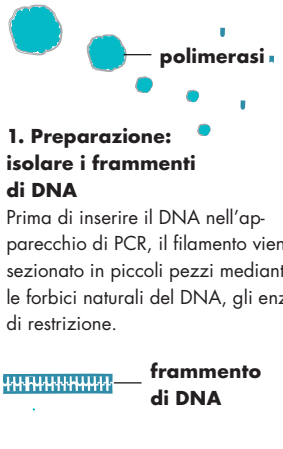
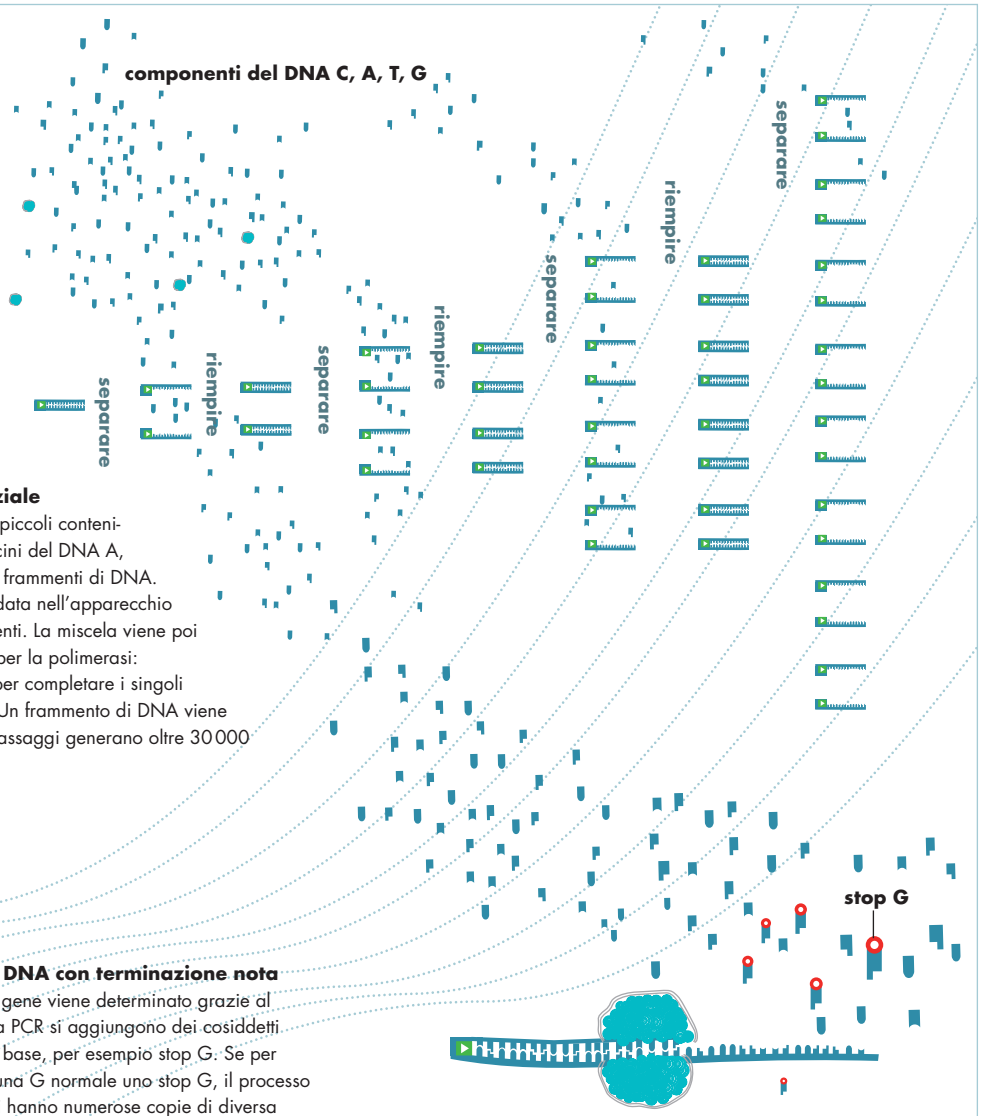
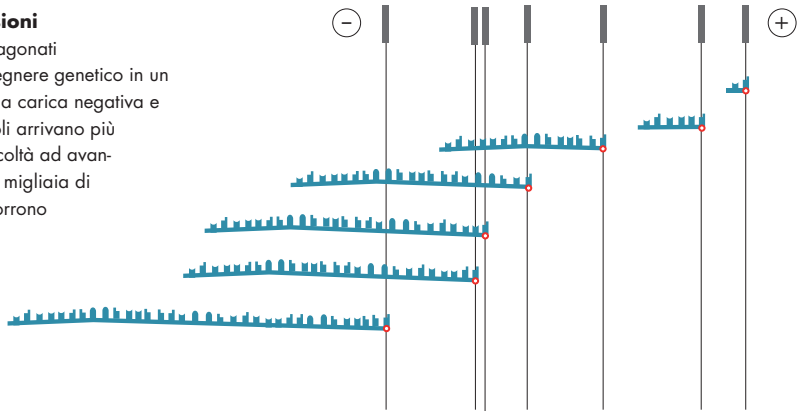
Genomica – il mondo del DNA





1. Preparazione: isolare i frammenti di DNA
Prima di inserire il DNA nell'apparecchio di PCR, il filamento viene sezionato in piccoli pezzi mediante le forbici naturali del DNA, gli enzimi di restrizione.

2. Tecnica PCR: crescita esponenziale
Per effettuare una PCR, si prendono dei piccoli contenitori di plastica dove si mettono i mattoncini del DNA A, C, T, G nonché gli enzimi polimerasi e i frammenti di DNA. Questa miscela viene innanzitutto riscaldata nell'apparecchio di PCR. Il DNA si divide in singoli filamenti. La miscela viene poi raffreddata a una temperatura ottimale per la polimerasi: l'enzima si avvale delle coppie di basi per completare i singoli filamenti e formare dei doppi filamenti. Un frammento di DNA viene così duplicato ad ogni passaggio. 15 passaggi generano oltre 30 000 frammenti di DNA identici.

3. Sequenziamento: frammenti di DNA con terminazione nota
L'ordine dei singoli mattoni di DNA in un gene viene determinato grazie al metodo d'interruzione della catena. Per la PCR si aggiungono dei cosiddetti codoni di stop per un determinato tipo di base, per esempio stop G. Se per caso la polimerasi incorpora al posto di una G normale uno stop G, il processo di copiatura s'interrompe. Dopo la PCR si hanno numerose copie di diversa lunghezza dei frammenti di DNA da studiare e tutti terminano con uno stop G.

4. Elettroforesi: ordinare in base alle dimensioni
I frammenti ottenuti sono troppo piccoli per essere paragonati direttamente fra loro. Vengono quindi iniettati dall'ingegnere genetico in un gel attraversato da corrente. I frammenti di DNA sono a carica negativa e migrano quindi verso il polo positivo. I pezzi più piccoli arrivano più lontano di quelli più grandi, che hanno maggiore difficoltà ad avanzare nel gel. Dopo la PCR ogni pezzo è disponibile in migliaia di copie. Poiché i frammenti della stessa lunghezza percorrono la stessa distanza nel gel, si possono distinguere delle bande in questa sostanza. Ogni banda corrisponde a un segmento che termina con G. Se due bande sono poste fianco a fianco, significa che anche nel gene ci sono due G vicine. Se le bande sono molto distanti fra loro, vuol dire che fra loro vi sono molte altre lettere. Ripetendo l'operazione con stop A, stop C e stop T si può determinare l'intera sequenza genetica.