

ATTREZZATURA DEL LABORATORIO E ALLESTIMENTO DI REAZIONI

DISPOSITIVI DI PROTEZIONE (DPI)

Camice, guanti lattice, schede di sicurezza reagenti

norme di comportamento in laboratorio, dispositivi di smaltimento rifiuti a rischio biologico, contenitori per scarto puntali e provette usati, contenitori scarto rifiuti
cappa chimica e biologica

ATTREZZATURA: -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	MATERIALI: -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 10µl e 100µl, gialli; 1000µl, blu), provette tipo eppendorf da 0,2ml e 1,5ml, rack porta provette.

I puntali andranno sempre scartati nell'apposito cestino presente su ogni bancone.

- Disporre **6 provette da 1,5mL** sul rack, trasferire in ciascuna 8, 15, 46, 100, 350, 770µl, rispettivamente di soluzione di blu bromofenolo (BBF), SDS, etanolo e glicerolo. Valutare la differenza riscontrata per ciascun liquido.
- Nella serie di provette col BBF aggiungere 2µl in ciascuna provetta di soluzione acida.

UTILIZZO DELLA CENTRIFUGA: per raccogliere tutto il volume sul fondo di una provetta

**NEL CASO IL LIQUIDO SI DEPOSITI SULLE PARETI DELLA PROVETTA, SARÀ' NECESSARIO CENTRIFUGARLA BREVEMENTE PER RACCOGLIERE NUOVAMENTE IL LIQUIDO SUL FONDO (*quick spin, spin down*)
PER CENTRIFUGARE LE PROVETTE DA 0,2mL BISOGNA UTILIZZARE I DOPPI ADATTATORI**

Uso della centrifuga per la **formazione di un pellet** a partire da 1ml di sospensione centrifugando a 13000rpm per 1min, togliere il surnatante **eccetto 50µL**, in cui lasciare immerso il *pellet*, e successiva risospensione del *pellet* nel surnatante rimasto. Ri-centrifugare per raccogliere nuovamente il *pellet*.

MODALITA' DI ALLESTIMENTO DI REAZIONI

1 In una **provetta da 1,5mL** depositare **100µL di BBF**, in una seconda **provetta da 1,5mL** depositare **2µL di soluzione acida**.

Qual è il modo più conveniente per unire ora le due soluzioni? Fatto ciò, ripartire il contenuto in **8 provette da 0.2mL** mettendo **10 µL** in ciascuno; poi aggiungere **10µL di etanolo** in ciascuna delle 8 aliquote. Mescolare bene facendo attenzione che **TUTTO** il volume si trovi nel fondo della provetta o eventualmente fare una centrifugata breve (*quick spin*).

2 In una **provetta da 1,5mL** depositare **350µL di acqua** e poi ripartire il contenuto in **7 tubi da 0,2mL** mettendo **40 µL** in ciascuno; poi **10µL di glicerolo** in ciascuna delle 7 aliquote. Mescolare

bene facendo attenzione che TUTTO il volume si trovi sul fondo della provetta o eventualmente fare una centrifugata breve (*quick spin*).

3 Preparare **6 provette da 1,5mL** con **10 μ L di SDS** ciascuna e aggiungere in ciascuna **3 μ L di glicerolo**, mescolare per rendere omogenea la soluzione, eventualmente fare una centrifugata breve (*quick spin*).

4 In una **provetta da 1,5mL** depositare **35 μ L di BBF** e poi ripartire il contenuto in **7 provette da 1,5mL** mettendo **5 μ L** in ciascuno. Prelevare poi **10 μ L** di acqua alla volta e trasferirli in ciascun tubo contenente i 5 μ L preparati prima e mescolare bene. Infine aggiungere in ciascuno **3 μ L di glicerolo** ed eventualmente fare una centrifugata breve (*quick spin*).

.