

LABORATORUL Nr. 1 (525)
BIOLOGIE MOLECULARĂ (50 puncte)

INSTRUCȚIUNI GENERALE

- Dacă sunteți pregătit pentru a merge în zona electroforetică ridicați în sus cartonașul verde.
- Dacă întâmpinați o dificultate pentru soluționarea căreia aveți nevoie de asistența unui supraveghetor, ridicați cartonașul roșu.
- Dacă doriți să mergeți la baie ridicați cartonașul albastru, în acest caz un asistent de laborator vă va însoți.
- Veți realiza lucrarea fiind divizați în 2 grupuri, competitorii cu numerele 1-7 reprezintă primul grup, competitorii cu numărul 8-14 reprezintă grupul nr.2. Schema de organizare a activității în laborator este prezentată în tabelul de mai jos:

Interval de timp	Grup	Activitate
0-5 min.	1+2	Instructaj general, verificarea prezenței materialelor indicate.
6-30 min.	1	Realizarea părții 2.
6-30 min.	2	Realizarea părții 1.
31-55 min.	1	Realizarea părții 1.
31-55 min.	2	Realizarea părții 2
55-60 min.	1+2	Finalizarea activităților, pregătirea pentru deplasarea în următorul laborator.

INSTRUCȚIUNI DE OPERARE A PIPETEI DOZATOR

- ✓ **Reglarea volumului** - Pentru a regla volumul adecvat, rotiți cadranul de reglare a volumului prezent în partea de sus a micropipetei. Poate fi rotit la dreapta sau la stânga pentru a micșora sau crește volumul.
- ✓ **Măsurarea volumului unui lichid** - Înainte de a măsura lichidul și de a-l transfera asigurați-vă că ați reglat volumul corect și că ați cuplat un vârful. Ținând pipeta vertical apăsați pistonul de sus până la prima oprire. Cufundați vârful micropipetei în soluție la aproximativ 3 mm adâncime în lichidul eșantionului. Eliberați încet presiunea de pe piston și lăsați-l să ajungă în poziția inițială. Lichidul va începe să intre în vârful. Urmăriți soluția care este trasă în vârful. Nu eliberați pistonul prea repede, deoarece poate provoca formarea de bule în soluție și poate provoca, de asemenea, stropirea soluției pe axul nesteril. Retrageți vârful din soluție. Lichidul va fi acum în vârful micropipetei.
Notă: Cea mai gravă și frecventă eroare este apăsarea pistonului până la a doua oprire înainte de a umple micropipeta. Evitați această eroare.
- ✓ **Transferarea volumului unui lichid** – Încărcați în vârful lichidul, apoi introduceți vertical vârful în recipientul în care lichidul trebuie transferat. Nu distribuiți lichidul în aer. Apăsați ușor pistonul până la prima oprire, apoi faceți o pauză și după aceea, apăsați în continuare pistonul până la a doua oprire. Cea mai mare parte a conținutului este eliberată la prima oprire, a doua oprire asigură că și ultima picătură de lichid este eliberată. Scoateți vârful vertical din recipient și readuceți pistonul în poziția inițială. Scoateți și aruncați vârful în recipientul pentru deșeuri folosind ejectorul de vârful.

DETERMINAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A PURITĂȚII ȘI CONCENTRAȚIEI ADN

Înainte de a folosi ADN-ul extras și purificat, în diverse manipulări moleculare, este necesar să se verifice puritatea și integritatea lui. Verificarea purității ADN se realizează de regulă spectrofotometric, ținând cont de următoarele considerente:

1. moleculele ADN (atât formele dublu-, cât și cele monocatenare) prezintă absorbanta maximă la lungimi de undă ce variază între 257 și 260 nm;
2. absorbanta maximă pentru proteinele rămase eventual în extract este la $\lambda=280$ nm;
3. există și unele proteine care absorb radiațiile luminoase cu $\lambda=260$ nm, dar contribuția lor la absorbanta totală a unui extract ADN la $\lambda=260$ nm este echivalentă cu cea a absorbantei la $\lambda=300$ nm
4. unele polizaharide absorb radiațiile luminoase cu $\lambda = 230$ nm
5. absorbanta la 220 nm este dată de oligonucleotide ce reprezintă de obicei molecule de ADN fragmentat în mod artificial în timpul tehnicilor de extracție și purificare;
6. în funcție de valorile A260 și A280 se poate stabili gradul de contaminare proteică, astfel:
 - ✓ raportul A260 / A280 optim este de 1.8-2.0
 - ✓ dacă acest raport este mai mic de 1.7, atunci contaminarea proteică a extractului ADN este semnificativă.
7. gradul de contaminare cu ARN este indicat de valori mai mari de 2.0 ale raportului A260/A280;
8. gradul de contaminare cu polizaharide se determina în funcție de valoarea raportului A260 /A230, care trebuie să fie mai mare de 2. Dacă obținem valori mai mici de 2, acest lucru este o dovada a prezentei polizaharidelor în extractul ADN.

Se constată deci, că pentru a aprecia gradul de puritate a unui extract ADN este necesară citirea spectrofotometrică a valorilor absorbantei la mai multe lungimi de undă. În paralel, dacă performanțele tehnice ale spectrofotometrului o permit, se recomandă și determinarea întregului spectru de absorbție al probei, în domeniul $\lambda = 200 - 350$ nm, pentru a putea astfel evidenția eventualii contaminați.

Determinarea concentrației de ADN:

Cea mai simplă metodă de determinare a concentrației ADN dintr-un extract se bazează pe citirea absorbantei la $\lambda = 260$ nm. Astfel, se pot folosi următoarele formule:

$$\begin{aligned} A_{260} = 1 & \text{ corespunde la } 50 \mu\text{g ADN d.c. / ml} \\ A_{260} = 1 & \text{ corespunde la } 33 \mu\text{g ADN m.c. / ml} \\ A_{260} = 1 & \text{ corespunde la } 40 \mu\text{g ARN m.c. / ml} \\ A_{260} = 1 & \text{ corespunde la } 20 \mu\text{g oligonucleotide / ml} \end{aligned}$$

N.B! Având în vedere faptul că în marea majoritate a cazurilor valoarea concentrației ADN este importantă pentru manipulările ulterioare ale acestuia, este absolut necesar ca înainte de determinarea concentrației să se estimeze gradul de puritate al extractului, și respectiv, determinarea exactă a A260.

ESTIMAREA A PURITĂȚII ȘI CONCENTRAȚIEI ADN PRIN ELECTROFOREZĂ

Este de asemenea recomandabil ca determinarea concentrației ADN pe baza A260 să fie corelată și cu aspectul ADN în gelul de electroforeză. De asemenea atunci când întregul volum al probei este foarte mic astfel încât nu permite citirea spectrofotometrică nici în cuve cu volum mic, cum ar fi cele de 50-100 μ l.

Electroforeza în gel de agaroză este o metodă care permite de a separa o populație mixtă de macromolecule precum ADN sau proteine într-o matrice de agaroză, una dintre cele două componente principale ale agarului. Benzile sunt vizualizate datorită utilizării compușilor fluorescenți intercalanți (bromura de etidiu sau SYBR Green) prin iradiere cu lumină UV.

Atunci când se dorește de a estima concentrația și calitatea ADN prin electroforeză se folosește gelul de agaroză. În gel se încarcă un volum mic de proba, iar alăturat se încarcă un marker molecular de lungime, (de exemplu, se pot folosi diluții ale unei probe de ADN standard, comercializat, cu concentrație cunoscută). Concentrația probei este apoi apreciată în comparație cu intensitatea spoturilor fluorescente emise de soluțiile cunoscute (se folosește colorant cu bromura de etidium). Aceasta metodă permite detectarea unor cantități extrem de mici de ADN (1-5 ng).

MATERIALE ȘI INSTRUMENTE NECESARE:

- ✓ ADN total extras din bacterii (**Eprubeta etichetată de la 1 la 13**)
- ✓ Loading Dye 6X, colorant de încărcare a probelor pe gel (**prezent la stația de lucru în hota chimică**)
- ✓ Suport pentru eprubete
- ✓ Etichete autoadezive, 2 un.
- ✓ Cariocă permanentă, 1 un.
- ✓ Parafilm
- ✓ pipetă dozator, (**prezent la stația de lucru în hota chimică**)
- ✓ Vîrfuri pentru pipeta dozator, (**prezente la stația de lucru în hota chimică**)
- ✓ Camera electroforetică cu gelul de agaroză în ea,

MERSUL LUCRĂRII:

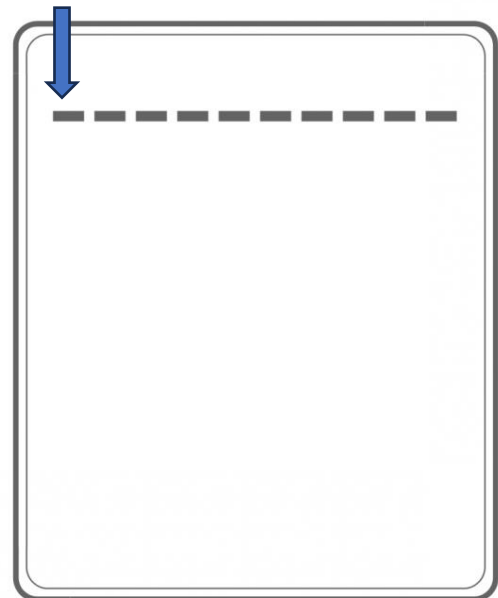
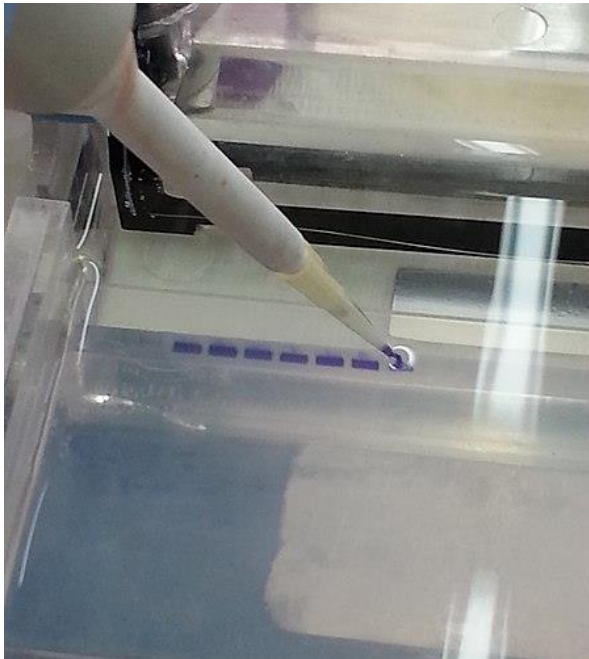
PARTEA I. Determinarea spectrofotometrică a purității și concentrației ADN

1. Pentru a cerceta spectrofotometric o probă de ADN total extras din bacterii, de obicei, se ia o mică cantitate din volumul total de ADN și se diluează.
2. Realizați sarcinile 1.1 - 1.4 din FOAIA DE RĂSPUNSURI.

PARTEA II. Estimarea a purității și concentrației ADN prin electroforeză

3. Camera electroforetică a fost asamblată de către asistenții de laborator. Pentru electroforeză va fi folosit un gel de 1% agaroză. Soluția tampon utilizată este TAE 1X (Tris-Acetate-EDTA, 40mM Bază Tris, 20mM acid acetic glacial, 1mM EDTA). Godeurile în care urmează să încărcați soluția de ADN colorată cu **Loading Dye, reprezintă spațiile libere din gelul de agaroză**. În unul din godeuri deja este plasat markerul de lungime, numit Ladder, sau pe gel deja vor exista plasate probele cercetate de către alți competitori.
4. Atunci când doriți să încărcați proba Dvs. pe gel ridicați cartonașul corespunzător pentru a solicita ajutorul asistentului. Puteți realiza acest lucru doar în intervalul de timp indicat pentru grupul Dvs.
5. Pentru a încărca probele pe gel urmează să parcurgeți următorii pași:

- ✓ Fiind însoțit de un asistent vă apropiați la stația de lucru, având cu sine proba de analizat plasată în suport, hârtia cerată (Parafilm) etichetată cu numărul mesei la care lucrați și FOILE DE RĂSPUNSURI.
- ✓ Solicitați asistentului să vă indice în care godeu să încărcați proba dvs.
- ✓ Setați pipeta la 1 μ l. Îmbrăcați un vârf curat.
- ✓ Pe hârtia cerată aplicați 2 picături de colorant Loading Dye.
- ✓ Aruncați vârful în recipientul pentru deșeuri.
- ✓ Setați pipeta la 5 μ l. Îmbrăcați un vârf curat
- ✓ În una din picăturile de colorant, adăugați 5 μ l soluție de ADN.
- ✓ Fără a schimba vârful setați pipeta la 6 μ l. Colectați în vârf tot amestecul Loading Dye + soluția de ADN de pe hârtia cerată.
- ✓ Încărcați probele pe gel așa cum este indicat în imaginea de mai jos. Țineți pipeta vertical. Introduceți vârful la 2 mm în godeu și apăsați pe piston până la prima oprire. Ținând pistonul apăsat retrageți vârful din godeu și din lichid. Relaxați pistonul. Aruncați vârful.



6. La finalizarea operației solicitați asistentul de laborator să semneze la **p. 1.5** în **FOAIA DE RĂSPUNSURI**.
7. Reveniți la locul de muncă și realizați sarcinile din **FOAIA DE RĂSPUNSURI**.