



**LICEO "PITAGORA"**

Scientifico, Scientifico opzione Scienze Applicate, Linguistico



# 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

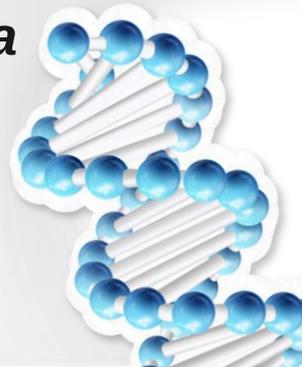
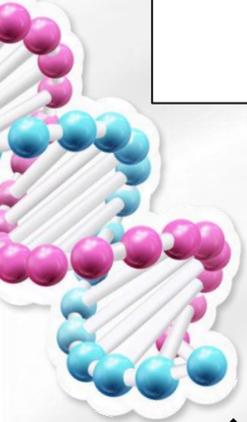
 **Alternanza**  
SCUOLA - LAVORO

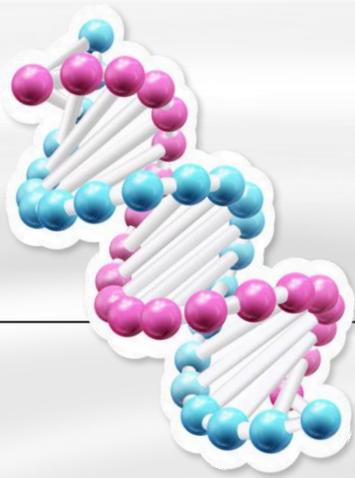


# INDICE

## PROGETTO P.C.T.O BIOTECNOLOGIE

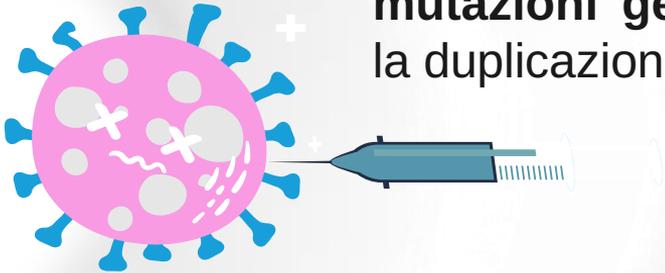
- ❖ *P.C.T.O A.S. 2021/2022: Varianti e Mutazioni*
- ❖ *P.C.T.O A.S. 2022/2023: Dalla PCR all'elettroforesi passando per l'estrazione del DNA e la Bioinformatica*





## 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.

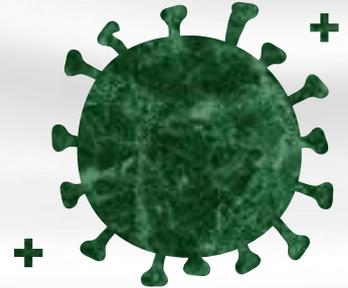
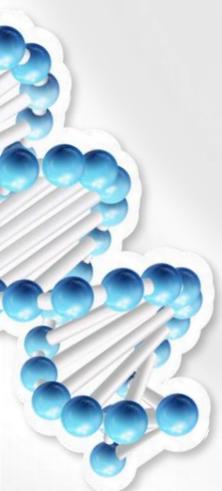


# VACCINI E MUTAZIONI



## *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

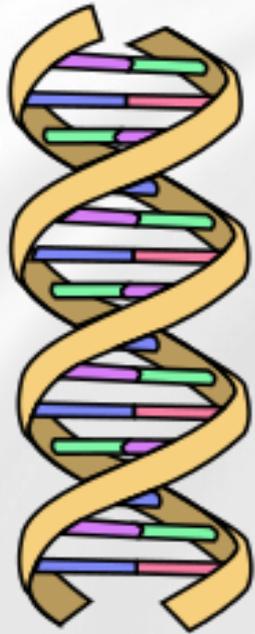
Vaccine	Ancestral		Alpha		Beta		Gamma		Delta		Omicron	
	Severe disease	Infection										
AstraZeneca	94%	63%	94%	63%	94%	69%	94%	69%	94%	69%	71%	36%
CanSino	66%	62%	66%	62%	64%	61%	64%	61%	64%	61%	48%	32%
CoronaVac	50%	47%	50%	47%	49%	46%	49%	46%	49%	46%	37%	24%
Covaxin	78%	73%	78%	73%	76%	72%	76%	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



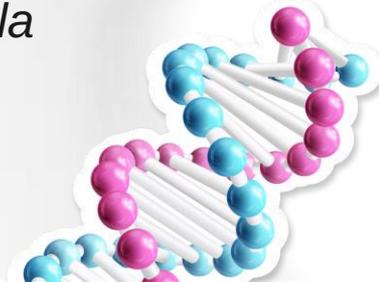
DNA

-  = 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**.

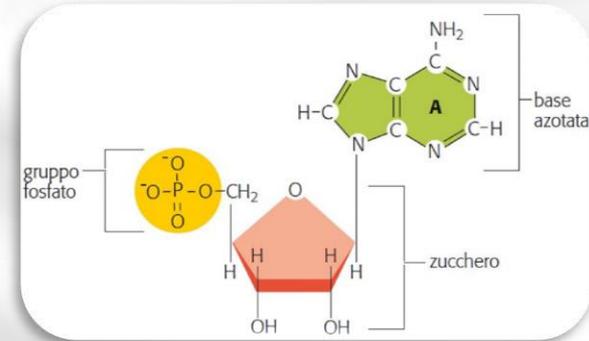
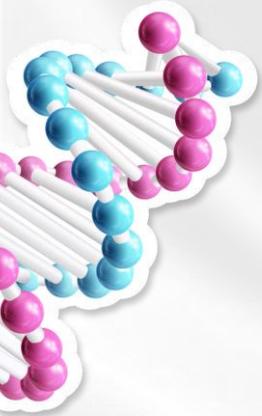


# IL DNA

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*

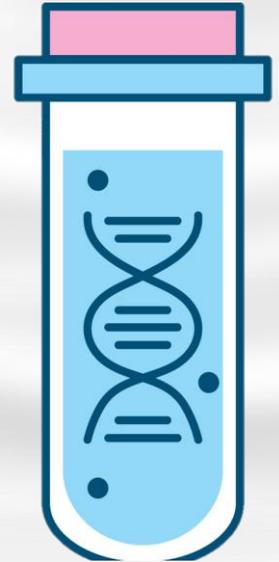
- *un **fosfato**: acido fosforico*
- *uno **zucchero** pentoso*
- *una **base** azotata: guanina, adenina, citosina , timina, uracile.*



# IL DNA E LA PCR

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

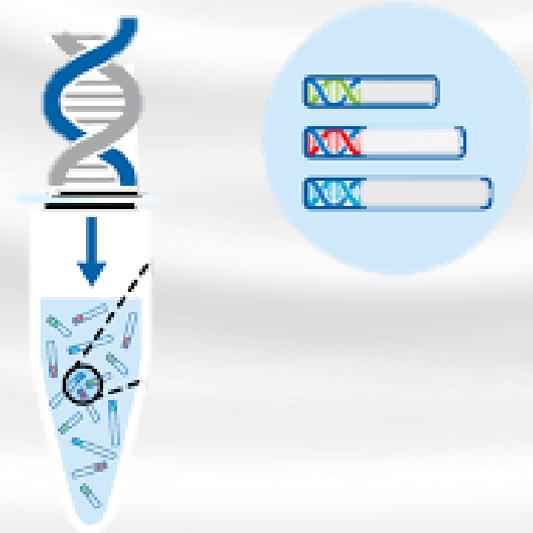
- ❖ Sangue
- ❖ Liquidi biologici (saliva, urina)
- ❖ Tessuti (biopsie)
- ❖ Unghie o capelli



# ESTRAZIONE DEL DNA

*Il DNA si estrae tramite:*

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



# ESTRAZIONE DEL DNA

**STEP 1**

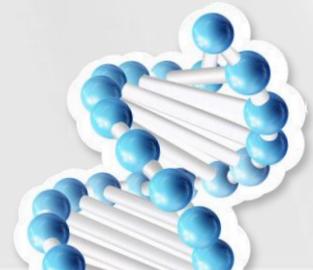
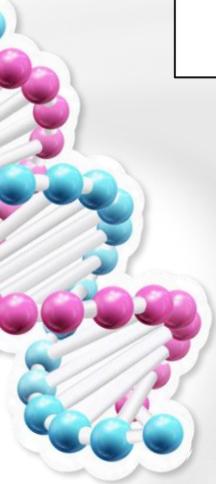
**LISI DELLE CELLULE**

**STEP 2**

**PURIFICAZIONE DEL DNA**

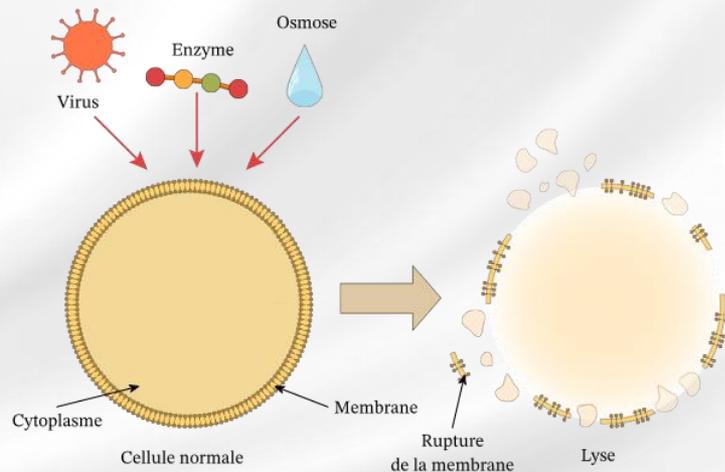
**STEP 3**

**PRECIPITAZIONE DEL DNA**



# PRIMO STEP: LISI DELLE CELLULE

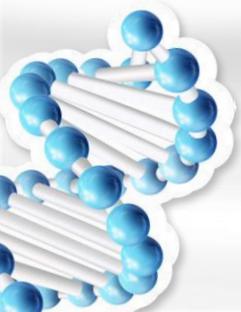
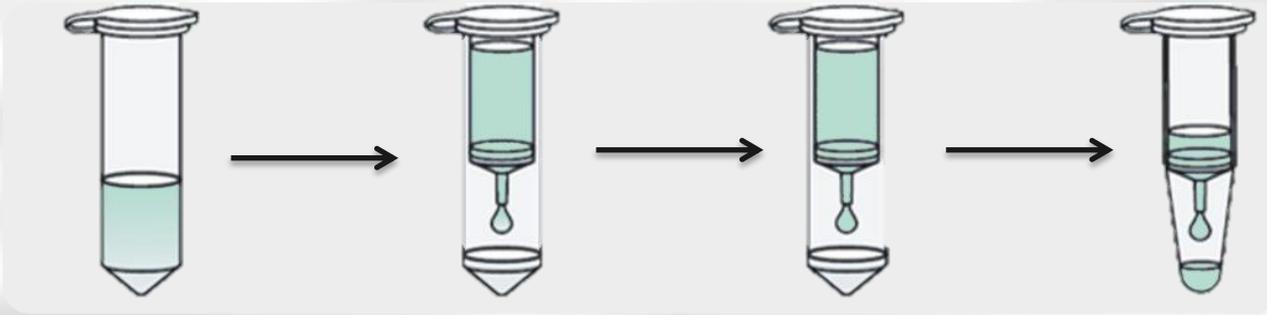
- **ROTTURA MECCANICA**
- **UTILIZZO DI AGENTI CHIMICI**
- **DIGESTIONE ENZIMATICA**



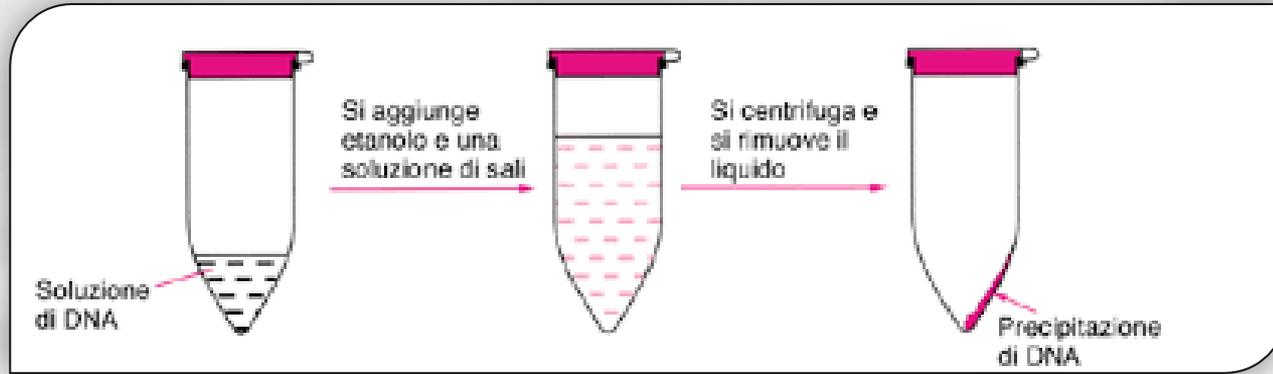
**Figure 8:** Schéma montrant comment la lyse peut se produire dans une cellule suite à la digestion de la membrane et du contenu d'une cellule par des enzymes ou en raison d'une répllication virale ou de la pression osmotique.

# SECONDO STEP: PURIFICAZIONE DEL DNA

Si isola il DNA dalle altre componenti cellulari



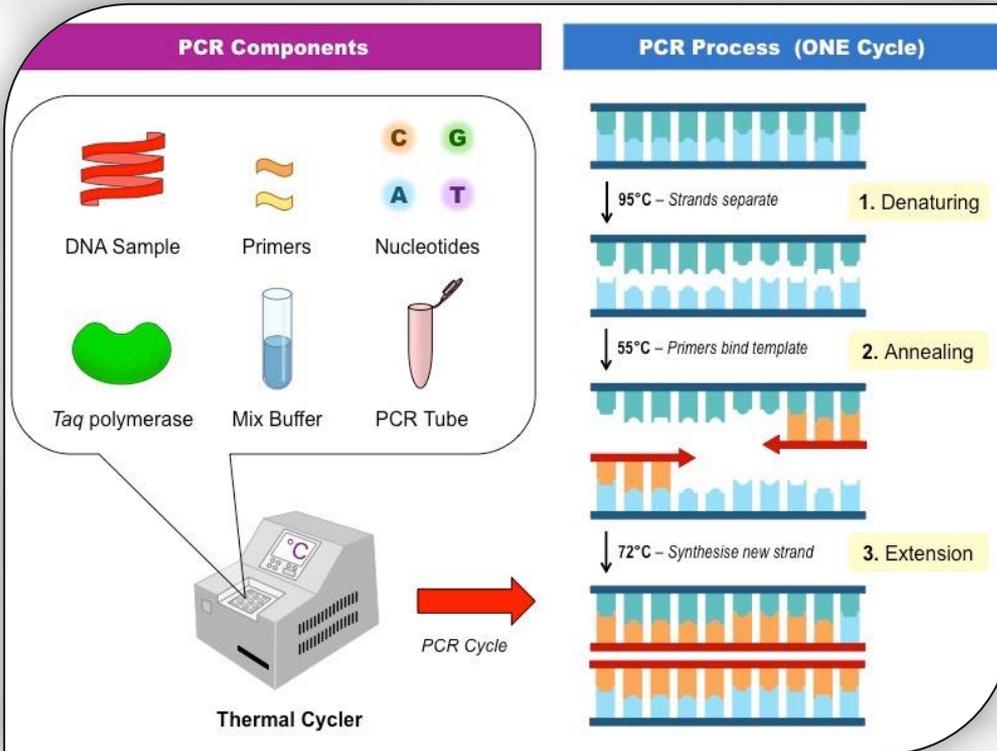
## TERZO STEP: PRECIPITAZIONE DNA



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)

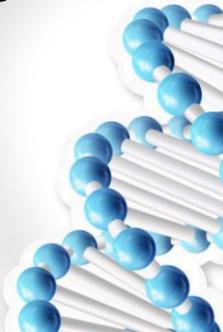


La **reazione a catena della polimerasi** (è una tecnica che permette di **amplificare** (cioè riprodurre in moltissime copie identiche) una specifica regione di **DNA**, a condizione che almeno una parte della sequenza che si vuole amplificare sia nota.

# 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 10<math>\mu</math>M</u>		0,7
<u>Primer REV 10<math>\mu</math>M</u>		0,7
<u>DNA</u>	40 ng/ $\mu$ L	0,6
<u>Dream Taq 5 U/<math>\mu</math>L</u>	1.5 U/ $\mu$ L	0,5
$H_2O$		16
$V_2$		<u>25</u>

**DNA** 40 ng/ $\mu$ l -24 ng/ $\mu$ l  
**Primer For** 10  $\mu$ M-0,28  $\mu$ M  
**Primer Rev** 10  $\mu$ M-0,28  $\mu$ M  
**dNTP** mix 1,25 mM-0.2 nM  
 green **Buffer** 10x-1x  
**Dream Taq** 5U/ $\mu$ l -2.5 U / $\mu$ l  
**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.

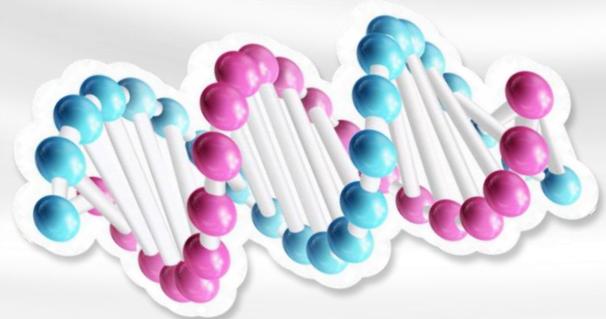


L'appaiamento (annealing) dei primer alle sequenze complementari del DNA a singola elica localizzate alle estremità del **frammento bersaglio**.

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

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

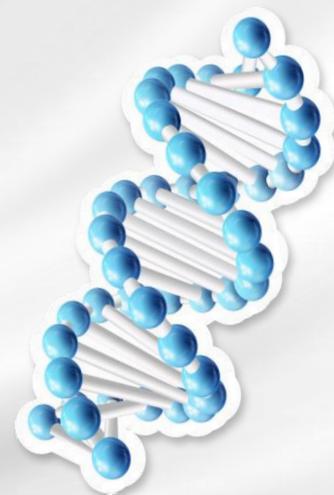
$$5. (60 - 5) \text{ } ^\circ\text{C} = 55 \text{ } ^\circ\text{C}$$



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

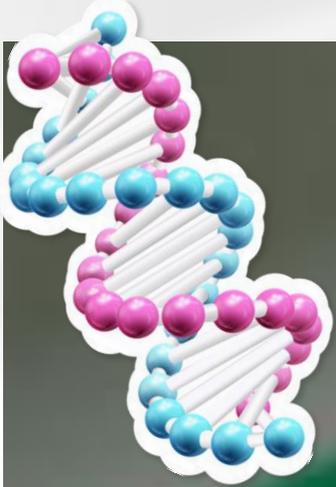
The screenshot displays the Ensembl genome browser interface. At the top, the Ensembl logo is visible along with navigation links for BLAST/BLAT, VEP, Tools, BioMart, Downloads, Help & Docs, and Blog. A search bar is present with the text "Search Human...". The main content area is titled "Human (GRCh38.p13)" and shows "Loci associated with SARS-CoV-2 infection". A table lists several variants with their genomic locations and associated 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

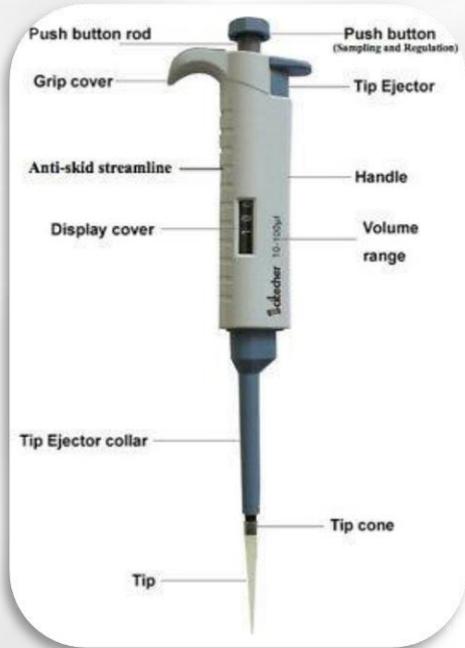
**5 temperature** diverse per ogni fase della reazione di PCR.

	<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

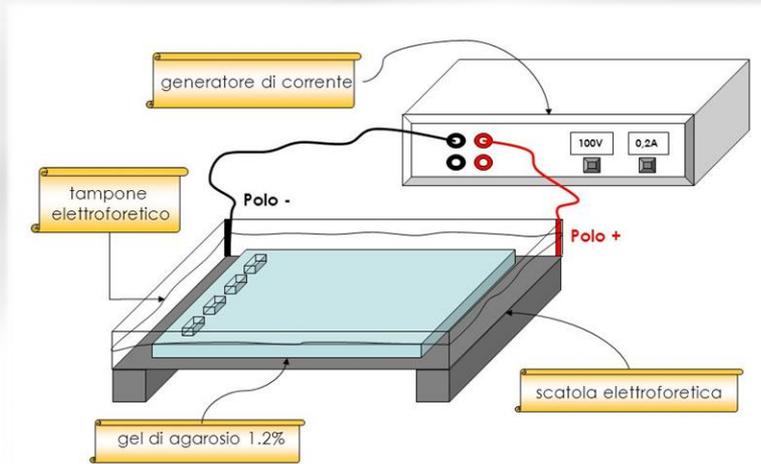
200  $\mu$ l

1000  $\mu$ l



**ELETTROFORESI**

# ELETTROFORESI



L'**elettroforesi** è una tecnica che si basa 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

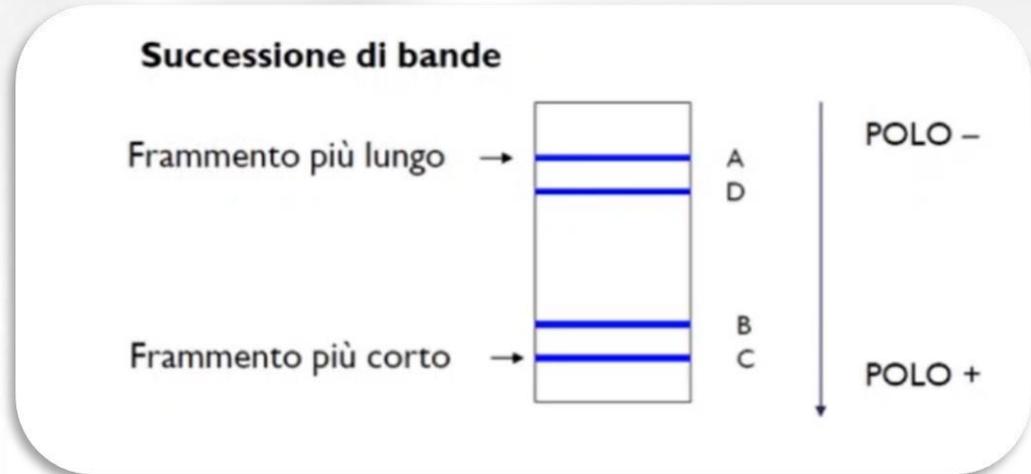
Si possono distinguere 3 tecniche di **elettroforesi**:

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:

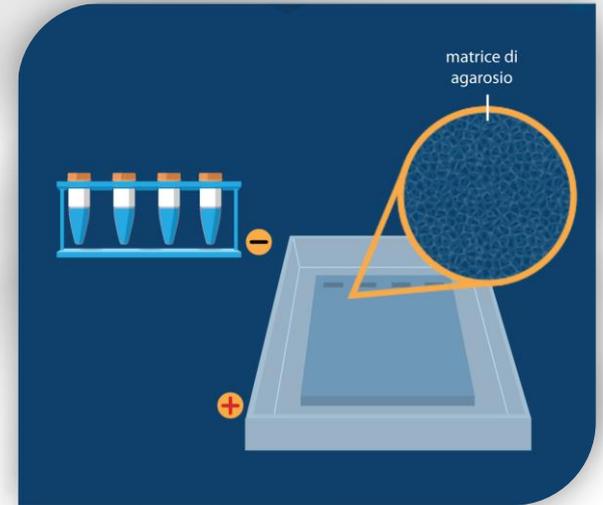
1. Dimensioni molecole (DNA)
2. Concentrazione agarosio
3. Corrente applicata



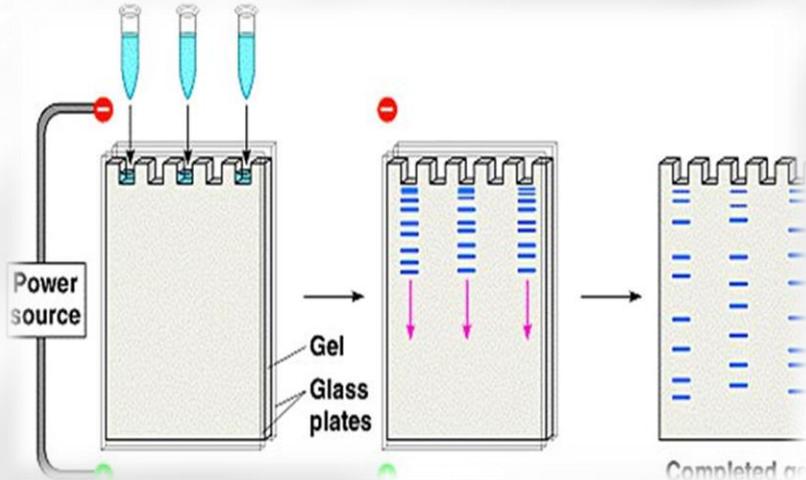
# GEL DI AGAROSIO

*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.



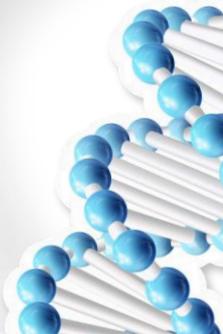
# PREPARAZIONE DEI CAMPIONI



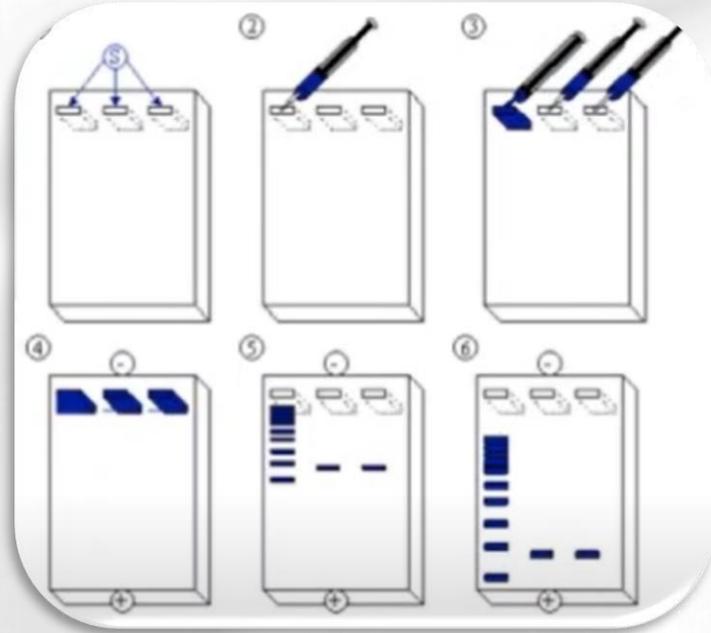
I frammenti di DNA più piccoli,  
migrano più velocemente

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

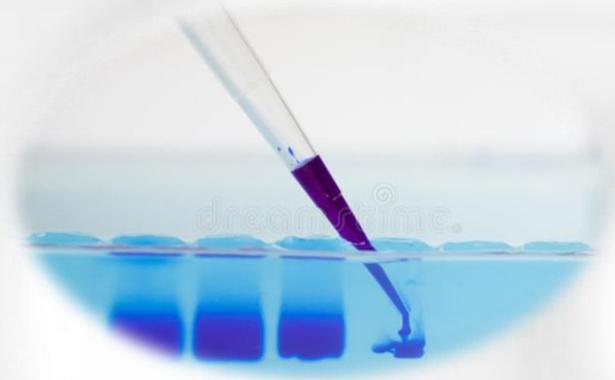
- ***Blu di bromofenolo***  
(molecola molto piccola che migra verso il polo positivo più rapidamente)
- ***Xilene cianolo***



# CARICAMENTO DEL GEL DI AGAROSIO



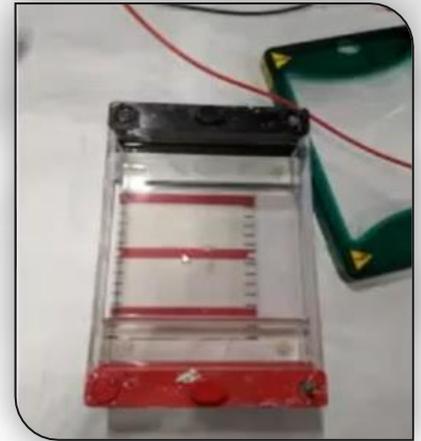
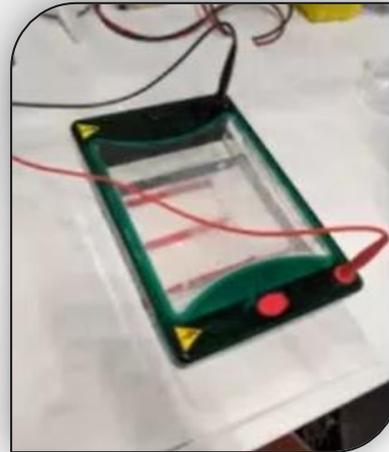
Il **colorante** ci da informazioni sulla **posizione** del campione



# ELETTROFORESI

L'apparecchiatura dell'elettroforesi è composta da:

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

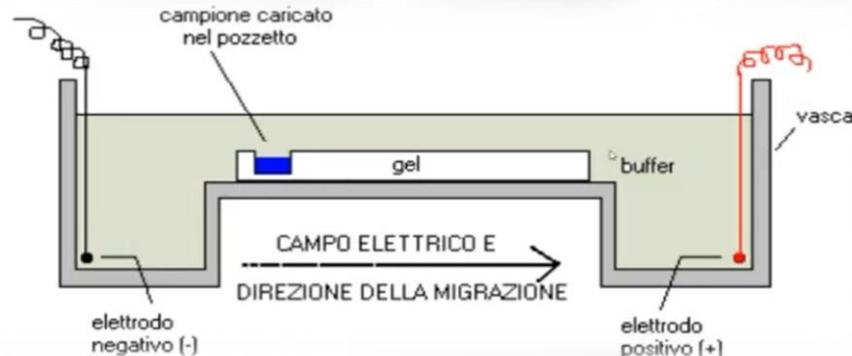


# ELETTROFORESI

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.

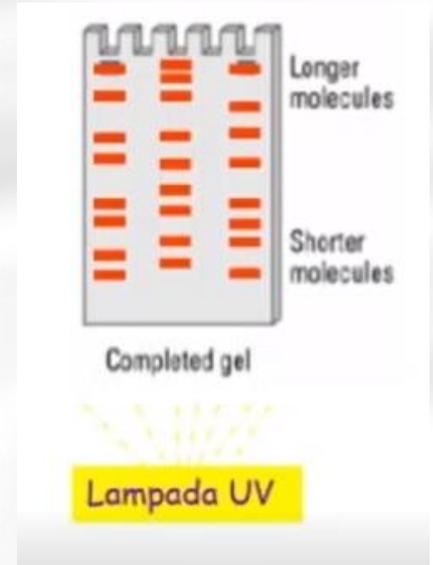


# VISUALIZZAZIONE DELLE BANDE DOPO L'ELETTROFORESI

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.

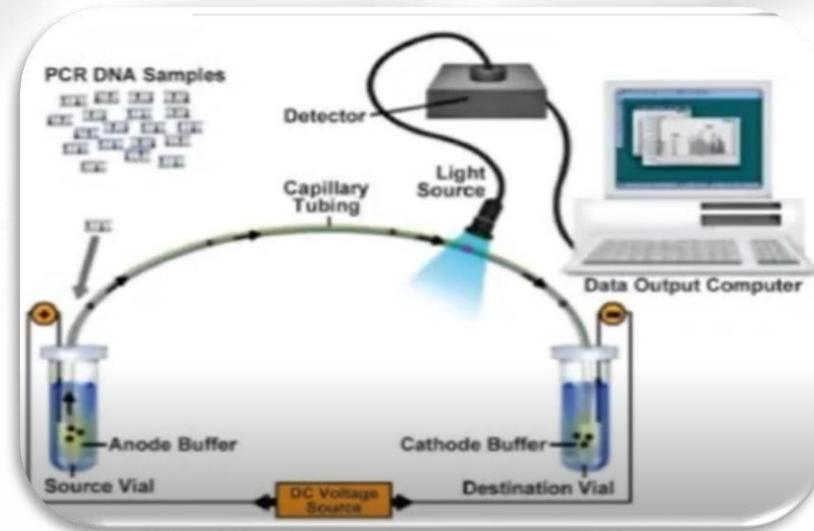
La *banda finale* del primo pozzetto sarà più *piccola* rispetto alla banda posta in alto



Foto di un'elettroforesi

# ELETTROFORESI CAPILLARE

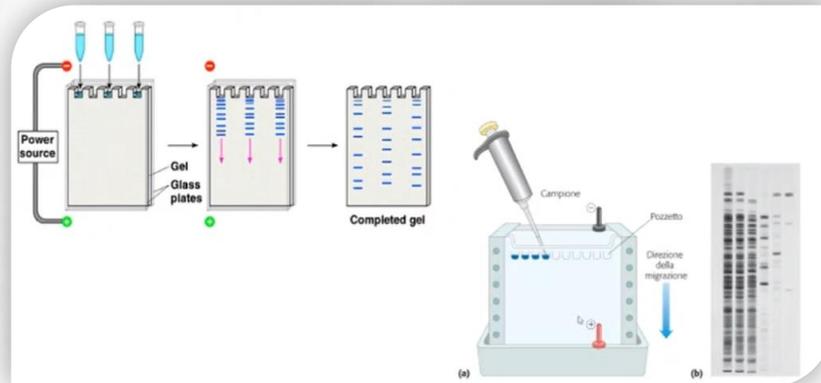
I componenti principali dello strumento sono: un **generatore** di corrente ad alto voltaggio, due **serbatoi** per il tampone, due **elettrodi** e un **capillare** che attraversa un sistema ottico di misurazione; il tutto controllato da un computer.



# 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.

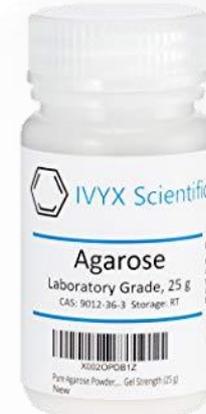
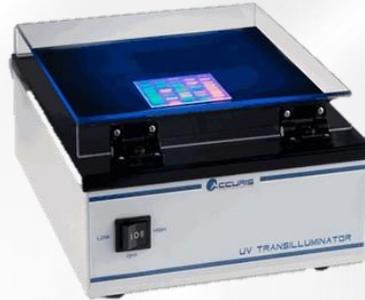


# ELETTROFORESI ORIZZONTALE SU GEL DI AGAROSIO



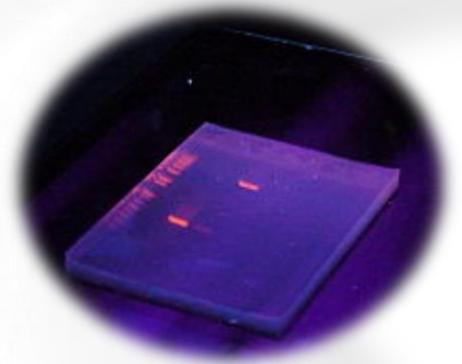
# MATERIALE UTILIZZATO

- 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