

APÈNDIX

APÈNDIX

A. Medis de cultiu i antibiòtics

Medis de cultiu

El medi més comú utilitzat per fer créixer bacteris d'*E. coli* és l'LB (Luria Bertrani) (vegeu taula A.1). Una vegada preparat el medi, s'esterilitza mitjançant calor humida a l'autoclau (120 °C durant 30 minuts). En el cas d'LB-agar, si es vol tenir medi que contingui antibiòtic, s'ha de deixar refredar fins a 55 °C (que no cremi) abans d'afegir-hi l'antibiòtic, i posteriorment s'escampa en càpsules de Petri. El medi NZY+Broth ha de portar uns suplementes que s'afegeixen just abans d'utilitzar-lo i que han de ser estèrils. El clorur magnèsic i el sulfat magnèsic s'esterilitzen a l'autoclau i la glucosa s'esterilitza per filtració. El medi NZY+Broth s'utilitza per regenerar cèl·lules *Epicurian coli* XL1-blue després de la transformació (vegeu apartat II-4.3).

Taula A.1 Medis de cultiu per a *E. coli*.

LB	LB-agar	NZY+Broth
<u>Per a 1 L</u> 10 g triptona 5 g extracte de llevat 10 g NaCl	<u>Per a 500 ml (40 càpsules)</u> 5 g triptona 2,5 g extracte de llevat 5 g NaCl 15 g agar	<u>Per a 1 L</u> 10 g NZ amina 5 g extracte de llevat 5 g NaCl Suplementes per afegir just abans d'utilitzar: 12,5 ml MgCl ₂ 1 M 12,5 ml MgSO ₄ 1 M 20 ml glucosa 20 %

Antibiòtics

Un dels antibiòtics més utilitzats en el cultiu i selecció de bacteris en les tècniques de DNA recombinant és l'ampicil·lina. Normalment es treballa amb vectors que confereixen resistència a aquest antibiòtic, i això n'assegura la propagació, ja que codifiquen β -lactamases que hidrolitzen l'ampicil·lina. Al llarg del temps, els nivells d'ampicil·lina aniran disminuint i les cèl·lules que no hagin incorporat el plasmidi (amb la resistència a l'antibiòtic) podran sobreviure i fins i tot desplaçar les que tenen el plasmidi.

Aquest fenomen també es pot observar sobre càpsules, on apareixen colònies satèl·lit petites (sensibles a l'antibiòtic) al voltant d'una colònia més gran (resistent). Per evitar el sobrecreixement de bacteris sense el plasmidi es recomana no arribar a la saturació del cultiu. Com a alternativa es pot utilitzar carbenicil·lina, que és més estable que l'ampicil·lina. A la taula A.2 es mostra la preparació d'estocs d'antibiòtics, segons Sambrook et al. (1989).

Taula A.2 Preparació d'estocs d'antibiòtics. Els estocs es preparen a una concentració 1.000 vegades superior a la de treball (l'estoc de tetraciclina es prepara a 100 vegades). Tots els antibiòtics s'han d'esterilitzar per filtració en filtres de 0,2 µm i es guarden congelats a -20 °C.

ANTIBIÒTICS		
<u>ampicil·lina</u>	<u>carbenicil·lina</u>	<u>cloramfenicol</u>
50 mg/ml en H ₂ O	50 mg/ml en H ₂ O	25 mg/ml en EtOH

B. Inhibidors de proteases

Per evitar la degradació de la proteïna recombinant per proteases bacterianes, durant el pocés d'extracció de la proteïna recombinant es treballa amb tampons que contenen inhibidors de proteases. Aquests inhibidors es poden preparar i afegir individualment (vegeu taula A.3) (Sambrook et al., 1989), o bé es poden afegir tots junts en forma de píndola (Complete, Roche).

Taula A.3 Preparació d'estocs d'inhibidors de proteases. L'aprotinina, la pepstatina A i la leupeptina s'utilitzen a una concentració d'1 µg/ml, i el PMSF, a 1 mM. Els inhibidors es guarden a -20 °C.

INHIBIDORS DE PROTEASES	
Aprotinina	1 mg/ml (en Hepes 10 mM pH 8)
Pepstatina A	0,5 mg/ml (en EtOH 96°)
Leupeptina	0,5 mg/ml (en H ₂ O)
PMSF	100 mM (en isopropanol)

C. Nomenclatura dels aminoàcids**Taula A.4 Nomenclatura dels aminoàcids.**

Nomenclatura dels aminoàcids		
A	Ala	alanina
C	Cys	cisteïna
D	Asp	àcid aspàrtic
E	Glu	àcid glutàmic
F	Phe	fenilalanina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptòfan
Y	Tyr	tirosina

D. Desplaçaments químics dels aminoàcids (RMN)

Taula A.5 Desplaçaments químics per ¹H. Desplaçaments químics per ¹H (en plegament a l'atzar o *random coil*) expressats en parts per milió (ppm). Dades segons Bundi i Wütrich (1979).

Residu	NH	αH	βH	altres
Gly	8.39	3.97	.	
Ala	8.25	4.35	1.39	
Val	8.44	4.18	2.13	γCH ₃ 0.97, 0.94
Ile	8.19	4.23	1.90	γCH ₂ 1.48, 1.19 γCH ₃ 0.95 δCH ₃ 0.89
Leu	8.42	4.38	1.65,1.65	γH 1.64 δCH ₃ 0.94, 0.90
Pro ^b		4.44	2.28,2.02	γCH ₂ 2.03, 2.03 δCH ₂ 3.68, 3.65
Ser	8.38	4.50	3.88,3.88	
Thr	8.24	4.35	4.22	γCH ₃ 1.23
Asp	8.41	4.76	2.84,2.75	
Glu	8.37	4.29	2.09,1.97	γCH ₂ 2.31, 2.28
Lys	8.41	4.36	1.85,1.76	γCH ₂ 1.45, 1.45 δCH ₂ 1.70, 1.70 εCH ₂ 3.02, 3.02 εNH ₃ ⁺ 7.52
Arg	8.27	4.38	1.89,1.79	γCH ₂ 1.70, 1.70 δCH ₂ 3.32, 3.32 NH 7.17, 6.62
Asn	8.75	4.75	2.83,2.75	γNH ₂ 7.59, 6.91
Gln	8.41	4.37	2.13,2.01	γCH ₂ 2.38, 2.38 δNH ₂ 6.87, 7.59
Met	8.42	4.52	2.15,2.01	γCH ₂ 2.64, 2.64 εCH ₃ 2.13
Cys	8.31	4.69	3.28,2.96	
Trp	8.09	4.70	3.32,3.19	2H 7.24 4H 7.65 5H 7.17 6H 7.24 7H 7.50 NH 10.22
Phe	8.23	4.66	3.22,2.99	2,6H 7.30 3,5H 7.39 4H 7.34
Tyr	8.18	4.60	3.13,2.92	2,6H 7.15 3,5H 6.86
His	8.41	4.63	3.26,3.20	2H 8.12 4H 7.14

^a Data for the nonterminal residues X in tetrapeptides GGXA, pH 7.0, 35°C [from Bundi and Wütrich (1979a), except that more precise data were obtained for Leu, Pro, Lys, Arg, Met, and Phe using new measurements at 500 MHz].
^b Data for *trans*-Pro.