

LAVORO DI PREPARAZIONE PER ATTIVITA' "SCENA DEL CRIMINE – STR AVANZATA

Consigliamo di far visionare ai ragazzi i video tutorial prima dell'attività stessa in modo da risparmiare molto tempo nelle spiegazioni pratiche in laboratorio.

Nella classe si possono allestire **5 gruppi di lavoro**, ciascuno dei quali può amplificare un DNA oggetto dell'analisi. Verranno poi preparati 2 gel di agarosio (1 gel per i campioni amplificati e un secondo gel per far eseguire il caricamento a tutti gli studenti)

L'insegnante dovrà scaricare il programma della Mini PCR dal sito della miniPCR. Il nome del software è miniPCR v2.0 (win10), oppure l'applicazione miniPCR su smartphone.

ALLESTIMENTO DELLE POSTAZIONI LAVORO PER LA FASE 1 DEL PROTOCOLLO

cosa serve in ogni postazione di lavoro:

- Sacchettino in plastica per i rifiuti solidi (tipo sacchetto frigoverre)
- Supporto per provette eppendorf piccole con una provettina da PCR chiusa
- Supporto per provette eppendorf standard
- Pennarello indelebile
- Micropipetta 5-50 ul
- Puntali per micropipetta 5-50 µl

Nel laboratorio devono esserci guanti, camici, bilancia, navicelle da pesata, centrifuga (ricordarsi il bilanciamento delle provette durante l'utilizzo), Mini PCR collegata ad un PC o smartphone.

La centrifuga deve essere utilizzata per portare sul fondo della provetta tutto il volume disponibile dei reagenti prima di iniziare l'esperimento e in ogni momento in cui per qualsiasi motivo il volume si sia disperso nella provetta e non si riesca a prelevare

MATERIALE E STRUMENTAZIONE CHE DEVE FORNIRE LA SCUOLA

- Bilancia
- Camici per i ragazzi
- Guanti
- Acqua deionizzata
- Forno a Microonde
- PC o Smartphone su cui installare il programma MiniPCR
- Frigorifero 4°C
- Congelatore -20°C

LAVORO PRELIMINARE ESEGUITO DAL DOCENTE

- Appena prima di iniziare la fase 1 del protocollo l'insegnante dovrà aggiungere con molta precisione 1.8 ul di primer nella provetta della Master Mix e miscelare. La Master Mix completa può quindi essere consegnata ai vari gruppi di lavoro per l'allestimento della PCR

REAGENTI da distribuire nelle diverse postazioni lavoro:

- DNA (un DNA differente in ciascuna postazione lavoro)
- Master Mix completa di primer (una sola provetta che verrà passata da una postazione all'altra)

ALLESTIMENTO DEL LABORATORIO PER LA FASE 2 DEL PROTOCOLLO: gel di agarosio ed elettroforesi

Verranno preparati due gel di agarosio su cui caricare i campioni anche in forma ripetuta per dare la possibilità a tutti di caricare un campione di DNA su gel. Si consiglia di preparare una sola postazione lavoro per la parte di elettroforesi.

- Agarosio a disposizione vicino alle bilance con spatola, navicella da pesata (o stagnola)
- Beuta da 100 ml
- Cilindro da 500 ml per la preparazione di 500 ml di TAE 1X
- Pipetta sierologica da 10 ml e "Porcellino"
- Cilindro da 50 ml
- Forno a microonde per scaldare il gel fino a completa ebollizione (attenzione non esagerare con la bollitura, non appena il gel è limpido interrompere il riscaldamento)
- Gel red a disposizione.
- Micropipetta 0.5-10 µl e puntali relativi
- Vaschetta con pettini e nastro adesivo per sigillare i due lati liberi
- Camera elettroforetica con generatore di corrente integrato
- 6X Loading dye: per ogni reazione di PCR i ragazzi dovranno aggiungere 4 µl di 6X loading dye prima di caricare il gel
- Sacchetto per i rifiuti solidi
- Schema di caricamento
- Transilluminatore UV
- Documentare il risultato con una foto da smartphone

POSSIBILE SUDDIVISIONE DEL LAVORO:

GIORNO 1: 2-3 ORE DI LAVORO:

- I ragazzi hanno già preso visione dei video tutorial a disposizione e del protocollo (uso delle micropipette, video tutorial sull'esecuzione dell'esperimento)
- Prove di pipettatura con acqua per prendere confidenza con le micropipette
- FASE 1 fino all'amplificazione del DNA con Mini-PCR
- Preparazione del Gel di agarosio e dopo polimerizzazione conservare a 4°C in un sacchetto o domopack
- (l'insegnante si occuperà di recuperare le provette al termine della PCR e li conserverà in un freezer a -20°C)

GIORNO 2: 1 ORA DI LAVORO (anche nel pomeriggio della stessa giornata)

- Caricamento su gel di agarosio dei prodotti di PCR, corsa elettroforetica, e visualizzazione del risultato.
- Discussione dei risultati ottenuti