

# BIOLOGIA MOLEKULARREKO ARLOKO LAN-ARAUAK. OHIKO ARAZOEN GIDA ETA HORIEN SOLUZIOA

## 1. OINARRIZKO PROZEDURAK:

Atal honetan Biologia Molekularreko teknikan kontutan hartzeko faktoreak azalduko ditugu, hala nola hazkutzaren inguruen, tanpoien eta produktu kimikoen erabilera eta gordetzeko kondizioak; disoluzioen prestakuntza: kontzentrazioen kalkulua...; eta aholku gida ohiko arazoak ekiditeko.

### 1.1 Kontzentrazioen kalkulua:

Azido eta baseak:

1.05 dentsitateko azido azetiko glaziar: 17.4 M da

1.045 dentsitateko % 36 azido azetiko: 6.27 M da

1.18 dentsitateko HCl: 11.6 M da

1.05 dentsitateko HCl: 2.9 M da

0.898 dentsitateko amonio hidroxido: 14.8M da

### 1.2. Soluzioen prestakuntza, eta oinarrizko informazioa:

Hainbat ikerlari ez dute ezagutzen metodo zuzenak soluzioak prestatzeko, pipetak erabiltzeko. Hurrengo informazioa lagungarria izan daiteke:

- **Likidoetan disolbatutako solidoak bolumena okupatzen dute.** Beraz, 1 M soluzio bat prestatzeko substantziaren mol bat pisatu (pisu molekularra gramoetan espresatuta da) eta disolbatzailearen litro bat baino gutxiagotan disolbatu. Guztiz disolbatuta dagoenean bukaerako litro bateko bolumenera doitu. pHa doitu behar bada, bukaerako bolumena doitu baino lehen azidoak edo baseak gehitu behar dira.

- **Molaritatea.** Mol bat pisu molekularra gramotan da, kristalizazio ura barne. Beraz, 88,1 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  anhidroa eta 136.1 g  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . sodio azetatoaren kantitate berdina daukate.

- **Osagai askoren disoluzioa endotermikoa da, eta beroa behar du.** Adibidez, urea eta guanidina hidrokloruroaren soluzioak prestatzerakoan beharrezkoa da pixka bat berotzea. Kontutan hartu behar da ere tenperatura altuak erreaktiboak kaltetu ditzakeela.

- **Nahaste konplexuen prestakuntza.** Osagai bat baino gehiagoko nahasketak prestatzerakoan hobe da osagai bakoitzeko stock soluzioak prestatzea eta ondoren nahastea. Lehengo osagaia gehitu behar denen ura izan behar da BETI. Adibidez, NaCl eta SDS gehitzen badituzu ura baino lehenago, SDSa hauspeatu egingo da (NaCl kontzentrazioaren eta tenperaturaren arabera). Eskuarki gatzak eta tanpoiak substantzia organikoak baino lehenago gehitu behar dira.

- **Stock soluzioen diluzioa:** Nahasteak prestatzerakoan stock soluzio batetik hazita osagai bakoitza hurrengo ekuazioa erabiliz diluitu:  $V_1 = V_2 C_2 / C_1$

$V_1$ : gehitu behar dugun stock soluzioaren bolumena

$C_1$ : stock soluzioa duen kontzentrazioa

$V_2$ : sortu nahi dugun soluzioaren bolumena

$C_2$ : sortu nahi dugun soluzioaren kontzentrazioa

Posible da erabiltze formula hau molaritate kontzentrazioekin eta pisu/bolumen portzentajearekin.

- **Dentsitatea eta kontzentrazioaren arteko erlazioa.** Erreaktiboak erosterakoak, substantzia batzuk likido puruak izaten dira, kontzentrazioaren informaziorik eman gabe, eta bakarrik dentsitatearen datuak ematen digute, adibidez, merkaptoetanola. Kontzentrazioa, kontzentrazio molarraren definizioaren arabera kalkulatu da: substantzia baten molen zenbakia litroko. Litro baten pisua kalkulatu da dentsitatea g/ml bider 1000 biderkatzen, eta molen zenbakia litroko pisu hau zati pisu molekularra gramotan zatikatzen. Adibidez, ur litro baten pisua 1000 gramokoa da, pisu molekularra 18 da, beraz kontzentrazio molarra  $1000/18=55.555$  M.

- **Pipeten erabilera.** Pipetak arazoak sor ditzakete, zehaztasunaren aldetik eta kontaminazioaren aldetik. Pipetaren erabilera zuzena egiteko enboloa presionatu behar da bigarren toperaino, likidoa zurgatu eta botatzeko orduan lehenengo toperaino presionatu behar da. Horrela egiten badugu galerak ekidingo ditugu, batez ere biskositate altuko likidoekin. Puntak ahalik eta gutxien sartu behar dira soluzioetan, kontaminazioak ekiditeko. Pipetekin beti xurgatu behar da oso poliki, likidoa puntan atxikia ez gelditzeko eta pipeta barrura ez sartzeko (pipeta eta enbolo kutsatuz). Oso erreza da zeharkako kontaminazioak edukitzea pipetak gaizki erabiltzeagatik.

- **Erreaktibo kimikoak garbiak gorde behar dira.** Ezin dira sartu beste substantzia kimikoak eduki dituen ontzi edo botila batean. Kontuz espatulekin, beste substantzia batekin kontaktua eduki badu, ezin dugu erabili garbitu barik. Nukleasa edo proteasaren kantitate beherena murrizte-tanpoi batean aste batzuetako lana galarazi dezake.

- **Solidoen garbiketa.** Protokolo desberdinetan, bakterioen DNAREN prezipitazioa etanolaren bidez, a.d, garbiketak gelditzen diren hainbat substantzia kanporatzeko dira, ondorengo teknikan eragozpenak sortuko lituzkeenak. Solidoak garbitzeko modurik errazena hurrengoa da: bolumen berdinarekin 3 garbiketa eginez. Soluzio baten prezipitazioa (pellet) garbitzeko, adibidez 1M gatza, likidoaren gatz-kontzentrazioa 1 M da; garbiketak urarekin egiten baditugu diluitu egingo luke.

- **Pelleten esekidura.** Protokolo askok *pelletaren* esekidura gomendatzen dute zentrifugatu eta gero, *pelletekin* ondorengo tratamenduak egiteko (hala nola bakterioen esekidura liozimorekin tratatzeko). Ez da nahastu behar esekidura disoluzioarekin!!!! Esekiduran, partikulak guztiz bakantzen dira; adibidez bakterioen zelulak esekitzerakoan, ezin dira pikorrak gelditu. Esekitzeko substantzia ez bada apurtzen frikzio indarren bidez, *vortexa* erabili ahal da esekidura lortzeko.

- DNAREN kontzentrazioaren neurketa espektrofotometriaren bidez. Azido nukleikoak argi ultramorea xurgatzen dute, absorbantziaren piko batekin 260 nm-tan. Puntu hau proteinen absorbantzia pikoaren ondoan dago (280 nm). Bi absorbantzia horien neurketa baimentzen du DNAREN kontzentrazioaren neurketa eta laginean aurkitzen diren beste substantzien presentzia. DNA eta RNAREN soluzio puruak  $A_{260} / A_{280}$  erlazioa 1.8 eta 2.0 koak

- 1 U/ml harizpi biko DNA ( $A_{260}$ ): 50  $\mu\text{g/ml}$
- 1 U/ml harizpi bateko DNA edo RNA ( $A_{260}$ ): 40  $\mu\text{g/ml}$
- 1 U/ml oligonukleotido ( $A_{260}$ ): 50  $\mu\text{g/ml}$

## **2. LAN-ARAUAK**

### **Laborategiko segurtasuna:**

Laborategiko oinarrizko segurtasun arauak oso agerikoak dira, eta horien artean honako hauek aurkitzen dira:

- Ezin da jan, edan erre, bizarra moztu, makillatu... lan gunean.
- Laborategian bata bat jantzita eta lotuta eraman behar da
- Ezin da bata erabili laborategitik kanpo
- Eskuak maiz garbitu behar dira, eta bereziki laborategitik irten baino lehen
- Ezin da pipetekin ahoz xurgatu
- Kontuz ibili behar da erreaktiboekin, substantzia kimikoekin, soluzioak, gasak...
- Substantzia arriskutsuak ezagutu behar dira, eta behar den moduan erabili eta gorde
- Disolbatzaileak dagozkien kutxetan edo armairuetan gorde behar dira.
- Ezin da eterra edo antzerako substantziak ohiko hozkailuetan
- Laborategiko beste ikertzaileei abisatu behar zaie substantzia toxikoekin tratatzerakoan
- Laborategia txukuna mantendu behar da eta lan egiteko gunea garbitu behar da laborategitik irten baino lehen. Gauza bakoitzak bere lekua dauka laborategian eta hor ipini behar da erabili eta gero.
- Laborategiko arduradunari abisatu behar zaio gertatzen den istripu biologiko edo kimiko, naiz eta txikia izan.
- Laborategi guztietan segurtasun-gida bat dago eta lanean hasi baino lehen irakurri behar da.

### **Manipulazio genetikoa:**

Prozedura egokiak jarraitu behar dira arazoak ekiditeko.

Manipulazio genetikoko guztiak ondo zehaztuak izan behar dira lan esperimentalarekin hasi baino lehen, eta eskema bat egin behar da suposatzen duen arriskua aztertzeko. Analisi horien arabera, lan baldintzan egokitu behar ditugu.

Segurtasuna 3 faktoretan datza:

- **Eskuratzea:** aldatutako organismoa edo beraien DNAa gorputzean sartzeko eta bizirik irauteko probabilitatea neurtzen du. Gizakiak kolonizatze ahalmena duten bakterioen eskuratze faktorea 1 da (adibidez *Salmonella* eta *E. coli*); aldaera ez kolonizatzaileak (*E. coli* K12, B eta C anduiak,  $10^{-3}$  faktorea daukate, ostalari-bektore ezinduta:  $10^{-6}$  -  $10^{-9}$ ko faktorea; eta genetikoki manipulatuak DNA, infektatzeko ahalmenik gabekoa  $10^{-12}$  ko faktorea.

- **Espresioa:** txertatutako geneak proteinetan espresatzeko probalitatea neurtzen du. Aurretik ezezaguna izanik arriskua maximoa izango balitz konputatzen da.
  - **Kaltea:** espresatutako proteinak egin ahal duen kaltea neurtzen du.
- Aurreko 3 baloreak elkarrekin biderkatuta ematen dute arrisku balorea seguritate biologikoen neurriak erabakitzen duena.

Biologia Molekularrari buruzko arau espezifikoak:

Aipatutako arauei hurrengo hauek gehi behar zaizkie:

- Lan guneak banatu behar dira zeharkako kontaminazioak eta laginen degradazioa ekiditeko: materialaren prestakuntza, azido nukleikoak erauzteko gunea, amplifikazioak egiteko, elektroforesiak egiteko...
  - Bata desberdin bat erabili behar da eta eskularruak maiz aldatu behar dira.
  - Laginaren DNA edo RNA degradatzen dituzten nukleasen ekintza ekidin behar da. Horretarako disoluzioak eta erabili behar den materiala autoklabatu behar da.
- Material esterila eta esterila ez dagoena elkarrekin ez da gorde behar. Lan egin behar da gune garbi batean edo fluxu laminarreko kabinan. Azido nukleiko edo entzimak hozkailutik ateratzerakoan izotzean mantendu behar dira.
- Ahal bada gomendagarria da gordetzea erreaktibo espezifikoak (entzimak. Abiarazleak, nukleotidoak...) hozkailu desberdin batean.
  - Murrizte entzimak kontu handiz manipulatu behar dira, hala nola. *Taq* polimerasak, oso erraz inaktibatzen direlako giro-tenperaturan. Hozkailutik kanpo ahalik eta denbora gutxien eduki behar dira, eta beti izotzean sartuta.
  - Esperimentu guztietan kontrol positibo eta negatiboak erabili behar dira, horrela emaitzak fidagarriak izateko

### 3. LABORATEGIKO ESKULIBURUAK:

Bibliografia atalean eskuliburu oso baliagarriak aurkituko dituzu behar dituzun teknikak burutzeko eta horien aplikazioak. Hala ere, laborategian eguneroko lanerako hurrengo gida gomendatzen dizugu, non materiak prestatzeko,oinarrizko teknika guztien protokoloak... aurkituko duzun: Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Joseph Sambrook and David W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. <http://www.MolecularCloning.com>