



KIT DIDATTICI

I kit didattici noleggiabili costituiscono uno strumento utile per portare un'attività di biologia molecolare dai nostri laboratori presso le vostre scuole



- Chi è il colpevole?
- OGM
- Sano o malato?
- Analisi cromosomiche
- Cristallizzazione del lisozima

Materiale comune a tutti i kit

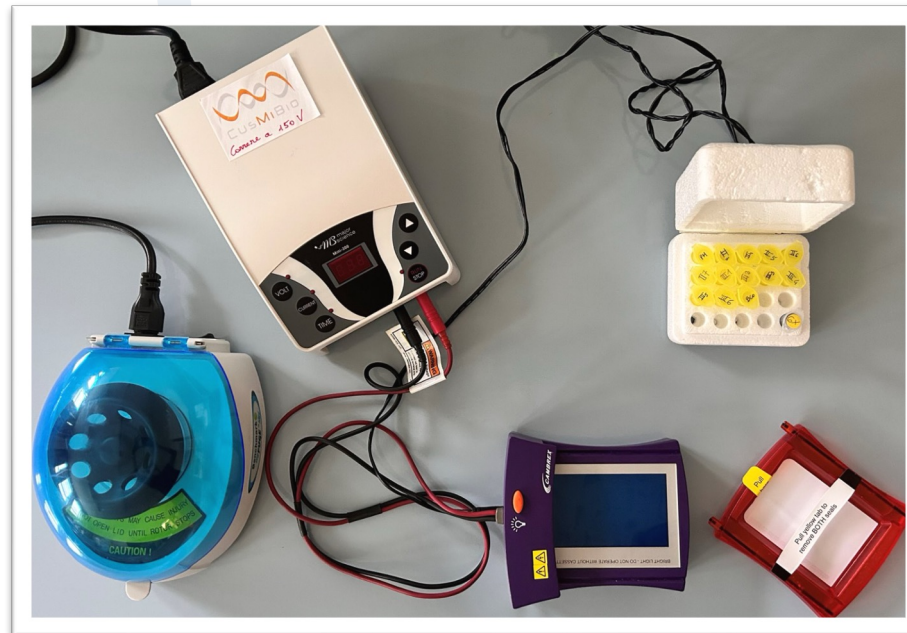
- 13 micropipette
- 4 scatole di puntali
- 13 vetrini in plexiglass
- 13 provette da 1,5 ml
contenenti acqua distillata
- 13 provette da 1,5 ml
contenenti colorante blu



Materiale kit

'Chi è il colpevole?', 'OGM', 'Sano o malato?'

- Cella elettroforetica di piccole dimensioni con transilluminatore incorporato (*flashgel system*)
- gel da 13 pozzetti pronti per l'utilizzo (gel *precast* o *flashgel*)
- alimentatore di corrente a cui collegare gli elettrodi della cella elettroforetica (*power supply*)
- microcentrifuga
- serie da 13 campioni di DNA



Materiale kit

'Chi è il colpevole?', 'OGM', 'Sano o malato?'

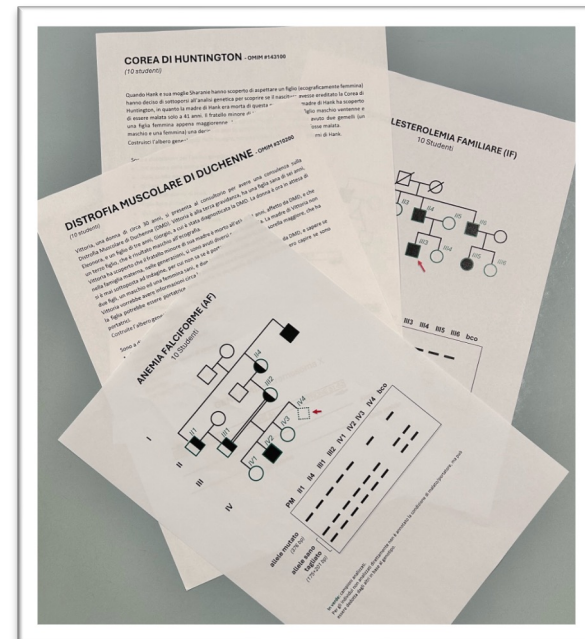


Il kit dell'attività 'Chi è il colpevole?' contiene:

- Telo con sagoma della vittima
- attrezzatura polizia scientifica: tuta, guanti, mascherina, soprascarpe, occhiali, prove (ipotetici reperti biologici), sacchetti con pinzette per il recupero delle prove

Il kit dell'attività 'Sano o malato?' contiene:

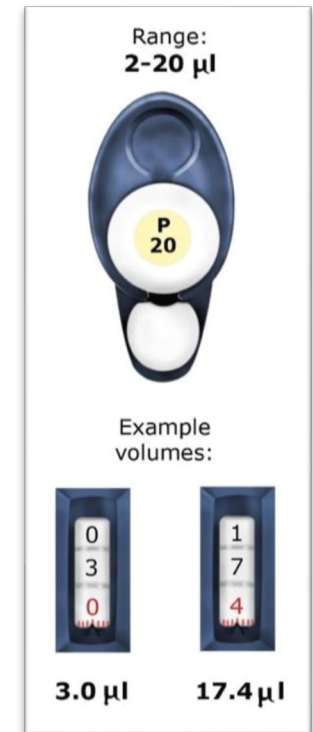
- Storie di consulenza genetica
- alberi genealogici



Esercitazioni con le micropipette

Suggerimenti:

- Illustrare il range di volumi entro cui la pipetta può lavorare
- mostrare agli studenti come **impostare il volume** ruotando il pistone e osservando le cifre. Per le p20 notare la presenza delle cifre decimali. **Fare attenzione a non superare il limite minimo e massimo del range**
- mostrare agli studenti come **inserire il puntale**, con una leggera pressione della micropipetta sul puntale inserito all'interno della scatola dei puntali



Esercitazioni con le micropipette

Spiegare come prelevare un volume di liquido:

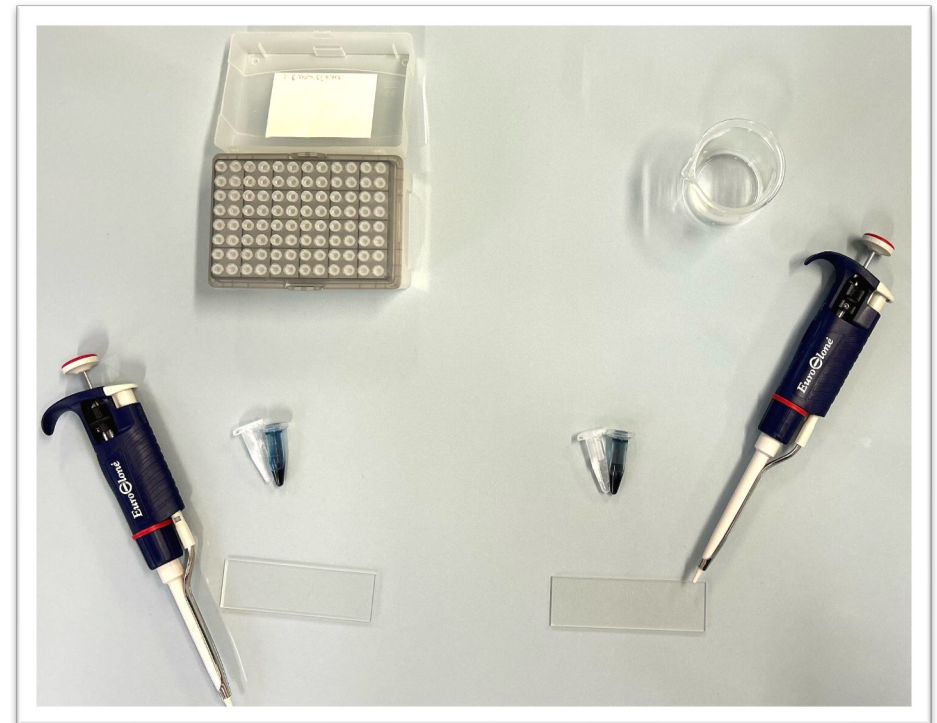
- Premere sul pistone fino a quando non si percepisce una resistenza
- mantenendo premuto con il pollice, inserire il puntale dentro il liquido da prelevare (per esempio si può usare la provetta contenente acqua)
- rilasciare verso l'alto il pollice lentamente per prelevare il liquido
- espellere il puntale nel contenitore dei rifiuti usando l'apposito pulsante vicino al pistone

Esercitazioni con le micropipette

Disporre sul banco da lavoro il materiale in modo che gli studenti lavorino a coppie.

Postazione tipo:

- Due vetrini in plexiglass
- due micropipette p20
- due provette con acqua
- due provette con colorante
- un contenitore dei rifiuti (es. un becher)
- una scatola di puntali

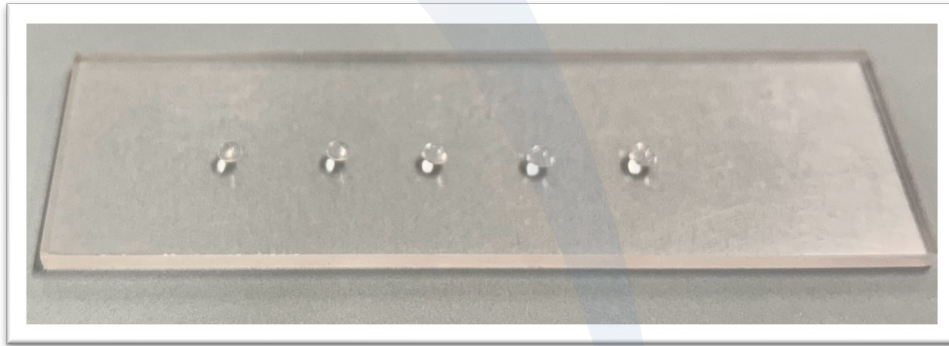


Diluizione seriale del colorante

- Ogni studente tiene in mano una p20 con puntale pulito e davanti a sé un vetrino in plexiglass
- L'esercizio prevede di prelevare 5 μ l di acqua dalla provetta; rilasciarli sul vetrino in modo da creare una goccia d'acqua da 5 μ l
- Ripetere lo stesso procedimento fino a formare 5 gocce di acqua da 5 μ l ciascuna. Disporre le gocce in fila ben distanti l'una dall'altra
- Aprire la provetta di colorante e farne prelevare 5 μ l
- Rilasciare la goccia di colorante dentro la prima goccia di acqua: la goccia sarà ora formata da colorante e acqua (10 μ l totali)
- Far prelevare da questa goccia 5 μ l
- Rilasciarli dentro la seconda goccia di acqua
- Dalla seconda goccia prelevare altri 5 μ l e metterli nella terza goccia e così via, fino all'ultima goccia

Se il lavoro di diluizione verrà fatto correttamente, le gocce risulteranno sempre più chiare per effetto della diluizione del colorante.

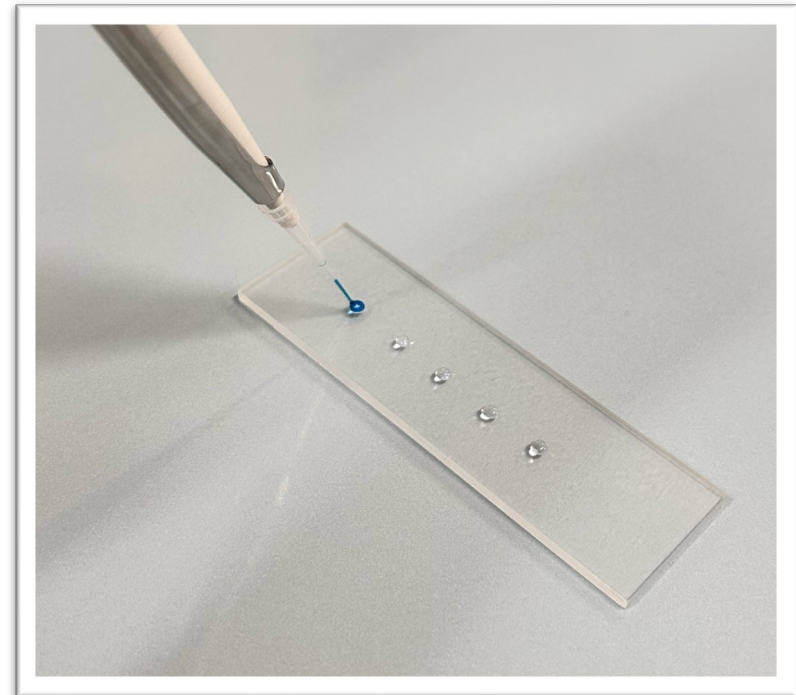
1. Posizionare 5 gocce d'acqua da 5 μ l ciascuna di acqua sul vetrino



3. Risultato della diluizione seriale

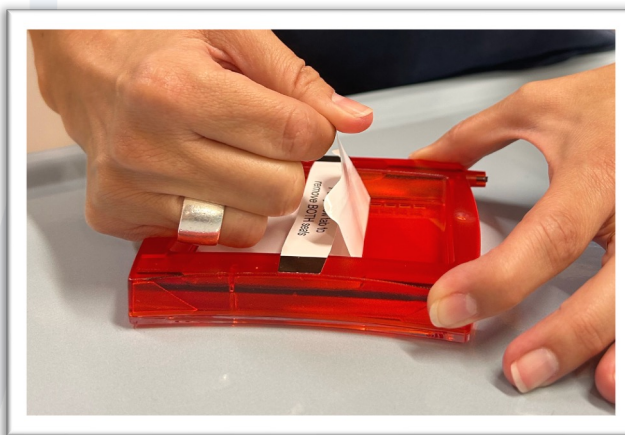


2. Procedere con la diluizione del colorante



Come allestire il bancone per l'elettroforesi

- Sistemare il *flashgel* system sul bancone collegando gli elettrodi al *power supply* che a sua volta viene collegato alla corrente elettrica. Collegare il macchinario per l'elettroforesi stesso alla corrente mediante lo spinotto per la visualizzazione del DNA
- aprire la confezione del *flashgel*
- eliminare la pellicola bianca che chiude i pozzetti
- incastrare il *flashgel* nell'apparecchio dell'elettroforesi seguendo le linee guida

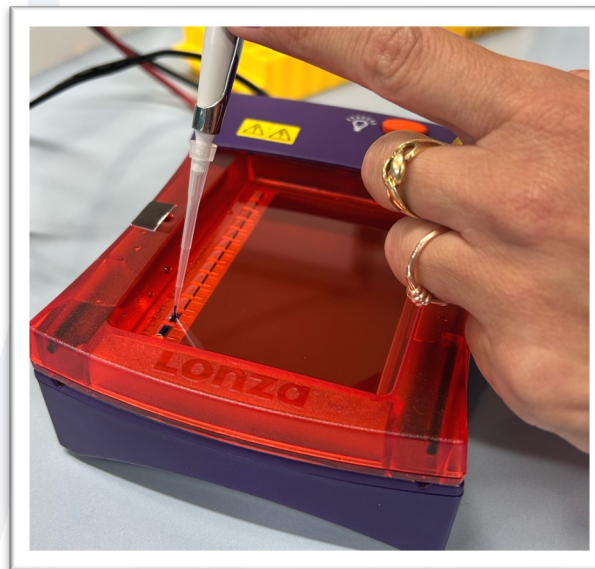


Come preparare i campioni da caricare su gel

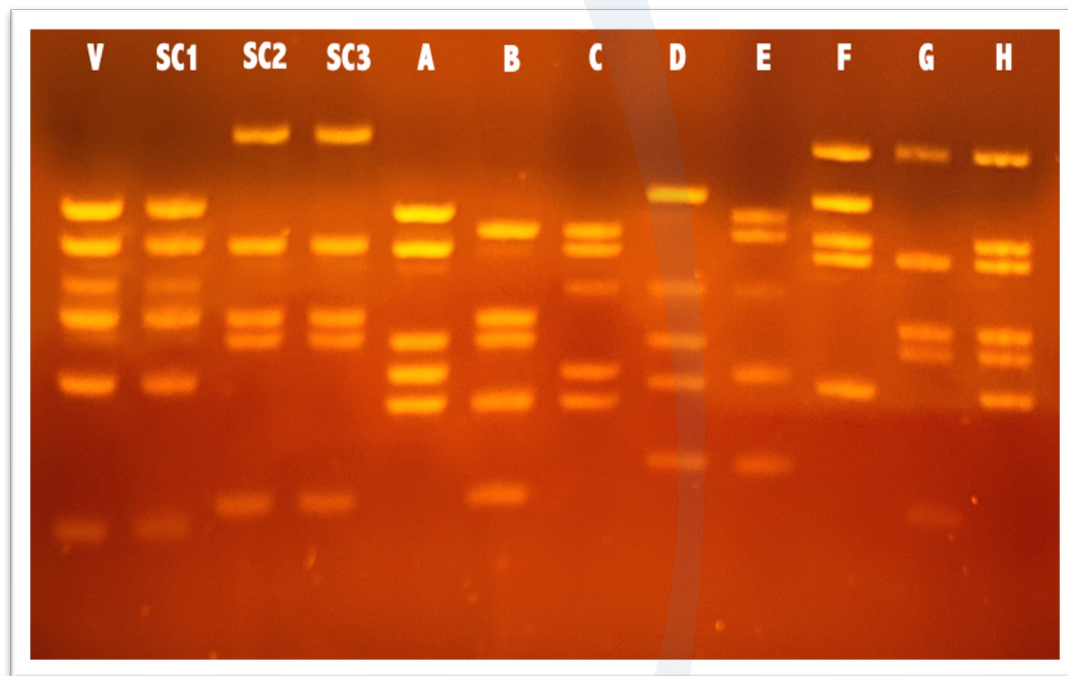
- Rimuovere dal frigo/freezer le provette contenenti il DNA e consegnarle agli studenti
- far aggiungere sulla parete interna della provetta 2 μ l di loading dye 6X
- collegare la centrifuga alla corrente elettrica
- centrifugare brevemente («spinnare») per circa 5 secondi le provette avendo cura di disporle in maniera bilanciata

Caricamento dei campioni nei pozzetti

- Far caricare agli studenti i campioni all'interno dei pozzetti del gel: 4 μ l di campione per pozzetto
- Premere START sull'alimentatore (150V)
- Attendere qualche minuto la corsa elettroforetica e controllare di tanto in tanto lo spostamento delle bande cliccando sul pulsante con il simbolo della lampadina



Esempio del risultato di un gel



LEGENDA GEL ('Chi è il colpevole?'):

V Vittima

SC1 Scena del Crimine 1

SC2 Scena del Crimine 2

SC3 Scena del Crimine 3

A, ..., H Sospettati

Materiale kit

'Analisi cromosomiche'

- Una provetta contenente preparati cromosomici fissati in metafase di cellule umane sane di sangue periferico (SP cells) e/o una provetta contenente preparati cromosomici fissati in metafase di cellule umane tumorali HeLa. Le metafasi sono risospese in una soluzione di etanolo e acido acetico
- una scatola contenente vetrini portaoggetto
- una scatola contenente vetrini coprioggetto
- colorante blu di metilene 0,05%

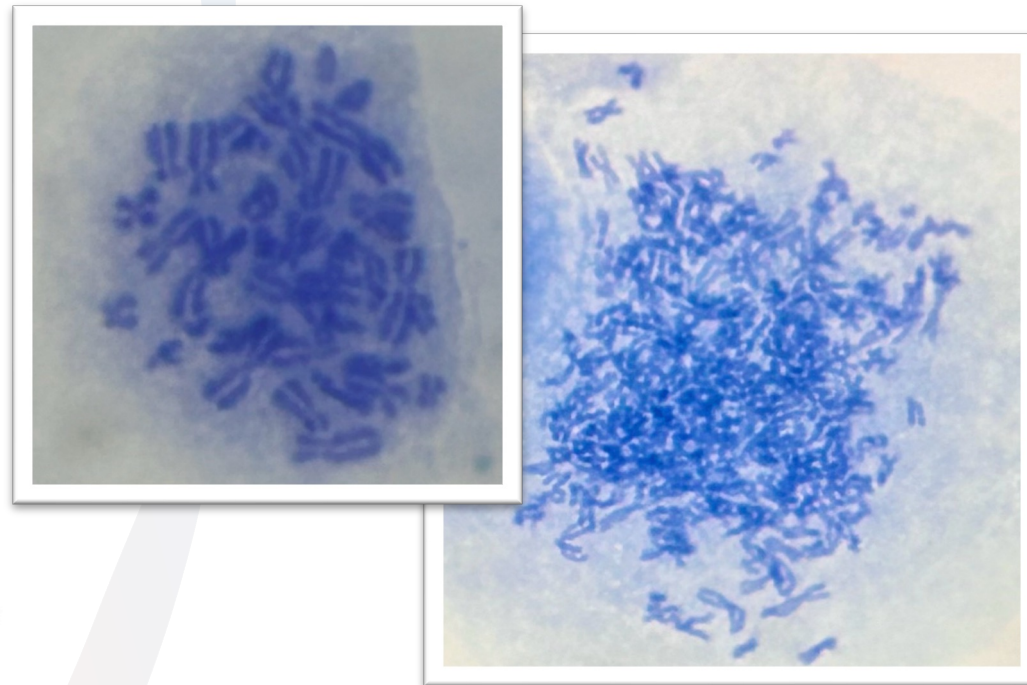
Le provette con i preparati cromosomici vanno conservate in freezer.
Possono essere riposte in frigo solo qualche ora prima
dell'esperimento.

Allestimento dei banconi:

- Disporre i banconi per le esercitazioni con le micropipette (vedi pag. 6)

Preparare inoltre i banconi con:

- un microscopio ottico (consigliato uno per coppia di studenti)
- un vetrino portaoggetto per ciascuno studente
- una scatola di vetrini coprioggetto
- matite
- becher con provetta contenente il colorante blu di metilene e pipetta Pasteur



Al termine delle esercitazioni con le micropipette, ogni studente dovrà:

- prendere il proprio vetrino portaoggetto facendo attenzione a toccarlo dalla parte della banda sabbiata
- scrivere il proprio nome sulla banda sabbiata con la matita
- risospendere il contenuto delle provette picchiettando con piccoli colpi delle dita sul fondo delle stesse
- prelevare con un puntale pulito 5 μ l da una provetta con le metafasi (a scelta fra SP e HeLa)
- inclinare il vetrino portaoggetto di circa 45°
- ponendo il puntale al centro del vetrino, far scivolare la goccia
- far asciugare qualche istante la soluzione, che evaporerà immediatamente
- prelevare del blu di metilene con la pipetta Pasteur
- ponendo il vetrino in piano sul bancone, rilasciare una goccia di colorante sulle metafasi (di cui sarà visibile un alone)
- coprire con vetrino coprioggetto, cercando di evitare la formazione di bolle d'aria
- osservare il vetrino al microscopio partendo dall'ingrandimento più piccolo

Materiale kit

'Cristallizzazione del lisozima'

- Provetta con soluzione di lisozima (40 ng/ml)
- Soluzione di NaCl al 20%
- Soluzione tampone pH 4.5 50 mM
- Acqua distillata
- Una scatola contenente vetrini coprioggetto
- Piastre *multiwell* per la cristallizzazione
- Micropipette p20, p200 e p1000 e puntali corrispondenti



Allestimento dei banconi:

- Disporre i banconi per le esercitazioni con le micropipette (vedi pag. 6)

Preparare inoltre i banconi con:

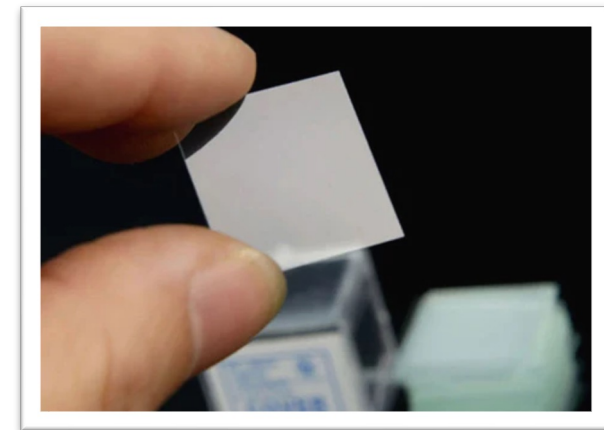
- Uno stereomicroscopio o un microscopio ottico (consigliato uno per coppia di studenti)
- un vetrino coprioggetto per ciascuno studente
- una piastra di cristallizzazione per coppia di studenti
- eventuale vetrino portaoggetto



Preparazione della soluzione di cristallizzazione :

- Ogni studente preparerà 500 μl di soluzione di cristallizzazione pipettando all'interno di un pozzetto della *multiwell* secondo il seguente schema:
200 μl di NaCl 20%
25 μl di tampone a pH 4.5 50 mM
275 μl di acqua distillata
- Mescolare con un puntale le soluzioni all'interno del pozzetto
- pipettare 2 μl di soluzione di lisozima al centro di un vetrino coprioggetto
- aggiungere alla goccia di lisozima sul vetrino 2 μl di soluzione di cristallizzazione prelevata dal pozzetto
- capovolgere il vetrino con la goccia di 4 μl pendente sul pozzetto con la soluzione di cristallizzazione

In alternativa, si possono effettuare delle prove aumentando il volume di NaCl a 225 μl e diminuendo di conseguenza il volume di acqua



- Coprire la piastra di cristallizzazione con il coperchio per prevenire l'evaporazione della goccia e per garantire il corretto raggiungimento dell'equilibrio di vapore necessario per la cristallizzazione della proteina
- mantenere la piastra a temperatura ambiente senza muoverla, per circa 1,5 h
- se si ha a disposizione lo stereomicroscopio, porre la piastra sotto l'obiettivo senza aprire il coperchio e osservare la formazione dei cristalli di lisozima
- se si ha a disposizione il microscopio ottico, aprire la piastra, sollevare delicatamente il vetrino coprioggetto dal pozzetto, ruotarlo di 180° e porlo su un vetrino portaoggetto
- visualizzare al microscopio ottico a partire dall'ingrandimento più piccolo.

