



**LICEO "PITAGORA"**

Scientifico, Scientifico opzione Scienze Applicate, Linguistico



**CAMBRIDGE**  
International Examinations

# P.C.T.O BIOTECNOLOGIE

*(Percorsi per le Competenze  
Trasversali e per l'Orientamento)*

A.S. 2022-2023

**Salvatore Francesco SEMPREVIVO Classe VA S.A**

Tutor del percorso: *prof.ssa Crocco Paolina*

LICEO STATALE "PITAGORA" RENDE

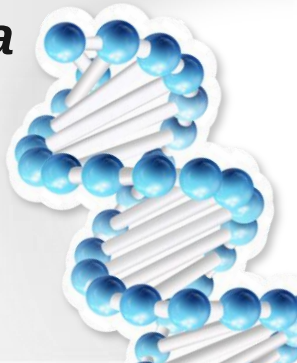
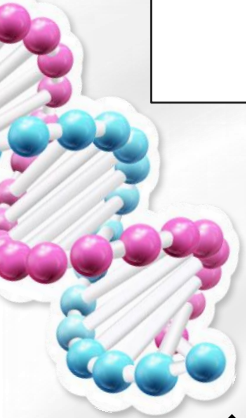
 **Alternanza**  
SCUOLA - LAVORO

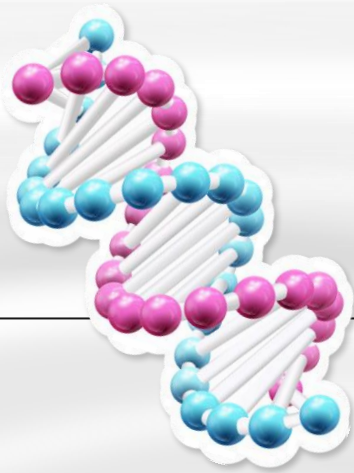


# INDICE

## PROGETTO P.C.T.O BIOTECNOLOGIE

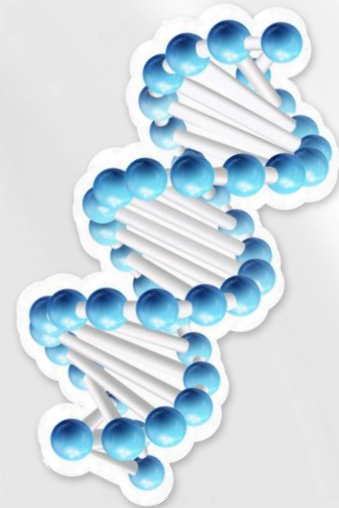
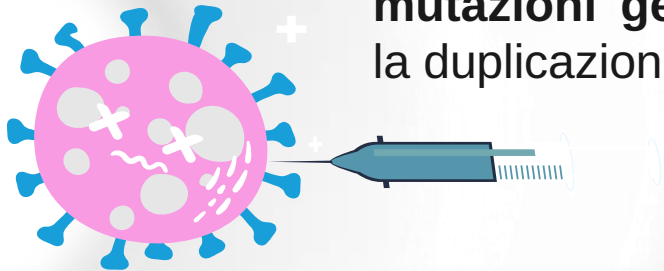
- ❖ *P.C.T.O A.S. 2021/2022: Varianti e Mutazioni*
- ❖ *P.C.T.O A.S. 2022/2023: Dalla PCR all'elettroforesi passando per l'estrazione del DNA e la Bioinformatica*





## LE MUTAZIONI DEL SARS-COV-2

Le vaccinazioni hanno inibito il virus del SARS-CoV-2, ma col passare del tempo si sono sviluppate tra la popolazione varianti del virus altamente contagiose. Esse sono delle **mutazioni genetiche**, dovute ad errori durante la duplicazione.

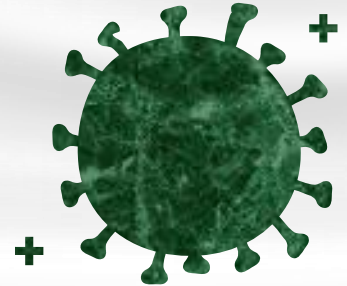
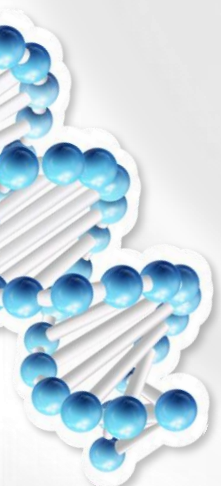


# VACCINI E MUTAZIONI



## *PERCHÈ GLI ATTUALI VACCINI NON SONO EFFICACI CONTRO LE MUTAZIONI ?*

Le varianti emergono perché il virus, replicandosi, tende a sviluppare nuove **mutazioni**. Le mutazioni **non influiscono** necessariamente **sull'efficacia di un vaccino** contro il **virus**. I vaccini possono proteggere la comunità da eventuali nuove varianti man mano che queste vengono rilevate.



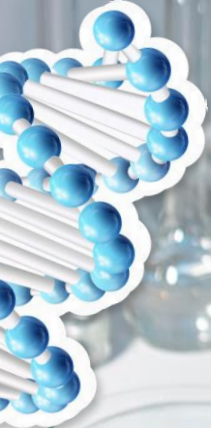
# EFFICACIA DEI VACCINI CONTRO LE VARIANTI

Vaccine	Ancestral		Alpha		Beta		Gamma		Delta		Omicron	
	Severe disease	Infection	Severe disease	Infection	Severe disease	Infection	Severe disease	Infection	Severe disease	Infection	Severe disease	Infection
AstraZeneca	94%	63%	94%	63%	94%	69%	94%	69%	94%	69%	71%	36%
CanSino	66%	62%	66%	62%	64%	61%	64%	61%	64%	61%	48%	32%
CoronaVac	50%	47%	50%	47%	49%	46%	49%	46%	49%	46%	37%	24%
Covaxin	78%	73%	78%	73%	76%	72%	76%	72%	76%	72%	57%	38%
Johnson & Johnson	86%	72%	86%	72%	76%	64%	76%	64%	76%	64%	57%	33%
Moderna	97%	92%	97%	92%	97%	91%	97%	91%	97%	91%	73%	48%
Novavax	89%	83%	89%	83%	86%	82%	86%	82%	86%	82%	65%	43%
Pfizer/BioNTech	95%	86%	95%	86%	95%	84%	95%	84%	95%	84%	72%	44%
Sinopharm	73%	68%	73%	68%	71%	67%	71%	67%	71%	67%	53%	35%
Sputnik-V	92%	86%	92%	86%	89%	85%	89%	85%	89%	85%	67%	44%
Other vaccines	75%	70%	75%	70%	73%	69%	73%	69%	73%	69%	55%	36%
Other vaccines (mRNA)	91%	86%	91%	86%	88%	85%	88%	85%	88%	85%	67%	45%





*Dalla **PCR** all'elettroforesi  
passando per l'estrazione  
del DNA e la Bioinformatica*



# IL DNA



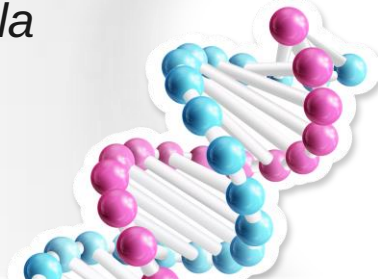
DNA

-  = Adenina
-  = Timina
-  = Citosina
-  = Guanina
-  = Struttura laterale  
(gruppo fosfato  
e 2-deossiribosio)

Il DNA si trova all'interno del nucleo e contiene l'informazione genetica.

Il DNA è un doppio filamento e ha una struttura a **doppia elica**.

Le basi azotate presenti nel DNA sono la **guanina**, l'**adenina**, la **citocina** e la **timina**.

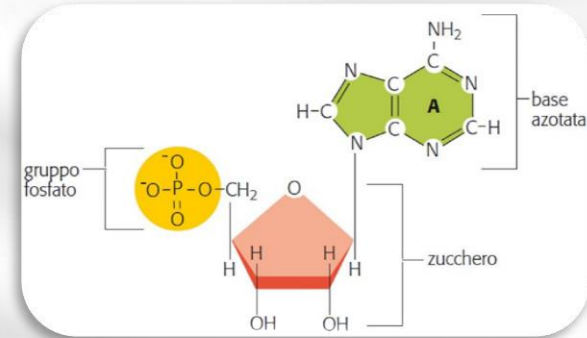
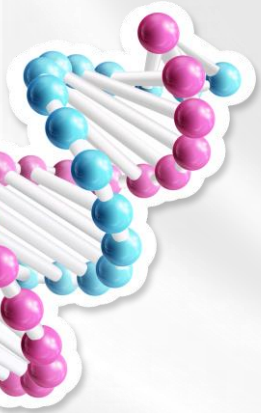


# IL DNA

Gli acidi nucleici **DNA** e **RNA** portano informazioni sotto forma di codici. Un acido nucleico è un *polimero di nucleotidi*.

*Un nucleotide è formato da*

- *un **fosfato**: acido fosforico*
- *uno **zucchero** pentoso*
- *una **base** azotata: guanina, adenina, citosina , timina, uracile.*

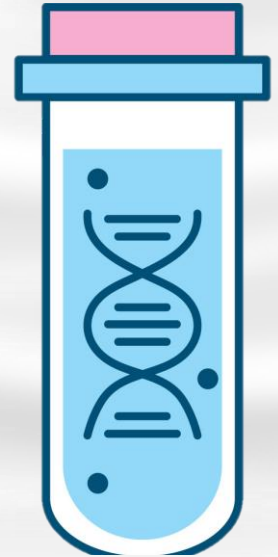




# IL DNA E LA PCR

Il **DNA** che deve essere amplificato tramite **PCR**, viene ottenuta tramite l'estrazione di esso da diversi **tessuti**:

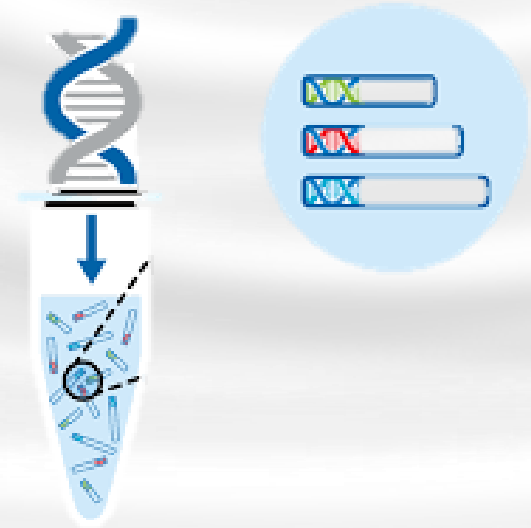
- ❖ Sangue
- ❖ Liquidi biologici (saliva, urina)
- ❖ Tessuti (biopsie)
- ❖ Unghie o capelli



# ESTRAZIONE DEL DNA

*Il DNA si estrae tramite:*

- *Rottura delle cellule*
- *Inattivazione delle nucleasi*
- *Isolamento del DNA dal resto*



# ESTRAZIONE DEL DNA

**STEP 1**

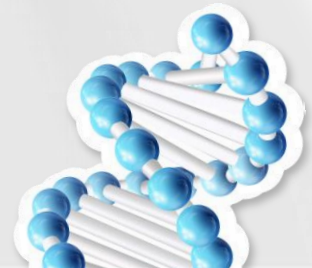
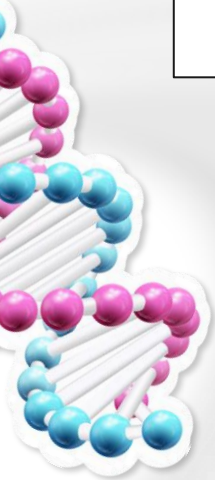
**LISI DELLE CELLULE**

**STEP 2**

**PURIFICAZIONE DEL DNA**

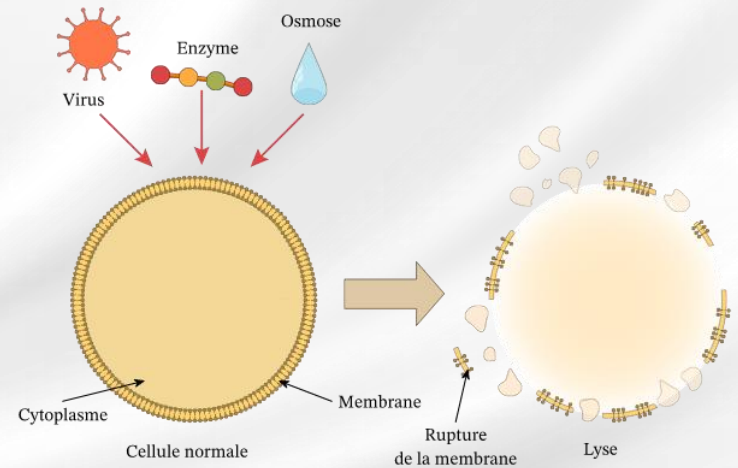
**STEP 3**

**PRECIPITAZIONE DEL DNA**



# PRIMO STEP: LISI DELLE CELLULE

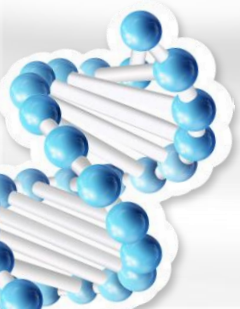
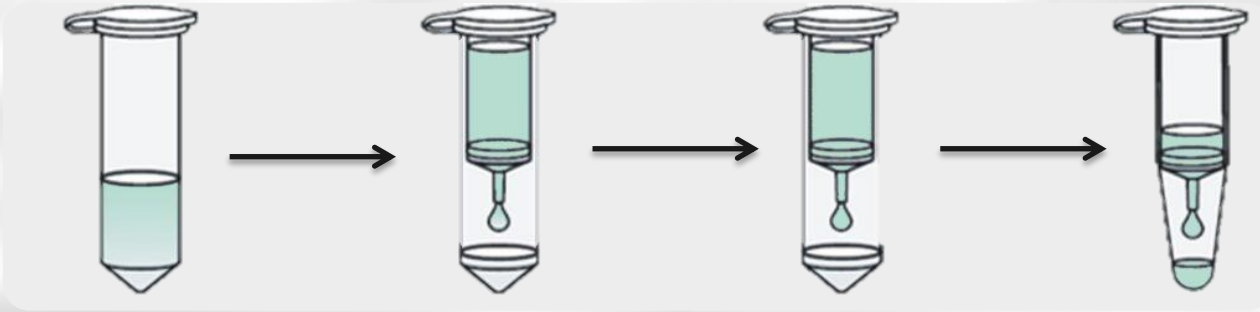
- **ROTTURA MECCANICA**
- **UTILIZZO DI AGENTI CHIMICI**
- **DIGESTIONE ENZIMATICA**



**Figure 8:** Schéma montrant comment la lyse peut se produire dans une cellule suite à la digestion de la membrane et du contenu d'une cellule par des enzymes ou en raison d'une répllication virale ou de la pression osmotique.

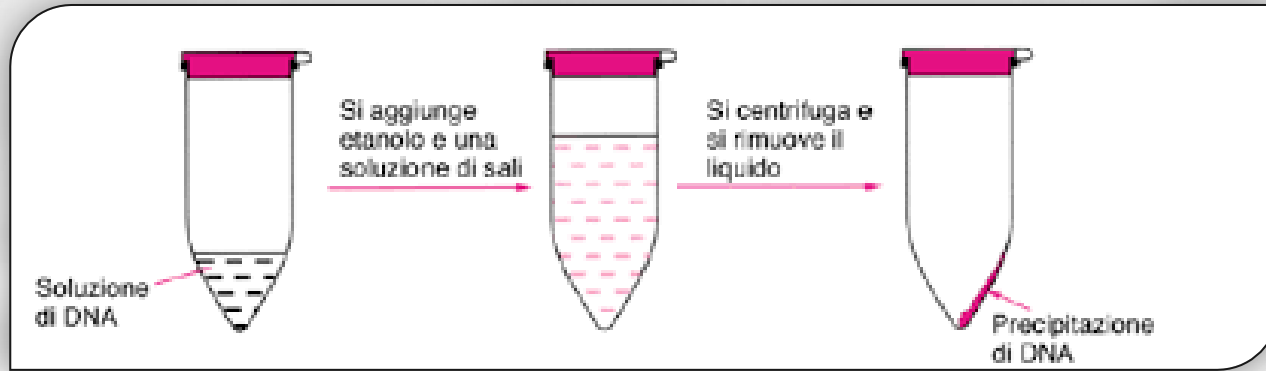
## SECONDO STEP: PURIFICAZIONE DEL DNA

Si isola il DNA dalle altre componenti cellulari





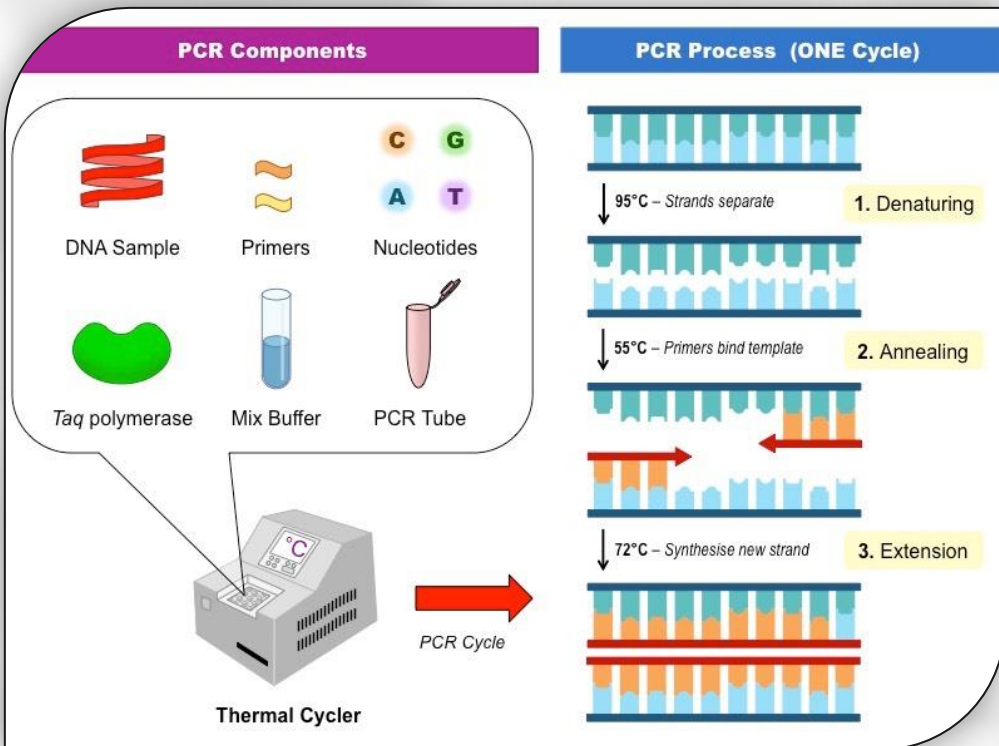
## TERZO STEP: PRECIPITAZIONE DNA



Si fa **precipitare** e **solidificare** il DNA in modo da poterlo recuperare, questo può avvenire tramite l'utilizzo di **alcoli**.



# REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERARI (PCR)

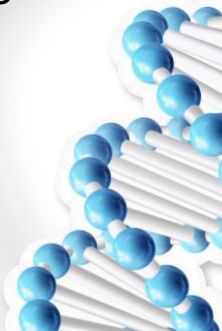


La **reazione a catena della polimerasi** (è una tecnica che permette di **amplificare** (cioè riprodurre in moltissime copie identiche) una specifica regione di **DNA**, a condizione che almeno una parte della sequenza che si vuole amplificare sia nota.

# REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERARI

La **PCR**, è un *processo ciclico* fatto di tappe che si ripetono molte volte:

- I filamenti di DNA a *doppia elica*, sottoposti a riscaldamento, si separano in filamenti singoli (*denaturazione*).
- Si aggiunge alla soluzione un breve *primer* sintetizzato artificialmente, insieme ai quattro desossiribonucleotidi trifosfati e alla DNA polimerasi
- la *DNA polimerasi* catalizza la produzione di nuovi filamenti complementari.



# LA TAQ-POLIMERASI

All'inizio esisteva un problema con la **PCR**: i requisiti termici.

Grazie alle ricerche di Thomas Brock e ai suoi collaboratori, fu scoperto un **organismo** poteva sopravvivere a temperature fino a **95 °C** grazie a un ***apparato metabolico termoresistente***. In questo modo si potevano compiere più cicli di PCR.

Successivamente si pensò di usare la Taq polimerasi anche per la PCR.



# PROTOCOLLO PCR

$C_1$	$C_1$	$V_1$
<u>Buffer 10x</u>	1x	2,5
<u>dNTPs 10mM</u>	1.25	4
<u>Primer FOR 10μM</u>		0,7
<u>Primer REV 10μM</u>		0,7
<u>DNA</u>	40 ng\μL	0,6
<u>Dream Taq 5 U/μL</u>	1.5 U\μL	0,5
$H_2O$		16
$V_2$		<u>25</u>

**DNA** 40 ng\μl -24 ng\ μl  
**Primer For** 10 μM-0,28 μM  
**Primer Rev** 10 μM-0,28 μM  
**dNTP** mix 1,25 mM-0.2 nM  
 green **Buffer** 10x-1x  
**Dream Taq** 5U/μl -2.5 U /μl  
**Acqua ultrapura**

FORMULE:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

**C**: concentrazione

**V**: volume



# TEMPERATURA DI ANNILING ( $T_a$ ) E MELTING ( $T_m$ )

Nella **temperatura di annealing** i **primer** si andranno a legare alla regione complementare.

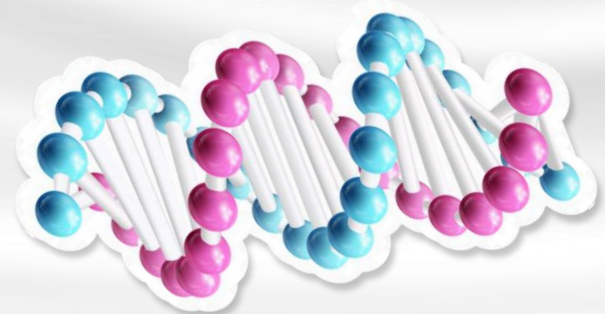


L'appaiamento (annealing) dei primer alle sequenze complementari del DNA a singola elica localizzate alle estremità del **frammento bersaglio**.

La Temperatura di melting ( $T_m$ ) è la **temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA sono denaturate**

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

$$T_a = \frac{(T_m \text{ FOR} + T_m \text{ REV})}{2} - 5$$



# SEQUENZE

FOR: GGCTCAGGTTGAGTACAGG

REV: AAGTCACTTGCGGCTCCA

## TEMPERATURA DI MELTING

1.  $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$
2.  $T_m (FOR) = 4 (12) + 2 (8) = 64 \text{ } ^\circ\text{C}$
3.  $T_m (REV) = 4 (10) + 2 (8) = 56 \text{ } ^\circ\text{C}$

## TEMPERATURA DI ANNEALING

4.  $T_a = \frac{(64 + 56) \text{ } ^\circ\text{C}}{2} - 5 = 60 \text{ } ^\circ\text{C}$
5.  $(60 - 5) \text{ } ^\circ\text{C} = 55 \text{ } ^\circ\text{C}$



**Ensembl** è una **banca dati** bioinformatica allestita con lo scopo di fornire informazioni aggiornate sui principali **genomi** eucariotici.

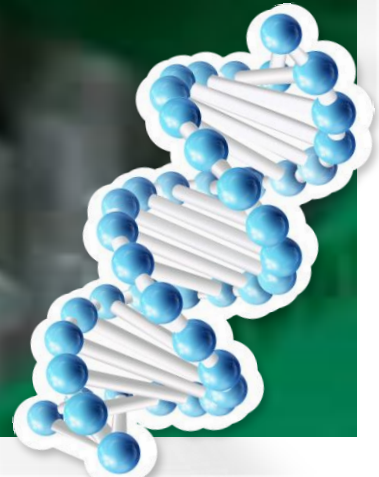
The screenshot displays the Ensembl genome browser interface. At the top, the Ensembl logo is visible along with navigation links for BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog. A search bar is present with the text "Search Human...". The main content area is titled "Human (GRCh38.p13)" and shows "Loci associated with SARS-CoV-2 infection". A table of results is displayed with the following columns: Name(s), Type, Genomic location (strand), Reported gene(s), Annotation source, Submitter, External reference, and Supporting evidence. The table contains four rows of variant data.

Name(s)	Type	Genomic location (strand)	Reported gene(s)	Annotation source	Submitter	External reference	Supporting evidence
rs10490770	Variant	3:45823240 (+)	-	NHGRI-EBI GWAS catalog	-	PMID:3423777 4	-
rs10774671	Variant	12:112919388 (+)	-	NHGRI-EBI GWAS catalog	-	PMID:3423777 4	-
rs11819389	Variant	3:101705614 (+)	-	NHGRI-EBI GWAS catalog	-	PMID:3423777 4	-
rs1819040	Variant	CHR_HSCHR17_1_CTG5-45 953711 (+)	-	NHGRI-EBI GWAS catalog	-	PMID:3423777 4	-





**PCR: REALIZZAZIONE  
DI UNA REAZIONE**



# PCR

## MATERIALE UTILIZZATO:

- 4 campioni di DNA ( 0,6  $\mu$ l )
- 4 Eppendorf 200  $\mu$ l
- Micropipette
- Mix di reazione (Taq-polimerasi, H<sub>2</sub>O, Enzima, Green Buffer (tampone), dNTP (nucleotidi) , 2 Primer (FORWARD e REVERSE) Volume totale: 25  $\mu$ l.
- Acqua distillata
- **Centrifuga**
- **Agitatore Vortex**
- **Termociclatore**





# DESCRIZIONE PCR

(All'interno delle eppendorf è presente una piccola parte di dna)

1. **Identificazione** di tutti i campioni
2. **Prelievo e Dispensamento** del DNA (prelevare una piccola quota di dna che deriva dalla madre)
3. Preparazione della mix di reazione (A cqua – Buffer – Primer – dNTP – Taq )
4. Si miscela la mix preparata tramite un agitatore Vortex
5. Per far avvenire la reazione, si mettono i campioni dentro il *termociclatore*.

# PROFILO TERMICO

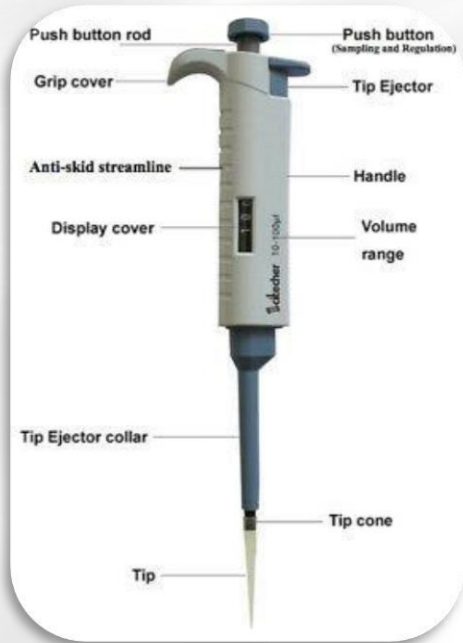
**5 temperature** diverse per ogni fase della reazione di PCR.

	<b>T denaturazione</b>	<b>T denaturazione (2)</b>	<b>Ta</b>	<b>T estensione</b>	<b>T estensione finale</b>
<b>TEMPERATURA</b>	95°C	95°C	95°C	72°C	72 °C
<b>TEMPO</b>	5 minuti	30 secondi	30 secondi	30 secondi	10 minuti

\* **Temperatura di estensione finale:** l'enzima va a riempire gli spazi rimasti all'interno dei frammenti amplificati

**X 35 VOLTE**

# MICROPIPETTE DA LABORATORIO



**P20**

MIN	MAX
0	2
2	0
0	0

decine  
unità  
decimi

2  $\mu$ l

20  $\mu$ l

**P200**

MIN	MAX
0	2
2	0
0	0

centinaia  
decine  
unità

20  $\mu$ l

200  $\mu$ l

**P1000**

MIN	MAX
0	1
2	0
0	0

migliaia  
centinaia  
decine

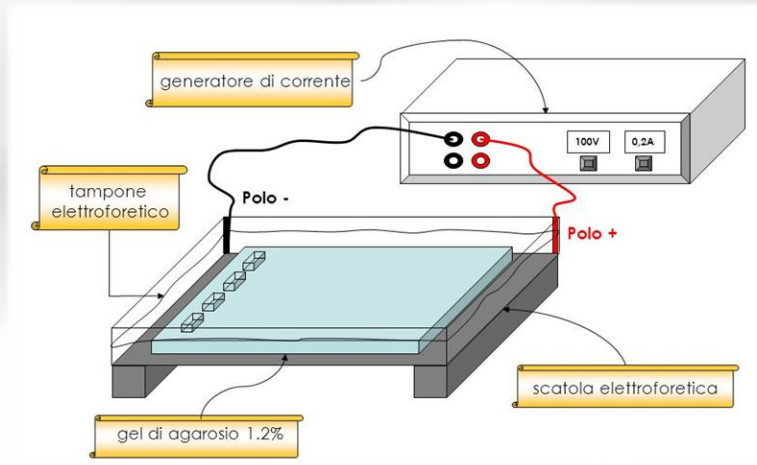
200  $\mu$ l

1000  $\mu$ l



**ELETTROFORESI**

# ELETTROFORESI



L'**elettroforesi** è una tecnica che si basata sul **movimento** di **particelle elettricamente cariche** immerse in un fluido per effetto di un **campo elettrico** applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso. Le particelle si spostano verso il **catodo** se hanno carica positiva e verso **l'anodo** se hanno carica negativa.

# ELETTROFORESI

Si possono distinguere 3 tecniche di **elettroforesi**:

1. **Elettroforesi DNA (sul gel di agarosio in orizzontale)**
2. **Elettroforesi delle proteine (su gel di poliacrilammide in verticale)**
3. **Elettroforesi capillare (capillare di poliacrilammide)**



# ELETTROFORESI DNA

Serve per verificare se la reazione della PCR è avvenuta. Le molecole si muovono su un supporto. La mobilità dipende da:

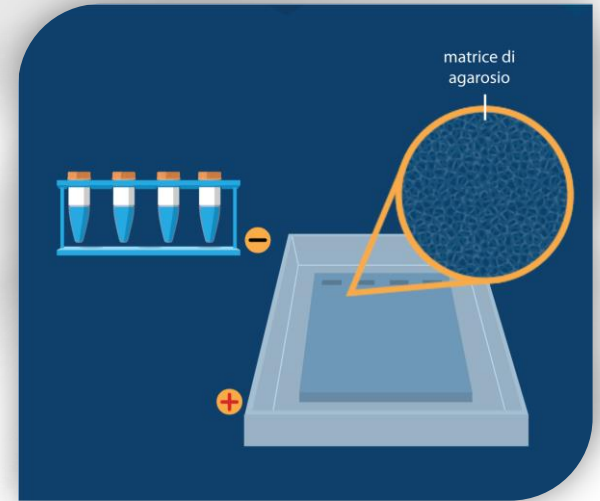
1. Dimensioni molecole (DNA)
2. Concentrazione agarosio
3. Corrente applicata



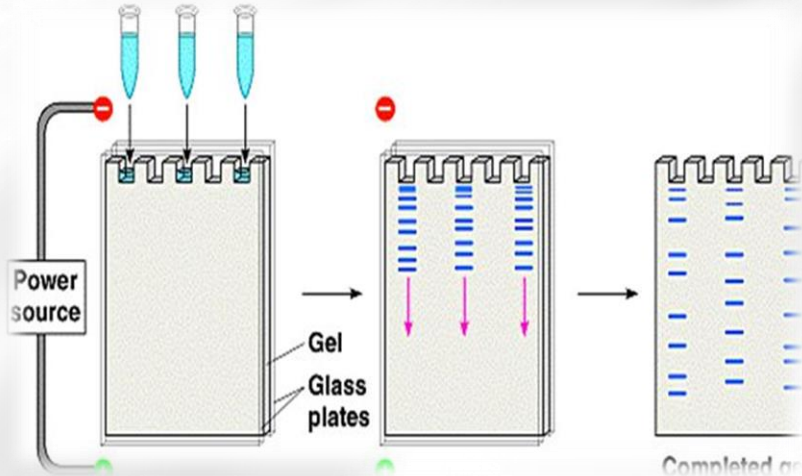
# GEL DI AGAROSIO

*L'agarosio* è un **polisaccaride** estratto dalle alghe rosse.

La polvere di *agarosio* si mescola con il tampone di elettroforesi , si bolle e si versa su una lastra di vetro e si lascia raffreddare finché si forma un gel.



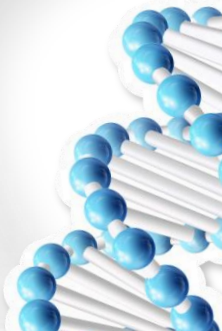
# PREPARAZIONE DEI CAMPIONI



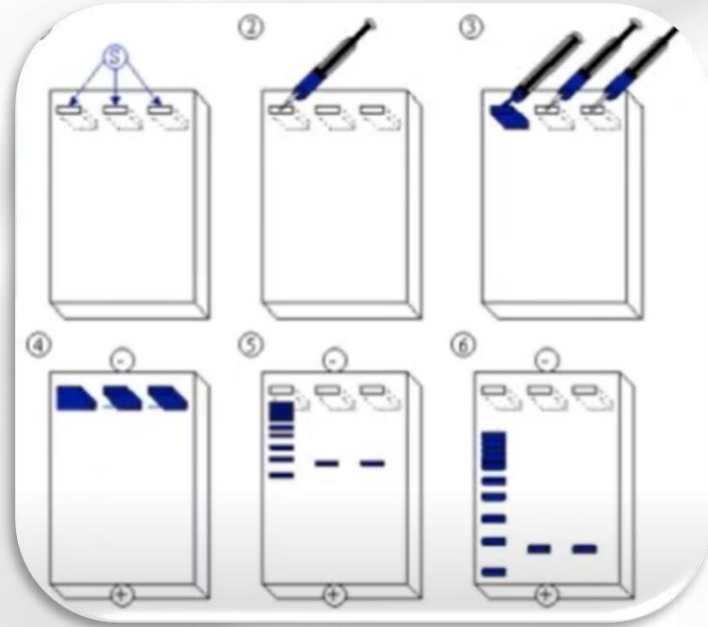
I frammenti di DNA più piccoli,  
migrano più velocemente

Il campione di DNA è miscelato con due **coloranti anionici** che servono a monitorare la corsa elettroforetica

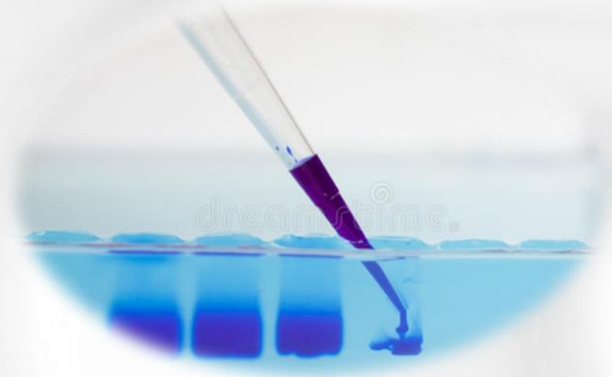
- ***Blu di bromofenolo***  
(molecola molto piccola che migra verso il polo positivo più rapidamente)
- ***Xilene cianolo***



# CARICAMENTO DEL GEL DI AGAROSIO



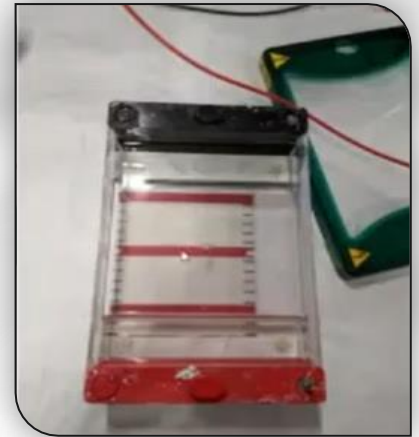
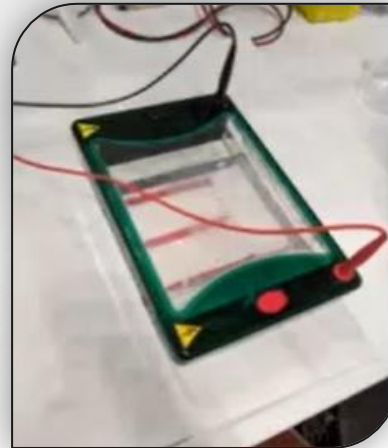
Il **colorante** ci da informazioni sulla **posizione** del campione



# ELETTROFORESI

L'apparecchiatura dell'elettroforesi è composta da:

- un **alimentatore**
- una **cella elettroforetica**

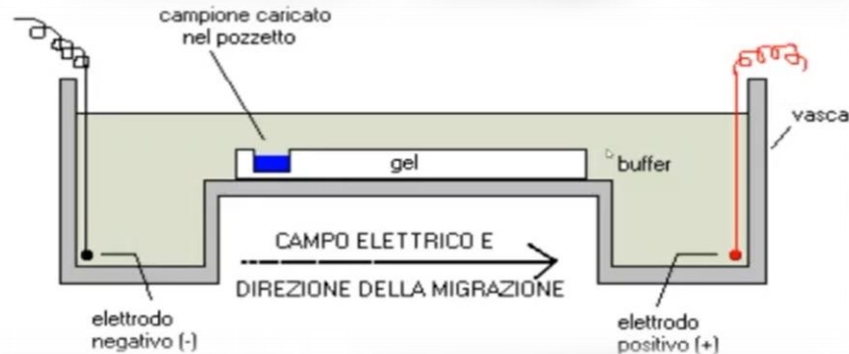


# ELETTROFORESI

Il tampone liquido (**buffer**) permette di condurre l'elettricità in tutta la vaschetta.

Diffondendosi all'interno del gel, l'elettricità è in grado di entrare in contatto con i ***campioni***.

Il campo elettrico permette il movimento delle molecole di DNA.



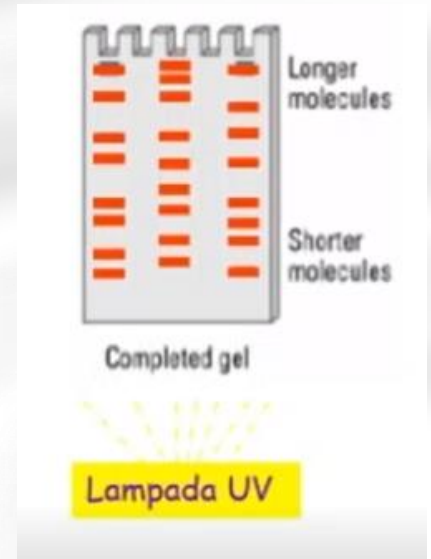


# VISUALIZZAZIONE DELLE BANDE DOPO L'ELETTROFORESI

Le bande sono visualizzate tramite al **bromuro di etidio**.

Sotto la luce UV (trans-illuminatore) , le bande di DNA sono visibili a causa della intensa fluorescenza rosso-arancione del **bromuro di etidio**.

Il segnale arancione dentro il gel, indica la posizione del DNA.



# ELETTROFORESI

In alto è possibile osservare i **5 pozzetti** nei quali è stato collocato il DNA.

Le **bande** migrano **dall'alto** verso il **basso**, perché il fondo del gel è rivolto al *polo positivo* e quindi il DNA è attratto verso il basso.

L'**intensità di illuminazione** indica la **quantità** di DNA.

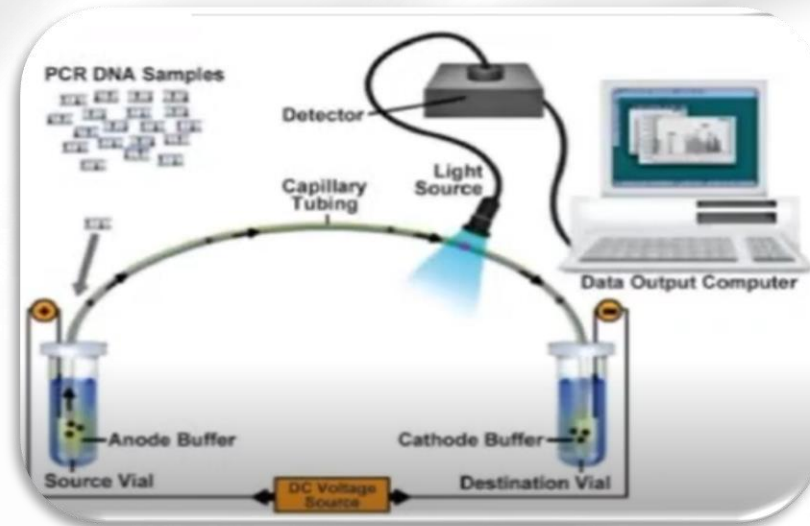
La *banda finale* del primo pozzetto sarà più *piccola* rispetto alla banda posta in alto



Foto di un'elettroforesi

# ELETTROFORESI CAPILLARE

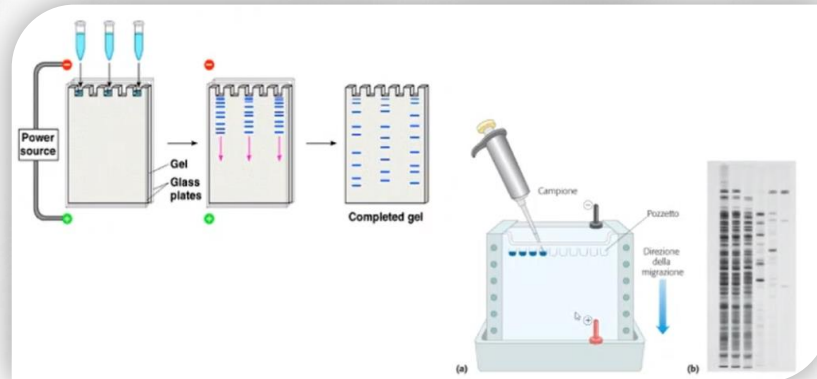
I componenti principali dello strumento sono: un **generatore** di corrente ad alto voltaggio, due **serbatoi** per il tampone, due **elettrodi** e un **capillare** che attraversa un sistema ottico di misurazione; il tutto controllato da un computer.



# ELETTROFORESI PROTEINE

Le proteine possono essere visualizzate sfruttando i principi dell'elettroforesi. Le proteine si muovono in un campo elettrico in modo diverso rispetto al DNA. Il gel utilizzato è quello di **poliacrilammide**

Questo tipo di elettroforesi si effettua di solito in verticale. I campioni una volta caricati nei pozzetti, migreranno dall'alto verso il basso.



# ELETTROFORESI ORIZZONTALE SU GEL DI AGAROSIO



# MATERIALE UTILIZZATO

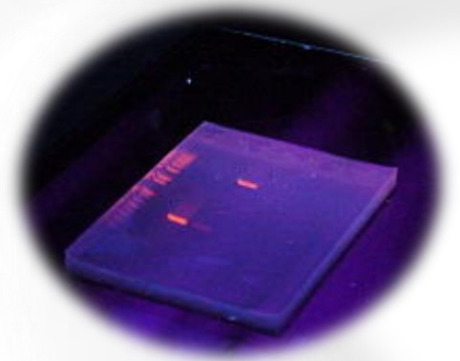
- Polvere di agarosio 2,4 g (2%)
- Buffer TBE 1x 120 ml
- Bilancia elettronica
- Foglio di Alluminio
- Etidio 6  $\mu$ l (molecola intercalante di acidi nucleici)
- Micropipetta
- Cilindro graduato
- Beuta
- Microonde
- Supporto per il gel
- Alimentatore
- Transilluminatore
- Camera elettroforetica
- Macchina fotografica del transilluminatore





# DESCRIZIONE

- Pesare 2,4 g di **agarosio** con una bilancia (sotto cappa);
- Con l'aiuto di un cilindro, pesare 120 ml di **TBE**;
- Mettere in una beuta l'agarosio e versare la TBE;
- Sciogliere l'agarosio contenuto nella beuta tramite un microonde;
- Preparare il supporto per il gel ;
- Sotto cappa, versare 6  $\mu$ l di **etidio** al livello del supporto e lasciare solidificare;
- Trascorsi circa 15 minuti, mettere il supporto dentro la camera elettroforetica;
- Caricare i campioni nei pozzetti collegando l'apparecchiatura per l'elettroforesi;
- Poggiare il gel solidificato sul transilluminatore ;
- Fotografare il gel con la macchina fotografica;
- Visualizzare sul computer i pozzetti e le bande (in bianco e nero).





**LICEO "PITAGORA"**

Scientifico, Scientifico opzione Scienze Applicate, Linguistico



**CAMBRIDGE**  
International Examinations

# P.C.T.O BIOTECNOLOGIE

*(Percorsi per le Competenze  
Trasversali e per l'Orientamento)*

A.S. 2022-2023

**Salvatore Francesco SEMPREVIVO Classe VA S.A.**

Tutor del percorso: *prof.ssa Crocco Paolina*

**LICEO STATALE "PITAGORA" RENDE**



Percorsi per le Competenze Trasversali e per l'Orientamento