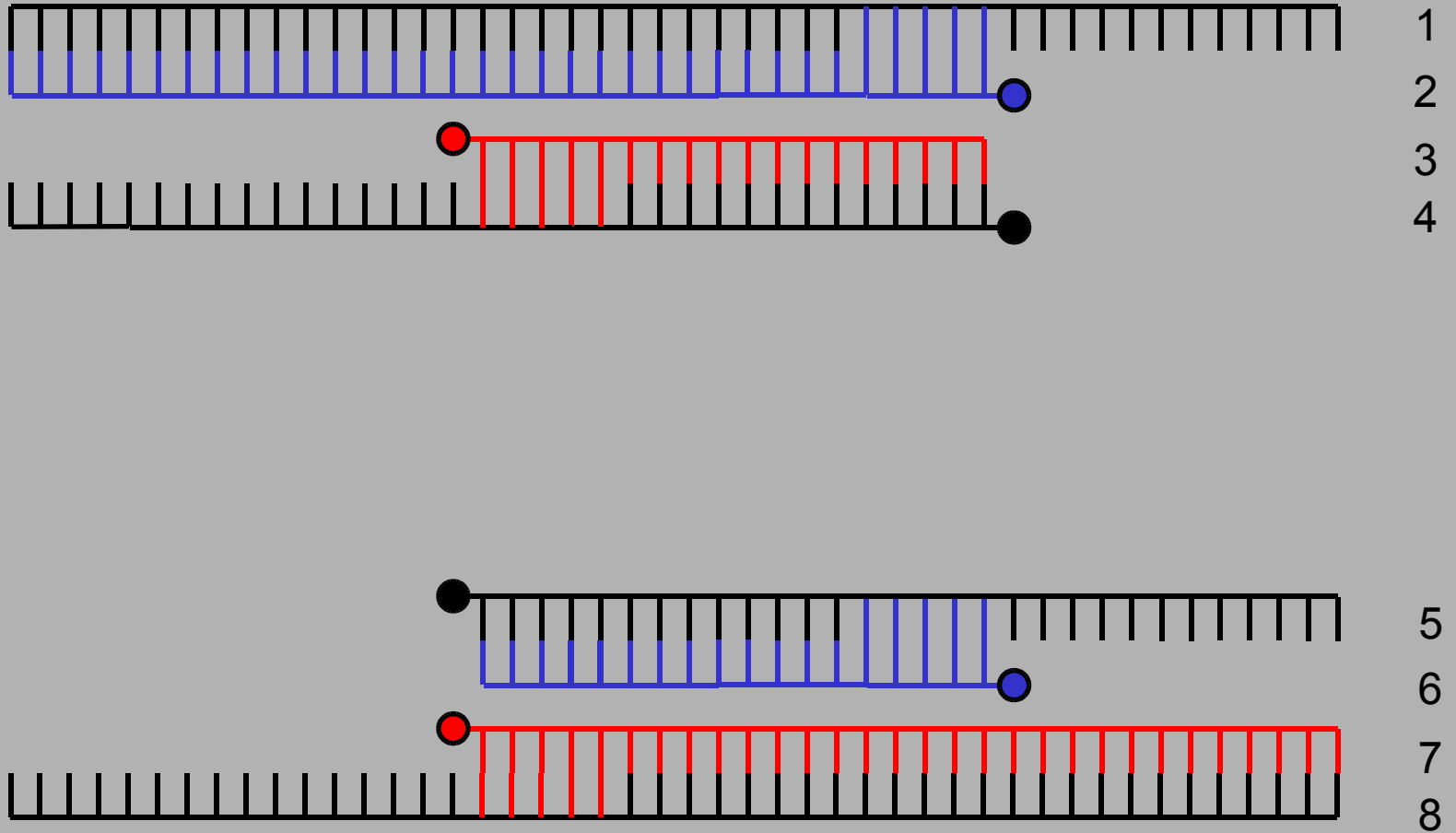
vengono creati 2 nuovi filamenti (numeri 2 e 3)  
parzialmente limitati dalle estremità della regione  
bersaglio



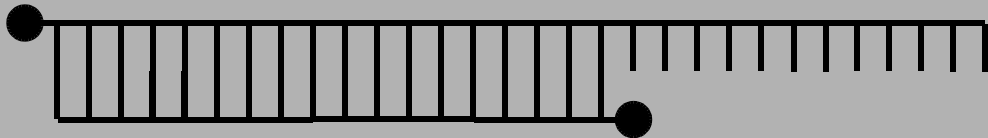
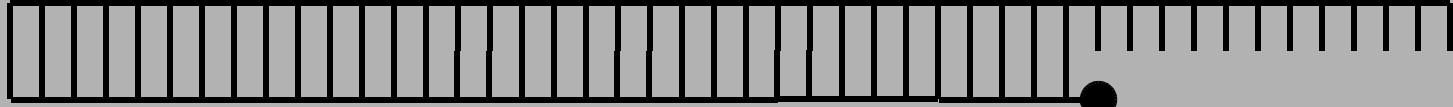
inizio del secondo ciclo: il processo si ripete sulle nuove coppie di filamenti prodotte

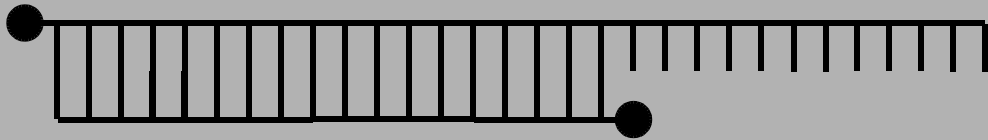
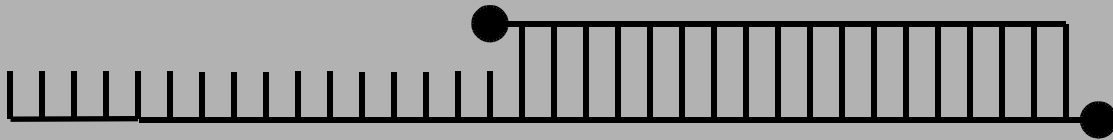
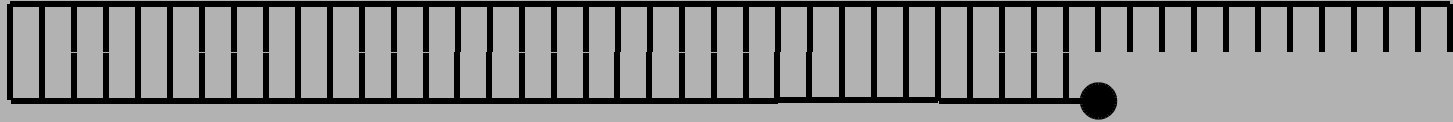


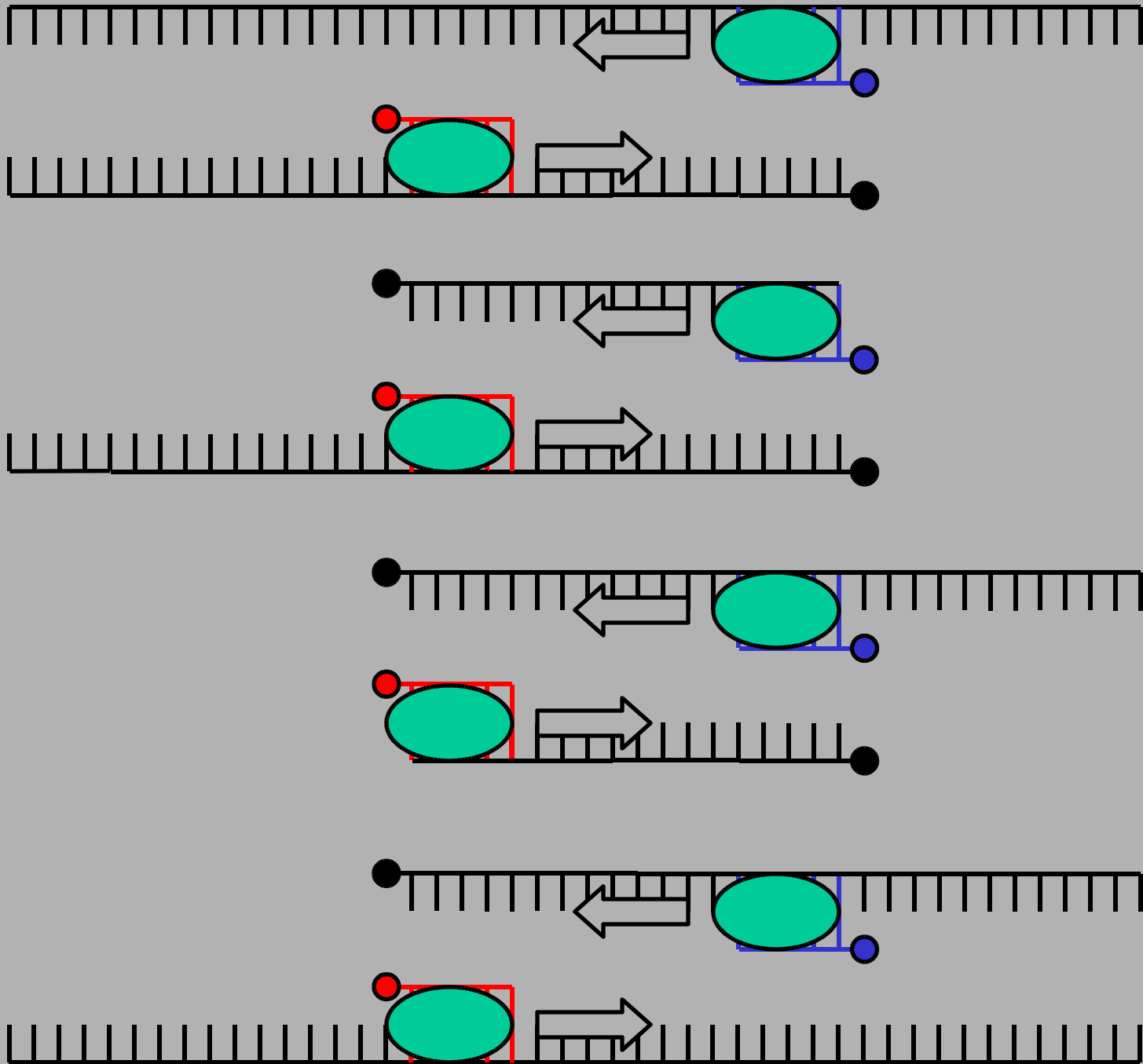




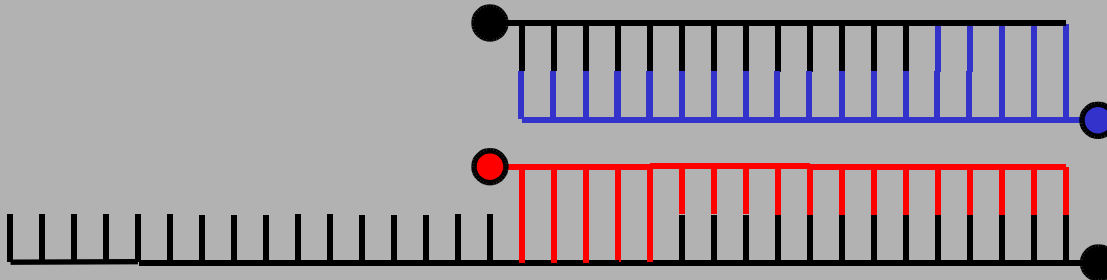
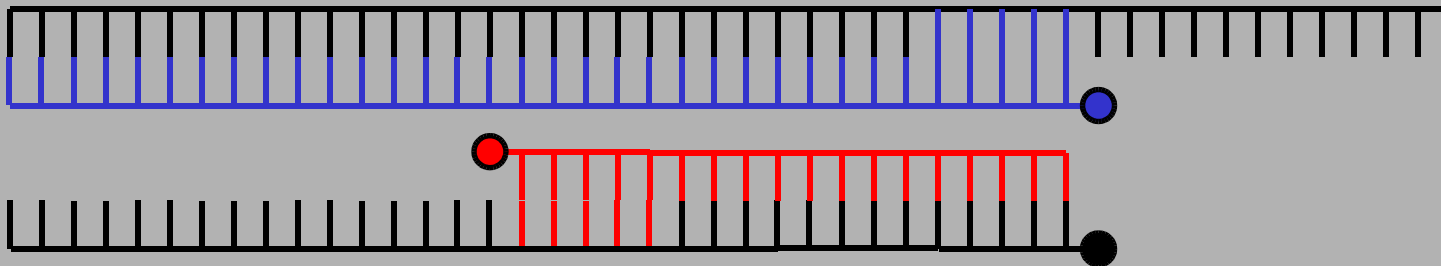
fine del secondo ciclo: compaiono filamenti (numeri 3 e 6) di lunghezza definita e pari alla dimensione della regione bersaglio



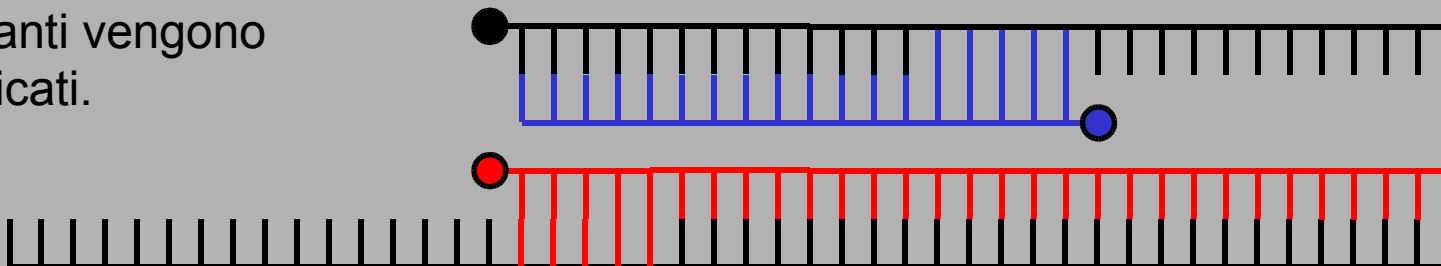
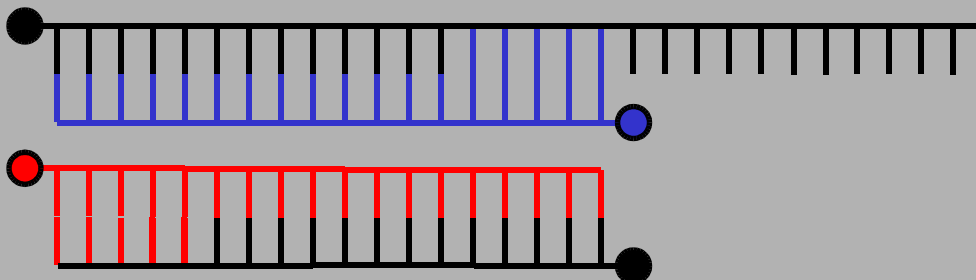


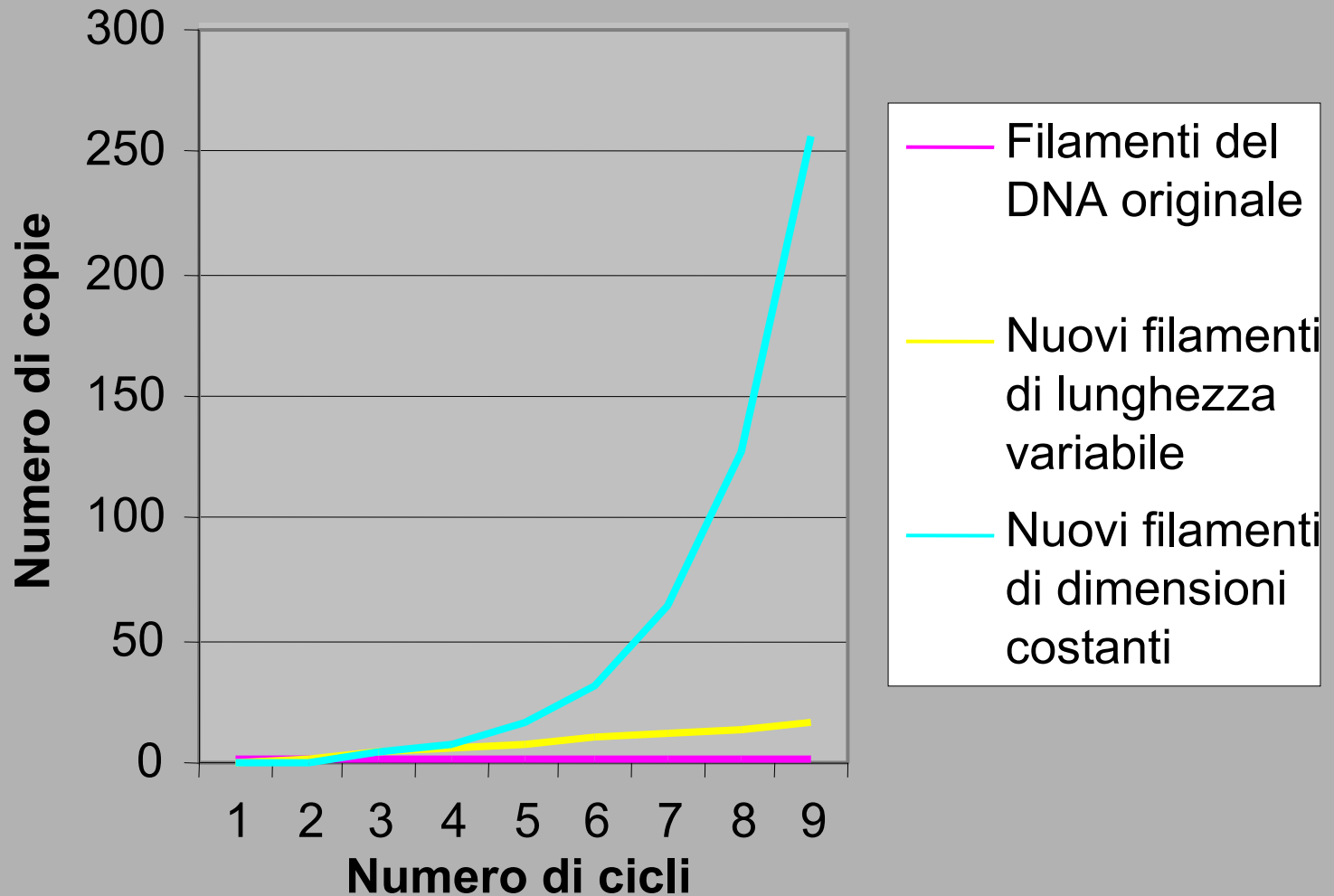






Nel terzo ciclo ed in quelli successivi vengono creati due nuovi filamenti di dimensioni variabili a partire dal DNA originale, mentre tutti i filamenti di dimensioni costanti vengono duplicati.





L'intero procedimento porta ad un accumulo esponenziale dei filamenti che iniziano e finiscono in corrispondenza dei primer. Alla fine della reazione (20-30 cicli) questi costituiranno il prodotto principale. I restanti prodotti costituiranno una quota trascurabile.