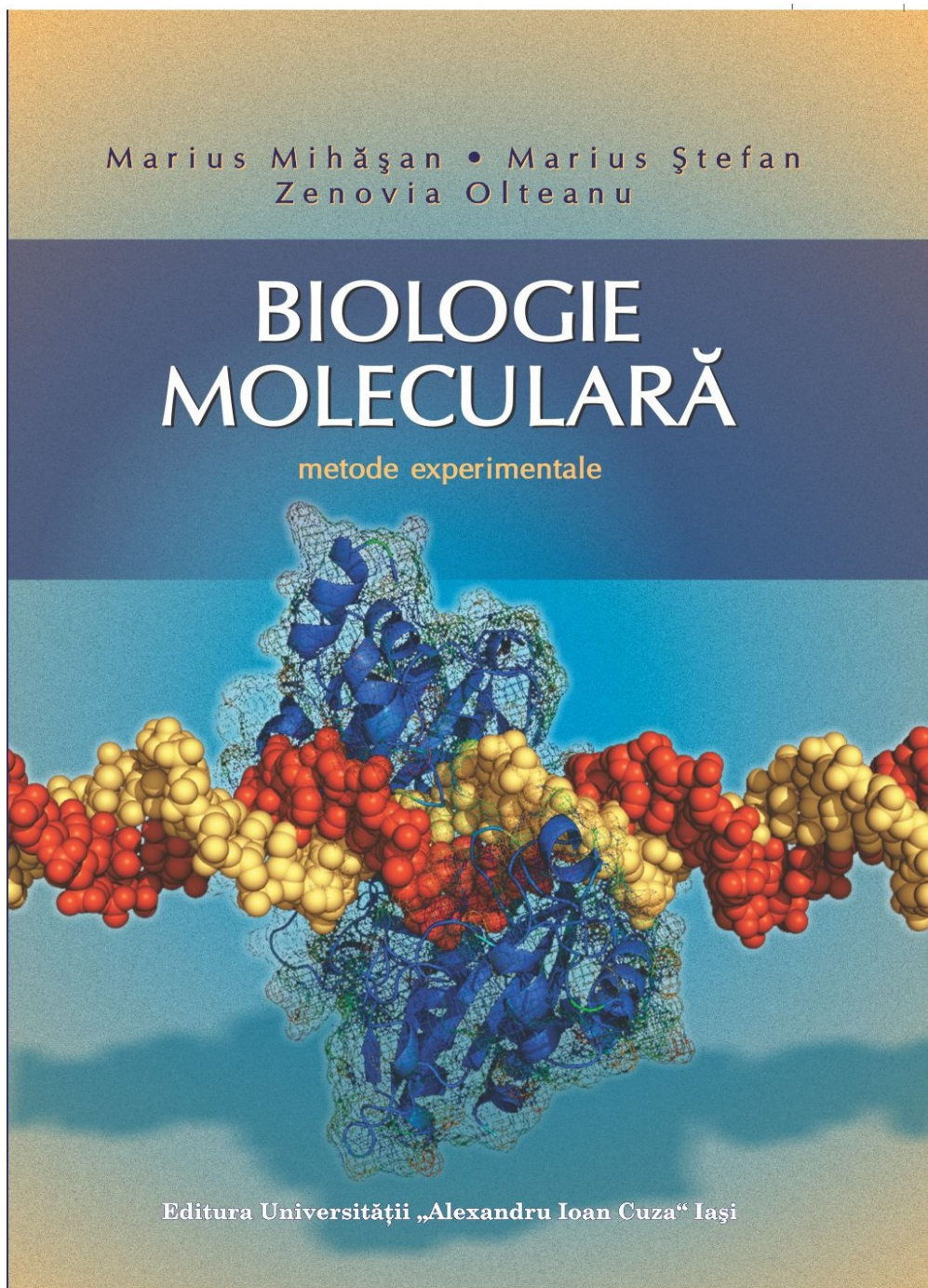


BIOLOGIE MOLECULARĂ - Metode experimentale

Marius Mihășan, Marius Ștefan, Zenovia Olteanu

Prefață de Gheorghe Benga



Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
MIHĂȘAN, MARIUS, ȘTEFAN, MARIUS, OLTEANU, ZENOVIA
Biologie moleculară: metode experimentale / Marius Mihășan,
Marius Ștefan, Zenovia Olteanu; prefață de Gheorghe Benga. – Iași:
Editura Universității „A.I. Cuza”, 2012
Bibliogr.
ISBN 978-973-703-816-6

CUPRINS

PREFAȚĂ de GHEORGHE BENGA	XI
INTRODUCERE	1
I. TEHNICI DE BAZĂ UTILIZATE ÎN LABORATORUL DE BIOLOGIE MOLECULARĂ	3
I.1 Sticlăria și instrumentele din materiale plastice	3
Siliconarea sticlăriei și a instrumentelor din materiale plastice.....	4
Spălarea și uscarea vaselor de laborator	5
I.2 Măsurarea volumelor	6
Măsurarea volumelor cu ajutorul pipetelor.....	7
I.3 Măsurarea maselor	12
Instrucțiuni privind utilizarea balanței electronice analitice	14
I.4 Centrifugarea	15
Instrucțiuni privind utilizarea centrifugii.....	16
I.5 Tehnici de bază folosite pentru manipularea microorganismelor	17
Măsuri de biosecuritate	17
Tehnici de sterilizare	21
II. METODE DE CULTIVARE A BACTERIEI <i>ESCHERICHIA COLI</i>	29
II. 1 Medii utilizate pentru cultivarea bacteriei <i>Escherichia coli</i>	30
Medii de cultură minimale.....	31
Medii de cultură complexe	33
Medii de cultură solide	36
Medii minimale solide.....	36
Medii de cultură complexe solide	36
Agar de acoperire	37
Agar de conservare prin înțepare	38
Antibiotice utilizate la prepararea mediilor de cultură.....	39

II. 2 Cultivarea <i>E. coli</i> pe medii solide.....	41
Însămânțarea la suprafața mediilor de cultură solide	42
Însămânțarea în profunzime a mediilor de cultură solide.....	44
II. 3 Cultivarea <i>E. coli</i> în medii lichide.....	47
Inocularea și cultivarea folosind volume mici de mediu	47
Inocularea și cultivarea folosind volume mari de mediu	48
II.4 Monitorizarea creșterii bacteriei <i>E. coli</i> în mediile lichide.....	48
Determinarea densității optice cu ajutorul spectrofotometrului	49
Determinarea densității optice cu ajutorul hemocitometrului.....	51
Determinarea numărului de bacterii prin cultivare în plăci Petri	52
II. 5 Păstrarea culturilor de <i>E. coli</i>	54
Păstrarea prin congelare la -80°C.....	55
 III. PLASMIDE ȘI TULPINI DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> UTILIZATE FRECVENT ÎN BIOLOGIA MOLECULARĂ.....	 57
III.1 Vectori plasmidiali utilizați frecvent în ingineria genetică.....	59
Principalele caracteristici ale vectorilor plasmidiali utilizați în ingineria genetică.....	61
Vectorul pUC19c.....	61
Vectorul pBlueScript II SK (+/-).....	62
Vectorul pET-21a	62
Vectorul pMAL-c5x.....	62
III.2 Tulpini de <i>Escherichia coli</i> utilizate frecvent în ingineria genetică	63
 IV. METODE ȘI TEHNICI FOLOSITE PENTRU IZOLAREA ȘI PURIFICAREA ADN-ULUI.....	 73
IV.1 Izolarea ADN-ului plasmidial	75
Izolarea ADN-ului plasmidial folosind metoda lizei alcaline.....	76
Izolarea ADN-ului plasmidial utilizând metoda lizei prin fierbere.....	81
IV.2 Izolarea ADN-ului genomic	84
Izolarea ADN-ului genomic din bacterii	85
Izolarea ADN-ului genomic din plante	90
Izolarea ADN-ului din țesuturi animale.....	95
IV. 3 Purificarea ADN-ului din soluții apoase	100

IV. 4 Izolarea ADN-ului din geluri de agaroză.....	103
IV. 5 Păstrarea ADN-ului purificat	107
V. AMPLIFICAREA ENZIMATICĂ <i>IN VITRO</i> A ACIZILOR NUCLEICI	111
V.1 Amplificarea enzimatică <i>in vitro</i> a ADN-ului sau PCR.....	113
Amplificarea enzimatică <i>in vitro</i> a fragmentelor de ADN de până la 4 kb	116
V.2 Criterii pentru alegerea oligonucleotidelor amorsă (primer).....	126
VI. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI ACIZILOR NUCLEICI ÎN SOLUȚIE.....	133
V.1 Determinarea concentrației acizilor nucleici prin spectroscopie UV-VIS.....	133
Determinarea concentrației acizilor nucleici prin spectroscopie UV	134
V.2. Determinarea concentrației acizilor nucleici prin fluorimetrie	138
Determinarea concentrației acizilor nucleici folosind bromura de etidiu.....	139
Determinarea concentrației acizilor nucleici folosind metoda cu folie din plastic....	141
Determinarea cantității de ADN pe geluri de agaroză	143
VII. SEPARAREA ELECTROFORETICĂ A ADN-ULUI.....	147
VII. 1 Electroforeza clasică în geluri de agaroză	150
VII. 2. Separarea ADN prin electroforeză în gel de poliacrilamidă cu gradient de agent denaturant	157
VII.3 Detecția ADN-ului în geluri de agaroză	168
Detecția ADN-ului folosind bromura de etidiu	169
Detecția ADN-ului în geluri de agaroză folosind coloranți de tip SYBR	171
Detecția ADN-ului în geluri de agaroză folosind albastrul de metilen	173
VIII. PURIFICAREA PROTEINELOR PRIN CROMATOGRAFIE DE AFINITATE FAȚĂ DE METALE	177
VIII.1 Strategii de clonare a genelor în vectori de expresie	181
VIII.2 Identificarea condițiilor optime de supraexpresie a proteinelor recombinat.	186

VIII.3 Purificarea prin IMAC a proteinelor recombinat�e în condi�ii native	192
VIII.4 Purificarea prin IMAC a proteinelor recombinat�e în condi�ii denaturante	198
VIII. 5 Determinarea maselor moleculare native utilizând cromatografia de filtrare prin gel (GF).....	200
Determinarea maselor moleculare native utilizând cromatografia de filtrare prin gel	206
Calibrarea coloanei de GF �i calcularea maselor molare	208
IX. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI PROTEINELOR	215
IX.1 Determinarea concentrației proteinelor prin spectroscopie UV.....	216
IX.2 Metode colorimetrice de determinare a concentrației proteinelor	219
Metoda Lowry.....	219
Metoda Bradford	224
Micrometoda Bradford de dozare a concentrației proteinelor	227
Metoda cu acid bichinonic (BCA)	229
Micrometoda BCA de dozare a proteinelor	231
Macrometoda BCA de dozare a proteinelor	232
IX.3 Realizarea curbelor de etalonare �i prelucrarea datelor	234
X. SEPARAREA ELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR	241
X.1 Electroforeza nativă a proteinelor în sistem discontinuu	243
X.2 Electroforeza proteinelor în condi�ii denaturante (SDS-PAGE)	253
X.3 Detectia proteinelor separate prin electroforeza pe geluri de poli(acrilamidă).....	257
Colorarea gelurilor de poli(acrilamidă) �n vederea eviden�ierii proteinelor.....	257
Colorarea cu Comassie Brilliant Blue R-250	259
Colorarea cu argint a gelurilor de poli(acrilamidă).....	261
X.4 Fotografierea gelurilor �i analiza imaginilor. Stabilirea masei moleculare relative	264
XI. EVIDEN�IEREA IMUNOLOGICĂ A PROTEINELOR – TEHNICA WESTERN-BLOT	273
XI.1 Obținerea anticorpilor policlonali. Tehnici de imunizare	273

Obținerea anticorpilor policlonali folosind adjuvantul Freund.....	275
XI.2 Imunobloting-ul.....	278
Electro-transferul proteinelor pe membrane în sistem semi-uscat.....	279
Imunodetecția proteinelor transferate pe membrane de nitroceluloză.....	282
XII. METODE COMPUTAȚIONALE DE STUDIU A PROTEINELOR.285	
XII.1 Fișiere FASTA și operații simple cu secvențe.....	286
XII.2 Baze de date cu informații despre proteine.....	290
Baze de date cu secvențe proteice	291
Baze de date cu structuri proteice	294
XII.3 Identificarea funcției proteinelor necunoscute cu ajutorul programului BLAST.295	
XII.4 Modelarea computațională a structurii tridimensionale a proteinelor	308
Programe, servere și metaservere	311
Aplicații ale metodelor de modelare a structurilor tridimensionale a proteinelor ..	316
XII.5 Modelarea computațională a complexilor liganzi-proteine	316
Problematika andocării moleculare	317
Evaluarea rezultatelor obținute prin andocare moleculară computerizată	324
Aplicații ale andocării moleculare.....	324
ANEXĂ.....	335

PREFAȚĂ

Biologia moleculară poate fi definită cel mai simplu ca fiind un concept de studiere a materiei vii prin prisma relației structură-funcție la nivel molecular. Este un concept ce a revoluționat științele biologice și medicale începând cu a doua jumătate a secolului XX. Dar pe lângă noile cunoștințe teoretice, revoluția produsă de biologia moleculară a fost posibilă și datorită introducerii de noi metode și tehnici de laborator. Toate lucrările experimentale de biologie moleculară implică utilizarea unor astfel de metode și tehnici. De aici rezultă și necesitatea unor cărți care să-i ajute pe cercetători în munca zilnică la masa de laborator (“bench”). În România nu cunosc să se fi scris o asemenea carte, care să descrie toate metodele și tehnicile de biologie moleculară la modul practic de lucru.

Efortul tinerilor colegi Marius Mihășan, Marius Ștefan și Zenovia Olteanu de a redacta o astfel de carte mi se pare de aceea deosebit de lăudabil și rezultatul este o lucrare de mare valoare.

Merită subliniat că sunt descrise pe de o parte unele tehnici de bază în laboratorul de biologie moleculară (dar și în laboratoarele de analize biomedicale, de biochimie și chimie clinică, de microbiologie, de biofizică etc), precum: pregătirea sticlăriei și a vaselor de laborator, măsurarea volumelor, a maselor, centrifugarea, tehnicile de bază folosite pentru manipularea microorganismelor, metodele de determinare a proteinelor, separarea electroforetică a proteinelor, tehnici de imunologie (obținerea de anticorpi policlonali, imunodeteția proteinelor transferate pe membrane de nitroceluloză) etc. Pe de altă parte sunt descrise metode specifice biologiei moleculare: plasmide și tulpini de *Escherichia coli* folosite frecvent în biologia moleculară, izolarea ADN-ului, purificarea proteinelor prin cromatografie de afinitate, metode computaționale de studiu a proteinelor.

Descrierea metodelor și a tehnicilor este foarte bine făcută, de la principiile teoretice, avantajele și limitele, până la descrierea concretă a materialelor necesare și a modului de lucru.

În acest fel cartea este un valoros ghid pentru lucrul în laborator, atât pentru începători (studenți, masteranzi, doctoranzi), cât și pentru avansați (cercetători postdoctorali, cadre didactice din învățământul

superior, tehnicienii de laborator cu experiență) și trebuie să se afle pe masa de lucru din laborator (ori aproape de masa de lucru).

Fiind eu însumi autor al unei cărți pentru laboratoarele clinice (Ion Manta, Mircea Cucuianu, Gheorghe Benga, Adriana Hodârnu, *Metode biochimice în laboratorul clinic*, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1975) și al unui îndrumător pentru lucrările practice cu studenții (Gh. Benga -Ed.- *Îndrumător pentru lucrările practice de biologie celulară și moleculară*, Editura Carpatica, Cluj-Napoca, 1997) îmi dau bine seama de dificultatea scrierii unei astfel de cărți și apreciez efortul foarte mare depus de autori.

Recomand călduros lucrarea scrisă de cei trei autori tuturor categoriile de cititori (și utilizatori) menționați mai sus, dar și celor care nu aplică sau nu vor aplica niciodată metodele și tehnicile de laborator ale biologiei moleculare, dar care vor să se orienteze în metodele și tehnicile laborator de biologie moleculară, spre a înțelege mai bine aplicațiile acestora în științele medicale și biologice.

Cluj-Napoca, 12 noiembrie 2012

Prof. Univ. Dr. Dhc. Gheorghe Benga

Membru corespondent al Academiei Române

Membru Titular al Academiei de Științe Medicale din România

Medic specialist de Laborator Clinic, Chimist,

Medic primar de Genetică Medicală,

Laboratorul de Explorări Genetice I al Spitalului Clinic Județean de Urgență Cluj-Napoca

Profesor Univ. Asociat, Disciplina de Biologie Celulară și Moleculară,

Universitatea de Vest „Vasile Goldiș” din Arad

Președinte al Filialei Cluj a C.R.I.F.S.T.

(Comitetul Român pentru Istoria și Filosofia Științei și Tehnicii) al Academiei Române

Honorary Associate, School of Molecular Biosciences,

University of Sydney, Australia

Past-President, Societatea Română de Medicină de Laborator

Past-President, Balkan Federation of Clinical Laboratory

E-mail: ggbenga@gmail.com

INTRODUCERE

Dacă biologia clasică s-a dezvoltat și a atins nivelul de cunoaștere de astăzi prin folosirea cu precădere a „studiilor observaționale”, biologia modernă se bazează în mod fundamental pe noțiunea de „experiment” și pe procesul de „experimentare” în scopul dobândirii de noi informații și cunoștințe. Experimentul are rolul de a verifica validitatea unei ipoteze formulate în prealabil utilizând pentru aceasta un ansamblu de tehnici și metode. Reușita unui experiment, adică formularea fără echivoc a unei concluzii legate de ipoteza de testat, depinde în mare măsură de capacitatea cercetătorului de a concepe un model de studiu, de a alege și de a utiliza în mod corect una sau mai multe metode de investigație.

Majoritatea lucrărilor de profil din ultima decadă, care descriu metode și tehnici de laborator utilizate în biochimie, enzimologie, biologie celulară și moleculară, au fost realizate cu precădere în scopuri didactice, fiind utilizate ca suport pentru prelegerile teoretice. Metodele experimentale sunt reduse frecvent la un set de indicații simple și clare pe care studenții să le poată urma cu ușurință. Lipsa unor informații generale despre principiile teoretice și aplicabilitatea metodelor dau însă o falsă impresie de imuabilitate a protocoalelor experimentale, ceea ce face ca experimentatorul să fie pus deseori în dificultate atunci când trebuie să adapteze metoda în mod specific.

În acest context, lucrarea de față se dorește a fi un ghid detaliat al unor metode-cheie, utilizate frecvent în biologia moleculară, concentrându-se nu numai pe simpla formulare a unor protocoale experimentale, ci și pe explicarea principiilor din spatele fiecărei metode în scopul precizării spectrului de aplicabilitate și a rezultatelor scontate. Fiecare din metodele prezentate au fost testate și utilizate de către autori în cadrul Laboratorului de Biochimie și Biologie Moleculară al Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași. Modul de prezentare este adaptat specificului fiecărei metode în parte, cuprinzând în general cinci secțiuni distincte:

1. **principiul metodei** – oferă informații legate de bazele teoretice ale metodei utilizate;
2. **avantaje** – furnizează informații legate de domeniul de aplicabilitate al metodei, rezultatele așteptate corelate cu date legate de sensibilitate, randament etc.;

3. **limitări** – prezintă condițiile în care metoda nu poate fi aplicată, dezavantajele sau inconvenientele sale în comparație cu metode similare;
4. **materiale necesare** – conține lista completă a reactivilor, materialelor, instrumentelor și aparaturii necesare, alături de instrucțiuni legate de prepararea reactivilor și indicații privind potențialele pericole care pot să apară în laborator;
5. **mod de lucru** – oferă indicații simple și precise privind suita de operații care trebuie efectuate pentru obținerea rezultatelor finale.

Prin conținut și structură lucrarea se adresează cu precădere studenților care frecventează studiile masterale și de doctorat, cercetătorilor post-doctorat, cadrelor didactice care coordonează lucrările de disertație și doctorat, tinerilor angajați în activitatea de cercetare, care fac primii pași în domeniul științelor vieții, precum și specialiștilor din domenii conexe. Prin aspectele teoretice abordate, prezenta lucrare poate fi utilă și cercetătorilor și tehnicienilor cu experiență care au deprins și utilizează aceste protocoale de ani buni, dar care nu au acordat suficientă importanță cunoștințelor teoretice care fundamentează metodele respective. Puțini vor fi cei care vor parcurge această lucrare de la un capăt la altul, dar sperăm că o vom regăsi pe masa de lucru a cât mai multor cercetători, funcționând ca un ghid pentru selecția, dezvoltarea și adaptarea protocoalelor experimentale la nevoile specifice ale experimentatorului.

Mesajul final pe care această lucrare dorește să îl transmită este că reproducerea în detaliu a fiecărei etape a unui protocol nu este suficientă pentru utilizarea cu succes a acestuia. Este mai important poate de cunoscut cum funcționează, în ce condiții se poate utiliza, ce informații poate și ce informații nu poate să ofere o anumită metodă, precum și care sunt parametrii critici de care trebuie să se țină cont la utilizarea unei tehnici experimentale.

Mulțumim anticipat celor care vor transmite sugestii, observații și recomandări care să conducă la completarea acestei lucrări în scopul îmbunătățirii unei viitoare ediții.

Autorii

Textul complet este disponibil in format electronic gratuit. Nu ezitati sa ma contactati in aceasta directie prin e-mail la adresa:

marius.mihasan@uaic.ro

ANEXĂ

TABEL A1. Multipli și submultipli ai unităților de măsură

Prefix	Factor de multiplicare	Abreviere
Atto	10^{-18}	a
Femto	10^{-15}	f
Pico	10^{-12}	p
Nano	10^{-9}	n
Micro	10^{-6}	μ
Mili	10^{-3}	m
Centi	10^{-2}	c
Deci	10^{-1}	d
Deca	10	da
Hecto	10^2	h
Kilo	10^3	k
Myria	10^4	my
Mega	10^6	M
Giga	10^9	G
Tera	10^{12}	T
Peta	10^{15}	P
Exa	10^{18}	E

TABEL A2. Tabel de conversie a celor mai utilizate unități de volum

Pentru a converti:	în:	se multiplică cu:
Centimetri cubi (cm³)	Microlitri (μl)	10 ³
	Mililitri (ml)	1
	Litri (l)	10 ⁻³
	Galoane (US)	2.641 x 10 ⁻⁴
	Metri cubi (m ³)	10 ⁻⁶
	Picioare cubice (cubic feet, ft ³)	3,531 x 10 ⁻⁵
	Inchi cubici (cubic inches (in. ³))	6,102 x 10 ⁻²
Litri (L)	Microlitri (μl)	10 ⁶
	Mililitri (ml)	10 ³
	Galoane (US)	0,2642
	Centimetri cubi (cm ³)	10 ³
	Metri cubi (m ³)	10 ⁻³
	Picioare cubice (<i>engl.</i> cubic feet, ft ³)	3,531 x 10 ⁻²
	Inchi cubici (<i>engl.</i> cubic inches (in. ³))	61.02
Mililitri (ml)	Litri (l)	10 ⁻³
	Microlitri (μl)	10 ³
Microlitri (μl)	Mililitri (ml)	10 ⁻³
	Litri (l)	10 ⁻⁶

TABEL A3. Tabel de conversie a celor mai utilizate unități de măsură

Pentru a converti din:	în:	se multiplică cu:
Concentrația		
Miligrame per litru (mg/l)	Părți pe milion (ppm)	1
Distanța		
Centimetri (cm)	Picioare (<i>engl.</i> feet, ft)	$3,281 \times 10^{-2}$
	Inchi (in.)	0,39
	Metri (m)	10^{-2}
	Milimetri (mm)	10
	Yarzi (yd)	$1,094 \times 10^{-2}$
Inchi (in)	Centimetri (cm)	2,54
	Picioare (<i>engl.</i> feet, ft)	$8,333 \times 10^{-2}$
	Metri (m)	$2,540 \times 10^{-2}$
	Milimetri (mm)	25,4
	Yarzi (yd)	$2,778 \times 10^{-2}$
Milimetri (mm)	Centimetri (cm)	0,1
	Picioare (<i>engl.</i> feet, ft)	$3,281 \times 10^{-3}$
	Inchi (in.)	$3,937 \times 10^{-2}$
	Metri (m)	10^{-3}
	Angstromi (Å)	Nanometri (nm)
Angstromi (Å)	Metri (m)	10^{-10}
	Picometri (pm)	100
Curentul și sarcina electrică		
Amperi pe centimetru pătrat (A/cm^2)	Amperi pe inci pătrați (A/in^2)	6,45
	Amperi pe metru patrat (A/m^2)	10^4

Pentru a converti din:	în:	se multiplică cu:
Amperi pe inci pătrați (A/in ²)	Amperi pe centimetru pătrat (A/cm ²)	0,16
	Amperi pe metru patrat (A/m ²)	1,55 x 10 ³
Amperi oră (A-hr)	Coulombi (C)	3,6 x 10 ³
	Faraday (F)	3,731 x 10 ⁻²
Coulombi (C)	Faraday (F)	1,036 x 10 ⁻⁵
Coulombi pe centimetru pătrat (C/cm ²)	Coulombi pe inci pătrat (C/in ²)	64,52
	Coulombi pe metru patrat (C/m ²)	10 ⁴
Coulombi pe inci pătrat (C/in ²)	Coulombi pe centimetru pătrat (C/cm ²)	0,16
	Coulombi pe metru patrat (C/m ²)	1,55 x 10 ³
Faraday (F)	Amperi-oră (A-hr)	26,8
	Coulombi (C)	9,649 x 10 ⁻⁴
Presiunea		
Atmosfere (atm)	Bari	1,01
	Milimetri coloana de Hg (mmHg) sau torri	760
Bari (bar)	Atmosfere (atm)	0,99
	Kilograme pe metru pătrat (kg/m ²)	1,020 x 10 ⁴
	psi	14,5
Milimetri coloana de Hg (mmHg) sau torri	Atmosfere (atm)	1,316 x 10 ⁻³
	Kilograme pe metru pătrat (kg/m ²)	136

Pentru a converti din:	în:	se multiplică cu:
Pascali (P)	Newtoni pe metru pătrat (N/m ²)	1
Rezistența electrică		
Ohmi (Ω)	Megaohmi (MΩ)	10 ⁶
	Microhmi (μΩ)	10 ⁻⁶
Timp		
Zile	Ore (hr)	24
	Minute (min)	1,44 x 10 ³
	Secunde (sec)	8,64 x 10 ⁴
Temperatura		
Grade Kelvin (K)	Grade Celsius (°C)	K-273,13
	Grade Fahrenheit (°F)	[(K - 273,13) × 9/5] + 32
Grade Celsius (°C)	Grade Kelvin (°K)	°C + 273,13
	Grade Fahrenheit (°F)	1,8 x °C + 32
Grade Fahrenheit (°F)	Grade Celsius (°C)	(F - 32)/1,8
Viteza		
Centimetri pe secundă (cm/s)	Picioare pe minut (ft/min)	1,2
	Picioare pe secundă (ft/sec)	3,281 x 10 ⁻²
	Kilometri pe oră (km/hr)	3,6 x 10 ⁻²
	Metri pe minut (m/min)	0,6
	Mile pe ora (miles/hr)	2,237 x 10 ⁻²
	Mile pe minut (miles/min)	3,728 x 10 ⁻⁴

TABEL A4. Date generale privind concentrația aproximativă a diversilor constituenți intracelulari după Ausubel et al., 2002 (1)

Macromolecule (proteine, acizi nucleici, poliglucide)	22% (w/w)
Molecule mici	
Apă	70% (w/w)
Monoglucide	3% (w/w)
Lipide	2% (w/w)
Aminoacizi liberi	0,4% (w/w)
Nucleotide	0,4% (w/w)
Ioni anorganici	1% (w/w)
Na ⁺	5-15 mM
K ⁺	140 mM
Mg ²⁺	30 mM
Ca ²⁺	1-2 mM
Cl ⁻	4 mM
pH	7,4

TABEL A5. Factori de conversie utilizați frecvent în studiul proteinelor și acizilor nucleici

Masa molară medie a unei perechi de baze = 649 Da

1 kb de ADN codifica 333 amino-acizi, adică ≈ 36.000 Da

1 fragment de 1 kB este echivalentul a $6,5 \times 10^5$ Da ADN dublu catenar,
 $3,3 \times 10^5$ Da ADN mono catenar sau $3,4 \times 10^5$ Da ARN monocatenar

1 $\mu\text{g/ml}$ ADN conține 3,08 μM fosfat

1 $\mu\text{g/ml}$ ADN cu dimensiunea de 1 kb conține 3,08 nM capete 5'

1 μmol pBR322 (4363 bp) este echivalent a 2,83 g

Masa molară medie a unui aminoacid = 110 Da

10 kDa dintr-o proteină conține ≈ 91 aminoacizi și este codificată de ≈ 273 nucleotide

TABEL A6. Modul de notare prescurtată a nucleotidelor

Prescurtare	Nucleotidă
A	Adenină
C	Citozină
G	Guanină
T	Timină
U	Uracil
M	Adenină sau Citozină
R	Adenină sau Guanină
S	Citozină sau Guanină
Y	Citozină sau Timină
K	Guanină sau Timină
V	Adenină, Citozină sau Guanină (oricare, exceptând Timina)
H	Adenină, Citozină sau Timină (oricare, exceptând Guanina)
D	Adenină, Guanină sau Timină (oricare, exceptând Citozina)
B	Citozină, Guanină sau Timină (oricare, exceptând Adenina)
N	Oricare din cele cinci nucleotide

TABEL A7. Principalele proprietăți fizico-chimice ale aminoacizilor

Aminoacid	Prescurtarea cu trei litere	Prescurtarea literă	Masă molară (g/mol)	Aria suprafeței accesibile ^a	Hidro- fobicitate ^b	Mutabilitate relativă ^c
Alanină	Ala	A	89.1	115	-0.4	100
Arginină	Arg	R	174.2	225	-0.59	65
Asparagină	Asn	N	132.1	160	-0.92	134
Acid aspartic	Asp	D	133.1	150	-1.31	106
Cisteină	Cys	C	121.2	135	0.17	20
Glutamat	Glu	E	147.1	190	-1.22	102
Glutamină	Gln	Q	146.2	180	-0.91	93
Glicină	Gly	G	75.1	75	-0.67	49
Histidină	His	H	155.2	195	-0.64	66
Isoleucină	Ile	I	131.2	175	1.25	96
Leucină	Leu	L	131.2	170	1.22	40
Lizină	Lys	K	146.2	200	-0.67	56
Metionină	Met	M	149.2	185	1.02	94

Aminoacid	Prescurtarea cu trei litere	Prescurtarea cu o literă	Masă molară (g/mol)	Aria suprafeței accesibile ^a	Hidrofobicitate ^b	Mutabilitate relativă ^c
Fenilalanină	Phe	F	165.2	210	1.92	41
Prolină	Pro	P	115.1	145	-0.49	56
Serină	Ser	S	105.1	115	-0.55	120
Treonină	Thr	T	119.1	140	-0.28	97
Triptofan	Trp	W	204.2	255	0.5	18
Tirozină	Tyr	Y	181.2	230	1.67	41
Valină	Val	V	117.1	155	0.91	74

^a Aria suprafeței accesibile este exprimată în Å² și este calculată pentru fiecare aminoacid ca parte a unui schelet polipeptidic (2)

^b Hidrofobicitatea este exprimată în unități arbitrare folosind scala OMH descrisă de Sweet și Eisenberg (1983) (3)

^c Mutabilitatea relativă este exprimată în unități arbitrare (alanina fiind aleasă ca referință) și reprezintă probabilitatea ca un aminoacid să sufere o mutație într-un timp dat (4)

TABEL A8. Compatibilitate chimică a diverselor tipuri de materiale plastice utilizate în laborator:

	ABS	Acetal	CPVC	LDPE	PC	PEEK	PP	PTFE	PVC	PVDF
Slovenți organici										
Acetonă	D	A	D	B	D	A	A	A	D	D
Acilonitril	D	N/A	A	A	D	A	A	A	B	A
Benzen	D	A	D	C	D	A	D	A	C	A
Cloroform	D	A	D	C	D	A	C	A	D	A
Diclorbenzen	D	N/A	D	N/A	D	A	C	A	D	A
Hexan	D	A	B	D	D	A	B	A	B	A
Nitrobenzen	D	C	D	C	D	A	B	A	D	A
Fenol	D	D	B	D	D	D	B	A	D	A
Toluen	D	C	D	C	D	A	C	A	D	A
Diclorețan	D	A	D	C	D	A	D	A	D	A
Alcooli										
Alcool amilic	A	A	A	B	B	A	B	A	A	D
Alcool benzilic	D	A	A	D	N/A	A	A	A	D	A
Alcool izopropilic	N/A	A	C	A	A	A	A	A	A	N/A
Etanol	B	A	B	B	B	A	A	A	C	N/A
Metanol	D	A	A	A	B	A	A	A	A	A

	ABS	Acetal	CPVC	LDPE	PC	PEEK	PP	PTFE	PVC	PVDF
Acizi										
Acid acetic glacial	D	D	B	A	B	A	B	A	D	C
Aqua Regia (HCl 80%, HNO ₃ 20%)	D	D	C	B	D	D	B	A	C	A
Acid citric	D	B	B	D	A	A	A	A	B	A
Acid formic	D	A	A	D	A	C	A	A	A	A
HF până la 75%	C	D	C	C	D	D	C	A	C	A
HCl 37%	A	C	A	B	D	A	C	A	B	A
H ₂ SO ₄ 10-75%	B	D	A	A	B	D	A	A	A	A
H ₂ SO ₄ 98%	N/A	N/A	C	C	N/A	D	A	A	D	A
Acid tricloroacetic, TCA	N/A	N/A	N/A	A	D	N/A	A	A	B	B
HNO ₃ până la 50%	C	D	B	B	B	D	B	A	B	A
HNO ₃	D	D	D	C	C	D	D	A	B	A
H ₃ PO ₄ mai concentrat de 40%)	D	D	A	B	A	A	A	A	B	B
Baze										
Amoniac	D	D	A	B	D	A	A	A	A	A
Mg(OH) ₂	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
KOH	A	A	A	A	D	A	A	A	A	A

	ABS	Acetal	CPVC	LDPE	PC	PEEK	PP	PTFE	PVC	PVDF
NaOH până la 80%	A	D	A	D	D	A	A	A	A	A
Altele										
Acetaldehidă	D	A	D	C	C	A	A	A	D	D
Detergenți	B	A	A	D	A	A	A	A	A	A
Formaldehidă	B	A	A	B	A	A	C	A	A	A
H ₂ O ₂	A	D	A	C	A	A	B	A	A	A
Iod	D	D	D	A	N/A	C	C	A	A	A
AgNO ₃	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Uree	B	A	A	A	D	A	A	A	D	A
NaOCl până la 20%	A	D	A	A	C	B	A	A	A	A

A = compatibilitate excelentă, **B** = compatibilitate bună, efecte mici – o ușoară decolorare sau coroziune, **C** = compatibilitate relativ bună, efecte mai pronunțate, nu se recomandă pentru utilizarea continuă; pot apărea fenomene de înmuțare sau umflare, **D** = efecte severe, nu se recomandă utilizarea, **N/A** = nu există informații despre compatibilitate

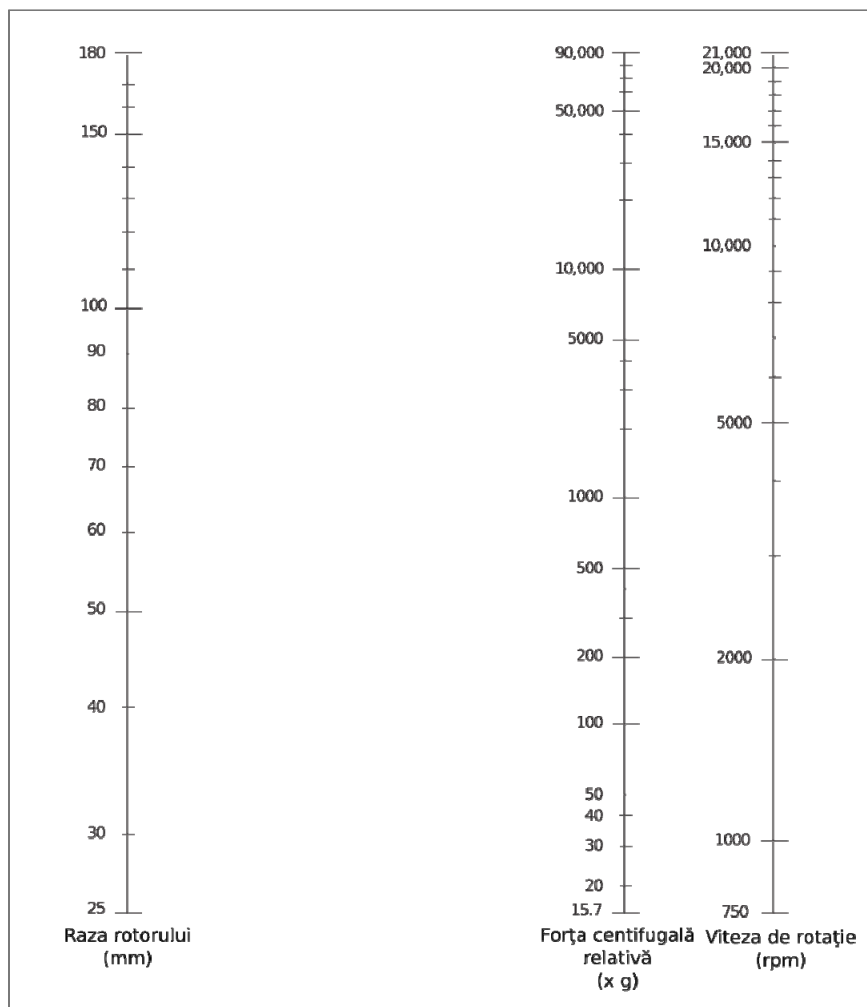


FIGURA A1. Nomogramă pentru conversia forței centrifuge (g) în viteză de rotație (rpm).

Pentru a identifica pe nomogramă o valoare necunoscută se trasează o dreaptă descrisă de două puncte de pe celelalte două coloane. Valoarea dorită se citește la intersecția dreptei cu coloana de interes. Pentru centrifugări la viteze mai mari se folosește nomograma din figura A2. Pentru valori precise, se utilizează ecuația prezentată în subcapitolul dedicat centrifugării, pagina 15.

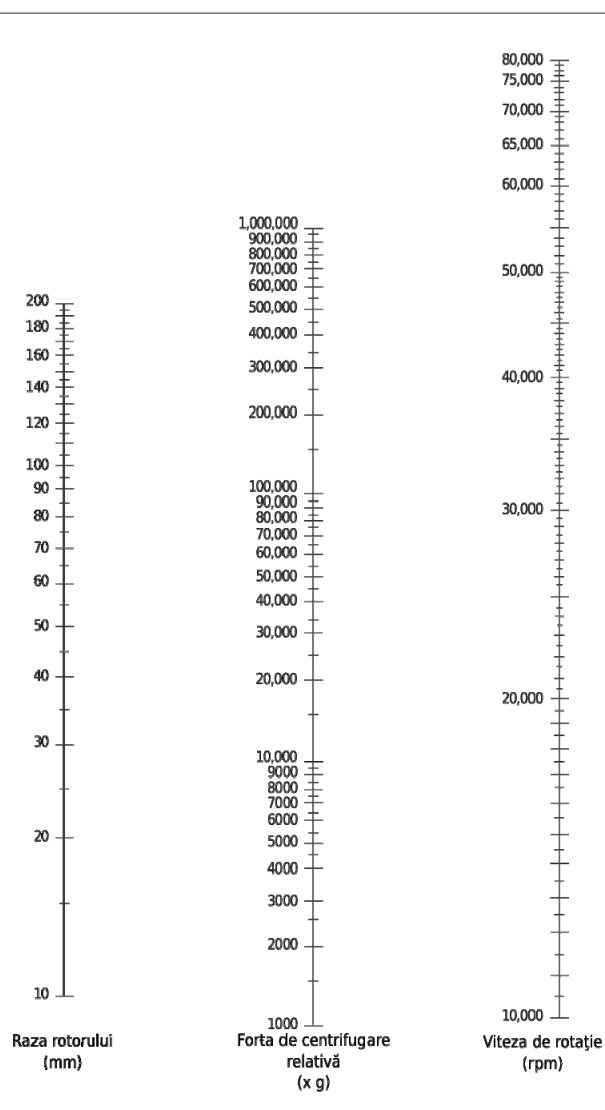


FIGURA A2. Nomogramă pentru conversia forței centrifuge (g) în viteză de rotație (rpm).

Pentru a identifica o valoare necunoscută folosind nomograma reprezentată în figura se trasează o dreaptă descrisă de două puncte de pe celelalte două coloane. Valoarea dorită se citește la intersecția dreptei cu coloana de interes. Pentru valori precise, se utilizează ecuația prezentată în subcapitolul dedicat centrifugării, pagina 15

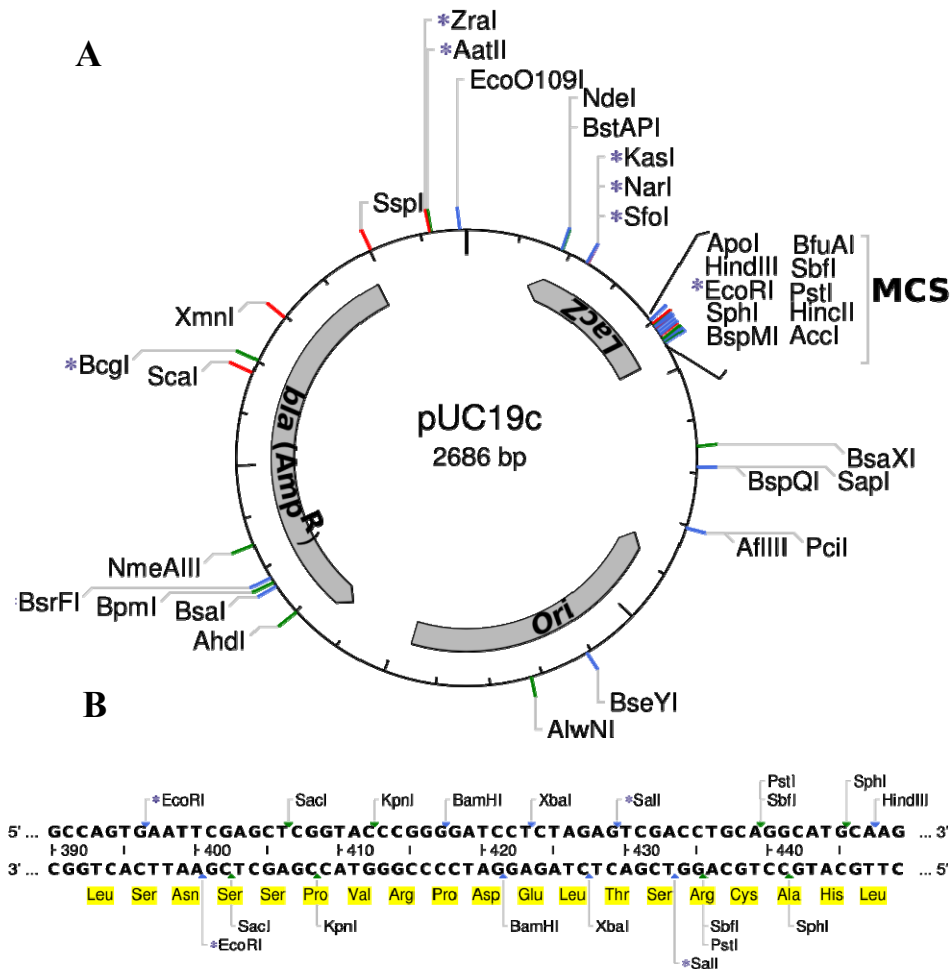


FIGURA A3. Harta situs-urilor de restricție a plasmidului pUC19c

A. organizarea generală a plasmidului (*mcs* – situs multiplu de clonare; *lacZ* – fragmentul N-terminal al genei ce codifică β -galactozidaza din calea metabolică a lactozei; *Ori* – originea de replicare provenind din plasmidul pMB1; *bla(Amp^R)* – conferă rezistență la ampicilină) **B.** Secvența în zona MCS

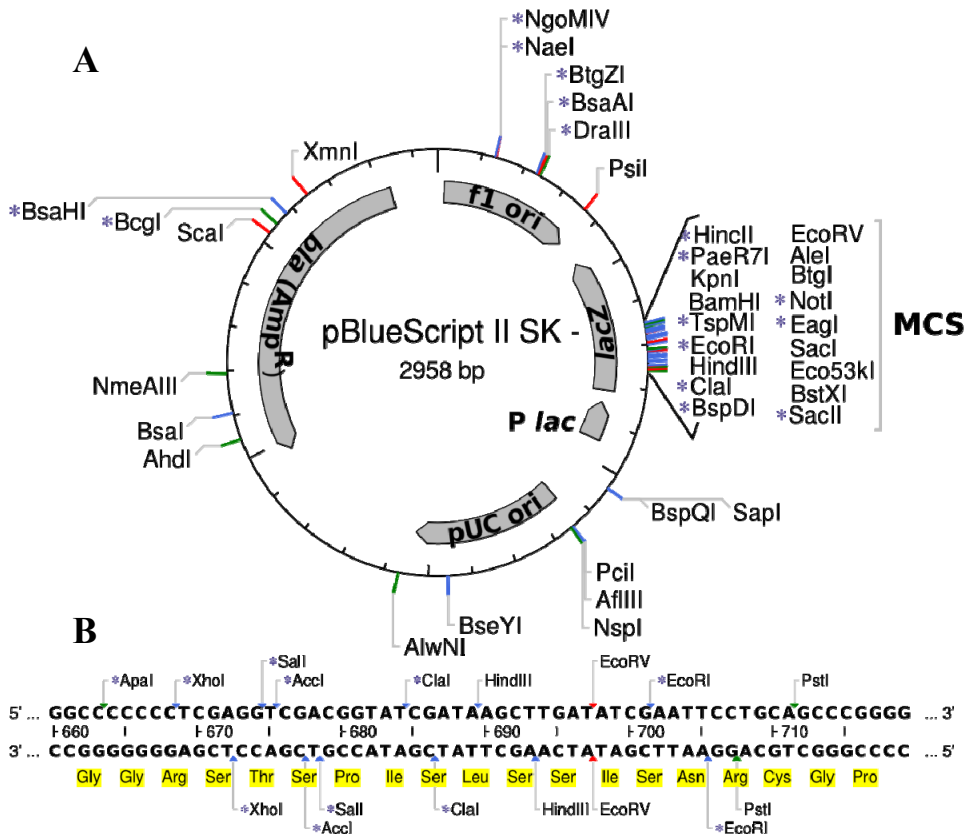


FIGURA A4. Harta situs-urilor de restricție a plasmidului pBluescript II SK –

A. organizarea generală a plasmidului (*mcs* – situs multiplu de clonare; *f1 ori* – originea de replicare provenind din fag; *lacZ* – fragmentul N-terminal al genei ce codifică β -galactozidaza din calea de metabolică a lactozei; *P lac* – promotorul sub controlul căruia este pusă gena clonată; *pUC ori* – originea de replicare provenind de la plasmidul pUC; *bla(Apm^R)* – gena ce conferă rezistență la ampicilină) **B.** Secvența în zona MCS.

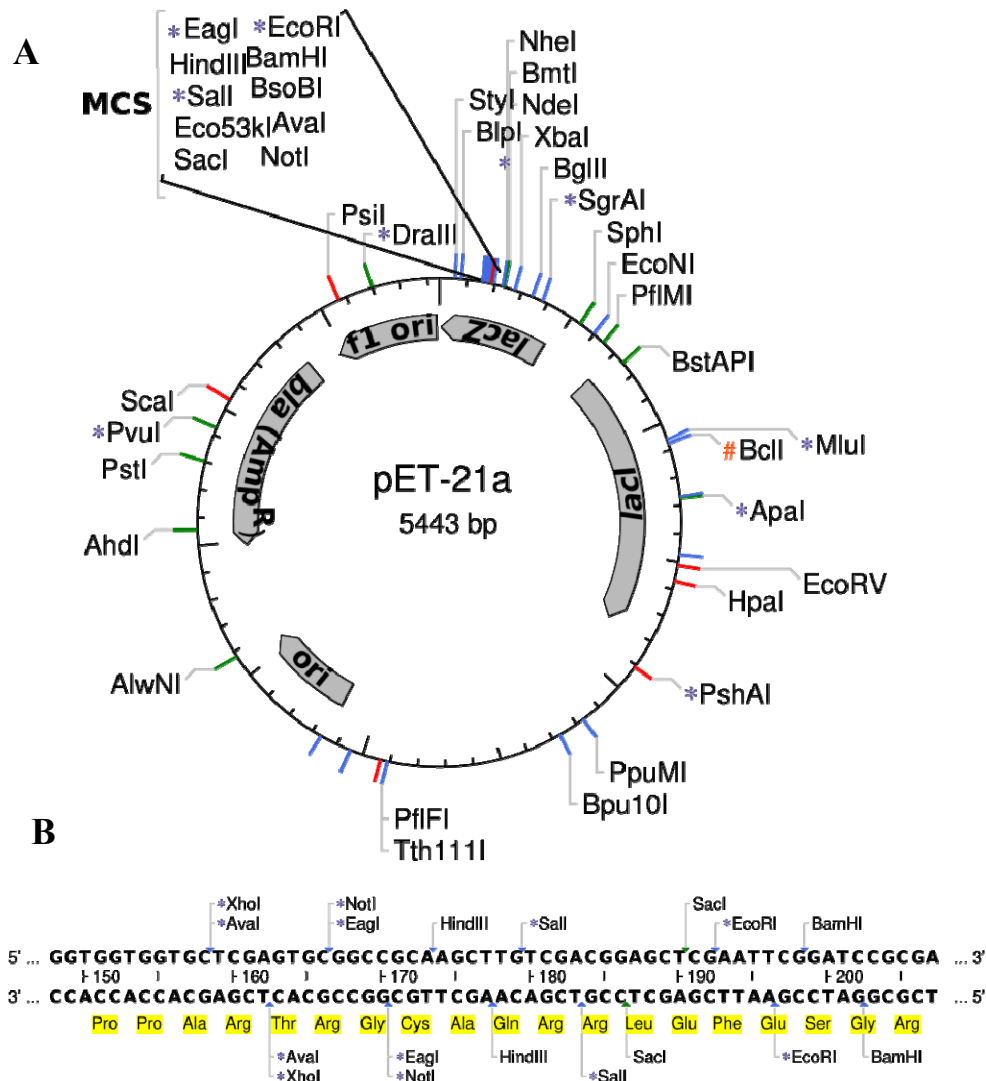


FIGURA A5. Harta situs-urilor de restricție a plasmidelor pET-21a;

A. organizarea generală a plasmidului (*mcs* – situs multiplu de clonare; *f1 ori* – originea de replicare provenind din fag *lacZ* – fragmentul N-terminal al genei ce codifică β -galactozidaza din calea metabolică a lactozei; face posibilă selecția alb/albastră prin complementare alfa pe plăci cu Xgal; *ori* – originea de replicare provenind de la plasmidul pUC; *lacI* – represorul din operonul lac cu rol în controlul expresiei genei clonate; *bla(Apm^R)* – gena ce conferă rezistență la ampicilină) B. Secvența în zona MCS.

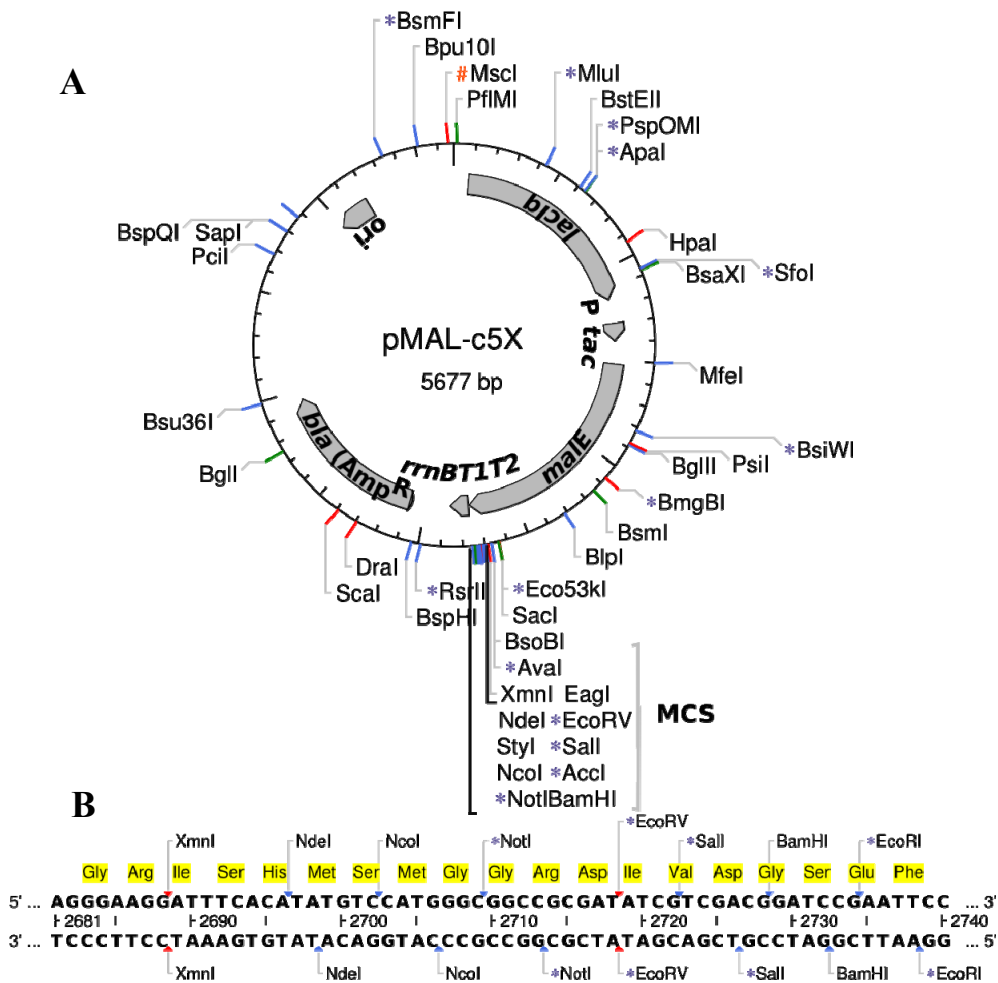


FIGURA A6. Harta situs-urilor de restricție a plasmidului pMAL-c5X

A. organizarea generală a plasmidului (*mcs* – situs multiplu de clonare; *bla(Amp^R)* – gena ce conferă rezistență la ampicilină; *ori* – originea de replicare provenind de la plasmidul pBlueScript; *lacIq* – represorul din operonul lac cu rol în controlul expresiei genei clonate; *P tac* – promotorul sub controlul căruia este pusă gena clonată; *malE* – maltose binding protein, proteina cu afinitate pentru maltoză din *E.coli*, *rmBT1T2* – zona de semnalizare a sfârșitului transcripției B. Secvența în zona MCS.

Bibliografie pentru Anexa

Bibliography

1. Ausubel, M. F., Brent, R., Kingston, E. R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, A. J., Struhl, K. (2002) – *Short Protocols in Molecular Biology*, p A2-1,. John Wiley & Sons Inc.
2. Chothia, C. (1976) – The nature of the accessible and buried surfaces in proteins, *Journal of Molecular Biology*, 105, 1-12.
3. Sweet, R. M., Eisenberg, D. (1983) – Correlation of sequence hydrophobicities measures similarity in three-dimensional protein structure, *Journal of Molecular Biology* , 171, 479-88.
4. Dayhoff, M., Schwartz, R., Orcutt, B. (1978) – A model of evolutionary change in proteins, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5, 345-352.