

1. Objectiu del repte.

El nostre objectiu de l'informe és identificar al culpable d'un assassinat basant-nos en mostres de caràcter microbiològic, realitzant proves d'anàlisi al laboratori.

2. Hipòtesi a investigar.

Considerem que es pot determinar la identitat del culpable basant-nos en la prova de PCR i Electroforesi amb gel d'agarosa, ja que les mostres de l'escena del crim contenen l'ADN d'aquest individu.

a. Fonamentació teòrica de la tècnica

La **PCR** és un procediment, del qual generem infinites còpies d'ADN, a partir d'una seqüència concreta, els materials principals que necessitem són 20ul de **Master-Mix** amb *primers* i aigua destil·lada (que està composta per Taq polimerasa, **NTPs** i clorur de magnesi, i 20ul de l'ADN), tenim tres mostres i la mostra del crim. Amb aquestes mostres, l'objectiu serà posar-les en el gel per a realitzar l'**electroforesi de gel d'agarosa**. Aquesta **electroforesi** consisteix en fer córrer les mostres d'ADN per un gel fet d'agarosa, per càrrega elèctrica. El gel d'agarosa contindrà Safe Red per poder veure amb el transiluminador les bandes que es generin, i les mostres tindran Orange G, per fer-les ressortir.

b. Punts forts i febles de la tècnica.

Els **punts forts** de l'**electroforesi** són que ens pot ajudar a comparar mostres d'ADN amb exactitud, també que amb aquesta tècnica podem detectar si hi ha mutacions a nivell genètic i podem determinar si dos (o més) individus tenen la mateixa herència genètica.

La **PCR** és una tècnica ràpida de fer. Amb aquesta tècnica, l'amplificació de l'ADN és molt més fàcil de fer i el termociclador ajuda a que tingui menys marge d'error en l'executar-se.

En canvi, els **punts febles** de l'**electroforesi** són que és molt complexa de fer, ja que ha de sortir bé el gel d'agarosa; els pous han d'estar ben marcats, etc. Això comporta que hi puguin haver errors. La contaminació de la mostra pot donar falsos resultats.

En la **PCR**, també un dels punts febles són el possible problema per la contaminació de les mostres i que a l'hora de fer servir el termociclador, poden haver-hi errors en programar-lo. A més, per si mateixa no determina res.

c. Procediment de la tècnica.

PCR:

1. Realitzar els càlculs.
2. Preparar el material necessari.
3. Preparar tubs amb els components i les mostres.(20 ul Master Mix amb Aigua destil·lada i *primers*, 20ul amb ADN)
4. Programar termociclador:

Step	Funció	Temp	Duració	Nº de cicles
Desnaturalització	Desnaturalitzar	94°C	2 min	X1
Cicle de temperatura	Desnaturalització	94°C	30seg	X35
	Annealing	52°C	30seg	
	Extensió	72°C	1min	
Extensió final	Extensió	72°C	10min	X1
Manteniment (hold)	Hold	12°C	Indeterminat	X1

5. Posar els tubs al termociclador.

Electroforesis en gel d'agarosa:

1. Calcular la quantitat d'agarosa al 3% per 100 ml de solució total.
2. Pesar agarosa en un erlenmeyer.
3. Enrasar l'agarosa posant 97 ml de TAE.1x (Tris, Àcid Acetic, EDTA)(es realitza una solució d'una concentració determinada i es dilueix a 1 part de cada 1000ml)
4. Utilitzar l'agitador i la placa calefactora per escalfar la solució d'agarosa sense que es congeli.
5. Una vegada dissolta, escalfar 30s al microones fins que estigui a punt d'ebullició
6. Agafar amb una micropipeta, 10ul de Safe red i introduir-lo al gel.
7. Esperar que es refredi i posar l'agarosa al motlle d'electroforesi.
8. Després, un cop fet la PCR, afegir 10ul d'Orange G, a les 4 mostres.
9. Una vegada s'hagi format el gel, treure el gel cuidadosament del motlle.
10. Carregar els pous del gel amb les mostres de PCR.
11. Posar el gel en la cubeta d'electroforesi, i carregar-la amb TAE 1x.
12. Connectar els cables i encendre l'aparell d'electroforesi, 100V durant 30min.
13. Esperar, i una vegada acabat el procés, retirar el gel i mirar-lo al transiluminador per veure les bandes d'ADN amb raigs UVA.

3. Resultats.

Amb l'electroforesi hem pogut veure que el primer sospitós no coincideix amb l'ADN de l'escena del crim.

4. Discussió dels resultats.

Els resultats que hem obtingut amb aquesta prova no han sigut concloents a l'hora de descobrir qui és l'assassí. Perquè de les mostres que vam dipositar al gel, només va córrer la del sospitós 1 conjuntament amb el marcador i la mostra de l'escenari del crim. Caldrien realitzar altres proves, com ara una anàlisi microbiana de la petjada, altres proves com el Test Hexagon i la prova d'identificació del grup sanguini (en cas de trobar-hi una mostra de sang), o una senzilla identificació de petjada dactilar, respecte a la seva forma.

5. Conclusions finals.

El gel d'agarosa amb mostres d'ADN, resultat de l'Electroforesi, no va mostrar cap coincidència entre les mostres analitzades i la mostra de material genètic trobada a l'escena del crim. **Per tal, podem concloure que cap dels sospitosos escollits per portar a terme les proves és el culpable de l'assassinat.**

Bibliografia

Dossier d'Espai d'habilitats.
Seminari de Criminologia