# Protocollo dell’attività

## Materiale a disposizione di ogni gruppo

* un pennarello indelebile a punta fine
* una micropipetta adatta a prelevare un volume di 20 μl
* punte per la micropipetta
* una scatolina in polistirolo contenente ghiaccio o un blocco termico, contenenti:
  + 120 μl di reagenti per PCR (liquido blu)
  + 25 μl di DNA estratto dalla scena del crimine (tubo viola)
  + 25 μl di DNA del sospetto A (tubo verde)
  + 25 μl di DNA del sospetto B (tubo blu)
  + 25 μl di DNA del sospetto C (tubo arancio)
  + 25 μl di DNA del sospetto D (tubo rosa)
* 5 tubini per PCR
* 5 adattatori per i tubini da PCR
* un bicchiere per gli scarti (punte e tubini)

## Protocollo sperimentale

Indossa i guanti (servono a proteggere il DNA che userai dalle nucleasi delle tue mani che lo degradano)

Accertati che i tubini per PCR siano chiusi e se non lo sono chiudili

Annota su ciascuno dei 5 tubini per PCR la sigla del tuo gruppo (sul lato del tubino, NON SUL TAPPO)

Su uno dei tubini per PCR scrivi la sigla SC (scena del crimine); su un altro scrivi A (sospetto A); su un altro scrivi B (sospetto B); su un altro scrivi C (sospetto C); su un altro scrivi D (sospetto D)

Prendi il tubino per PCR siglato SC, aprilo, utilizzando la micropipetta con una punta pulita trasferisci al suo interno 20 μl di DNA ottenuto dalla scena del crimine (tubo viola), richiudilo, mettilo dentro un adattatore e metti l’adattatore col tubino dentro in ghiaccio

Butta via la punta

Prendi il tubino per PCR siglato A, aprilo, utilizzando una nuova punta trasferisci al suo interno 20 μl di DNA del sospetto A (tubo verde), richiudilo, mettilo dentro un adattatore e metti l’adattatore col tubino dentro in ghiaccio

Ripeti l’operazione trasferendo nei tubini per PCR il DNA dei sospetti B (tubo blu), C (tubo arancio) e D (tubo rosa). Ogni volta usa una punta diversa per evitare contaminazioni fra i campioni!

Ora prendi uno per volta i tubini per PCR contenenti ciascuno un diverso campione di DNA e aggiungi al DNA i reagenti per PCR facendo nel modo seguente:

* controlla che la micropipetta sia impostata sui 20 μl
* metti una nuova punta alla micropipetta
* prendi il tubino contenente i reagenti per PCR (liquido blu) e preleva da quel tubino 20 μl, richiudi il tubino e riponilo in ghiaccio
* prendi uno dei tubini per PCR contenente solo DNA, aprilo e versaci dentro i 20 μl di liquido blu che hai appena prelevato
* aspira e rilascia il liquido più volte con la pipetta per mescolare, infine espelli tutto il liquido, chiudi il tubino e riponilo in ghiaccio
* butta via la punta
* ripeti l’operazione fino a quando non avrai aggiunto a ciascun tubino sia il DNA che i reagenti per PCR (è facile controllare: se è blu e il volume contenuto è >20μl c’è tutto!)

Una volta terminata l’operazione contatta l’insegnante e andremo a riporre i tubini di reazione nel termociclatore per far avvenire la reazione in condizioni controllate.

## Schema sintetico delle reazioni da preparare

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Sigla i tubini -> | Aggiungi il DNA -> | Aggiungi i reagenti per PCR |
| Iniziali + SC | 20μl di DNA dalla Scena del Crimine | 20μl di reagenti per PCR (blu) |
| Iniziali + A | 20μl di DNA del sospetto A (tubo verde) | 20μl di reagenti per PCR (blu) |
| Iniziali + B | 20μl di DNA del sospetto B (tubo blu) | 20μl di reagenti per PCR (blu) |
| Iniziali + C | 20μl di DNA del sospetto C (tubo arancio) | 20μl di reagenti per PCR (blu) |
| Iniziali + D | 20μl di DNA del sospetto D (tubo rosa) | 20μl di reagenti per PCR (blu) |