

ATTREZZATURA E ALLESTIMENTO DEL LABORATORIO

DISPOSITIVI DI PROTEZIONE

Camice, guanti in lattice, schede di sicurezza reagenti
norme di comportamento in laboratorio, dispositivi di smaltimento rifiuti a rischio biologico
cappa chimica e biologica

ATTREZZATURA:	MATERIALI:
-pipette automatiche -frigo 4°C -congelatori -20°C -centrifughe da banco -bilancia tecnica e analitica -incubatore a 37°C -celle elettroforetiche -alimentatori -forno a microonde -termociclatore per PCR	-vetreria (bottiglie Pirex, cilindri, becker, beute, -provette da reazione in polipropilene di vari volumi (provette eppendorf da 0,2-0,5-1,5mL, tubi falcon da 15 e 50mL) -supporti (rack) portaprovette -puntali monouso per pipette -acqua distillata / deionizzata -pipette graduate -reagentario

UTILIZZO PIPETTE AUTOMATICHE E STIMA DEI VOLUMI:

Si utilizzano pipette automatiche con puntali **monouso** (*range* 10 e 100µl, gialli; 1000µl, blu), provette tipo eppendorf da 1,5ml, rack portaprovette, soluzione BBF (blu di bromofenolo). I puntali vanno scartati nell'apposito cestino presente su ogni bancone. Disponendo 6 provette sul rack, trasferire in ciascuna 8, 15, 46, 123, 350, 770µl rispettivamente, avendo cura di depositare il liquido sul fondo. **Nel caso il liquido si depositi sulle pareti della provetta, sarà necessario centrifugarla brevemente per raccogliere nuovamente il liquido sul fondo.** Passare le provette ad un collega del gruppo che verificherà utilizzando le pipette l'esattezza dei volumi depositati.

ALLESTIMENTO DI REAZIONI in parallelo

- 1- Preparazione di **3 reazioni uguali indipendenti**, ciascuna del volume finale di **16µL** aggiungendo **12 µL** di E124 e **4µL** di BBF nelle **provette da 0,5mL**. Verificare il volume FINALE di ciascuna reazione in ciascuna provetta. POI aggiungere altri **6µL** di glicerolo **in ciascuna reazione**, mescolare bene e prelevare **da ciascuna reazione 10µL** e trasferirli in un'altra provetta. **VERIFICARE IL VOLUME CHE RIMANE** in ciascuna provetta da cui si sono prelevati i 10 µL.
- 2- Preparazione di **150µL di un'unica miscela** da cui ricavare **3 reazioni equivalenti** con volume finale di 50µL ciascuna. Aggiungere in una **provetta da 1,5mL IN SEQUENZA: 87µL BBF, 30µL H₂O, 15µL BBF, 15µL glicerolo, 3µL E124** mescolare bene facendo attenzione che TUTTO il volume si trovi nel fondo della provetta. Preparare ora una **provetta da 0.5mL** con depositati sul fondo **6 µL** di soluzione A. A questo punto trasferire TUTTO il volume in questa provetta e mescolare bene nuovamente. La miscela va suddivisa e trasferita in **3 provette da 0,2mL**. Accertandosi di avere tutto il volume sul fondo della provetta, trasferire **50µl** della miscela in ciascuna **provetta da 0,2mL**. Alla fine **VERIFICARE** che ogni provetta da 0,2mL contenga **50µL** e che tutte e 3 le provette appaiano **UGUALI** fra loro per volume, colore, etc.

PREPARAZIONE SOLUZIONE per EF su gel di agarosio

pesare sulla bilancia tecnica 1g di agarosio (sulla stagnola o sulla navicella) e trasferirlo nella bottiglia pirex

- aggiungere 100ml di tampone TAE 1x
- **AGGIUNGERE 3µL di GelRed**
- contrassegnare la bottiglia Pirex col nome del gruppo