

MARIA PRISECARU
IONUȚ STOICA
DUMITRA RĂDUCANU

BIOLOGIE CELULARĂ
Metode de laborator

Editura „Alma Mater” Bacău

2015

CUPRINS

INTRODUCERE	7
Capitolul 1. Metode uzuale de investigație utilizate în biologia celulară	9
1.1. Ultracentrifugarea diferențială	9
1.2. Metode citochimice (histochimice)	12
1.3. Metode citofizice	15
1.4. Autohistoradiografia	19
1.5. Electronmicroscopia	19
1.6. Culturile de celule și țesuturi	21
Capitolul 2. Tehnica microscopică. Preparate microscopice	30
2.1. Microscopul fonic	31
2.1.1. Microscopul fonic obișnuit	31
2.1.2. Microscopia prin fluorescență	36
2.1.3. Microscopia în contrast de fază	40
2.1.4. Microscopia în lumina polarizată	42
2.2. Microscopia electronică	45
2.3. Metode pentru examenul citologic în microscopia fonică	47
2.3.1. Metoda efectuării secțiunilor fine	48
2.3.1.1. Recoltarea	48
2.3.1.2. Fixarea	49
2.3.1.3. Includerea în parafină	59
2.3.1.4. Deshidratarea	60
2.3.1.5. Clarificarea	61
2.3.1.6. Impregnarea cu parafină	61
2.3.1.7. Includerea propriu-zisă	61
2.3.1.8. Secționarea	64
2.3.1.9. Etalarea și lipirea secțiunilor pe lamă	66
2.3.2. Metoda etalării materialului biologic în monostrat	68
Capitolul 3. Coloranții și mecanismele colorării	76
3.1. Coloranții. Generalități.	76
3.2. Clasificarea coloranților	77
3.3. Mecanismele colorării	77

3.4. Principalele metode de colorare	78
3.4.1. Colorarea secțiunilor la parafină	79
3.4.2. Tehnica colorării cu hemalaun-eozină (HE)	80
3.4.3. Colorații nucleare	83
3.4.4. Colorații citoplasmatică	85
3.4.5. Colorațiile vitale	88
Capitolul 4. Lucrări practice de laborator	94
LABORATOR 1 Izolarea membranelor plasmatică eritrocitare prin centrifugare	94
LABORATOR 2 Izolarea și purificarea nucleilor hepatici într-un mediu de suspendare cu acid citric	96
LABORATOR 3 Izolarea și purificarea ADN-ului nuclear	98
LABORATOR 4 Izolarea mitocondriilor din ficat	100
LABORATOR 5 Colorația Feulgen cu hidroliză acidă pentru evidențierea ADN	103
LABORATOR 6 Colorația cu verde-metil și pironină pentru evidențierea selectivă a acizilor nucleici	106
LABORATOR 7 Colorarea proteinelor cu albastru de bromfenol mercuric	109
LABORATOR 8 Evidențierea glicogenului prin reacția PAS	111
LABORATOR 9 Evidențierea histochimică a lipidelor	114
LABORATOR 10 Evidențierea fierului feric (Fe ³⁺)	116
LABORATOR 11 Evidențierea peroxidazelor	118
LABORATOR 12 Evidențierea fosfatazei acide	120
LABORATOR 13 Evidențierea fosfatazei alcaline	123
LABORATOR 14 Determinarea grupelor sanguine ABO	128
LABORATOR 15 Identificarea acizilor nucleici cu acridin-orange	134
LABORATOR 16 Dozarea acizilor nucleici prin metoda Spirin	135
LABORATOR 17 Separarea electroforetică a proteinelor	138
LABORATOR 18 Separarea electroforetică a proteinelor din membrana plasmatică eritrocitară	143
LABORATOR 19 Cromatografia de partiție (descendentă)	147
LABORATOR 20 Cromatografia de absorbție (prin schimbători de ioni) pe bază de dextran (Sephadex)	152
LABORATOR 21 Separarea pigmentilor clorofilieni prin cromatografie pe hârtie	156
LABORATOR 22 Izolarea hemoglobinei prin centrifugare	159
LABORATOR 23 Evidențierea histologică a histonelor și în	163

	general a proteinelor bazice prin tehnica de colorare cu verde intens FCF	
LABORATOR 24	Localizarea intracelulară a calciului (tehnica de colorare cu roșu de alizarină S)	166
LABORATOR 25	Determinarea activității glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G-6PDH)	168
LABORATOR 26	Determinarea activității lactat-dehidrogenazei (LDH)	169
LABORATOR 27	Culturile celulare – modele experimentale moderne	170
LABORATOR 28	Protocol pentru inducerea și creșterea calusului la <i>Daucus carota</i> L.	176
LABORATOR 29	Protocol pentru inducerea și creșterea calusului la <i>Nicotiana tabacum</i> L.	179
LABORATOR 30	Protocol pentru obținerea unei suspensii celulare din calus de <i>Daucus carota</i> L.	181
LABORATOR 31	Protocol pentru izolarea protoplaștilor din suspensii derivate din culturi de <i>Nicotiana tabacum</i> var. <i>bright yellow</i>	183
LABORATOR 32	Determinarea numărului de celule dintr-o suspensie utilizând hemocitometrul	185
LABORATOR 33	Protocol pentru cultura și regenerarea protoplaștilor la plante	192
LABORATOR 34	Protocol pentru obținerea de plante haploide la <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> prin androgeneză experimentală	195
LABORATOR 35	Protocol pentru obținerea plantelor haploide prin ginogeneză experimentală la <i>Triticum aestivum</i> L.	198
LABORATOR 36	Metode de hibridare celulară	201
LABORATOR 37	Tehnica culturilor de celule și țesuturi animale	206
Capitolul 5. Metode moderne de investigație și aplicațiile lor		212
5.1. Hibridarea		212
5.1.1. Principiu		213
5.1.2. Denaturarea		213
5.1.3. Renaturarea (annealing/reannealing)		214
5.1.4. Factorul stringent		214
5.1.5. Tipuri de hibridări		215
5.1.6. Hibridizare <i>in situ</i>		220

5.1.7. Importanța reacției de hibridare pentru medicină și biologie	222
5.2. Sonde genetice	223
5.3. Clonarea ADN – ului	232
5.4. Reacția de polimerizare în lanț (pcr)	235
5.5. Secvențierea ADN- ului	240
5.6. Fingerprinting genomic (amprente de ADN)	242
BIBLIOGRAFIE	245