

LA VALIGETTA DEL BIOTECNOLOGO

2025-2026

CURATO DA

DOTT.SSA CRISTINA BEZ

DOTT. CATELLO DEL SORBO

DOTT. VITO D'ALESSANDRO

Redatto da PLS

Piano Nazionale Lauree Scientifiche - Scienze
Dipartimento CIBIO dell'Università di Trento

La Valigetta del Biotecnologo nasce con l'obiettivo di offrire un **supporto** a docenti teorici, docenti tecnico-pratici e tecnici di laboratorio delle **scuole superiori**, per la realizzazione di esperienze pratiche di **microbiologia** e **biotecnologie**.

Questo lavoro è da intendersi come traccia di **riferimento** da cui prendere spunto per organizzare il proprio laboratorio, **adattabile** e **modificabile** in base alla creatività e alle esigenze specifiche di ciascun contesto.

Sommario

Esperienza 1 - Preparazione di un terreno di coltura liquido sterile	2
Esperienza 2 - Preparazione di un terreno di coltura solido sterile	6
Esperienza 3 - Isolamento di microrganismi in coltura pura	11
Esperienza 4 - Test di fermentazione degli zuccheri	15
Esperienza 5 - Attività antimicrobica	21
Esperienza 6 - Trasformazione batterica	26
Esperienza 7 - Disinfezione delle mani	35
Esperienza 8 - Disinfezione delle superfici.....	39
Esperienza 9 - Elettroforesi di DNA precut Lambda su gel di agarosio.....	43
Esperienza 10 - Reazione a catena della Polimerasi (PCR).....	50
Appendice	58
ALLEGATI.....	58
CONTATTI	64



E S P E R I E N Z A 1

PREPARAZIONE DI UN TERRENO DI COLTURA LIQUIDO STERILE



Preparazione di un terreno di coltura liquido sterile

IL CONTESTO

I terreni di coltura sono substrati specifici utilizzati per far crescere colture di batteri, lieviti e muffe. Forniscono ai microrganismi tutto ciò di cui hanno bisogno per nutrirsi e svilupparsi: una fonte di carbonio e azoto, minerali, vitamine, fattori di crescita e acqua. Esistono diversi tipi di terreni, che si distinguono in base a vari criteri.

Classificazione quantitativa

- **Terreni sintetici (o definiti):** contengono componenti noti e in quantità precise. Sono usati per far crescere microrganismi con esigenze nutrizionali ben conosciute. Tra questi vi sono i **terreni minimi**, che forniscono solo gli elementi essenziali per la sopravvivenza del microrganismo.
- **Terreni complessi:** contengono estratti di carne, lievito o piante. Forniscono tutto il necessario per la crescita, ma la composizione esatta e le quantità non sono conosciute nei dettagli.

Classificazione qualitativa

- **Terreni arricchiti:** molto nutrienti, contengono sangue (di pecora, montone o cavallo), rosso d'uovo, albumina o vitamine. Sono adatti a microrganismi "esigenti". Tra questi vi sono i **terreni elettivi**, che favoriscono la crescita di specie normalmente più lente.
- **Terreni selettivi:** contengono sostanze (es. sali biliari, antibiotici, sangue) che favoriscono la crescita di un gruppo specifico di microrganismi e inibiscono gli altri.
- **Terreni differenziali:** includono indicatori (come pH o reazioni specifiche) che modificano l'aspetto delle colonie o del terreno stesso, permettendo di distinguere diversi microrganismi.

Classificazione in base alla forma

- **Terreni liquidi (brodi):** usati per colture in sospensione.
- **Terreni solidi:** si ottengono aggiungendo agar, un polisaccaride composto da agarosio e agaropectina. L'agar si scioglie sopra gli 85°C e solidifica solo sotto i 45°C, il che permette di distribuire il terreno liquido in piastre Petri prima che indurisca.

Dopo aver pesato i componenti e aggiunto l'acqua, i terreni vengono sterilizzati in **autoclave** (di solito 121°C, 15 psi, 15 minuti). Le **sostanze termosensibili**, come zuccheri e antibiotici, vengono invece sterilizzate per filtrazione e aggiunte al terreno già sterile.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

- 20 g di LB liofilizzato (sufficiente per preparare 1 L di terreno)

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE DEL TERRENO

Materiali per postazione:

- Bottiglia con tappo a vite (oppure beuta chiusa con stagnola) da 250 o 500 mL
- Ancoretta magnetica
- Piastra riscaldante con agitatore magnetico
- Spruzzetta con acqua distillata
- Cilindro graduato da 100 o 250 mL

Materiali in comune:

- 20 g di LB liofilizzato
- Cucchiaino o spatola
- Soluzione di NaOH 0,1 M (facoltativa)
- Cartina di tornasole (facoltativa)
- Bacchetta di vetro
- Cappa aspirante

Procedura:

1. Posizionare la bilancia sotto la cappa aspirante.
2. Pesare direttamente nella bottiglia la quantità necessaria di LB liofilizzato (20 g/L, vedere anche le FAQ).
3. Aggiungere un primo volume di acqua distillata (da $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ del volume finale) e mettere in agitazione fino a completa dissoluzione della polvere.
4. Aggiungere il resto dell'acqua, facendo attenzione a non riempire mai completamente il contenitore.
5. **Sterilizzazione con pentola a pressione:** Lasciare 20 minuti a partire dal fischio.
6. **Sterilizzazione con autoclave:** inserire la bottiglia con il tappo allentato in autoclave e avviare il ciclo di sterilizzazione (121°C, 15 minuti).
7. Una volta terminato, il terreno LB è sterile. Chiudere ermeticamente i coperchi.
 - Per conservarlo: mantenere la soluzione sterile a temperatura ambiente (preferibilmente in frigorifero) anche per mesi, avendo cura di aprire il tappo solo in condizioni sterili.

FAQ

Che cos'è un terreno di coltura?

È il mezzo nel quale (o sul quale) può avvenire lo sviluppo e la crescita *in vitro* di un microrganismo. Tale mezzo deve garantire: adeguata concentrazione di nutrienti, giusto grado di umidità, pH ottimale, sterilità e protezione da agenti esterni.

Qual è la formulazione del Luria-Bertani secondo Lennox (LB Lennox)?

- 10 g/L Triptone
- 5 g/L Estratto di lievito
- 5 g/L NaCl

Quali sono le istruzioni del produttore?

- Aggiungere 20 g di LB liofilizzato a 1 L di acqua distillata
- Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a 121 °C
- Lasciar raffreddare parzialmente prima di aggiungere eventuali supplementi

Si possono preparare quantità diverse di terreno?

Sì. Basta rispettare la proporzione:

$$20g : 1L = xg : yL$$
$$xg = \frac{20g \times yL}{1L}$$

dove y è il volume desiderato e x la massa corrispondente da pesare (*incognita*).

Si può pesare l'acqua invece di misurarne il volume?

Sì. È comune usare la bilancia, considerando valida l'equivalenza 1 mL = 1 g.

Come si lavora in sterilità sul bancone?

Vedi Allegato C.

Cosa significa “flambare” il collo dei contenitori?

Consiste nel passare velocemente l'imboccatura del contenitore sulla fiamma del Bunsen subito dopo averlo aperto e poco prima di richiuderlo. Questo passaggio riduce il rischio di contaminazioni.



E S P E R I E N Z A 2

PREPARAZIONE DI UN TERRENO DI CULTURA SOLIDO STERILE



Preparazione di un terreno di coltura solido sterile

IL CONTESTO

I terreni di coltura sono substrati specifici utilizzati per far crescere colture di batteri, lieviti e muffe. Forniscono ai microrganismi tutto ciò di cui hanno bisogno per nutrirsi e svilupparsi: una fonte di carbonio e azoto, minerali, vitamine, fattori di crescita e acqua. Esistono diversi tipi di terreni, che si distinguono in base a vari criteri.

Classificazione quantitativa

- **Terreni sintetici (o definiti):** contengono componenti noti e in quantità precise. Sono usati per far crescere microrganismi con esigenze nutrizionali ben conosciute. Tra questi vi sono i **terreni minimi**, che forniscono solo gli elementi essenziali per la sopravvivenza del microrganismo.
- **Terreni complessi:** contengono estratti di carne, lievito o piante. Forniscono tutto il necessario per la crescita, ma la composizione esatta e le quantità non sono conosciute nei dettagli.

Classificazione qualitativa

- **Terreni arricchiti:** molto nutrienti, contengono sangue (di pecora, montone o cavallo), rosso d'uovo, albumina o vitamine. Sono adatti a microrganismi "esigenti". Tra questi vi sono i **terreni elettivi**, che favoriscono la crescita di specie normalmente più lente.
- **Terreni selettivi:** contengono sostanze (es. sali biliari, antibiotici, sangue) che favoriscono la crescita di un gruppo specifico di microrganismi e inibiscono gli altri.
- **Terreni differenziali:** includono indicatori (come pH o reazioni specifiche) che modificano l'aspetto delle colonie o del terreno stesso, permettendo di distinguere diversi microrganismi.

Classificazione in base alla forma

- **Terreni liquidi (brodi):** usati per colture in sospensione.
- **Terreni solidi:** si ottengono aggiungendo agar, un polisaccaride composto da agarosio e agaropectina. L'agar si scioglie sopra gli 85°C e solidifica solo sotto i 45°C, il che permette di distribuire il terreno liquido in piastre Petri prima che indurisca.

Dopo aver pesato i componenti e aggiunto l'acqua, i terreni vengono sterilizzati in **autoclave** (di solito 121°C, 15 psi, 15 minuti). Le **sostanze termosensibili**, come zuccheri e antibiotici, vengono invece sterilizzate per filtrazione e aggiunte al terreno già sterile.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

- 20 g di terreno LB liofilizzato (per preparare 1 L di terreno solido)
- 15 g di agar (per preparare 1 L di terreno solido)
- 40 piastre Petri sterili (grandi, 10 mm)

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE DEL TERRENO (+ AGAR)

Materiali per postazione:

- Bottiglia con tappo a vite (oppure beuta chiusa con stagnola) da 250 o 500 mL
- Ancoretta magnetica
- Piastra riscaldante con agitatore magnetico
- Acqua distillata
- Cilindro graduato da 100 o 250 mL

Materiali in comune:

- 20 g di LB liofilizzato
- 15 g di agar
- Cucchiaino o spatola
- Soluzione di NaOH 0,1 M (facoltativa)
- Cartina di tornasole (facoltativa)
- Bacchetta di vetro
- Cappa aspirante
- Autoclave o pentola a pressione

Procedura:

1. Posizionare la bilancia sotto la cappa aspirante.
2. Pesare direttamente nella bottiglia la quantità di polveri (LB e agar) necessaria, calcolandola in base al volume desiderato (20 g/L di LB liofilizzato e 15 g/L di agar. *Consultare le FAQ per maggiori dettagli*).
3. Aggiungere un primo volume di acqua distillata (circa $\frac{1}{4}$ – $\frac{1}{2}$ del volume finale) e mettere in agitazione fino a completa dissoluzione delle polveri.
 - Nota: l'agar non si scioglie a temperatura ambiente, ma solo oltre gli 85°C.
4. Aggiungere il resto dell'acqua, facendo attenzione a non riempire mai completamente il contenitore.
5. **Sterilizzazione con pentola a pressione:** Lasciare 20 minuti a partire dal fischio. In questo caso, è fortemente consigliato scaldare prima la bottiglia su piastra riscaldante o a bagnomaria finché le polveri non si sciolgono e la soluzione non diventa giallina.
6. **Sterilizzazione con autoclave:** inserire la bottiglia con il tappo allentato in autoclave e avviare il ciclo di sterilizzazione (121°C, 15 minuti).
7. Terminato il ciclo di sterilizzazione (pentola a pressione o autoclave), agitare subito il terreno per distribuire uniformemente l'agar.
8. Al termine, l'LB agar è sterile: chiudere ermeticamente i contenitori.



- Se non si preparano subito le piastre, il terreno sterile può essere conservato a temperatura ambiente per diversi mesi in forma solida, aprendo il tappo solo in condizioni sterili.

PARTE SECONDA – PREPARAZIONE DELLE PIASTRE

Materiali per postazione:

- Becco Bunsen (per lavorare in sterilità)
- Piastra riscaldante con agitatore magnetico
- 4 piastre Petri sterili
- 100 mL di LB agar sterile, allo stato liquido (non solidificato), in bottiglia

Procedura:

1. Se l'esperimento non viene svolto subito dopo aver completato la **PARTE PRIMA**: riscogliere l'LB agar in microonde o in bagnetto termostatico, agitando di tanto in tanto per renderlo omogeneo. Fornire agli studenti il terreno già liquefatto, mantenendolo sopra i 50 °C.
2. Etichettare le piastre Petri: scrivere sul fondo o sul bordo (mai sul coperchio) il tipo di terreno e l'ID del gruppo.
3. Allentare il tappo della bottiglia senza toglierlo. Il calore in uscita eviterà l'ingresso di aria contaminante.

Da questo punto in poi, lavorare in ambiente sterile.

4. Versare il terreno liquido in ciascuna piastra Petri, una alla volta, operando in sterilità: distribuire da $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ del volume della piastra (circa 20 – 25 mL).
 - Se si utilizza meno terreno, il rischio è che si secchi; se si utilizza più terreno, il risultato è uno spreco di materiale non necessario.
5. Fare un leggero movimento rotatorio per distribuire uniformemente il terreno. Successivamente, appoggiare il coperchio sulle piastre senza coprirle del tutto, in modo che il vapore possa uscire, così da evitare la formazione di condensa.
6. Lasciare raffreddare fino a completa gelificazione (15 – 20 minuti) in ambiente sterile.
7. Una volta solidificate, chiudere i coperchi e conservare le piastre capovolte.
8. Per conservarle a lungo, riporle nel loro sacchetto e mantenerle in frigorifero

FAQ

Che cos'è un terreno di coltura?

È il mezzo nel quale (o sul quale) può avvenire lo sviluppo e la crescita *in vitro* di un microrganismo. Tale mezzo deve garantire: adeguata concentrazione di nutrienti, giusto grado di umidità, pH ottimale, sterilità e protezione da agenti esterni.

Qual è la formulazione del Luria-Bertani Agar secondo Lennox (LB Agar Lennox)?

- 15 g/L Agar
- 10 g/L Triptone
- 5 g/L Estratto di lievito
- 5 g/L NaCl

Quali dosi di LB e agar vanno utilizzate?

Per 1 L di terreno: 20 g di LB liofilizzato + 15 g di agar.

Quali sono le istruzioni del produttore?

- Aggiungere 20 g di LB liofilizzato e 15 g di agar a 1 L di acqua distillata
- Scaldare in agitazione fino a ebollizione e completa dissoluzione
- Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a 121 °C
- Lasciar raffreddare parzialmente prima di aggiungere eventuali supplementi
- Distribuire in piastre Petri e lasciare solidificare

Si possono preparare quantità diverse di terreno?

Sì. Basta rispettare la proporzione:

- Per l'LB $\rightarrow 20g : 1L = xg : yL \rightarrow xg = \frac{20g \times yL}{1L}$
- Per l'agar $\rightarrow 15g : 1L = xg : yL \rightarrow xg = \frac{15g \times yL}{1L}$

dove y è il volume desiderato e x la massa corrispondente da pesare (*incognita*).

Si può pesare l'acqua invece di misurarne il volume?

Sì. È comune usare la bilancia, considerando valida l'equivalenza 1 mL = 1 g.

Come si lavora in sterilità sul bancone?

Vedi Allegato C.

Cosa significa “flambare” il collo dei contenitori?

Consiste nel passare velocemente l'imboccatura del contenitore sulla fiamma del Bunsen subito dopo averlo aperto e poco prima di richiuderlo. Questo passaggio riduce il rischio di contaminazioni.



E S P E R I E N Z A 3

**ISOLAMENTO DI MICRORGANISMI
IN COLTURA PURA**

Isolamento di microrganismi in coltura pura

IL CONTESTO

In molti processi di laboratorio è fondamentale identificare e isolare il microrganismo con cui si sta lavorando. L'identificazione può basarsi su **caratteristiche fenotipiche**, cioè osservabili direttamente, oppure su **analisi genetiche**, che sfruttano le moderne tecniche di biologia molecolare, come la PCR (per approfondire, si veda l'*Esperienza 10*).

Tra i criteri fenotipici più utilizzati troviamo:

- le caratteristiche microscopiche, come la forma, la dimensione e la disposizione delle cellule
- le caratteristiche colturali, come l'aspetto delle colonie, il colore e la loro consistenza
- i test biochimici, che mettono in evidenza le diverse attività metaboliche
- le reazioni sierologiche, basate sul riconoscimento tra antigeni e anticorpi

Per svolgere correttamente questi studi è indispensabile partire da una **coltura pura**, cioè contenente **un solo microrganismo**. Questo si ottiene isolando una singola colonia, così da essere certi che tutte le cellule presenti siano identiche. Solo in questo modo i risultati delle analisi – siano esse fenotipiche o molecolari – possono essere considerati affidabili.

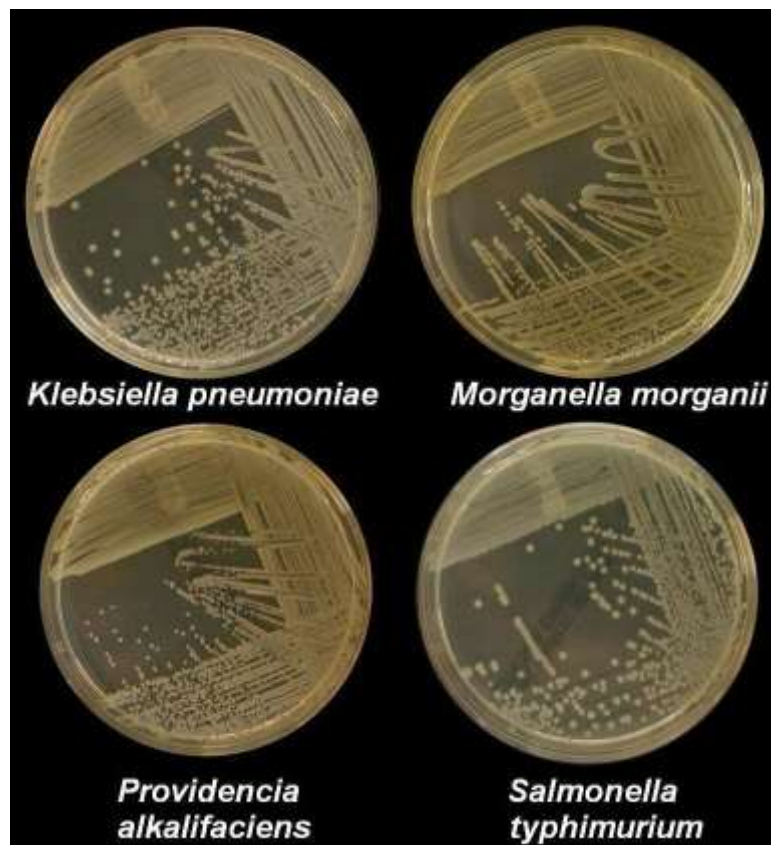


Figura 1. Quattro piastre di agar con colture pure di batteri Gram-negativi in crescita.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

- Piastra con *E. coli* DH5- α [Livello di biosicurezza 1]
- Anse a occhiello
- Tutto il necessario per l'*Esperienza 2*

PARTE PRIMA – ISOLAMENTO DELLE SINGOLE COLONIE

Materiali per postazione:

- Anse a occhiello (sacchetto monouso o ansa in nickel-cadmio)
- Scheda per descrizione colonie
- Piastre nuove di terreno nutriente
- Carta da sterilizzazione (opzionale)
- Becco Bunsen
- Pennarello indelebile a punta fine

Materiali in comune:

- 1 piastra di *E. coli* DH5- α [Livello di biosicurezza 1]

Procedura:

1. Preparare le piastre Petri di LB Agar come descritto nell'*Esperienza 2*.
2. Identificare alcune colonie ben isolate dalle circostanti.
3. Segnare con un pennarello indelebile, sul fondo della piastra, le colonie da prelevare, assegnando a ciascuna un identificativo (ID).
4. Etichettare lo stesso numero di piastre nuove riportando ID del gruppo e ID della colonia.

Da questo punto in poi, lavorare in ambiente sterile.

5. Con l'occhiello sterile, prelevare una piccolissima quantità di materiale e distribuirlo con la **tecnica per strisciamento** sulle nuove piastre.
6. Incubare le piastre capovolte alle condizioni necessarie:
 - Batteri: 37 °C per 24 h o 22 °C per 72 h
 - Lieviti: 30 °C per 24–48 h

PARTE SECONDA – OSSERVAZIONE DELLE PIASTRE

Materiali per postazione:

- Piastre incubate (**PARTE PRIMA**)
- Scheda descrizione colonie (Allegato D)
- Becco Bunsen



- Carta da sterilizzazione (opzionale)
- Ansa a occhiello sterile (opzionale)

Procedura:

1. Osservare lo striscio e verificare se sono presenti colonie ben isolate.
2. Controllare se le colonie risultano tutte uguali o se presentano caratteristiche diverse (vedi Allegato D per supporto).
3. Se sono presenti tipologie diverse di colonie, ripetere il procedimento del giorno precedente, prelevando una colonia ben isolata dalla piastra in esame.

FAQ

Come appare uno striscio eseguito correttamente?

Uno striscio ben eseguito mostra colonie molto concentrate nella parte iniziale, che diventano via via più diluite fino a risultare **chiaramente separate tra loro**. Le colonie devono avere caratteristiche simili (colore, forma, margini, ecc.), poiché derivano tutte dallo stesso microrganismo.



E S P E R I E N Z A 4

TEST DI FERMENTAZIONE DEGLI ZUCCHERI



Test di fermentazione degli zuccheri

IL CONTESTO

Gli zuccheri rappresentano la principale fonte di carbonio nei terreni di coltura. Ogni ceppo microbico possiede specifici enzimi che gli consentono di utilizzare solo alcuni zuccheri, e non altri.

La capacità di metabolizzare diversi zuccheri, combinata con altri test biochimici, permette di costruire un **profilo metabolico** utile per identificare il microrganismo.

Durante la fermentazione degli zuccheri, i prodotti più comuni sono **acidi organici**, che abbassano il pH del terreno, rendendolo più acido. Questa variazione può essere rilevata tramite un **indicatore di pH**, che permette l'individuazione della crescita batterica attraverso un cambiamento nel colore del terreno. Tra gli indicatori più usati troviamo il Rosso fenolo, il Blu bromotimolo e il Porpora bromocresolo

Inoltre, con l'uso della **campanella di Durham**, è possibile verificare la produzione di gas durante la fermentazione.



Figura 2. Da sinistra a destra: tubo non inoculato; fermentazione del glucosio da parte di *E. coli* con produzione di gas (bolla nella campanella di Durham); fermentazione del glucosio da parte di *S. sonnei* senza produzione di gas; assenza di fermentazione da parte di *P. aeruginosa*.

Nota pratica: molti zuccheri sono termosensibili e non resistono per più di 2 minuti in autoclave. Per questo motivo si sterilizza prima il terreno di base (per approfondire, si veda *Esperienza 1*) e solo dopo si aggiunge la soluzione zuccherina concentrata. Quest'ultima, prima di essere aggiunta al terreno, viene sterilizzata tramite **filtrazione sterile** con filtri che possiedono pori da 0,45 μm .

Il ceppo di *E. coli* DH5- α utilizzato negli esperimenti qui descritti, oltre a essere relativamente sicuro (**Livello di biosicurezza 1**), è privo dell'enzima **β -galattosidasi**, a differenza di altri ceppi presenti in natura, ed è quindi incapace di metabolizzare il lattosio.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

- 7 provette sterili da 15 mL
- 6 siringhe
- 6 filtri sterili da 0,45 µm
- Micropipette P1000 con scatole di puntali
- Cloruro di Sodio (NaCl)
- Triptone
- 1 piastra con *E. coli* DH5-α [Livello di biosicurezza 1]
- 1 vortex
- Varie tipologie di zuccheri allo stato solido

Nota: la soluzione di Rosso Fenolo 0,5% **non è inclusa**. È possibile prepararla o sostituirla con un altro indicatore compatibile con la crescita batterica.

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE DEL TERRENO PER TEST CARBOIDRATI

Materiali per postazione:

- Bottiglia da 250 o 500 mL
- 1 mL di Rosso Fenolo 0,5%
- 7 provette da batteriologia
- 6 campanelle di Durham
- Micropipetta P1000 con scatola di puntali
- Becher per i rifiuti biologici liquidi
- Contenitore per i rifiuti biologici solidi

Materiali in comune:

- Bilancia tecnica
- Autoclave
- NaCl
- Triptone
- Spatole o cucchiari
- Vortex

Procedura (20 minuti)

1. In una bottiglia da 500 mL pesare e mescolare:
 - 4 g di Triptone
 - 2,5 g di NaCl
 - 1440 µL di soluzione di Rosso Fenolo 0,5%
 - 400 mL di acqua distillata
2. Trasferire 9 mL di terreno in 6 provette e 10 mL in 1 provetta (per il **controllo negativo** senza zucchero).
3. Inserire una campanella di Durham in ogni provetta.



4. Applicare un pezzo di nastro indicatore per autoclave su una provetta.
5. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti (in alternativa, usare una pentola a pressione come indicato nell'*Esperienza 1*)
6. Conservare le provette a 2–8 °C.

PARTE SECONDA – PREPARAZIONE E UTILIZZO DELLE SOLUZIONI ZUCCHERINE

Materiali per postazione:

- Bacchetta di vetro o ancorretta magnetica
- 7 provette contenenti il terreno base per test di fermentazione (**PARTE PRIMA**)
- Brodocoltura di *E. coli* DH5- α [**Livello di biosicurezza 1**]
- Tubi sterili da 15 mL
- Siringa
- Filtro sterile da 0,45 μ m
- Micropipetta P100 con scatola di puntali
- Becher per rifiuti biologici liquidi

Materiali in comune:

- Incubatore (opzionale)
- Nastro di carta (scotch)
- Bilancia
- Zuccheri (glucosio, fruttosio, lattosio, saccarosio, mannitolo)
- Spatole o cucchiaini

Procedura

A. Preparazione delle soluzioni zuccherine

1. Preparare un becher da 50 mL e marcare un tubo sterile da 15 mL con nome zucchero 10% (es. glucosio 10%)
2. Pesare nel becher 1 g di zucchero.
3. Aggiungere 10 mL di acqua distillata con un cilindro graduato nel becher contenente lo zucchero.
4. Mescolare fino a completo scioglimento.
5. Filtrare la soluzione nel tubo sterile da 15 mL usando siringa e filtro da 0,45 μ m.
 - Aliquotare 1 mL in tubi da 1,5 mL.
 - Conservare a –20 °C.
 - Ripetere la procedura per ciascuno zucchero.

B. Aggiunta dello zucchero ai terreni

1. Etichettare 5 provette con ID gruppo, *E. coli* DH5- α e il nome di una delle 5 tipologie di zucchero fornite. Etichettare la sesta provetta con ID gruppo, *E. coli* DH5- α , “neg” (controllo negativo, senza zuccheri).
2. Aggiungere 1 mL della corrispondente soluzione zuccherina al 10% (w/v) ai 9 mL di terreno base preparato nella **PARTE PRIMA** (5 provette in totale).



- La concentrazione finale dello zucchero sarà dell'1%.
 - L'aggiunta è preferibile subito prima dell'uso, ma può essere fatta anche in anticipo.
 - 5 provette conterranno, ciascuna, una diversa tipologia di zucchero. La sesta provetta sarà priva di zucchero e rappresenterà il controllo negativo.
3. Conservare le provette a 2–8 °C per **massimo 1–2 settimane**.

Da questo punto in poi, lavorare preferibilmente **in ambiente sterile**.

C. Preparazione dell'inoculo

1. Etichettare l'ultima provetta contenente 9 mL di terreno sterile LB con "*E. coli* DH5- α 1:10".
2. Indossare guanti e occhiali protettivi.
3. Vortexare la brodocoltura di *E. coli* DH5- α .
4. Prelevare 1 mL della brodocoltura con la P1000 e aggiungerlo ai 9 mL contenuti nel tubo LB precedentemente marcato (**diluizione 1:10**).
5. Con la P1000, inoculare ciascuna delle 6 provette (5 con zucchero + 1 controllo negativo senza zucchero) con **0,5 mL di sospensione di *E. coli* DH5- α 1:10**.
6. Incubare a:
 - **37 °C per 24 ore**, oppure
 - **temperatura ambiente per 2–3 giorni**.
7. Al termine, rimuovere gli occhiali, gettare i guanti nei rifiuti biologici e lavarsi accuratamente le mani.
8. Dopo l'incubazione, conservare le provette a 2–8 °C.

PARTE TERZA – VERIFICA DELLA CRESCITA MICROBICA

Materiali per postazione

- Provette inoculate e incubate

Procedura

1. Osservare il colore del terreno contenente **Rosso Fenolo** e controllare la campanella di Durham.
 - **Giallo** → risultato positivo: il batterio ha utilizzato lo zucchero come fonte di carbonio, producendo acidi che hanno abbassato il pH.
 - **Rosso** → risultato negativo: lo zucchero non è stato fermentato.
 - **Bolla d'aria nella campanella** → il microrganismo ha prodotto gas durante la fermentazione.

FAQ

Se dimentico di aggiungere il Rosso Fenolo prima della sterilizzazione, posso inserirlo dopo?

Sì. La soluzione di Rosso Fenolo è fornita sterile (filtrata) e può essere aggiunta anche in un secondo momento.

Il Rosso Fenolo è pericoloso?

Sì, ma solo in polvere o a concentrazioni elevate. Nella diluizione indicata da questo protocollo non è considerato pericoloso.

Cosa significa se ci sono bollicine nella campanella di Durham?

Che i batteri hanno prodotto gas durante la fermentazione.

Posso eseguire l'esperimento senza le campanelle di Durham?

Sì. In questo caso si potrà valutare solo l'acidificazione del terreno (variazione di colore), ma non la produzione di gas.

Posso usare un indicatore di pH diverso dal Rosso Fenolo?

Sì, a patto che il suo intervallo di viraggio sia intorno al pH neutro-acido. Alcuni esempi: blu di bromotimolo o rosso metile.



E S P E R I E N Z A 5

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA



Attività antimicrobica

IL CONTESTO

Esistono sostanze capaci di rallentare la crescita dei microrganismi o di ridurne drasticamente la presenza. La stessa molecola, a seconda della concentrazione, può avere un effetto **inibitorio** (a dosi intermedie) o addirittura **microbicida** (a dosi più elevate). Il meccanismo con cui agiscono varia in base alla loro natura chimica.

Nelle biotecnologie, gli antibiotici più utilizzati sono **ampicillina** e **streptomicina**. I geni che conferiscono resistenza a queste molecole sono comunemente inseriti nei **plasmidi** e permettono di selezionare le cellule che, durante una trasformazione, hanno effettivamente acquisito il plasmide.

- L'**ampicillina**, appartenente alla classe dei **beta-lattamici**, blocca la formazione dei legami crociati del peptidoglicano, indebolendo così la parete cellulare.
- La **streptomicina**, che fa parte degli **aminoglicosidi**, interferisce invece con la **sintesi proteica**, legandosi all'rRNA 16S della subunità 30S del ribosoma batterico.

Per valutare l'efficacia di un antibiotico, o la capacità di un batterio di resistergli, si utilizzano **test standardizzati**. Uno dei più comuni è la determinazione della concentrazione minima inibente (**MIC**), che corrisponde alla più bassa concentrazione di antibiotico in grado di **bloccare la crescita** visibile del microrganismo. Un parametro correlato è la concentrazione minima battericida (**MBC**), che indica invece la quantità di antibiotico necessaria per **uccidere** il batterio. La MBC si ricava trasferendo su nuove piastre i campioni che non mostravano crescita durante il test della MIC: se in queste subcolture non compare alcuna colonia, significa che il batterio è stato eliminato (*Figura 3*).

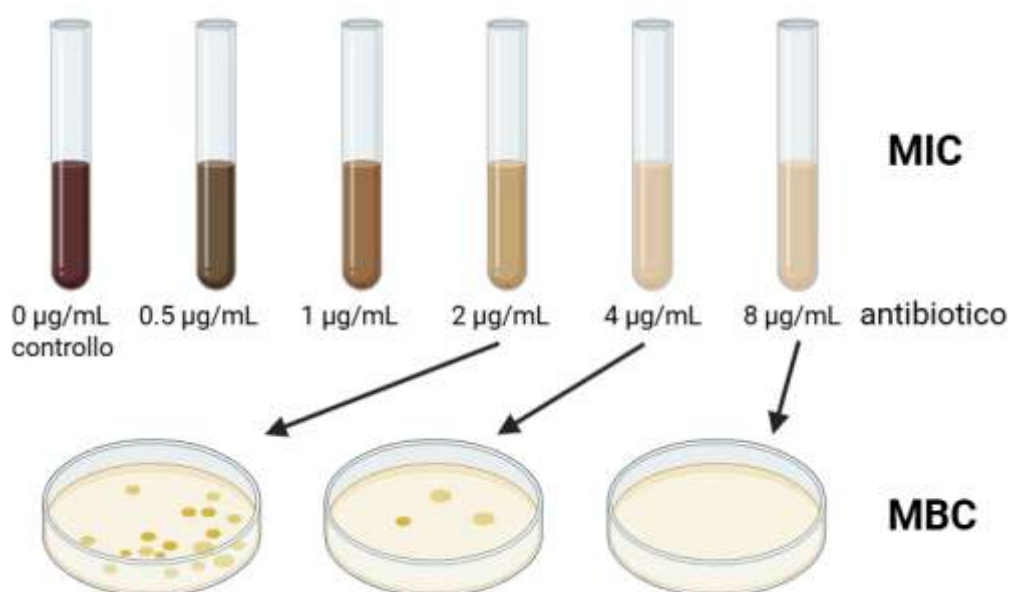


Figura 3. Nell'esempio, la **MIC** dell'antibiotico per il ceppo considerato è pari a 4 µg/mL, mentre la **MBC** è 8 µg/mL.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

Materiali forniti:

- 6 micropipette P1000 + 3 scatole di puntali sterili
- 6 micropipette P200 + 3 scatole di puntali sterili
- Tubi sterili da 15 mL
- Tubini sterili da 1,5 mL
- Ampicillina, soluzione 50 mg/mL (Amp)
- Streptomicina, soluzione 50 mg/mL (Str)
- 1 piastra di *E. coli* DH5- α [Livello di biosicurezza 1]

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE E AGGIUNTA DELLE SOLUZIONI ANTIBIOTICHE

Materiali per postazione:

- 5 provette da 15 mL con 9.5 mL di brodo nutriente sterile (per i dettagli sulla preparazione, si veda l'*Esperienza 1*)
- 1 mL di brodocoltura di *E. coli* DH5- α [Livello di biosicurezza 1]
- 1 tubo da 15 mL ("LB") con 9 mL di brodo nutriente sterile
- Tubini sterili da 1.5 mL
- Tubi sterili da 15 mL
- (per i gruppi pari) Ampicillina 50 mg/mL
- (per i gruppi dispari) Streptomicina 50 mg/mL
- 1 micropipetta P1000 con puntali sterili
- 1 micropipetta P200 con puntali sterili
- Cestino per rifiuti solidi da banco

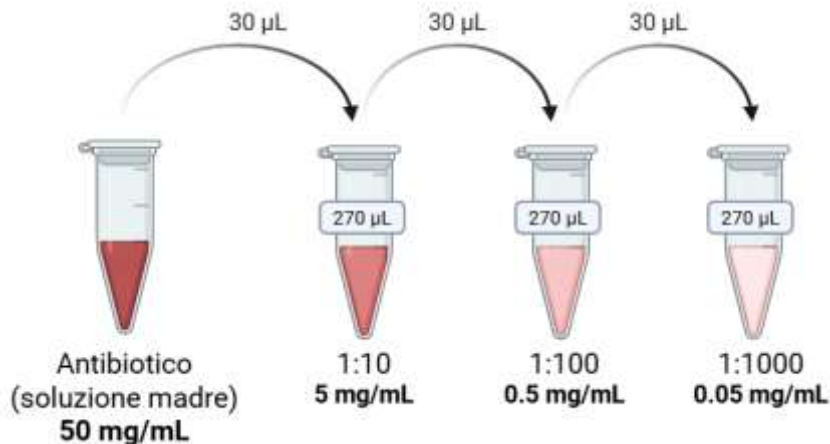
Materiali in comune:

- Vortex
- Spinner

Procedura

A. Preparazione delle soluzioni di antibiotico (es. Ampicillina)

1. Etichettare tre tubini da 1,5 mL con: "**amp 1:10**", "**amp 1:100**", "**amp 1:1000**".
2. Aggiungere **270 μ L di H₂O sterile** in ciascun tubino (usare la P1000).
3. Con la P200, trasferire **30 μ L di soluzione madre** di ampicillina/streptomicina (**50 mg/mL**) nel tubino 1:10.
4. Vortexare, quindi prelevare **30 μ L della soluzione 1:10** e trasferirli nel tubino 1:100.
5. Vortexare, quindi prelevare **30 μ L della soluzione 1:100** e trasferirli nel tubino 1:1000.



B. Preparazione del terreno di coltura con antibiotico

- Etichettare le 5 provette di brodo nutriente sterile con:
 - ID gruppo
 - Tipo di antibiotico (Amp o Str)
 - Concentrazione finale:
 - **0,375 µg/mL, 0,75 µg/mL, 1,5 µg/mL, 3 µg/mL, 6 µg/mL**
- Calcolare, a partire dalle soluzioni preparate, i volumi di antibiotico da aggiungere a ciascuna provetta per ottenere le concentrazioni desiderate.
- Trasferire i rispettivi volumi nelle provette corrispondenti (come riportato in *Tabella*)

	Concentrazione finale (µg/mL)	Concentrazione iniziale (mg/mL)	Volume da prelevare (µL)	Volume finale (mL)
Provetta n. 1	0,375	0,05 (1:1000)	75	10
Provetta n. 2	0,75	0,05 (1:1000)	150	10
Provetta n. 3	1,5	0,5 (1:100)	30	10
Provetta n. 4	3	0,5 (1:100)	60	10
Provetta n. 5	6	0,5 (1:100)	120	10

C. Preparazione dell'inoculo

- Etichettare il tubo "LB" contenente 9 mL di terreno sterile con la dicitura "*E. coli* DH5-α 1:10".
- Indossare guanti e occhiali protettivi.

Da questo punto in poi, lavorare in ambiente sterile.

- Vortexare la brodocoltura di *E. coli* DH5-α e trasferirne 1 mL nel tubo etichettato contenente i 9 mL di terreno sterile, utilizzando la P1000 (**diluizione 1:10**)

D. Inoculo

- Vortexare il tubo *E. coli* DH5-α 1:10.

2. Aggiungere ad ogni provetta 0,5 mL di sospensione batterica diluita.
3. Incubare a **37 °C per 24 ore**.
4. Al termine, rimuovere occhiali e guanti, quindi lavarsi accuratamente le mani.
5. Conservare le provette a **4 °C per un massimo di 1-2 settimane**.

PARTE SECONDA – VALUTAZIONE DELLA MIC

Materiali per postazione

- 5 provette inoculate con diverse concentrazioni di antibiotico
- Uno schermo per la valutazione della torbidità

Procedura

1. Osservare la torbidità delle provette per determinare la **concentrazione minima di antibiotico che inibisce la crescita**.
2. Una provetta **torbida** indica che la concentrazione di antibiotico è insufficiente a bloccare la crescita batterica.
3. Una provetta **limpida** indica che la concentrazione è efficace e la crescita di *E. coli* è inibita.

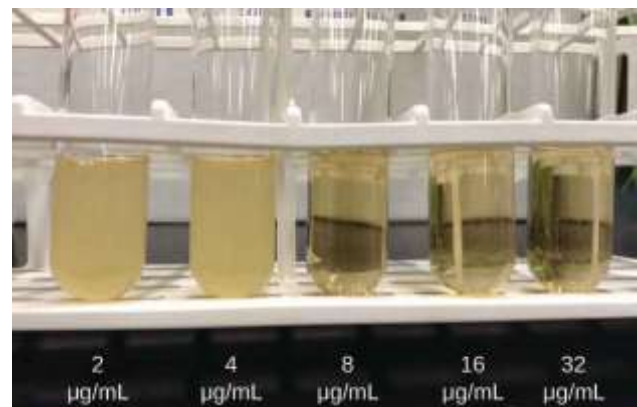
FAQ

Come posso valutare la torbidità?

Utilizzando degli standard di confronto/controlli. Il riferimento per una soluzione “non torbida” è il terreno non inoculato, mentre il riferimento per una soluzione torbida è il terreno inoculato ma privo di antibiotico.

Se ho difficoltà a distinguere la torbidità?

È utile appoggiare le provette davanti a un foglio con righe stampate o superfici rigate: le righe appariranno più o meno definite a seconda della torbidità della soluzione. Un esempio è riportato nell'immagine a destra, da cui si evince che la MIC è pari a 8 µg/mL.



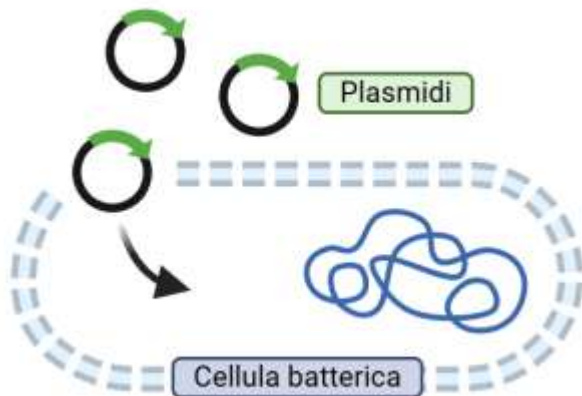


E S P E R I E N Z A 6

TRASFORMAZIONE BATTERICA

Trasformazione batterica

IL CONTESTO



La **trasformazione batterica** è una tecnica fondamentale della biologia molecolare che consente di introdurre **plasmidi** (segmenti di DNA circolare esogeno) all'interno di **cellule batteriche**.

Questo processo permette ai microrganismi di acquisire nuove caratteristiche, come la **resistenza a un antibiotico** o l'espressione di una **proteina d'interesse terapeutico**.

In laboratorio, un esempio didattico largamente adottato consiste nell'utilizzare il batterio *E. coli* come organismo ospite in combinazione con un plasmide contenente il gene della **Green Fluorescent Protein (GFP)**. La GFP, isolata in origine dalla medusa *Aequorea victoria*, emette fluorescenza verde quando esposta alla **luce UV** e rappresenta un marcatore **facilmente osservabile**. L'inserimento di un plasmide che porta sia il gene GFP sia un gene di resistenza ad un antibiotico permette di selezionare le cellule trasformate: solo quelle che hanno incorporato il plasmide sopravvivono in presenza dell'antibiotico e mostrano fluorescenza. Questo tipo di esperimento è utile per mostrare in maniera semplice ed efficace il legame tra DNA, espressione genica e fenotipo.



CONTENUTO DELLA VALIGETTA

Materiali forniti:

- Terreno LB liofilizzato (per preparare 0.5 L di terreno solido)
- Agar in polvere (per preparare 0.5 L di terreno solido)
- Terreno LB liquido/brodo nutriente
- 24 piastre Petri sterili (piccole, 60 mm)
- 1 piastra Petri contenente LB agar (grande, 100 mm)
- 1 piastra Petri Starter con singole colonie di *E. coli* K-12 [Livello di biosicurezza 1]
- 6 micropipette P10
- 6 micropipette P200
- 6 micropipette P1000
- 3 scatole di puntali sterili per P10
- 3 scatole di puntali sterili per P200
- 3 scatole di puntali sterili per P1000
- 1 scatola di tubini da 1.5 mL
- Portaprovette (rack)
- Plasmide pGLO (0.08 µg/mL), DNA
- Ampicillina (10 mg/mL), antibiotico
- Arabinosio (300 mg/mL), zucchero
- Soluzione di trasformazione (CaCl₂)
- Lampadina UV

OPERAZIONI PRELIMINARI

Per garantire la corretta riuscita dell'esperienza di trasformazione, è necessario che il docente prepari in anticipo una nuova piastra starter a partire da una singola colonia batterica presente nella piastra starter fornita nella valigetta.

1. Sistemare sul bancone la piastra Starter contenente le colonie batteriche e la piastra contenente LB agar.
2. Utilizzando un'ansa sterile da inculo, selezionare una singola colonia batterica dalla piastra Starter e strisciarla sulla piastra contenente terreno LB agar, suddividendo idealmente la superficie della piastra in cinque settori (come indicato nella *Figura 4*). Eseguire lo striscio in modo sequenziale da un settore al successivo, riducendo progressivamente la quantità di batteri trasferiti, così da favorire la formazione di colonie isolate.
3. Incubare la piastra in posizione capovolta a 37 °C per 24 ore oppure a temperatura ambiente per circa 3 giorni, fino alla comparsa di colonie batteriche ben visibili.
4. Al termine dell'incubazione, la nuova piastra starter è pronta per l'utilizzo.
NON conservare mai la piastra starter in frigorifero, poiché le basse temperature possono compromettere la capacità dei batteri di essere trasformati.

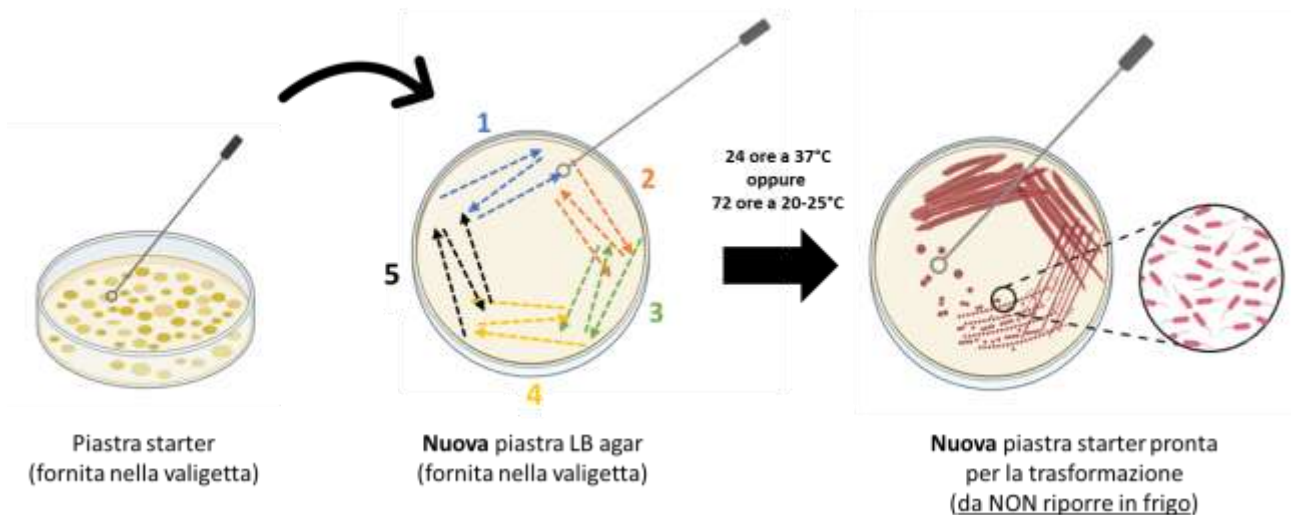


Figura 4. Una singola colonia batterica viene prelevata con un'ansa sterile e distribuita in cinque settori di una nuova piastra per ottenere colonie isolate.

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE DELLE PIASTRE DI SELEZIONE

Materiali per postazione:

- 4 piastre Petri sterili (piccole, 60 mm)

Materiali in comune:

- 10 g di terreno LB liofilizzato
- 7.5 g di agar
- Cucchiaino o spatola
- 3 mL di Ampicillina 10 mg/mL
- Microonde

Procedura

1. Versare 500 mL di acqua distillata sterile in una beuta o bottiglia da 1 L.
2. Aggiungere alla beuta le polveri di LB liofilizzato e agar (per approfondire, si veda la procedura riportata nell'*Esperienza 2*).
- **Sterilizzazione con pentola a pressione:** Lasciare 20 minuti a partire dal fischio. In questo caso, è fortemente consigliato scaldare prima la bottiglia su piastra riscaldante o a bagnomaria finché le polveri non si sciolgono e la soluzione non diventa giallina.
- **Sterilizzazione con autoclave:** inserire la bottiglia con il tappo allentato in autoclave e avviare il ciclo di sterilizzazione (121°C, 15 minuti).
3. Terminato il ciclo di sterilizzazione (pentola a pressione o autoclave), agitare subito il terreno per distribuire uniformemente l'agar.
4. Lasciare raffreddare fino a circa 50 °C (preferibilmente a bagnomaria. Quando è possibile afferrare la beuta senza scottarsi, la temperatura è corretta).
5. Mentre il terreno si raffredda, marcare le 4 piastre sul fondo (**non sul coperchio**) come segue:



- LB/amp +pGLO
- LB/amp/ara +pGLO
- LB/amp -pGLO
- LB -pGLO

Da questo punto in poi, lavorare preferibilmente in ambiente sterile.

6. Versare il terreno raffreddato nella piastra “LB -pGLO”, riempiendole per circa 1/3 dell'altezza (circa 15 mL per piastra).
7. Aggiungere 3 mL di Ampicillina 10 mg/mL al terreno rimasto nella beuta/bottiglia (la concentrazione finale di Ampicillina sarà intorno ai 50-100 µg/mL).
8. Distribuire il terreno LB + Ampicillina nelle restanti 3 piastre.
9. Fare un leggero movimento rotatorio per distribuire uniformemente il terreno. Successivamente, appoggiare il coperchio sulle piastre senza coprirle del tutto, in modo che il vapore possa uscire, così da evitare la formazione di condensa.
10. Lasciare raffreddare fino a completa gelificazione (15 – 20 minuti) in ambiente sterile.
11. Una volta solidificate, chiudere i coperchi e conservare le piastre capovolte.
12. Per conservarle a lungo, riporle nel loro sacchetto e mantenerle in frigorifero.

PARTE SECONDA – TRASFORMAZIONE

Materiali per postazione:

- 1 piastra Petri con LB agar (**PARTE PRIMA**)
- 3 piastre Petri di selezione con LB agar + Ampicillina (**PARTE PRIMA**)
- 1 tubino da 1.5 mL con 10 µL di plasmide pGLO
- 1 tubino da 1.5 mL con 550 µL di soluzione di trasformazione (CaCl₂)
- 1 tubino da 1.5 mL con 550 µL di terreno LB liquido/brodo nutriente
- 1 tubino da 1.5 mL con 60 µL di Arabinosio
- 1 micropipetta P10
- 1 micropipetta P200
- 1 micropipetta P1000
- 1 scatola di puntali sterili per P10
- 1 scatola di puntali sterili per P200
- 1 scatola di puntali sterili per P1000
- Anse sterili da inoculo
- Anse sterili a L
- Portaprovetta
- Vaschetta con ghiaccio tritato
- Pennarello indelebile

Materiali in comune:

- Nuova piastra Starter con *E. coli* K-12 [Livello di biosicurezza 1]
- 1 scatola di tubini da 1.5 mL
- Bagnomaria 42 °C

- Incubatore 37 °C

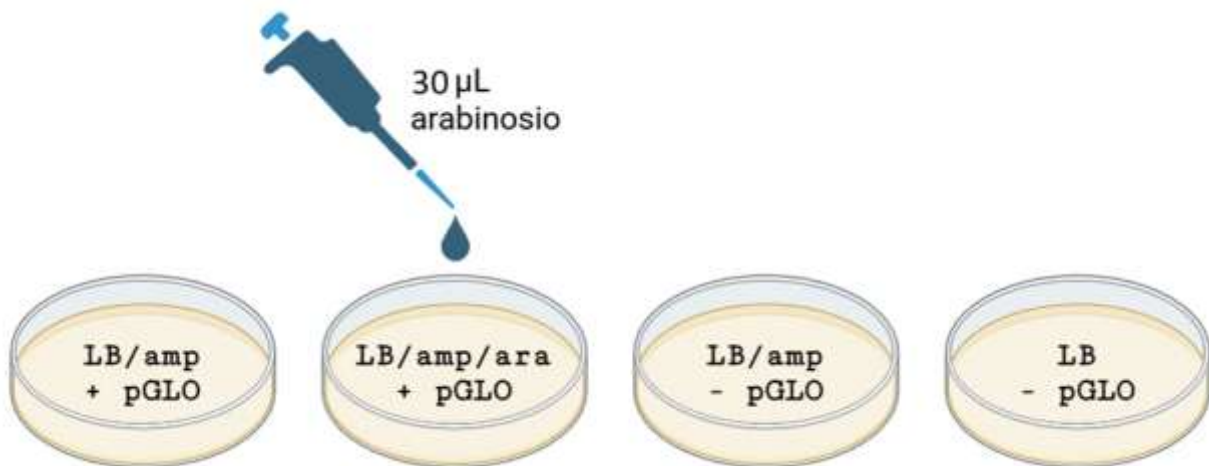
Procedura

A. Preparazione della trasformazione

1. Marcare due tubi sterili da 1.5 mL: “+pGLO” e “-pGLO”.
2. Aggiungere 250 µL di soluzione di trasformazione in ciascun tubo.
3. Riporre i tubi in ghiaccio.
4. Con un’ansa sterile, prelevare una colonia dalla nuova piastra Starter (preparata in **OPERAZIONI PRELIMINARI**), immergerla nel tubo “+pGLO”, mescolare e riporre in ghiaccio.
5. Ripetere l’operazione con il tubo “-pGLO” utilizzando una nuova ansa sterile.
6. Aggiungere 10 µL di plasmide pGLO solo al tubo “+pGLO” e mescolare pipettando delicatamente.
7. Riporre entrambi i tubi in ghiaccio per 10 minuti.

B. Allestimento delle piastre Petri

1. Disporre le 4 piastre preparate e marcate nella **PARTE PRIMA** sul bancone.
2. Aggiungere 30 µL di Arabinosio sulla piastra “LB/amp/ara +pGLO”.



3. Disperdere la goccia su tutta la superficie con un’ansa a L sterile.

C. Shock termico

1. Trasferire i 2 tubini “-pGLO” e “+pGLO” dal ghiaccio al bagnomaria a 42°C per 50 secondi.
2. Riporre immediatamente i 2 tubi in ghiaccio per 2 minuti.

D. Recupero e inoculo

1. Rimuovere i tubi dal ghiaccio e lasciarli a temperatura ambiente.
2. Aggiungere 250 µL di brodo nutriente in ciascun tubo e mescolare delicatamente.
3. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti.



4. Inoculare 50 µL dal tubino “-pGLO” nella piastra “LB -pGLO” e disperdere con ansa a L sterile.
5. Ripetere per la piastra “LB/amp -pGLO”.
6. Inoculare 50 µL dal tubino “+pGLO” nella piastra “LB/amp +pGLO” e disperdere con ansa a L sterile.
7. Ripetere per la piastra “LB/amp/ara +pGLO”.
8. Capovolgere le piastre e incubare a 37°C per 24 ore.

PARTE TERZA – OSSERVAZIONE DEI RISULTATI

Materiali per postazione:

- 4 piastre Petri inoculate e incubate

Materiali in comune:

- Lampadina UV

Procedura

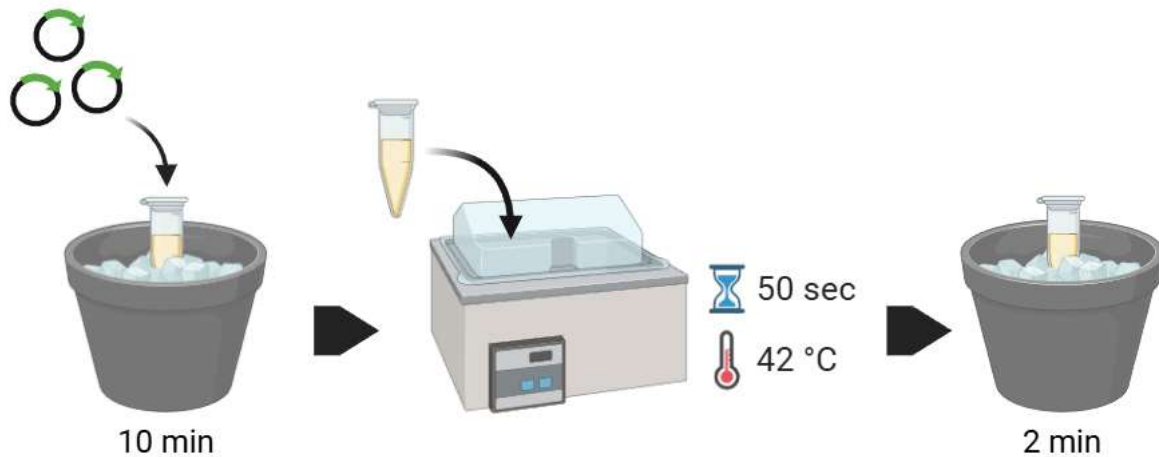
Verificare per ogni piastra:

1. **Presenza e numero delle colonie:** indica se i batteri hanno potuto crescere sul terreno specifico; il numero fornisce un'idea dell'efficienza della trasformazione e della selettività dell'antibiotico.
2. **Forma e colore delle colonie:** permette di confrontare i batteri trasformati con quelli non trasformati; colonie bianche indicano assenza di espressione della GFP, mentre la forma regolare conferma la purezza della coltura.
3. **Reattività alla luce UV:** evidenzia la presenza di GFP nelle colonie che hanno acquisito e attivato il gene; solo le colonie cresciute su terreno con arabinosio e contenenti il plasmide mostrano fluorescenza verde

FAQ

Perché è importante far durare 50 secondi lo shock termico a 42°C?

Lo shock termico (passaggio rapido da ghiaccio a 42°C e ritorno sul ghiaccio) è essenziale per favorire l'ingresso del DNA plasmidico nei batteri. La durata di 50 secondi è stata ottimizzata per massimizzare l'efficienza di trasformazione del ceppo utilizzato. Tempi più lunghi, ad esempio 90 secondi, riducono l'efficienza di circa il 50%. Saltare lo shock termico riduce drasticamente la trasformazione, con un numero di cellule trasformate fino a 10 volte inferiore.



Qual è il ruolo del CaCl_2 ?

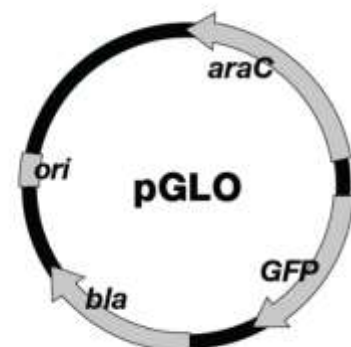
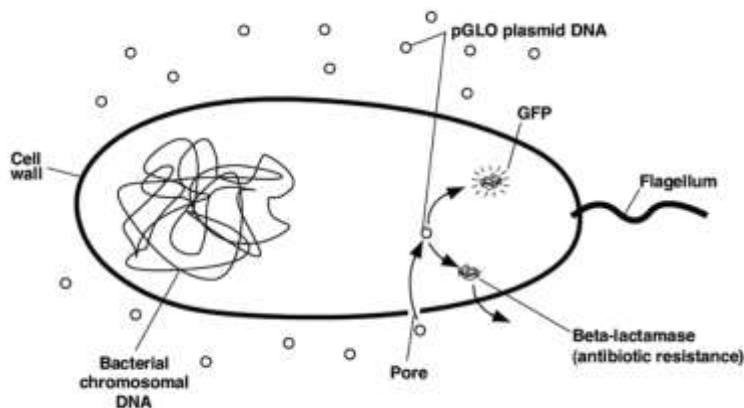
Il CaCl_2 presente nella soluzione di trasformazione rende le cellule competenti all'ingresso del DNA plasmidico. I cationi Ca^{2+} neutralizzano le cariche negative del DNA (gruppi fosfato) e della membrana cellulare. Questa neutralizzazione riduce la **repulsione elettrostatica** e permette al DNA di avvicinarsi e attraversare la membrana, processo completato grazie allo shock termico.

Perché aggiungere LB dopo lo shock termico?

Il breve periodo di incubazione dopo lo shock termico consente il recupero cellulare, permette l'inizio della crescita e produrre alle cellule trasformate la **beta-lattamasi**, l'enzima che conferisce resistenza all'ampicillina. Quando verranno piastrate sul terreno selettivo, le cellule avranno già iniziato a sintetizzare l'enzima necessario per sopravvivere in presenza dell'antibiotico e formare colonie.

Come funziona il sistema inducibile pGLO?

"pGLO" è il nome di un plasmide ingegnerizzato al fine di far produrre ai batteri la GFP solo quando nell'ambiente è presente lo zucchero arabinosio. È quindi un sistema di espressione genica inducibile basato su un meccanismo di accensione/spegnimento molto semplice da osservare.



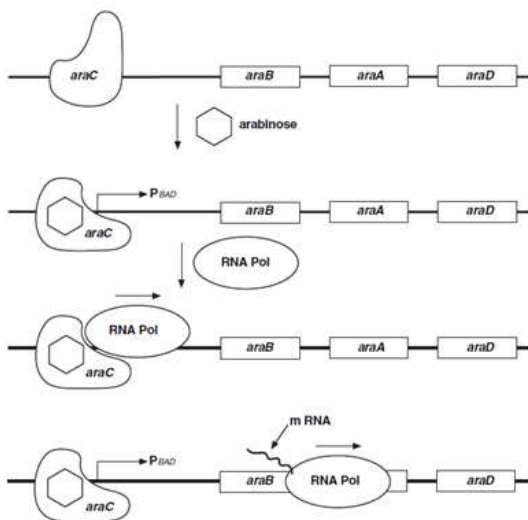
In breve:

- **Il plasmide pGLO entra nei batteri tramite trasformazione.** Oltre al gene che produce la GFP, il plasmide contiene anche un gene di resistenza all'ampicillina: questo permette, quando l'antibiotico è presente, di selezionare solo i batteri che hanno effettivamente preso il plasmide.
- **La GFP non è sempre "accesa".** Il gene GFP, nel plasmide pGLO, è sotto il controllo del promotore *P_{BAD}*, che in natura regola l'espressione dei geni necessari a metabolizzare l'arabinosio nei batteri.
- **La proteina regolatrice AraC decide se il gene si accende o no.** Il plasmide produce anche AraC, che può assumere due configurazioni:

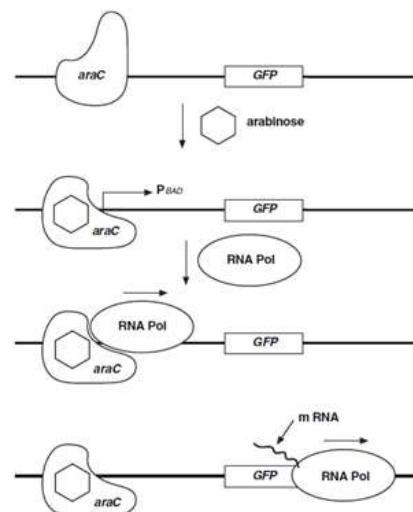
Senza arabinosio: AraC blocca il promotore *P_{BAD}* → GFP è spento → batteri bianchi.

Con arabinosio: AraC cambia forma, permette alla RNA polimerasi di legarsi → GFP è acceso → i batteri producono GFP (visibile tramite luce UV).

The Arabinose Operon



Expression of Green Fluorescent Protein





E S P E R I E N Z A 7

DISINFEZIONE DELLE MANI



Disinfezione delle mani

IL CONTESTO

Un **antisettico** è una sostanza chimica in grado di prevenire o bloccare la **crescita dei microrganismi**, agendo attraverso la loro inibizione o distruzione. Questi composti possono essere applicati in modo sicuro sui tessuti viventi, poiché combinano un'azione microbica efficace con una bassa citotossicità.

Gli antisettici vengono classificati in base al loro **livello di efficacia** e, nella tabella seguente, sono riportati quelli più comunemente impiegati in ambito ospedaliero.

Livello di attività	ANTISETTICO
Basso	Perossido d'idrogeno 3%
Basso	Iodofori (alcune formulazioni)
Basso	Clorexidina
Intermedio	Clorossidante elettrolitico (allo 0,05% con 550ppm di cloro attivo)
Intermedio	Iodofori (con oltre 40/50 mg di iodio libero o oltre 10000mg/ litro di iodio disponibile)
Intermedio	Alcoli (isopropilico, etilico) 70-90%

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

Materiali forniti:

- 20 g di LB broth in polvere
- 15 g di Bacto Agar in polvere
- 30 piastre Petri sterili

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE DELLE PIASTRE

Materiali per postazione:

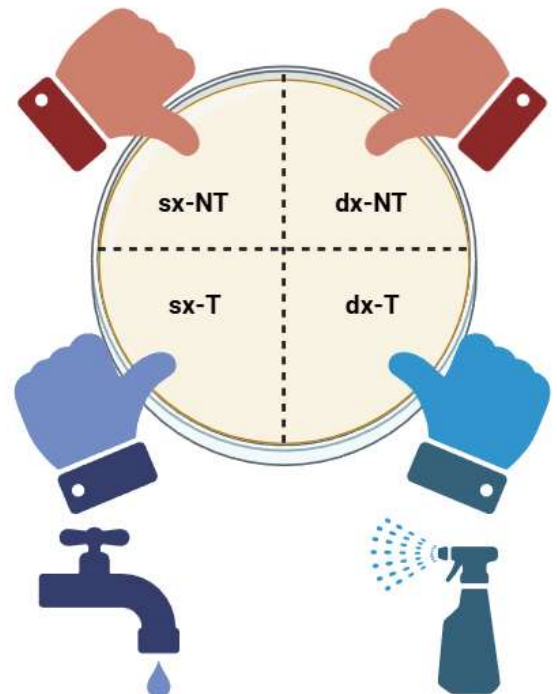
- Una piastra di LB Agar
- Carta assorbente

Materiali in comune:

- Pennarello vetrografico
- Clorexidina (soluzione cutanea) o altro disinfettante
- Acqua di rubinetto

Procedura

1. Preparare le piastre di LB Agar seguendo le indicazioni riportate nell'*Esperienza 1*.
2. Etichettare la piastra di LB Agar con l'ID del gruppo e il proprio nome.
3. Con il pennarello vetrografico tracciare una croce sul fondo della piastra per suddividerla in quattro settori. Annotare in piccolo il proprio nome sul bordo.
4. Identificare i quattro quadranti indicando cosa verrà piastrato: pollice destro e sinistro **non trattati** (NT) e **trattati** (T) con disinfettante o acqua. Scrivere: "dx-NT", "sx-NT", "dx-T" e "sx-T".
5. Appoggiare per alcuni secondi il polpastrello del pollice sinistro sul settore "sx-NT" e il pollice destro sul settore "dx-NT".
6. Con carta assorbente o al lavandino, strofinare acqua corrente sul pollice sinistro per circa 10 secondi.
7. Lasciare asciugare per non più di un minuto, evitando di toccare superfici che possano contaminare il pollice.
8. Premere delicatamente il polpastrello del pollice sinistro sul settore "sx-T".
9. Con carta assorbente, distribuire clorexidina (o altro disinfettante) sul pollice destro per circa 10 secondi.





10. Lasciare asciugare per non più di un minuto, evitando contaminazioni accidentali.
11. Premere il polpastrello del pollice destro sul settore “dx-T”.
12. Incubare la piastra a 37 °C per circa 24 ore (oppure a 22 °C per 72 ore).

PARTE SECONDA – OSSERVAZIONE DEI RISULTATI

Materiali per postazione:

- Piastre di LB Agar incubate
- Calcolatrice

Procedura

1. Distribuire le piastre incubate;
2. Contare il numero di colonie presenti in ciascun quadrante;
3. Calcolare la percentuale di riduzione ottenuta con i due metodi di trattamento utilizzando la formula:

$$\% \text{ riduzione} = \frac{(NT - T)}{NT} \times 100\%$$

dove

NT = numero di colonie nel quadrante non trattato

T = numero di colonie nel quadrante trattato

Se **T > NT**, la percentuale di riduzione è pari a **0%**.

Se **T = 0**, la riduzione è pari al **100%**.

Confrontare i due valori ottenuti per valutare l'efficacia relativa dei due trattamenti.

FAQ

Ci possono essere microrganismi tossici o rischiosi nelle piastre?

Di norma, sulla pelle non sono presenti microrganismi pericolosi. Tuttavia, è buona pratica osservare le piastre senza aprirle. Se compare una colonia dall'aspetto anomalo, è consigliabile sigillare la piastra con scotch o parafilm.

Come si smaltiscono le piastre contenenti microrganismi?

Le piastre devono essere eliminate come rifiuti biologici: prima vanno autoclavate e poi smaltite nel rifiuto secco.

È possibile osservare le piastre allo stereomicroscopio?

Sì. Lo stereomicroscopio è molto utile per visualizzare con maggiore precisione le colonie e riconoscerne forma e margini.



E S P E R I E N Z A 8

DISINFEZIONE DELLE SUPERFICI

Disinfezione delle superfici

IL CONTESTO

Si definisce **disinfettante** un composto chimico in grado di eliminare i microrganismi presenti su superfici o materiali inerti, con l'unica eccezione di alcune spore batteriche. Questi prodotti vengono classificati in base al loro livello di efficacia.

L'**attività biocida**, ovvero la capacità del disinfettante di danneggiare e uccidere i microrganismi bersaglio, è **influenzata da diversi fattori**: il tipo di superficie su cui deve agire, le caratteristiche del microrganismo, l'entità della carica microbica, la durata dell'esposizione, la presenza di biofilm, nonché il pH e la temperatura dell'ambiente in cui si applica.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

Materiali forniti:

- 20 g di LB broth in polvere
- 15 g di Bacto Agar in polvere
- 30 piastre Petri sterili

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE DELLE PIASTRE

Materiali per postazione:

- Una piastra di LB Agar
- Un cotton fioc a testa
- Carta assorbente

Materiali in comune:

- Pennarello indelebile a punta fine
- Etanolo 70%
- Acqua di rubinetto
- Scotch di carta

Procedura

1. Etichettare il fondo delle piastre con l'ID del gruppo e il tipo di trattamento applicato: "Etanolo 70%" e "NT" (non trattato);
2. Con lo scotch di carta delimitare su una superficie due aree da 100 cm² (circa la superficie di un sottobicchiere di dimensioni standard), marcandole "Etanolo" e "NT". Le due zone devono essere vicine ma non contigue;
3. Applicare etanolo al 70% nell'area "Etanolo", strofinando con carta assorbente per 10 secondi;
4. Strofinare un cotton fioc sull'area non trattata e distribuirlo uniformemente, con delicatezza, sulla piastra "NT";
5. Ripetere l'operazione con un nuovo cotton fioc per l'area trattata con etanolo, utilizzando la piastra "Etanolo 70%";
6. Incubare le piastre a 37 °C per 24 ore (oppure a 22 °C per 72 ore).

PARTE SECONDA – OSSERVAZIONE DEI RISULTATI

Materiali per postazione:

- Piastre di LB Agar incubate
- Penna conta-colonie (opzionale)
- Scheda di identificazione colonie (Allegato D)

Procedura

1. Esaminare le piastre e verificarne l'integrità, l'assenza di condensa e la presenza di colonie ben distinguibili.
2. Contare il numero di colonie presenti in entrambe le piastre, avvalendosi della penna conta-colonie se disponibile.
3. Calcolare quindi la percentuale di riduzione del numero di colonie derivanti dalla superficie trattata rispetto alla condizione non trattata, utilizzando la formula:

$$\% \text{ riduzione} = \frac{(NT - E_{\text{etanolo}})}{NT} \times 100\%$$

dove

NT = numero di colonie superficie non trattata

Etanolo = numero di colonie superficie trattata con Etanolo 70%

Se **Etanolo** > **NT**, la percentuale di riduzione è pari a **0%**.

Se **Etanolo** = **0**, la riduzione è pari al **100%**.

FAQ

Ci possono essere microrganismi tossici o pericolosi nelle piastre?

Generalmente, sulle superfici con cui entriamo in contatto non crescono microrganismi pericolosi. Tuttavia, è sempre consigliabile osservare le piastre senza aprire il coperchio. Se dovesse apparire qualche colonia sospetta, sigillare la piastra con scotch o parafilm e non aprirla.

Come smaltire le piastre con microrganismi?

Le piastre devono essere considerate rifiuti biologici. Prima dello smaltimento, è necessario autoclavare il materiale per sterilizzarlo e poi gettarlo nel rifiuto secco.



E S P E R I E N Z A 9

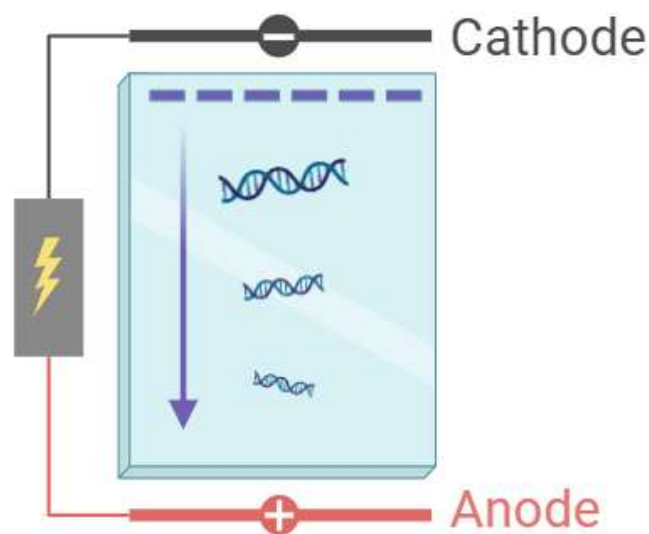
ELETTROFORESI DI DNA PRECUT DI LAMBDA SU GEL DI AGAROSIO



Elettroforesi di DNA precut Lambda su gel di agarosio

IL CONTESTO

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica utilizzata per **separare molecole di DNA** in base alla loro **lunghezza**. Il DNA ha **carica negativa** grazie ai gruppi fosfato dei nucleotidi, quindi viene attratto verso il polo positivo sotto l'azione di un campo elettrico. Frammenti più lunghi incontrano maggiore resistenza nel gel e si muovono più lentamente, mentre quelli più corti migrano più rapidamente.



Il gel è costituito da **agarosio**, un polisaccaride che forma una maglia: più alta è la concentrazione di agarosio, più fitta sarà la rete e maggiore sarà la capacità di separare frammenti di DNA di dimensioni simili. L'elettroforesi produce un profilo di bande lungo l'asse del gel, che può essere visualizzato con marcatori fluorescenti. Per determinare le dimensioni dei frammenti, si fa correre un **marker di DNA** di lunghezza nota accanto ai campioni. È possibile anche analizzare campioni di DNA digeriti con enzimi di restrizione: il pattern di bande risultante è specifico per ciascun enzima, permettendo l'identificazione dei frammenti generati. Come esempio di elettroforesi, si utilizzerà il **DNA del Batteriofago Lambda precut**, ovvero già digerito con **enzimi di restrizione**. Questo DNA rappresenta un riferimento ideale perché contiene frammenti di lunghezze note e variabili, permettendo di osservare chiaramente come le molecole di diverse dimensioni migrano nel gel. L'utilizzo di DNA Lambda precut consente inoltre di familiarizzare con la tecnica senza la variabilità legata a digestioni appena eseguite, garantendo risultati riproducibili e facilmente interpretabili. In questo modo gli studenti possono confrontare le bande ottenute con le dimensioni note dei frammenti e comprendere meglio il principio di separazione molecolare.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

Materiali forniti:

- 6 micropipette P10
- 6 micropipette P100
- 3 scatole di puntali sterili per P10
- 3 scatole di puntali sterili per P100
- 1 scatola di tubini da 1.5 mL
- Campioni di DNA (diluiti 1:8)
 - 30 μ L di DNA Lambda non digerito o *uncut* (tubino "1", colore giallo)
 - 30 μ L di DNA Lambda digerito con ***PstI*** (tubino "2", colore viola)
 - 30 μ L di DNA Lambda digerito con ***EcoRI*** (tubino "3", colore verde)
 - 30 μ L di DNA Lambda digerito con ***HindIII*** (tubino "4", colore rosso)
- 30 μ L di Sample Loading Dye (tubino "5", colore blu)
- Apparecchiatura per elettroforesi con trasformatore
- Gel precast

OPERAZIONI PRELIMINARI (circa 30')

Questa fase di preparazione delle aliquote può essere svolta dal docente, dal tecnico o dagli studenti, prestando attenzione alle piccole quantità.

1. Decongelare in ghiaccio i tubini contenenti i reagenti;
2. Centrifugare per pochi secondi (*spinnare*) i tubini con la centrifuga dotata di supporto per tubini da 1.5 mL, per convogliare tutta la soluzione sul fondo.
3. Marcare chiaramente i tubini in cui saranno preparate le aliquote (5 tubini da 1.5 mL per gruppo) con i numeri corrispondenti: "1", "2", "3", "4", "5".
4. Aliquotare i DNA in modo che ogni gruppo di studenti (massimo 6 gruppi) disponga dei tubini contenenti DNA e marker mantenuti in ghiaccio. Se le aliquote non vengono utilizzate immediatamente, conservarle in congelatore fino a pochi minuti prima dell'uso.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E CARICAMENTO SU GEL

Materiali per postazione:

- 4 μ L di DNA Lambda non digerito (1)
- 4 μ L di DNA Lambda digerito con ***PstI*** (2)
- 4 μ L di DNA Lambda digerito con ***EcoRI*** (3)
- 4 μ L di DNA Lambda digerito con ***HindIII*** (4)
- 4 μ L di Sample Loading Dye (5)
- Vaschetta con ghiaccio tritato



- 1 micropipetta P10
- 1 micropipetta P100
- 1 scatola di puntali sterili per P10
- 1 scatola di puntali sterili per P100

Materiali in comune:

- 1 scatola di tubini da 1.5 mL sterili
- Minispinner
- Vortex

Procedura

Indossare i **guanti** per evitare la contaminazione dei campioni con le tracce di DNA presente sulle mani. Pulire il banco di lavoro con **etanolo al 70%** (o alcol denaturato diluito al 70%) e carta assorbente prima e dopo l'attività, così da ridurre al minimo la contaminazione da parte di DNA estraneo. Se non diversamente specificato, mantenere i tubi contenenti il DNA in ghiaccio.

A. Preparazione dei campioni di DNA di Lambda

1. Scongellare in ghiaccio le aliquote di DNA di Lambda 1, 2, 3, 4 e il Sample Loading Dye (5).
2. Etichettare i 4 tubini contenenti le aliquote di DNA aggiungendo l'ID del gruppo.
3. Aggiungere 1 μ L di Sample Loading Dye (5) a ciascuno dei tubi contenenti DNA e mescolare *spipettando* delicatamente.

B. Preparazione della cassetta (vedi foto nella sezione FAQ)

1. Rimuovere la cassetta dalla confezione.
2. Togliere la pellicola bianca che copre i pozzetti.
3. Riempire i pozzetti con acqua distillata utilizzando una micropipetta P100.
4. Capovolgere la cassetta per eliminare l'eccesso d'acqua.
5. Inserire la cassetta nell'apposito alloggiamento.

C. Caricamento del DNA di Lambda e avvio della corsa

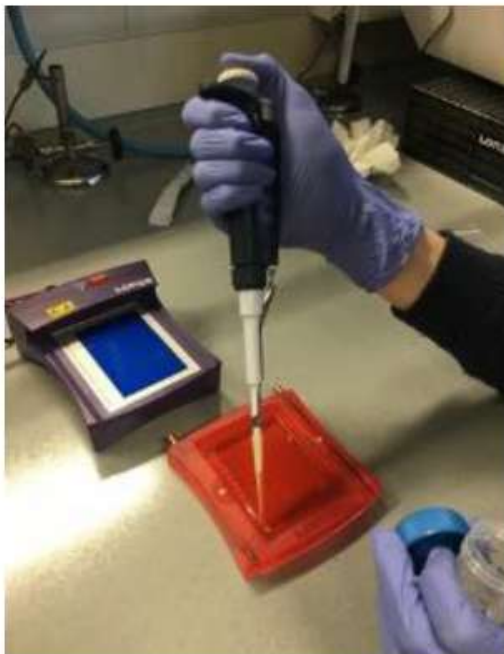
È utile segnare direttamente sulla cassetta, con un pennarello a punta fine per superfici lisce, l'identificativo dei campioni caricati, così da ricordare cosa si sta caricando nei pozzetti.

1. Caricare 5 μ L di campione in ogni pozzetto.
2. Collegare il polo positivo (rosso) del dock al polo positivo dell'alimentatore e il polo negativo (nero) al polo negativo.
3. Avviare l'alimentatore.
4. Accendere la lampada e seguire la migrazione dei campioni per 2–7 minuti.
5. Interrompere la corsa prima che i frammenti più piccoli raggiungano il bordo del gel.
6. Scollegare i cavi del dock dall'alimentatore e spegnerlo.
7. Osservare il gel ed effettuare le considerazioni finali.

FAQ

Come va preparata la cassetta?

- Rimuovere la cassetta dalla confezione.
- Rimuovere la striscia bianca con scritta "Lonza".
- Rimuovere la pellicola bianca che copre i pozzetti.
- Riempire i pozzetti con acqua distillata tramite P100.
- Rovesciare la cassetta per eliminare l'eccesso di acqua; tamponare se necessario.
- Inserire la cassetta nel blocco viola.



Perché il DNA viene fornito diluito 1:8?

Il DNA è fornito già diluito perché il sistema di elettroforesi utilizzato è particolarmente sensibile e richiede concentrazioni relativamente basse per garantire una separazione efficace dei frammenti. Caricare quantità troppo elevate comprometterebbe la risoluzione, rendendo più difficile distinguere le bande corrispondenti ai diversi pesi molecolari.

Come conservare il DNA se la corsa viene eseguita in un giorno diverso?

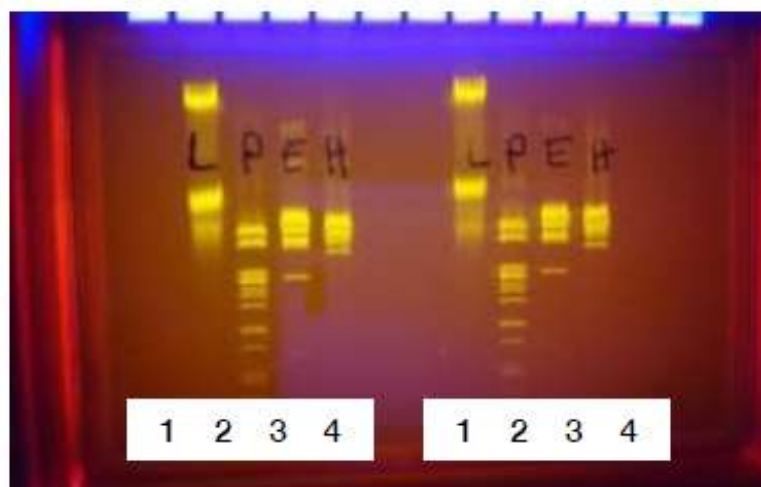
Il DNA può essere conservato a 4 °C (frigo) senza difficoltà. Per periodi più lunghi, superiori alle 24 ore, è preferibile conservarlo a -20 °C (congelatore).

Come dovrebbe apparire il gel dopo aver caricato i campioni?

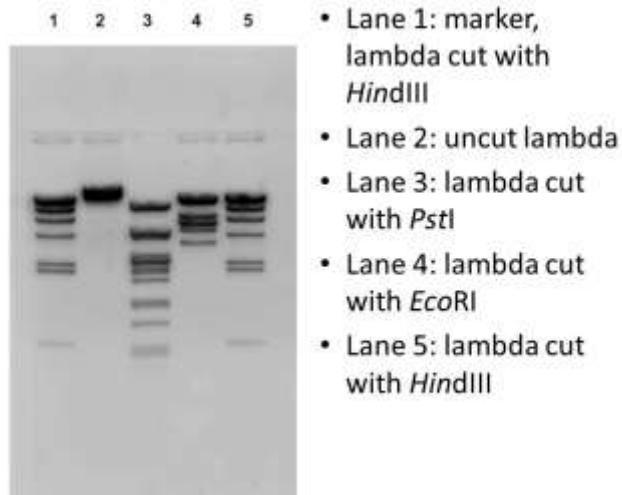
Con la lampada accesa, i pozzetti devono risultare ben illuminati, permettendo di vedere chiaramente il campione depositato al loro interno:

**Come dovrebbe apparire il gel al termine della corsa elettroforetica?**

I frammenti di DNA devono essersi separati lungo il gel in base al loro peso molecolare, formando bande ben definite: quelle più piccole saranno migrate più in basso, mentre quelle più grandi rimarranno più vicine ai pozzetti.



Come tagliano il DNA del Batteriofago Lambda gli enzimi di restrizione usati?



Quanti campioni si possono caricare per cassetta?

La cassetta presenta una configurazione di 16 pozzetti per ciascuna delle due file, per un totale massimo di 32 campioni caricabili contemporaneamente.



Quando fermare la corsa elettroforetica?

La corsa va interrotta quando le bande corrispondenti ai frammenti di DNA risultano chiaramente separate. Poiché i campioni migrano su due file parallele, è importante verificare che le migrazioni non si sovrappongano prima di spegnere lo strumento.

Come va smaltita la cassetta?

Il gel precast va smaltito come **rifiuto pericoloso** dopo l'uso. Non deve essere manomesso o gettato nei rifiuti comuni.



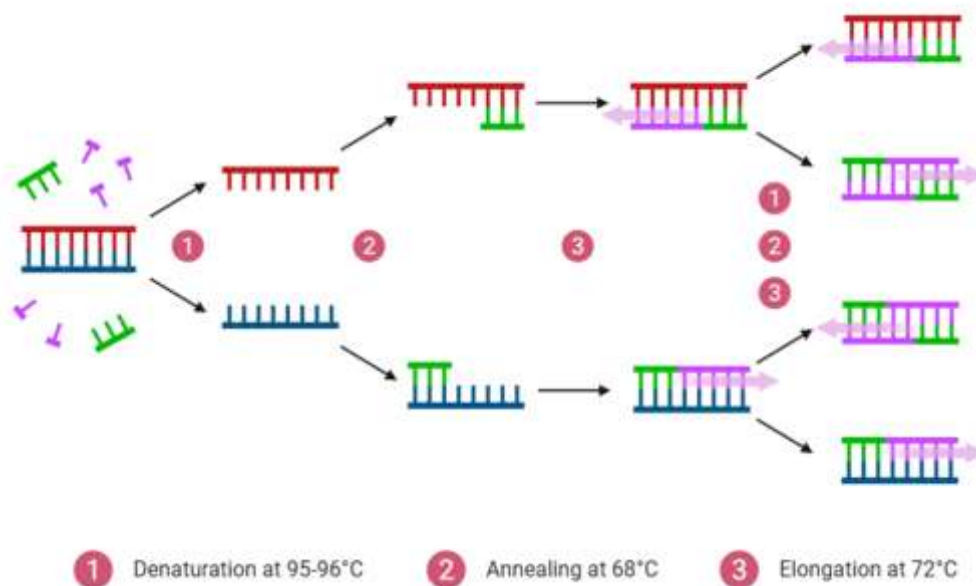
E S P E R I E N Z A 1 0

REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

Reazione a catena della Polimerasi (PCR)

IL CONTESTO

La **PCR** (reazione a catena della polimerasi) è una tecnica di biologia molecolare che permette di “copiare” in grande quantità un tratto specifico di **DNA**, anche quando è presente in quantità molto piccole, rendendola una tecnica molto potente e utilizzata, per esempio, in **genetica forense**. Il tratto da amplificare viene definito da due **primer**: brevi sequenze di circa 20 nucleotidi che riconoscono e si legano ai punti di inizio e fine della regione di interesse. Una volta appaiati ai filamenti di DNA, i primer forniscono alla DNA polimerasi un punto di partenza per sintetizzare nuove copie del segmento desiderato, tramite l'aggiunta di deossinucleotidi trifosfati. La PCR procede attraverso **cicli ripetuti** di variazione della temperatura. In una prima fase, a circa 95 °C, il calore sostituisce l'azione dell'elicasa cellulare separando i due filamenti della doppia elica (fase di **denaturazione**). Abbassando poi la temperatura, i primer si appaiano alle sequenze complementari (fase di **annealing**). Infine, a 72 °C, la DNA polimerasi inizia la sintesi dei nuovi filamenti (fase di **estensione**). Ripetendo questi passaggi decine di volte, la quantità della regione compresa tra i due primer aumenta in modo **esponenziale**: ad ogni ciclo, infatti, le copie prodotte diventano a loro volta stampo per ulteriori amplificazioni.



Poiché il processo richiede temperature molto elevate, si utilizza una DNA polimerasi termostabile, derivata dal batterio *Thermus aquaticus*, che rimane attiva proprio attorno ai 72 °C. Questo permette alla reazione di procedere in modo efficiente senza che l'enzima venga danneggiato dal calore. Una volta ottenuto il campione amplificato, l'esito della PCR può essere verificato tramite **elettroforesi su gel di agarosio**. Facendo migrare il DNA nel gel insieme a un marcatore di peso molecolare, è possibile osservare la presenza e la dimensione del frammento amplificato: una banda luminosa nella posizione attesa conferma che la PCR ha prodotto proprio la sequenza desiderata.

CONTENUTO DELLA VALIGETTA

Materiali forniti:

- 30 μ L di DNA Crime Scene (CS) – tappo viola
- 30 μ L di DNA sospettato A (A) – tappo verde
- 30 μ L di DNA sospettato B (B) – tappo blu
- 30 μ L di DNA sospettato C (C) – tappo viola
- 30 μ L di DNA sospettato D (D) – tappo rosso
- 4 μ L di soluzione 50 $\times$ di primers (P) – tappo giallo, soluzione di colore blu
- 155 μ L di Master Mix 2 $\times$ (MM) – tappo verde
- 10 μ L di Allele ladder 1 $\times$ (già diluita 1:8), “Ladder”
- 50 μ L di Loading dye Orange G (OG) – tappo giallo
- 6 micropipette P10
- 6 micropipette P100
- 3 scatole di puntali sterili per P10
- 3 scatole di puntali sterili per P100
- 1 scatola di tubini da 1.5 mL sterili
- 1 scatola di tubini da 0.2 mL per PCR, sterili
- Minispinner
- Vortex
- Termociclatore

OPERAZIONI PRELIMINARI (circa 30')

Questa fase di preparazione delle aliquote può essere svolta dal docente, dal tecnico o dagli studenti, prestando attenzione alle piccole quantità.

1. Decongelare in ghiaccio i tubini contenenti i reagenti;
2. Utilizzare la centrifuga con il supporto per tubini da 1.5 mL e centrifugare per pochi secondi (*spinnare*) i vari tubini contenenti i reagenti già sciolti.
3. Etichettare i tubini in cui verranno preparate le aliquote in modo che il contenuto sia chiaramente identificabile: “CS”, “A”, “B”, “C”, “D” (utilizzare 5 tubini da 0.2 mL) e “MM”, “P” (utilizzare 2 tubini da 1.5 mL).
4. Preparare le aliquote di DNA, la Master Mix (MM) e i primers in modo che ogni gruppo di studenti (massimo 6 gruppi) disponga dei 5 tubini contenenti i DNA da amplificare, conservati in ghiaccio.

Nota: se non vengono utilizzate subito, conservare le aliquote in congelatore fino a pochi minuti prima dell'uso.

PARTE PRIMA – PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E AVVIO DELLA PCR

Materiali per postazione:

- 4 μL di DNA Crime Scene (CS)
- 4 μL di DNA sospettato A (A)
- 4 μL di DNA sospettato B (B)
- 4 μL di DNA sospettato C (C)
- 4 μL di DNA sospettato D (D)
- 1 vaschetta di ghiaccio tritato
- 1 micropipetta P10
- 1 micropipetta P100
- 1 scatola di puntali sterili per P10
- 1 scatola di puntali sterili per P100
- 1 μL di soluzione 50 $\times$ Primers (P)
- 50 μL di soluzione 2 $\times$ Master Mix (MM)

Materiali in comune:

- 1 scatola di tubini da 0.2 mL per PCR, sterili
- 1 Minispinner
- 1 Vortex

Preparazione della MMP (Master Mix + Primers) [1 ogni 2 gruppi]

La MMP va preparata al massimo un'ora prima dell'uso e tutti i tubi devono essere mantenuti in ghiaccio quando non utilizzati.

1. Usare un tubino da 1.5 mL e marcarlo con "MMP".
2. Aggiungere a 50 μL di Master Mix (MM) 1 μL di Primers (P) e mescolare delicatamente *pipettando*.
3. Centrifugare brevemente per raccogliere tutto sul fondo del tubino.
4. La soluzione può essere mantenuta in ghiaccio per circa un'ora.

Installazione del termociclatore "VWR Ristretto 32 thermal cycler"

1. Posizionare il termociclatore su una superficie solida e piana.
2. Verificare che la griglia di ventilazione non sia coperta e che ci siano almeno 25 cm liberi su tutti i lati.
3. Collegare il cavo di alimentazione all'apposito alloggiamento e alla presa di corrente (240 V).
4. Accendere l'apparecchio mettendo su ON il pulsante di accensione accanto all'ingresso del cavo.

5. Verificare la presenza del programma "PCR_valigetta". Se non è presente, impostarlo:

- Selezionare il menu "Programs".
- Selezionare "New".
- A sinistra compariranno le sezioni modificabili; man mano che vengono aggiunte, compariranno sulla destra (per maggiori dettagli, consultare il manuale dello strumento).
- Selezionare "Heat lid" e impostare la temperatura del coperchio a 110°C.
- Impostare lo *step iniziale di denaturazione*: 94°C per 2 minuti, 1 volta.
- Impostare **35 cicli** composti da:
 - ❖ *Denaturazione*: 94°C per 30 secondi
 - ❖ *Appaiamento*: 52°C per 30 secondi
 - ❖ *Estensione*: 72°C per 1 minuto
- Impostare il *ciclo finale di estensione*: 72°C per 10 minuti, 1 volta.
- Impostare il mantenimento a 4°C per tempo infinito.

Step	Funzioni	Temperatura	Durata	Numero di cicli
Denaturazione iniziale	Denaturare	94°C	2 min	X1
Ciclo termico	Denaturare	94°C	30 sec	X35
	Appaiare	52°C		
	Estendere	72°C	1 min	
Ciclo finale	Estendere	72°C	10 min	X1
Mantenimento	Mantenere	12°C	Per sempre	X1

Procedura

Indossare i **guanti** per evitare la contaminazione dei campioni con le tracce di DNA presente sulle mani. Pulire il banco di lavoro con **etanolo al 70%** (o alcol denaturato diluito al 70%) e carta assorbente prima e dopo l'attività, così da ridurre al minimo la contaminazione da parte di DNA estraneo. Se non diversamente specificato, mantenere i tubi contenenti il DNA in ghiaccio.

A. Preparazione dei campioni CS, A, B, C e D (ogni gruppo lavora autonomamente e contemporaneamente)

1. Mantenere tutti i tubi sul ghiaccio.
2. Etichettare i 5 tubini da PCR da 0.2 mL "CS", "A", "B", "C" e "D" con l'ID del proprio gruppo.
3. Aggiungere 4 µL di Master Mix + Primers (MMP) a ciascun tubino.
4. Mescolare delicatamente i reagenti pipettando o utilizzando il vortex per pochi secondi.
5. Centrifugare brevemente tutti i campioni nella centrifuga con supporto per tubini da 0.2 mL.
6. Mantenere i tubi sul ghiaccio fino all'uso.



B. Preparazione del controllo (uno per tutta la classe)

Serve a verificare l'assenza di reazioni aspecifiche dei primers e a confermare che l'ambiente di lavoro sia pulito.

1. Etichettare un tubino da 0.2 mL come "control".
2. Aggiungere 4 μ L di acqua distillata.
3. Aggiungere 4 μ L di MMP.

C. Avvio della PCR

1. Inserire i tubini nel termoblocco del termociclatore (32 spazi disponibili).
2. Selezionare il programma preimpostato tramite "Programs > Open > PCR_valigetta".
3. Premere "Run".
4. Attendere il completamento del ciclo (circa 1 ora e 30 minuti).
5. Raccogliere i tubini e conservarli in congelatore.

PARTE SECONDA – CARICAMENTO SU GEL

Materiali forniti:

- Prodotti di PCR di A, B, C, D e CS (ottenuti nella **PARTE PRIMA** dell'*Esperienza 10*)
- 5 μ L di Allele Ladder 1 $\times$ (già diluita 1:8)
- 50 μ L di Orange G loading dye 5 $\times$ (OG), tappo arancione
- 6 micropipette P10
- 6 micropipette P100
- 3 scatole di puntali sterili per P10
- 3 scatole di puntali sterili per P100
- 1 scatola di tubini da 1.5 mL sterili
- 1 Minispinner
- 1 Vortex
- Apparecchiatura per elettroforesi con trasformatore
- Gel precast

Aliquotare 8 μ L di Orange G in ciascuno dei 6 tubini da 1.5 mL (uno per gruppo) e marcarli "OG".

Materiali per postazione:

- 8 μ L di prodotto di PCR della Crime Scene (CS)
- 8 μ L di prodotto di PCR del sospettato A (A)
- 8 μ L di prodotto di PCR del sospettato B (B)
- 8 μ L di prodotto di PCR del sospettato C (C)
- 8 μ L di prodotto di PCR del sospettato D (D)
- 8 μ L di Orange G loading dye 5 $\times$
- 400 μ L di acqua distillata (dH₂O)
- 1 micropipetta P10



- 1 micropipetta P100
- 1 vaschetta di ghiaccio tritato

Materiali in comune (ogni due postazioni):

- 1 scatola di puntali sterili per P10
- 1 scatola di puntali sterili per P100

Materiali in comune (per tutte le postazioni):

- 10 μ L di Allele Ladder 1 $\times$ (già diluita 1:8)
- 8 μ L di prodotto di PCR “controllo”
- 1 scatola di tubini da 1.5 mL sterili
- Minispinner
- Vortex

Procedura

Indossare i **guanti** per evitare la contaminazione dei campioni con le tracce di DNA presente sulle mani. Pulire il banco di lavoro con **etanolo al 70%** (o alcol denaturato diluito al 70%) e carta assorbente prima e dopo l'attività, così da ridurre al minimo la contaminazione da parte di DNA estraneo. Se non diversamente specificato, mantenere i tubi contenenti il DNA in ghiaccio.

A. Preparazione dei prodotti di PCR

1. Scongelare i prodotti di PCR e il loading dye in ghiaccio.
2. Aggiungere 48 μ L di H₂O distillata a ciascuno degli 8 μ L di prodotto di PCR e mescolare *spipettando* (diluizione 1:7).
3. Preparare 5 tubi da 1.5 mL e marcarli con l'ID del gruppo e i nomi dei 5 campioni.
4. Aggiungere 1 μ L di Orange G loading dye a ciascun tubo.
5. Aggiungere 4 μ L di prodotto di PCR diluito nel tubo corrispondente e mescolare.

B. Preparazione dell'allele ladder e del controllo (uno per tutta la classe)

1. Aggiungere 2 μ L di Orange G loading dye ai 10 μ L di Allele Ladder (sufficienti per caricare 5 μ L di ladder in ciascuna delle due file di pozzetti del gel).
2. Aggiungere 48 μ L di H₂O distillata agli 8 μ L di prodotto di PCR “control” e mescolare *spipettando* (diluizione 1:7).
3. Preparare 1 tubo da 1.5 mL e marcarlo “control”.
4. Aggiungere 1 μ L di Orange G al tubo.
5. Aggiungere 4 μ L del prodotto di PCR “control” diluito nel tubo e mescolare.

C. Preparazione della cassetta (vedi foto nella sezione FAQ dell'Esperienza 9)

1. Rimuovere la cassetta dalla confezione.
2. Rimuovere la striscia bianca con scritta “Lonza”.
3. Rimuovere la pellicola bianca che copre i pozzetti.
4. Riempire i pozzetti con acqua distillata tramite P100.
5. Rovesciare la cassetta per eliminare l'eccesso di acqua; tamponare se necessario.
6. Inserire la cassetta nel blocco viola.

D. Caricamento dei prodotti di PCR e avvio

In questa fase può essere utile scrivere direttamente sulla cassetta, con un pennarello vetro-scrivibile a punta fine, le lettere dei campioni che si stanno caricando, così da ricordare facilmente il contenuto di ogni pozzetto.

1. Caricare 5 μ L di allele ladder (con Orange G) nel primo pozzetto.
2. Caricare 5 μ L di ciascun campione nei pozzetti successivi.
3. Collegare polo positivo (rosso) e polo negativo (nero) tra dock e alimentatore.
4. Avviare l'alimentatore a 275 V.
5. Accendere la lampada e seguire la corsa per 2–7 minuti.
6. Fermare la corsa prima che i frammenti più veloci (= più piccoli) escano dal gel.
7. Spegner l'alimentatore e scollegare i cavi.
8. Osservare il gel e annotare le osservazioni del caso.

E. Smaltimento della cassetta

Il gel precast va smaltito come **rifiuto pericoloso** dopo l'uso. Non deve essere manomesso o gettato nei rifiuti comuni.

FAQ

Come dovrebbero apparire i campioni appena caricati?

A luce accesa, i pozzetti dovrebbero illuminarsi; può essere utile inserire la fascetta a metà del gel per attenuare la luce, che risulta molto intensa.

Come dovrebbe apparire il gel a fine corsa?

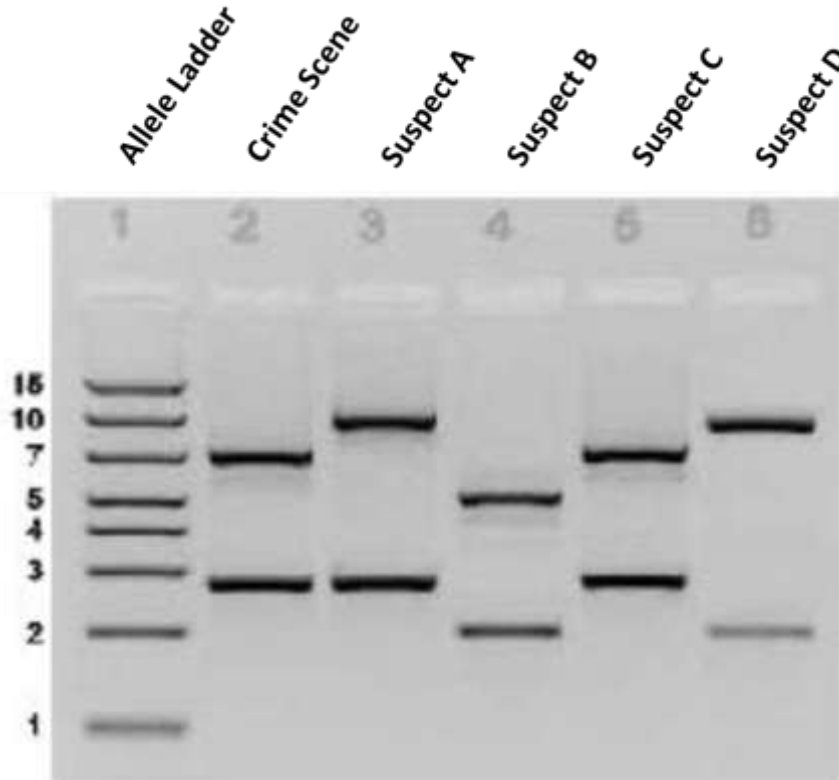
I frammenti dovrebbero essersi spostati lungo il gel e distribuiti in base al loro peso molecolare, con quelli più corti e leggeri che migrano più velocemente verso la parte inferiore.



Chi è il colpevole?

Il colpevole è il sospettato C. Questo si deduce confrontando le bande delle colonne CS con quelle dei sospettati: solo gli alleli 7 e 3 coincidono, secondo gli indicatori di peso molecolare, con il DNA della scena del crimine.

57



Perché bisogna diluire i prodotti di PCR?

Perché il sistema Lonza FlashGel™ DNA System è molto sensibile e non funziona correttamente alle normali concentrazioni di lavoro.

Perché l'Allele Ladder arriva già diluita?

Per ragioni logistiche.

Quanti campioni si possono caricare per cassetta?

La cassetta ha 16x2 pozzetti, quindi può contenere al massimo 32 campioni, disposti su due file.

Quando fermare la corsa elettroforetica?

Bisogna spegnere lo strumento quando i frammenti di DNA di diverse grandezze risultano ben separati. Poiché i campioni corrono su due file, occorre verificare che non si sovrappongano.

ALLEGATI

Allegato A

Un buon ricercatore ha sempre con sé:

- ✓ Un pennarello indelebile o vetrografico a punta fine.
- ✓ Una calcolatrice.
- ✓ Un accendino.
- ✓ Un quaderno per gli appunti.
- ✓ Matita e gomma o penna.

Prima di iniziare il lavoro:

- ✓ Indossare il camice all'ingresso dell'area laboratorio.
- ✓ Leggere attentamente il protocollo della giornata.
- ✓ Assicursi di avere a disposizione il cestino per rifiuti biologici solidi, il contenitore per rifiuti biologici liquidi e quello per taglienti (se necessario).
- ✓ Indossare i guanti, se richiesti.
- ✓ Pulire il bancone con il disinfettante più adatto, usando carta assorbente.
- ✓ Verificare di avere tutto il materiale necessario tramite la check list.

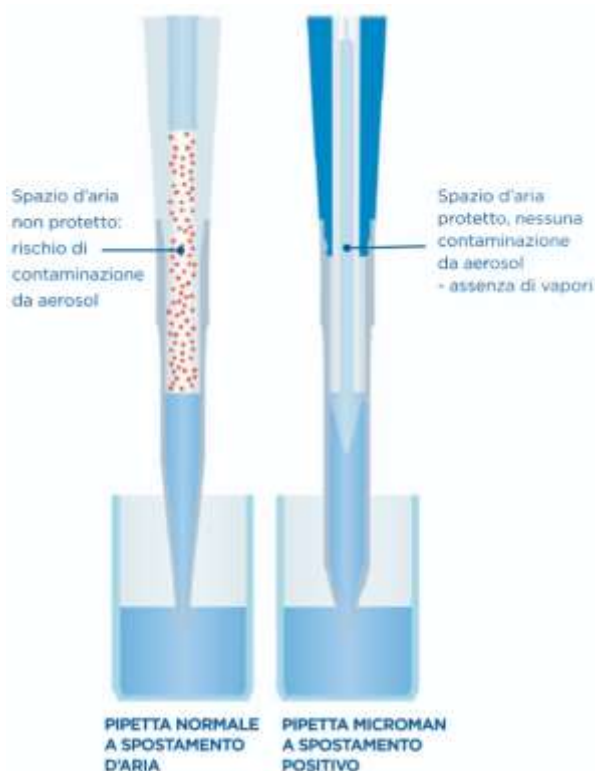
Dopo aver terminato il lavoro:

- ✓ Smaltire il materiale biologico e quello contaminato negli appositi contenitori per rifiuti biologici solidi, liquidi o taglienti.
- ✓ Recuperare dal bancone i contenitori con reattivi ancora utilizzabili e non contaminati.
- ✓ Pulire di nuovo il bancone con il disinfettante più adatto, usando carta assorbente.
- ✓ Togliere i guanti e gettarli nel cestino per rifiuti biologici solidi.
- ✓ Togliere il camice all'uscita dell'area laboratorio.

Allegato B

COME USARE LA MICROPIPETTA

A. Background



La **micropipetta** è uno strumento fondamentale in ogni laboratorio di biotecnologie. Saperla utilizzare correttamente è una competenza essenziale per chiunque lavori con campioni liquidi. Serve infatti a trasferire piccole quantità di soluzione in modo preciso e riproducibile. Esistono diverse tipologie di micropipette. Le più comuni sono quelle a **spostamento d'aria**: all'interno della pipetta rimane sempre un piccolo cuscinetto d'aria che separa il pistone dal liquido aspirato, rendendole adatte alla maggior parte delle soluzioni acquose. In alternativa, esistono le micropipette a **spostamento positivo**, più adatte per soluzioni molto viscosi o chimicamente aggressive. In questo caso il pistone è parte del puntale usa e getta ed entra direttamente in contatto con il liquido, migliorando precisione e controllo in condizioni più difficili.

B. Struttura

La micropipetta è costituita da un corpo che integra diversi componenti, disposti dall'alto verso il basso:

- Il pulsante del pistone a due stop, utilizzato per la regolazione grossolana del volume e per aspirare o espellere il liquido.
- Il pulsante per l'espulsione del puntale.
- L'anello per la regolazione fine del volume, presente non sempre.
- Il display che indica il volume impostato.
- L'espulsore del puntale.
- L'asta su cui si aggancia il puntale usa e getta.

C. Funzionamento generale

Regolazione del volume. Per impostare il volume desiderato, utilizzare la vite a scatti dello stantuffo e controllare il valore sul display. Prestare attenzione a rimanere sempre all'interno del range ottimale della pipetta, indicato sul corpo dello strumento (0,5–10 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL).

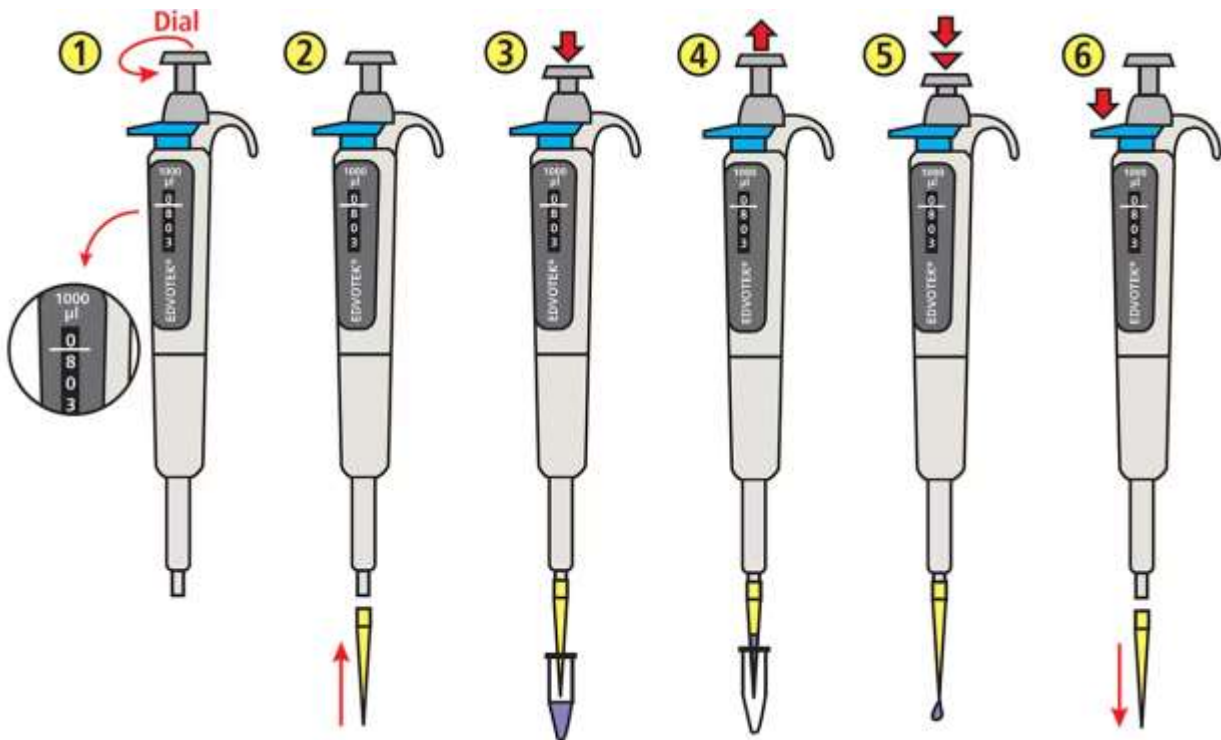
Aggancio del puntale. Posizionare la micropipetta verticalmente sul puntale, esercitare una leggera pressione verso il basso e ruotare leggermente per fissarlo sull'asta. Non premere il meccanismo di sgancio durante l'operazione.

Preparazione all'aspirazione. Premere lo stantuffo fino al primo stop per creare il vuoto, prima di immergere il puntale nel liquido da prelevare. Immergere solo alcuni millimetri della punta, evitando di introdurre la struttura della micropipetta nel liquido.

Immersione del puntale. Mantenere lo stantuffo premuto durante l'immersione e tenere la micropipetta in posizione verticale. L'estremità del puntale deve toccare la parete della provetta, che va inclinata tra 10° e 45°, e immersa per pochi millimetri.

Aspirazione del campione. Rilasciando lentamente lo stantuffo, la pressione negativa generata farà risalire il liquido nel puntale, permettendo di prelevare la quantità desiderata.

Rilascio del campione. Premendo nuovamente lo stantuffo con il pollice, la pressione interna spinge il liquido fuori dal puntale. Per espellere completamente il campione, premere lo stantuffo fino a fine corsa.



Allegato C

COME LAVORARE IN STERILITÀ SUL BANCONE

Background

Lavorare in sterilità significa adottare una serie di precauzioni per evitare che il lavoro in laboratorio venga contaminato da agenti esterni che potrebbero interferire o compromettere gli esperimenti. Per una sterilità completa è necessario lavorare in ambienti chiusi e controllati, come le cappe biologiche. Nella maggior parte degli esperimenti scolastici, però, è sufficiente un banco di lavoro con ripiano facilmente lavabile e non poroso, insieme a un **becco di Bunsen** per creare un ambiente di lavoro più sicuro.

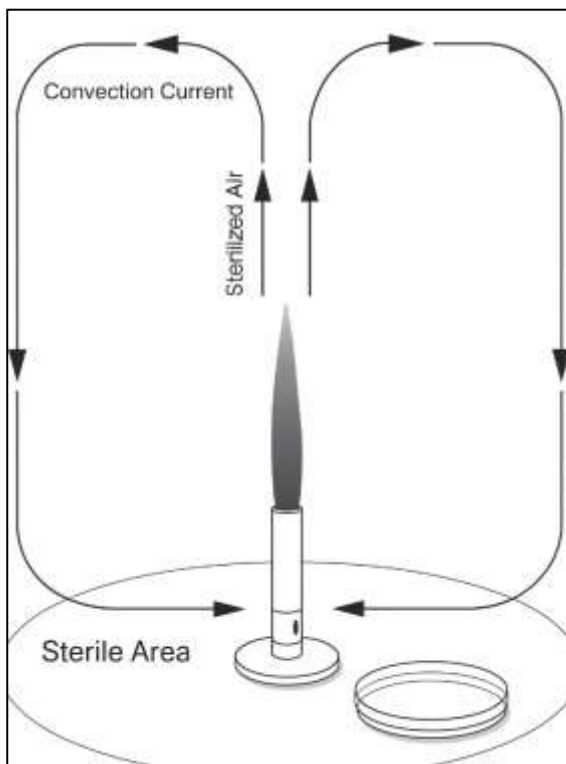
Lavoro in ambiente aperto

Per lavorare in sicurezza su un piano aperto occorrono un banco lavabile, un becco di Bunsen e etanolo al 70% in uno spruzzino. Il procedimento prevede:

1. Disinfettare la superficie del banco con etanolo al 70% e carta assorbente, evitando pezze e strofinacci.
2. Accendere il becco di Bunsen e attendere qualche minuto.
3. Flambare (passare a fiamma) l'imboccatura di beute, provette e altri strumenti prima e dopo l'uso, sfruttando la fiamma per ridurre il rischio di contaminazione.

Etanolo

L'etanolo al 70% è un disinfettante di livello intermedio, efficace per pulire superfici e strumenti prima, durante e dopo le attività di laboratorio.



Campo sterilizzato dal Bunsen

La fiamma del becco di Bunsen può raggiungere temperature fino a 1500-1600 °C. L'aria che entra in contatto con il calore viene considerata sterile e, grazie ai moti convettivi, forma un ambiente sterile limitato per alcune decine di centimetri attorno alla fiamma. Questo ambiente è però fragile e facilmente perturbabile da movimenti bruschi, vento o conversazioni dirette verso la fiamma.

Passaggio a fiamma (flambatura)

Consiste nel riscaldare l'imboccatura dell'oggetto da sterilizzare, creando una corrente ascensionale che riduce il rischio di deposizione di contaminanti.



La fiamma

Secondo le **linee guida OMS 2019**, non è consigliato sterilizzare anse e spatole semplicemente passandole sulla fiamma, poiché il movimento d'aria può disperdere microrganismi. Si preferisce utilizzare plastiche monouso. Le anse metalliche a occhiello calibrato, solitamente in leghe di platino o altri metalli resistenti, possono essere portate a rosso sulla fiamma e sterilizzate completamente. Necessitano di alcuni secondi per raffreddarsi; è pratico avere due anse a disposizione, alternandole. Le spatole in metallo o vetro si sterilizzano passando sulla fiamma, ma senza raggiungere il rosso. Hanno bisogno di qualche minuto per raffreddarsi; anche in questo caso se ne possono usare due alternandole. Un'alternativa per spatole e pinzette è immergere la parte da sterilizzare in alcol etilico al 96% e infiammarlo brevemente. Tutti gli oggetti riutilizzabili vanno sterilizzati sia prima sia dopo l'uso.

Azioni che possono perturbare l'ambiente sterile:

- Passaggio veloce di persone.
- Movimenti bruschi delle braccia o del corpo.
- Parlare, starnutire, tossire, soffiarsi il naso, ridere.
- Finestre o porte aperte e correnti d'aria.

Elementi che possono compromettere la sterilità:

- Pulizia generale insufficiente del laboratorio (piastre di agar con più di 50 UFC/h).
- Disinfezione inadeguata delle superfici di lavoro.
- Addestramento poco efficace del personale.
- Scarsa igiene personale, ad esempio lavaggio delle mani con saponi antisettici blandi.

Allegato D

SCHEDA DESCRIZIONE COLONIE

Colonia intera: Puntiforme  Circolare  Rizoide  Irregolare  Filamentosa 	Bordo: Intero  Ondulato  A lobi  Filamentoso  Arricciato 
Superficie: Liscia, brillante Irregolare Increspata Secca, polverosa	Elevazione: Piatta  Sporgente  Convessa  Incurvata  Umbonata 

CONTATTI

CIBIO - Dipartimento di Biologia Cellulare, Computazionale e Integrata via Sommarive 9, 38123 Povo (Trento)

SEGRETERIA

tel. +39 0461 283163 - 3995

email. valigetta_biotechnologo@unitn.it

web. www.cibio.unitn.it/node/968

PER DOMANDE TECNICHE RELATIVE ALLE ESPERIENZE

tel. +39 0461 282073

PER CONCORDARE RITIRO/RESTITUZIONE DELLA VALIGETTA

email. labmgmt.cibio@unitn.it