



Geboeid door Wiskunde en Wetenschappen

Biologie

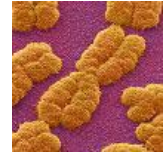
Het maken van een DNA-profiel

Jos Punie - Lieve Bernaerts - Patrick Reygel

© 2004, LUC Diepenbeek (België), Geboeid door Wiskunde en Wetenschappen

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Het is toegelaten voor leerkrachten om deze tekst te reproduceren voor gebruik in de klas.



Voorwoord

Met de steun van de Vlaamse Regering ontwikkelt het LUC sinds mei 2001 het project "Geboeid door Wiskunde en Wetenschappen", dat kadert in het actieplan Wetenschapsinformatie en Innovatie. Het project is een aanvulling op de activiteiten van het Scholennetwerk van de faculteit Wetenschappen van het LUC.

Bedoeling van dit project is de interesse voor wiskunde en Wetenschappen in het hoger onderwijs te stimuleren bij de leerlingen. Dit willen we doen door interactieve leerlingenactiviteiten met boeiende toepassingen van actuele maatschappelijke topics in het wetenschappelijk onderzoek aan te bieden, die tegelijk passen in het leerplan van de derde graad secundair onderwijs.

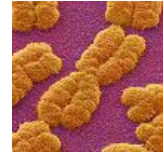
Anderzijds willen we met dit project ook de contacten tussen leerkrachten wiskunde en wetenschappen intensifiëren. Daarom werken niet alleen LUC-stafleden aan dit project, maar zijn ook leerkrachten uit verschillende scholen in de regio er actief bij betrokken.

Prof. dr. H. Callaert

Voorzitter van het scholennetwerk van de Faculteit Wetenschappen, LUC.

Het project "Geboeid door Wiskunde en Wetenschappen" is een actie die wordt ondersteund binnen het actieplan Wetenschapsinformatie en Innovatie. Dit actieplan is een initiatief van Dirk Van Mechelen, Vlaams minister van Financiën en Begroting, Innovatie, Media en Ruimtelijke Ordening, tevens bevoegd voor Wetenschapsbeleid, in overleg met Marleen Vanderpoorten, Vlaams minister van Onderwijs en Vorming.

Het project "Geboeid door Wiskunde en Wetenschappen" wordt, in opdracht van de Vlaamse regering, gerealiseerd door de administratie Wetenschap en Innovatie van het ministerie van de Vlaamse Gemeenschap en door het Limburgs Universitair Centrum.



Inleiding

Binnen het project “Geboeid door Wiskunde en Wetenschappen” tracht de vakgroep biologie via drie verschillende initiatieven de interesse van de leerlingen van de derde graad ASO aan te wakkeren.

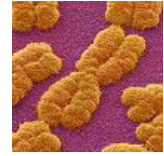
- Samen met de collega’s van de andere vakgroepen stellen wij een aantal ICT-practica op punt. Hierbij laten wij leerlingen zelf experimentele gegevens registreren met behulp van sensoren, gekoppeld aan een grafische rekenmachine.
- Het tweede initiatief “Voeding” is werkelijk interdisciplinair. Via zelfstudiemodules worden topics uit de verschillende wetenschappen gecentreerd rond de context “Voeding en gezondheid”.
- Tenslotte werd een practicumconcept met uitvoerige achtergrondinformatie rond DNA-technologie uitgewerkt. Tijdens de looptijd van het project kunnen leerlingen van het zesde jaar onder leiding van hun leerkracht het practicum uitvoeren in LUC-laboratoria. De leerkrachten kunnen vooraf via een workshop kennismaken met het practicumconcept.

Deze bundel omvat het practicum en het omkaderend lessenpakket voor dit laatste initiatief.

Tijdens een practicum in het LUC slagen de leerlingen erin om met behulp van courante knipenzymen, relatief ongevaarlijke chemicaliën en eenvoudige gel-elektroforese een herkenbaar DNA-profiel van de lambdafaag te verwezenlijken.

Maar er is meer. Het practicum wordt ook gekaderd in een lessenpakket dat de leerkracht in zijn eigen school kan gebruiken. Dit lessenpakket bestaat uit de volgende delen.

- Een voorbereidende les brengt via werkbladen begrippen als PCR, restrictie-enzymen, gelektroforese... op een praktische manier aan.
- Met behulp van de volledige practicumhandleiding kan de leraar in school de labosessie aan het LUC terdege voorbereiden.
- Een PC-simulatie, die gebruik maakt van de zoekfunctie in een tekstverwerker, resulteert in een theoretische voorspelling van het DNA-profiel van de lambdafaag. Leraren die met hun klas voor het practicum niet naar het LUC kunnen komen vinden in deze ICT-module een mogelijk alternatief.
- Als nabespreking van het practicum kan de laatste module dienen. Deze leestekst bespreekt een aantal toepassingsgebieden van DNA-profilering aan de hand van concrete voorbeelden.



Het DNA-practicum en de omkaderende lesmodules werden in het schooljaar 2001-2002 op punt gezet in samenwerking met een aantal leerkrachten biologie van de derde graad ASO. Graag willen wij deze collega's bedanken. Zij vormen de kern van ons scholennetwerk biologie.

Heb jij eveneens zin om mee te werken in dit netwerk of heb je zelf ideeën om het biologieonderwijs in de derde graad nog boeiender te maken, dan nodigen wij je graag uit om je bij ons scholennetwerk aan te sluiten. Ga zeker eens een kijkje nemen op www.luc.ac.be/scholennetwerk . Geef ons via deze website een seintje zodat wij je in de toekomst kunnen uitnodigen voor samenkomsten van ons netwerk.

Jos Punie
Lieve Bernaerts
Patrick Reygel

Simulatie van een DNA-vaderschapstest

Concreet voorbeeld

(Art. Lode Ramaekers Het belang van Limburg do. 24/01/02)

Manu (fictieve naam) wil zekerheid, klaarheid over het biologische vaderschap van het kind van zijn vrouw.

"Mijn vrouw is vier jaar jonger dan ik. We kennen mekaar bijna 25 jaar: 10 jaar gevrijd, 14 jaar getrouwd (geweest, zeg maar). In de eerste helft van vorig jaar leerde ze een vriend kennen en ze had met die man een 'slippertje'. Van die éné keer werd ze zwanger, zei ze zelf, achteraf. Dat bleek - voor haar - al heel gauw, maar aanvankelijk wist ik daar niks van. We verlangden allebei naar een kleintje en we deden ons best om er eentje te krijgen. We zijn nog samen met vakantie geweest, maar 14 dagen daarna heeft zij mij verlaten. Ze is gaan samenwonen met die 'vriend' die haar naar eigen zeggen zwanger gemaakt heeft, daar is ze voor 100 procent zeker van.

Ik blijf met twijfels zitten: in die periode hadden we nog betrekkingen met mekaar. De gynaecoloog mag dan wel zeggen dat de bevruchting einde april plaats gehad heeft, juist in de periode van dat slippertje, maar gynaecologen zitten er ook wel eens naast en ik sluit niet uit dat ik de biologische vader ben. Hoe dan ook, we zijn een scheidingsprocedure met onderlinge toestemming gestart en begin januari zijn we voor de eerste keer naar de rechtbank geweest. Die procedure is nu weer opgeschort, want ik wil eerst en vooral die kwestie met dat kind van de baan. Als ik de vader blijk te zijn dan wil ik mijn rechten - hoederecht, bezoekrecht en zo - en ik wil er ook voor betalen. Is de huidige vriend van mijn vrouw de biologische vader, dan scheiden we toch gewoon en moet ze maar roeien met de riemen van nu. Dan hoeft het kind mijn naam niet (meer) te dragen en draai ik ook niet op voor de kosten. De jongste tijd zit ik mij vragen te stellen: stel dat ik mij te pletter rijd, dan gaat mijn hebben en houden naar een kind dat misschien helemaal niet van mij is. Zinloos toch! Daarom wil ik klaarheid door zo'n test "

DNA-polymorfisme als principe achter de genetische "vingerafdruk"

De genetische informatie in de kern van elke cel van één individu is volledig identiek. Vertrekkend bij de bevruchte eicel werd immers bij elke celdeling het volledige DNA van de chromosomen gerepliceerd.

Daarentegen is de genetische variatie tussen individuen zeer groot. De drijvende kracht achter deze variatie zijn spontane mutaties. Indien deze mutaties ontstaan in geslachtscellen dan worden deze veranderingen tijdens de voortplanting op de volgende generaties overgebracht. Zo ontstaan bij elke mutatie twee varianten in de populatie van het desbetreffende stukje DNA. Zulke variatie in DNA-sequenties noemt men DNA-polymorfismen.

Men kan DNA indelen in coderend DNA en niet-coderend DNA. Het coderende DNA omvat de genen, die instaan voor de goede synthese van lichaamseiwitten en enzymen. Een mutatie in zo een gen kan makkelijk leiden tot inbouw van een verkeerd aminozuur en dus tot een abnormale structuur van het eiwit. Vele van dergelijke mutanten zijn niet levensvatbaar. Mutaties in niet-coderende gedeelten van het DNA vormen echter geen bedreiging voor de levensvatbaarheid of het vermogen tot voortplanten. Het is dan ook niet verwonderlijk dat de variatie in het niet-coderende DNA 10 keer groter is dan in het coderend deel. Omdat door geslachtelijke voortplanting bij elke generatie terug een vermenging optreedt van het DNA van twee individuen is er in de loop van de menselijke geschiedenis een eindeloze genetische verscheidenheid tot stand gekomen. Enkel eeneiige tweelingen hebben een volledige identieke volgorde van basenparen in hun DNA. De DNA-frequentie is voor elk individu net zo uniek als zijn vingerafdruk. Het komt er dus op neer deze variatie op de ene of ander manier zichtbaar te maken.

Niet gans het genoom is nodig voor een genetische vingerafdruk

Ongeveer 40 procent van het niet-coderende DNA bestaat uit zogenaamd repetitief DNA. Dat zijn korte DNA-sequenties van maximaal 60 basenparen lang die ettelijke keren herhaald worden. Zeer korte repetitieve sequenties (2 tot 10) worden STR's (Short Tandem Repeats) genoemd. Als men de zo een repetitieve zone onderzoekt en vergelijkt bij verschillende individuen dan blijkt het aantal herhalingen zeer sterk te variëren. Deze STR-zones blijken immers erg mutatiegevoelig te zijn en dat verklaart de grote variatie die in de loop der tijden ontstaan is in de populatie. De verschillende varianten die zo ontstaan zijn noemt men ook VNTR's (Various Number of Tandem Repeats). Dankzij deze grote variatie vormen de VNTR-loci de aangewezen plaatsen om individuele verschillen te herkennen. Bij het maken van een genetische vingerafdruk moeten maar enkele van dergelijke zones onderzocht worden om een kenmerkend patroon voor een individu te bekomen.

De PCR-techniek

Simulatie

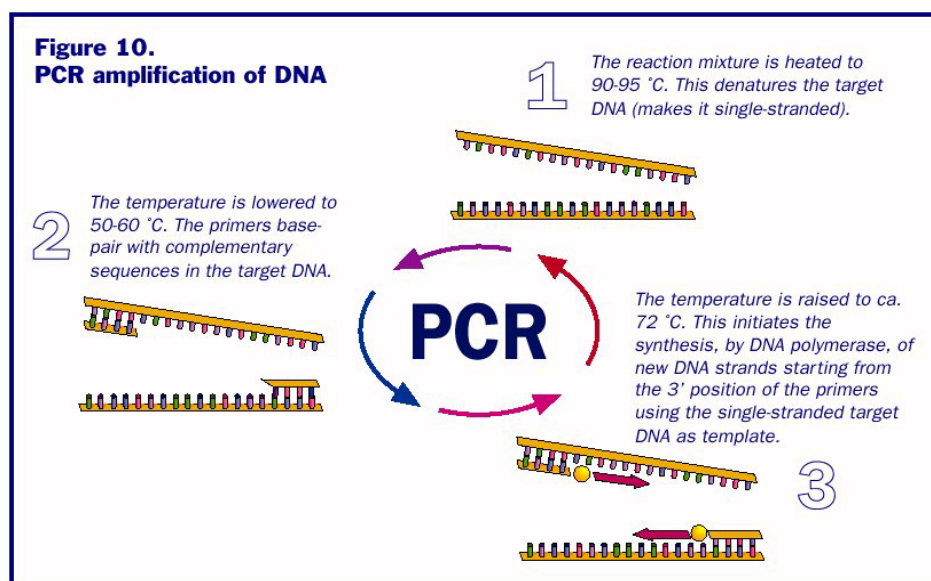
Elk groepje krijgt telkens 4 keer 2 DNA-sequenties (telkens 2 sequenties voor de moeder, het kind, de echtgenoot en de vriend). Om deze sequenties aan elke groep te kunnen uitdelen heeft de leerkracht het oorspronkelijke werkblad moeten fotokopiëren.

Ook in werkelijkheid moeten de interessante repetitieve zones uit het DNA vermenigvuldigd worden. Bij forensisch (= gerechtelijk) DNA-onderzoek volstaan enkele cellen uit speeksel op een sigarettenpeuk of uit wortelmateriaal van één enkele haar. Voor vaderschapstesten neemt men wat schraapsel van de wang. De methode om van dit kleine beetje DNA voldoende testmateriaal te bekomen heet de **PCR-techniek**.

De PCR-techniek of Polymerase Chain Reaction berust eigenlijk op de werking van een enzym dat wij kennen van de replicatie van DNA: het DNA-polymerase. Dit enzym plaatst tijdens de replicatie tegenover elke base van een geopende enkelstrengige DNA-keten de complementaire base. Vanaf 1988 kon men dit enzym in een werkbare vorm afzonderen, zodat replicatie in vitro (= "in glas" = buiten de levende cel) mogelijk werd. Daarna werd dit proces zodanig geautomatiseerd, dat er in een herhaalde cyclus van drie stappen telkens opnieuw een verdubbeling van het gewenste DNA plaatsgrijpt.

- Eerste stap Het dubbelstrengig DNA wordt door de temperatuur op te drijven tot 90-95 °C gescheiden in twee complementaire, enkele strengen.
- Tweede stap Er worden zogenaamde 'primers' toegevoegd. Dit zijn 2 korte DNA'stukjes (20-30 basen lang) die complementair zijn met een sequentie die zich net voor en achter de te onderzoeken STR-regio's bevinden. Dan wordt afgekoeld tot 50-60°C. Bij deze temperatuur binden de primers zich op de complementaire sequenties van de aanwezige strengen.
- Derde stap Door de temperatuur terug te verhogen tot 72°C begint het polymerase een complementaire streng aan te bouwen, vertrekkend van de aanwezige primers.

Deze drie stappen worden zo een 25 tot 35 keer herhaald totdat men voldoende DNA - onderzoeksmateriaal bekomen heeft.



Deze figuur komt uit Unit 2: DNA Profiling van EIBE <http://www.rdg.ac.uk/EIBE/home.html>

De werking van restrictie-enzymen

Simulatie

Knip eerst voor de vier personen de twee dubbelstrengen (behorende tot 2 homologe chromosomen) uit.

Zoek in de bovenste van elke DNA-sequentie de voorkomende GGCC-tandems en arceer of onderlijn ze.

Knip daarna de dubbelstrengen op de gemerkte plaatsen door tussen de tweede G en de eerste C. Knip van voor en van achter ook de 5'- en 3'-karakters weg.

Op deze manier werken ook de restrictie-enzymen.

Je hebt nu de werking van een restrictie-enzym gesimuleerd. Restrictie-enzymen vormen verweermiddelen van bacteriën tegen binnendringende virussen. Deze enzymen kappen het virale DNA in stukjes zodat het onschadelijk gemaakt wordt. Restrictie-enzymen zoeken naar een specifieke sequentie in het DNA en breken binnen die frequentie het DNA doormidden.

Er zijn vele restrictie-enzymen bekend, elk met hun eigen herkenningssequentie en knippatroon. Dit zijn de meest bekende en de meest gebruikte:

EcoRI - restriction site GAATTC na de G

BamHI - restriction site GGATCC na de eerste G

HindIII - restriction site AAGCTT na de eerste A

HaellI - restriction site GGCC na de tweede G

De eerste cursiefgedrukte letters verwijzen naar de bacteriesoort waarin het enzym aangetroffen wordt.

Opmerkelijk is dat de meeste restrictie-enzymen een palindroom als herkenningssequentie hebben. (De 3'-5'-sequentie van rechts naar links is gelijk aan de 5'-3'-sequentie van links naar rechts)

5'-...GAATTC...-3'
3'-...CTTAAG...-5'

5'-...GGCC...-3'
3'-...CCGG...-5'

5'-...AAGCTT...-3'
3'-...TTCGAA...-5'

Door restrictie-enzymen te gebruiken wordt het DNA dat via PCR-techniek bekomen was in welbepaalde fragmenten gekapt. Door het voorkomen van de verschillen in het aantal STR's zal de lengte van die fragmenten echter variëren van individu tot individu. Bij het kind zal voor elk fragment echter een even lang fragment aangetroffen worden bij één van zijn twee ouders.

Gelelektroforese

Simulatie

Voor elk individu vind je ook een werkblad met een rooster.

Rangschik nu per individu de bekomen fragmenten **van klein naar groot**.

In werkelijkheid worden de DNA-fragmenten ook op die manier gerangschikt door **gelelektroforese**. Schrijf naast elk fragment de lengte in basenparen.

Door het gebruik van restrictie-enzymen is het DNA nu verdeeld in fragmenten van verschillende lengte. Door voor elk individu nu de stukjes per lengte te rangschikken kan gekeken worden welke fragmenten bij het kind overeen stemmen met fragmenten bij de moeder en welke afkomstig kunnen zijn van één van de twee potentiële vaders. Bij forensisch onderzoek en bij vaderschapsbepaling gebruikt men daarvoor de techniek van gelelektroforese. Men maakt een gel en in die gel brengt men sleuven aan. Na inwerking van de restrictie-enzymen brengt men het DNA van elk individu over in één van de sleuven. Er wordt ook een referentiestaal (bestaande uit DNA-fragmenten van gekende lengte) aangebracht in een andere sleuf. Dan wordt de gel in een elektrisch veld gebracht. Door de fosfaatgroepen in het DNA zijn de fragmenten negatief geladen. Zij zullen dus beginnen te migreren naar de positieve pool. Grote fragmenten worden echter sterker gehinderd door de gel dan kleine fragmenten. De kleinste fragmenten migreren dus sneller en zo worden de door restrictie bekomen DNA-fragmenten mooi gesorteerd volgens hun lengte. Men moet dan enkel de fragmenten nog zichtbaar maken. Oorspronkelijk gebeurde dat met radioactieve merkers. In de moderne techniek brengt een computergestuurde laserstraal de banden op een scherm. (Tijdens het practicum zullen wij echter een kleurstof gebruiken).

Wie is nu de vader?

Simulatie

Vergelijk eerst het patroon van het kind met dat van de moeder.

Elimineer nu de fragmenten die beiden gemeenschappelijk hebben.

Zoek daarna bij welke van de twee potentiële vaders de overblijvende strookjes van het kind voorkomen.

Wat is je besluit?

Moeder

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	

Kind

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	

Echtgenoot

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	

Vriend

lengte	1	2	3	4	5	6	lengte
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
1-10							1-10
11-20							11-20
21-30							21-30
31-40							31-40
41-50							41-50
	1	2	3	4	5	6	
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	

Practicum: het maken van een DNA-profiel

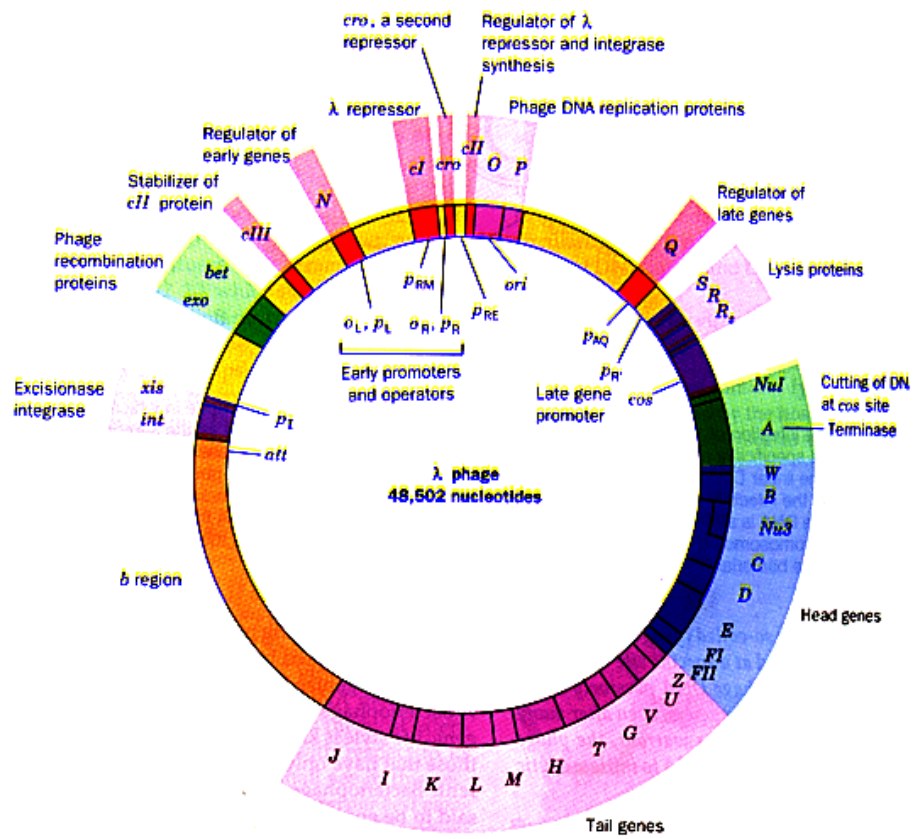
(Met dank aan Jo Bloemen voor zijn basisversie van dit practicum en aan Brigitte Vanacken voor de technische uitwerking)

Achtergrondinformatie

Met welk genoom wordt gewerkt tijdens dit practicum?

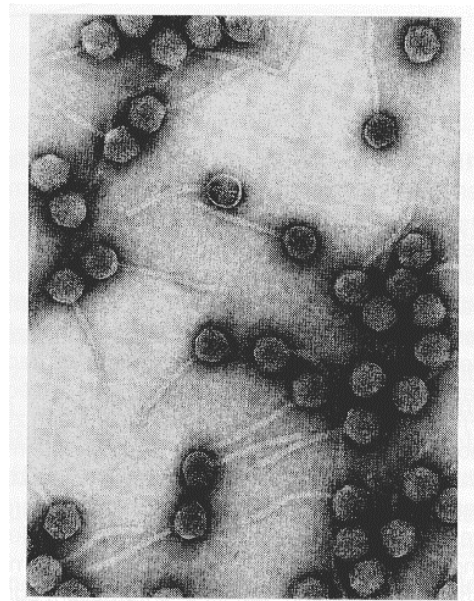
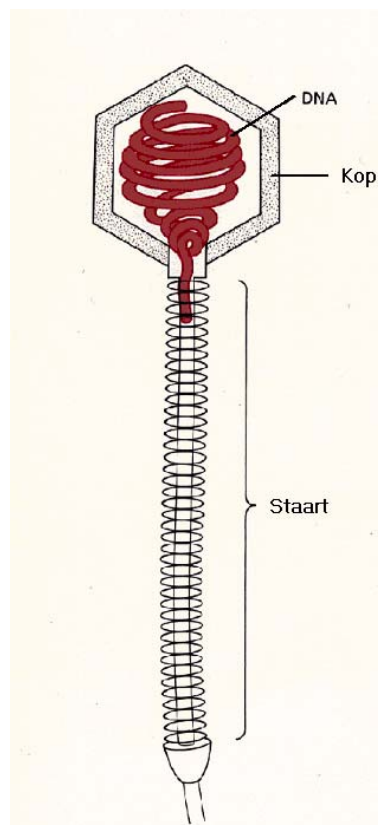
Wij gaan tijdens deze praktische sessie werken met het genoom van de λ -faag. Dit bestaat uit een dubbelstrengige DNA-helix in circulaire vorm, met 48.502 basenparen.

Een schematische voorstelling van de genetische en moleculaire map van de λ -faag wordt hieronder weergegeven.



Wat is een faag?

Een bacteriofaag, ook vaak kortweg faag genoemd, is een type virus dat specifiek bacteriën aantast en deze meestal ook vernietigt. Virussen bestaan uit een eiwitmantel omheen een DNA- of RNA-streng. Wanneer we de algemene vorm van de eiwitmantel bekijken, komen er bij de bacteriofagen meestal twee delen terug: de kop en de staart.



e.m.- foto van λ -faag

Fagen kunnen zich niet zelf vermenigvuldigen en zijn voor hun voortplanting afhankelijk van bacteriën. Hiervoor hechten ze zich aan de celwand van de bacterie vast met behulp van hun staart. De staart heeft de vorm van een holle koker die samentrekt om de inhoud van de kop, het genetische materiaal (DNA of RNA), te injecteren in een bacterie. De bacteriële cel wordt hierdoor omgevormd tot een fabriekje dat nieuwe virussen produceert. Nadat de faag zich door de bacterie heeft laten kopiëren, barst de bacteriecel uit elkaar, waardoor grote aantallen nieuwe kopieën van de bacteriofaag vrijkomen.

Eén van de best bestudeerde fagen is de faag lambda, een virus dat *E. coli* infecteert. De kop is 64 nm in diameter en de staart is 150 nm lang.

Welke restrictie-enzymen gebruiken we?

Er zijn een groot aantal knipenzymen gekend, die het DNA dwars doorknippen op de voor dat enzym specifieke "herkenningsplaats" of "knipplaats". Deze

enzymen komen uit bacteriën. Daar hebben ze de functie om vreemd DNA, bijvoorbeeld van een aanvallend virus, onschadelijk te maken.

In dit practicum wordt bijvoorbeeld gewerkt met het enzym *EcoRI*. Dit is het eerste enzym (I) dat uit de stam R van de bacterie *Escherichia coli* geïsoleerd werd. Dit enzym knipt het DNA op plaatsen waar de basensequentie G I AATTC (of CTAA I G in de complementaire streng) voorkomt. Op de plaats van de verticale streep wordt geknipt. Enkel het virale DNA wordt geknipt. In het eigen (bacteriële) DNA zit immers een soort van afscherming tegen dit knipenzym. De *EcoRI*-herkenningssequentie is in het λ -DNA aanwezig op 5 verschillende plaatsen. Na inwerking van dit enzym op het λ -DNA ontstaan er dus 6 verschillende DNA-fragmenten.

Een tweede enzym waarvan gebruik gemaakt wordt tijdens deze sessie is het *HindIII*-enzym. *Hind*-enzymes zijn afkomstig van de bacterie *Haemophilus influenza*. Vooral de restrictie-enzymen type II en type III van deze bacterie worden frequent gebruikt. Deze 2 verschillende enzymen zijn werkzaam tegen 2 diverse virussen. Ze hebben ook totaal andere knipfrequenties. Tijdens dit practicum gebruiken wij het type III. Dit enzym knipt het DNA bij de volgende herkenningssequentie: A I AGCTT. Deze sequentie komt op 7 plaatsen voor in het genoom van de λ -faag. Er zullen dus 8 DNA-fragmenten ontstaan na restrictie door het *HindIII*-enzym.

Iets meer over gelelektroforese...

Gelelektroforese wordt gebruikt om de lengte van de bekomen DNA-fragmenten te bestuderen en te vergelijken met elkaar.

Hiervoor worden de met knipenzym behandelde DNA monsters aangebracht in een gel. Hiervoor gebruiken we een agarose gel. Agarose is een natuurlijk polysacharide dat, opgelost in buffer, vloeibaar is op hoge temperatuur en gelvormig wordt bij afkoeling.

Wanneer op deze gel dan een elektrisch veld wordt aangelegd, migreert het DNA omwille van zijn negatieve lading naar de positieve pool. Tijdens deze migratie ondervindt het DNA een weerstand die afhankelijk is van de grootte van de molecule. Kleinere DNA-fragmenten ondervinden minder weerstand en migreren dus sneller doorheen de gel naar de overzijde. Grotere fragmenten migreren trager en zullen binnen eenzelfde tijdsduur minder ver gemigreerd zijn.

Na de elektroforese wordt de positie van de verschillende fragmenten gevisualiseerd door kleuring, en kunnen de bekomen DNA patronen met elkaar vergeleken worden.

In dit practicum worden de 2 geknipte DNA-monsters (en een niet geknipt monster) vergeleken met een referentiestaal. In dit laatste zitten verschillende fragmenten waarvan de lengte perfect gekend is. Het gebruikte referentiestaal is zodanig samengesteld uit fragmenten met lengten van veelvouden van 500 basenparen (500 1000 1500 2000...11500 12000). Het fragment van 5000 bp levert na gelelektroforese een extra-heldere band.

Maken van een DNA-profiel van de λ -faag: practicum

Hanteren van micropipetten

We werken met zeer kleine hoeveelheden DNA en restrictie-enzymen: van de grootte-orde van enkele μl . Vandaar dat we ook pipetten gebruiken waarmee we dergelijke kleine hoeveelheden kunnen afmeten: "micropipetten" genaamd. Verder hebben we ook zeer kleine recipiënten nodig om deze microhoeveelheden in te doen. Deze noemen we eppendorfbuisjes of kortweg "epjes". We starten eerst met het leren hanteren van de micropipet. Voor elk nieuwe vloeistof drukken wij een vers tipje op de pipet. Raak dit tipje niet aan met de handen. Druk de knop boven op de pipet halfweg in vooraleer het tipje in de vloeistof te dompelen. (Niet indrukken tijdens het onderdompelen, want dan veroorzaak je schuimvorming.) Laat na indompelen de knop terug los en de vloeistof wordt opgezogen. Nu breng je de pipet over naar het epje. Plaats de tip zo dicht mogelijk bij de bodem van het epje, enigszins schuin ten opzichte van de wand van het epje. Druk nu de knop bovenaan het pipet volledig in. Om het tipje na gebruik te verwijderen druk je de schuifknop opzij van de pipet naar beneden.

Oefen nu eerst het hanteren van de micropipet.

- Neem het epje met vermelding "WATER"
- Stel je pipet in op 4 μl
- Zuig dit volume op
- Kijk hoe de vloeistof zich in het tipje bevindt. Zo krijg je een idee van de te pipetteren hoeveelheden.
- Pipetteer dit volume terug in het epje "water". Leer daarbij het tipje tegen de rand, net boven de aanwezige vloeistof te plaatsen.
- Laat iedereen van je groep dit uitvoeren, zo oefen je het hanteren van de micropipet.



Restrictie-enzymen laten inwerken op de λ -faag

Op de werktafel vind je de volgende zaken terug. Wij geven je de raad deze eerst eens goed te bekijken.

Ga vooral na wat er zich in elk epje bevindt.

- ✓ DNA van de λ -faag: λ -DNA
- ✓ restrictie-enzymen afkomstig van de bacterie *E. coli*, stam R, (enzym I) : *EcoRI*
- ✓ restrictie-enzymen afkomstig van *H. influenzae* (enzym III): *HindIII*
- ✓ twee buffers: buffer 1 en 2

De restrictie-enzymen worden bewaard in het ijsbad.

We maken 3 verschillende profielen van het λ -DNA.

- ✓ Het eerste profiel wordt verkregen door het *EcoRI*-enzym op het DNA te laten inwerken.
- ✓ Het tweede profiel verkrijgen we door het *HindIII* enzym op het DNA te laten inwerken.
- ✓ Bij het derde profiel wordt het DNA helemaal niet bewerkt door een restrictie-enzym (controle-epje).

1. Om deze 3 profielen aan te maken, gebruiken we 3 verschillende epjes. Merk deze met een stift: duid op het epje aan welk restrictie-enzym wordt toegevoegd.
2. Breng met een micropipet in elk epje 4 μ l λ -DNA. Pipetteer de vloeistof op de bodem en zorg ervoor dat alles uit de tip verdwenen is.
3. Breng nu in het epje voor *EcoRI* en in het controle-epje telkens 5 μ l van buffer 1. Gebruik een andere tip om 5 μ l van buffer 2 toe te voegen aan het epje voor *HindIII*

epje	λ -DNA	buffer
1. met <i>EcoRI</i>	4 μ l	5 μ l (buffer 1)
2. met <i>HindIII</i>	4 μ l	5 μ l (buffer 2)
3. controle-epje	4 μ l	5 μ l (buffer 1)

4. Voeg vervolgens 1 μ l van het nodige restrictie-enzym (zie tabel) toe aan het juiste epje. Bij het controle-epje gebruik je water i.p.v. een restrictie-enzym. Gebruik telkens een nieuwe tip!

epje	λ -DNA	buffer	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	H ₂ O
1. met <i>EcoRI</i>	4 μ l	5 μ l (buffer 1)	1 μ l	–	–
2. met <i>HindIII</i>	4 μ l	5 μ l (buffer 2)	–	1 μ l	–
3. controle-epje	4 μ l	5 μ l (buffer 1)	–	–	1 μ l

5. Sluit de 3 epjes af. Tik met de buisjes op de labotafel en centrifugeer ze nadien, zodat alle vloeistof op de bodem zit.

- De buisjes worden vervolgens in een waterbad bij 37°C geplaatst. De restrictie-enzymen werken optimaal bij deze temperatuur. Het λ -DNA wordt nu door de restrictie-enzymen "geknipt", zodat meerder DNA-fragmenten met verschillende lengte bekomen worden. De incubatie (= restrictie) duurt zo'n 20 minuten.

Gieten van de agarosegel voor elektroforese

De verschillende DNA-fragmenten moeten van elkaar gescheiden worden d.m.v. gelelektroforese.

- In de elektroforesekamer worden eerst de twee zwarte tussenschotten geplaatst.
- Giet nu de warme gel langzaam (zodat er geen luchtbelletjes gevormd worden) in de elektroforesekamer.
- Breng hierin vervolgens de kam aan.

Deze kam zorgt ervoor dat er sleuven in de gel ontstaan. In deze sleuven worden dan later de 3 DNA-stalen en een referentiestaal aangebracht. Laat de gel een 20-tal minuten opstijven.

PAUZE 1 (ca. 20 min.)

Aanbrengen van de geïncubeerde DNA-stalen

- Overgiet de gel met een bufferoplossing.
- Aan de 3 DNA-stalen wordt telkens 2 μ l kleurstof toegevoegd, zodat we het migratiepatroon van deze stalen kunnen volgen tijdens de gelelektroforese.
- Breng in een eerste sleuf 10 μ l aan van het referentiestaal. In 3 andere sleuven breng je telkens 10 μ l van de 3 geknipte en gekleurde DNA-stalen. Noteer hieronder in welke sleuf je elk staal aangebracht hebt.

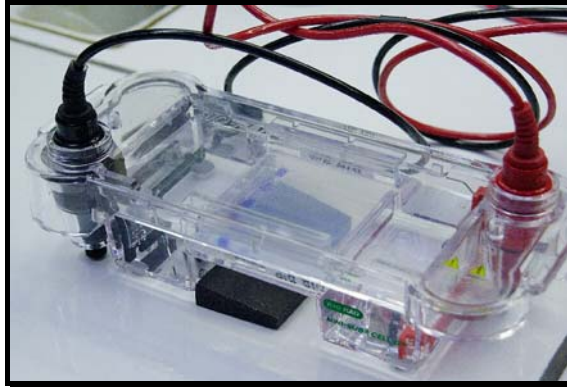
Staal	referentie (ruler)	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	controle
Sleuf nr.				



- Sluit de elektroforesekamer aan op de spanningsbron en schakel deze laatste aan.

5. De elektroforese duurt tot de kleurstof ongeveer $2/3$ van de gel doorlopen heeft. (opm.: de kleurstoffen migreren iets sneller dan de DNA-fragmenten doorheen de gel. Ze geven dus aan wanneer de elektroforese beëindigd moet worden. Als we de elektroforese te lang zouden aanhouden, migreren de DNA-fragmenten immers uit de gel.) De totale duur van de elektroforese bedraagt ongeveer een uur.

PAUZE 2 (ca. 60 min.)



D. Kleuring van de gel

Na de elektroforese wordt de gel gekleurd. Dit duurt ongeveer een half uur.

PAUZE 3 (ca. 30 min.)

(Omdat deze gel in de kleurstof mee naar school genomen mag worden, kan pauze 3 wegvallen.)

Vergelijk de experimenteel bekomen DNA-patronen met deze die je voorspeld hebt a.d.h.v. de theoretische berekeningen met behulp van de computer.

Theoretische berekening met computer van het DNA-profiel van de λ -faag

Het genoom van de λ -faag is volledig gekend en bestaat uit 48502 basenparen. Via onze webstek www.luc.ac.be/scholennetwerk kan je het "Zoekraam lambdafaag.doc" afhalen. Dit document bevat gans het genoom in een overzichtelijk genummerde tabel. Met behulp van de zoekfunctie van een tekstverwerker is het mogelijk in deze tabel de knipplaatsen van de restrictie-enzymen op te sporen.

Waar knippen de restrictie-enzymen in het Lambda-genoom?

De *EcoRI* - restrictiesequentie is GAATTC en dit enzym knipt na de G.

Start de tekstverwerker Word en open het document "Zoekraam lambdafaag.doc"

Ga in de Word-menubalk naar Beeld en kies Pagina-indeling.

Kopieer de sequentie GAATTC naar het klembord(Ctrl-Ins).

Druk functietoets F5.

Selecteer het Tabblad "Zoeken" en plak de sequentie in de tekstbalk (Shift-Ins).

Klik nu op de knop "Volgende zoeken".

Nu zie je bij welke basepositie de eerste knip gegeven wordt. Noteer dit in de tabel van werkblad 1

Klik opnieuw "Volgende zoeken."

Herhaal de werkwijze tot het einde van het document bereikt is.

Je hebt nu alle knipplaatsen voor *EcoRI* en je kunt dus zelf de lengte van elk fragment berekenen.

De *HindIII* - restrictiesequentie is AAGCTT en dit enzym knipt na de eerste A.

Kopieer nu deze sequentie AAGCTT naar het klembord en herhaal bovenstaande procedure.

Na berekening van de lengte van de fragmenten kan je op werkblad 2 deze met een streep situeren ten opzichte van de DNA-ladder-fragmenten.

Werkblad 1

Berekenen de lengte van de restrictiefragmenten *EcoRI*

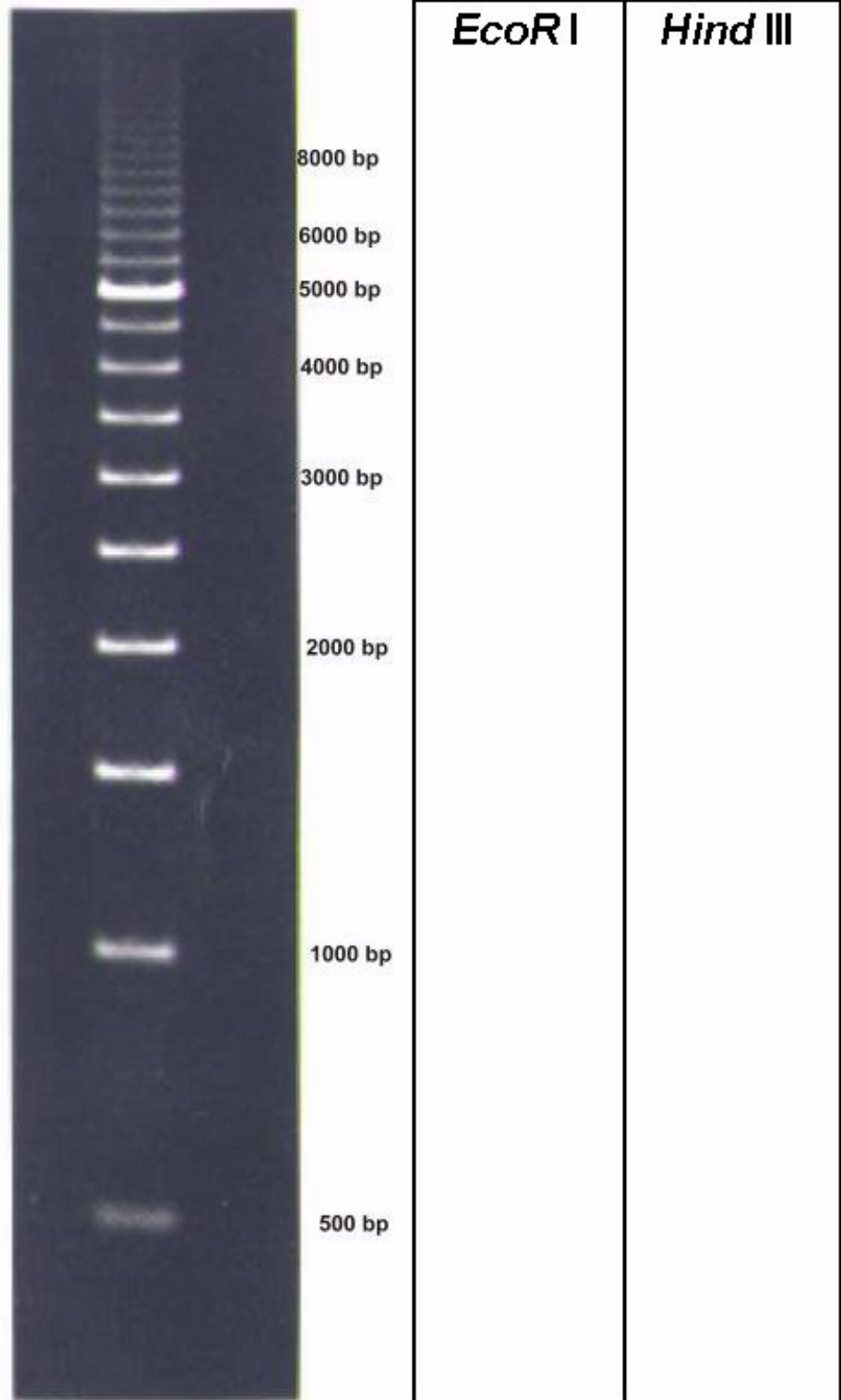
knipplaats 1	21226	21226	lengte fragment 1
knipplaats 2			lengte fragment 2
knipplaats 3			lengte fragment 3
knipplaats 4			lengte fragment 4
knipplaats 5			lengte fragment 5
einde genoom	48502		lengte fragment 6

Berekenen de lengte van de restrictiefragmenten *HindIII*

knipplaats 1			lengte fragment 1
knipplaats 2			lengte fragment 2
knipplaats 3			lengte fragment 3
knipplaats 4			lengte fragment 4
knipplaats 5			lengte fragment 5
knipplaats 6			lengte fragment 6
knipplaats 7			lengte fragment 7
einde genoom	48502		lengte fragment 8

Werkblad 2

Situeer met een streep de berekende restrictiefragmenten ten opzichte van de DNA – ladderfragmenten.



Toepassingsgebieden van DNA-profilering

Het gebruik van DNA-profielen bij het oplossen van misdaden

Bij gewelddaden als moord of verkrachting komt het er op aan om een individu aan te wijzen op basis van achtergelaten sporen, zoals sperma, haren of bloedvlekken. Via PCR, behandeling met restrictie-enzymen en gelelektroforese komt men tot een DNA-profiel. Een overeenkomst tussen het DNA van een achtergelaten spoor en het DNA van een potentiële dader vormt dus een belangrijke aanwijzing.

Vanaf de introductie van de forensische DNA-techniek in Europa is er veel aandacht besteed aan de harmonisatie en standaardisatie tussen de verschillende staten. Met het oog op het bestrijden van criminaliteit over de grenzen heen is het van groot belang om DNA-gegevens via Interpol te kunnen uitwisselen. De Europese labs hebben in 1996 gekozen voor het SGM-systeem (Second Generation Mix). Van 1996 tot eind 1999 gebruikten de Europese laboratoria een multiplex PCR techniek, waarmee in één keer zes merkers op verschillende chromosomen en één seksspecifieke DNA-merker worden vermenigvuldigd en geanalyseerd. (Met deze laatste merker kan het geslacht van de DNA-donor worden achterhaald). De kans dat een willekeurig, onschuldig individu met deze methode eenzelfde DNA-profiel vertoont als het achtergelaten spoor is kleiner dan één op een miljoen. Eind 1999 is binnen Europa het SGM Plus multiplex PCR systeem geïntroduceerd. Met dit multiplex systeem worden vier nieuwe DNA-merkers aan het systeem toegevoegd. Daarmee is de identificatie quasi zeker geworden. Het meest voorkomende SGM Plus Profiel heeft een frequentie van minder dan één op twee miljard.

Loci in het SGM-systeem	Locus	Chromosoom
	FGA	4
	D8S1179	8
	THO	11
	VWA	12
	D18S51	18
	D21S11	21
	Amelogenine	X en Y-chromosoom; dit gen is op het X-chromosoom 6 basenparen korter dan op het Y-chromosoom.
Bijkomende loci in het SGM-systeem	D2S1338	2
	D3S1358	3
	D16S539	16
	D19S433	19

Het grote voordeel van de integrale Europese aanpak is dat men nu in staat is DNA-profielen uit te wisselen. Een DNA-profiel van een onopgelost misdrijf kan vergeleken worden met de DNA-databestanden van de omliggende landen. Bovendien is voor de 7 oorspronkelijke SGM-loci ook uitwisseling mogelijk met de databanken in de USA en Canada.

DNA-onderzoek leidt niet alleen tot aanwijzing van een schuldige. Een afwijking tussen het DNA-profiel van de verdachte en dat van de sporen zal hem ook vrijpleiten. In de USA zijn een aantal ter dood veroordeelden onschuldig gebleken dankzij een DNA-onderzoek. Zo kwam in augustus 2001 Charles Fain vrij uit de dodencel in Idaho. Hij was 18 jaar geleden veroordeeld omwille van de verkrachting en de moord op een negenjarig meisje. Op het lijkje waren haren gevonden die van kleur overeenkwamen met deze van Fain. Hoewel een proef met de leugendetector in zijn voordeel pleitte werd hij toch veroordeeld op basis van de aangetroffen haren. Na een vergelijkend DNA-onderzoek, begin 2001, blijkt zijn profiel zeer duidelijk te verschillen met dit van de haartjes. Tegenstanders van de doodstraf vragen nu ook voor enkele al terechtgestelden een vergelijkend DNA-onderzoek op de sporen die tot hun veroordeling geleid hebben. Frank Lee Smith, een ter dood veroordeelde die in zijn cel stierf tengevolge van kanker, bleek bijvoorbeeld onschuldig toen zijn DNA vergeleken werd met dat van sperma gevonden bij het slachtoffer. Opmerkelijk is dat het onderzoek hier aangevraagd werd door de familie van het slachtoffer, om Smith's schuld definitief te kunnen bewijzen.

Soms wordt er bij misdaden ook gezocht of haartjes e.d. niet afkomstig zijn van het slachtoffer. Zo kan men, als het DNA uit deze haartjes overeenstemt met dit van het slachtoffer, bewijzen dat het slachtoffer op die plaats aanwezig geweest is.

Vaderschapstest

DNA-profilering is een veel gebruikte techniek om duidelijkheid te verkrijgen bij betwisting van het vaderschap.

Ieder individu heeft twee allelen voor elk gen, n.l. één van zijn moeder en één van zijn vader. Dat geldt ook voor de VNTR-regio's die onderzocht worden bij DNA-profilering. Elke band in het DNA-profiel van het kind, die niet afkomstig is van de moeder moet wel terug te vinden zijn in het DNA-profiel van de vader. Het is dus enkel kwestie deze banden terug te vinden in het DNA-profiel van een van de kandidaat vaders.

In de klassieke vaderschapstesten worden vijf VNTR-loci onderzocht en voor elk hiervan bestaan er meerdere allelen. De kans dat twee willekeurige, niet-verwante individuen volledig dezelfde allelen hebben is kleiner dan 1 op 10000. Met andere woorden, de waarschijnlijkheid dat een kandidaat-vader met overeenstemmend profiel inderdaad de vader is overstijgt de 99,99 %. Als twee broers beiden de mogelijke vader zijn dan stijgt de kans op een gemeenschappelijk profiel tot minstens 0,4 %. Maar in dat geval kan men met enkele bijkomende VNTR-regio's de kans op overeenkomst nog gevoelig verkleinen.

Identificatie van slachtoffers bij rampen

Bij sommige rampen zoals vliegtuigongevallen en branden worden mensen onherkenbaar verminkt. Traditioneel probeerde men de slachtoffers dan te identificeren op basis van b.v. de tanden. Nu kan men de lichamen van de slachtoffers identificeren door hun DNA-profiel te vergelijken met dit van hun verwanten.

Bij een vliegtuigramp op Spitsbergen in 1996 kwamen 141 personen om. Door DNA onderzoek konden de 257 gevonden stoffelijke resten terug toegeschreven worden aan 141 individuen. Verder slaagde men er in om 139

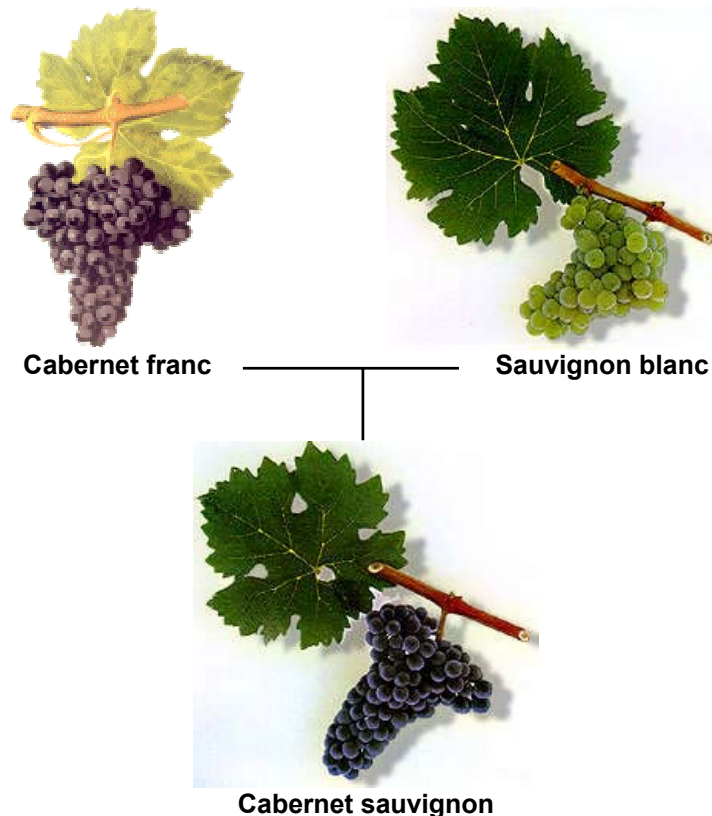
van de slachtoffers ook te herkennen door het DNA te vergelijken met dit van hun verwanten.

Het onderzoek is niet altijd zo succesvol. Stoffelijke resten die door hitte beschadigd zijn of die langere tijd in zeewater gelegen hebben zijn veel moeilijker te analyseren.

Ook bij de aanslag op de WTC-torens werd aan de familie gevraagd om van de vermiste slachtoffers b.v. wat haren uit een kam te verzamelen, zodat herkenning van stoffelijke resten via DNA-profilering mogelijk wordt.

Verwantschap tussen plantenvariëteiten

Sommige gecultiveerde planten variëteiten zijn eeuwen oud en men weet niet door welke kruising zij tot stand gekomen zijn. Ook hier biedt een DNA-onderzoek uitkomst.



Grote wijnen worden gemaakt met een relatief klein aantal variëteiten van de druif *Vitis vinifera* L. De druif bij uitstek voor kwaliteitswijnen is de Cabernet sauvignon, die al sinds de 17de eeuw gekweekt wordt in de Bordeauxstreek en die nu in praktisch alle grote wijngebieden van de wereld terug te vinden is. Via DNA-profilering zijn de stamouders van deze druif achterhaald in 1997. Men stelde bij een 50-tal druivenvariëteiten profielen op voor 24 polymorfe loci. Uiteindelijk bleek de Cabernet sauvignon een kruising van de Cabernet franc en de Sauvignon blanc.

Opsporen van genetisch gemanipuleerde organismen (GGO's) in voeding

Aan het Centrum voor toegepast onderzoek en dienstverlening (CTO) van de Hogeschool Gent ging in maart 2001 het laboratorium AgriFing van start. De bedoeling van AgriFing is via DNA-profilering te onderzoeken of er GGO's aanwezig zijn in levensmiddelen.

Mitochondriaal DNA: de genetische "familienaam" van de mens

Niet alleen de chromosomen in de kern bevatten DNA. Ook de mitochondriën, die instaan voor de ademhaling van de cel, bevatten een klein beetje DNA. Dit mitochondriaal DNA (mtDNA) is vrij klein (slechts 16 000 bp), maar toch interessant om twee redenen.

In de eerste plaats bezit een cel vele honderden mitochondriën, zodat één enkele cel kan volstaan voor het opstellen van een DNA-profiel. Dit is van belang bij het DNA-onderzoek op haren. Intacte cellen kunnen enkel voorkomen aan de haarwortel. Ontbreekt deze, dan kan men wel nog mtDNA onderzoeken, omdat mitochondriën voorkomen over heel de lengte van een haar.

Een tweede reden is dat de mitochondriën van een individu volledig afkomstig zijn van zijn moeder. Enkel de eicel levert mitochondriën. Deze van de zaadcel dringen bij de bevruchting niet door in het cytoplasma van de eicel.

Mitochondriaal DNA is dus als het ware een "familienaam" die in vrouwelijke lijn doorgegeven wordt.

Historische toepassingen van mitochondriaal DNA

Zelfs uit skeletten kan men zeer goed mtDNA isoleren. Dit leidde o.a. tot opheldering van twee historische mysteries.

In 1918, na de Russische revolutie, werden de tsaar, de tsarina en hun kinderen terechtgesteld en op een geheime plaats begraven.



De laatste tsaar en zijn familie

In 1979 werd deze begraafplaats gelokaliseerd. Na het uit elkaar vallen van de Sovjet Unie kregen onderzoekers de gelegenheid om forensische analyses uit te voeren.

Dit forensisch onderzoek werd uitgevoerd door het laboratorium van de Forensic Science Service in Engeland.

In het massagraf werden 9 skeletten aangetroffen. Het mtDNA van deze skeletten werd vergeleken met dat van prins Philip van Engeland. Hij is nl. de zoon van een dochter van een zuster van de tsarina en moet, door deze vrouwelijke afstamming, hetzelfde mtDNA hebben. Door vergelijking kon men de tsarina en haar drie kinderen identificeren. Om de tsaar te identificeren deed men een vergelijking met mtDNA afkomstig van het skelet van zijn ouder broer, die gestorven was in 1899.

Een tweede, soortgelijke historische kwestie was de vraag of de Franse troonopvolger werkelijk gestorven was in de gevangenis, tijdens de Franse revolutie.

Een zekere Naundorff die in 1845 stierf te Delft, Nederland wierp zich op als Franse troonopvolger. Hij zou als kind ontsnapt zijn uit de gevangenis "Le Temple" in Parijs.

Het team van prof. Cassiman van de K.U.Leuven hield zich bezig met deze kwestie.

In mei 1998 konden zij aantonen dat het mtDNA van Naundorff duidelijk verschilde van het mtDNA van meerdere afstammelingen van Maria Theresia van Oostenrijk (de grootmoeder langs moeders zijde van Lodewijk XVII).



Lodewijk XVII

Maar het onderzoek ging nog verder. In een Parijse kapel werd een hart van een kind bewaard. Het zou afkomstig zijn van de troonopvolger Lodewijk XVII. De arts, die in de gevangenis de lijkschouwing verricht had, zou het mee buiten gesmokkeld hebben. Het werd geconserveerd in wijnazijn en belandde uiteindelijk als relikwie in de kapel. Was dit het hart van Lodewijk XVII?

Professor Cassiman kreeg de toestemming mitochondriaal DNA te isoleren uit het relikwie. Het bekomen DNA-profiel blijkt op alle plaatsen te kloppen met dat van de familieleden uit het eerste onderzoek. Dit hart is dus meer dan waarschijnlijk dat van de gestorven Franse kroonopvolger.

Gebruik van mtDNA bij de studie van de menselijke evolutie

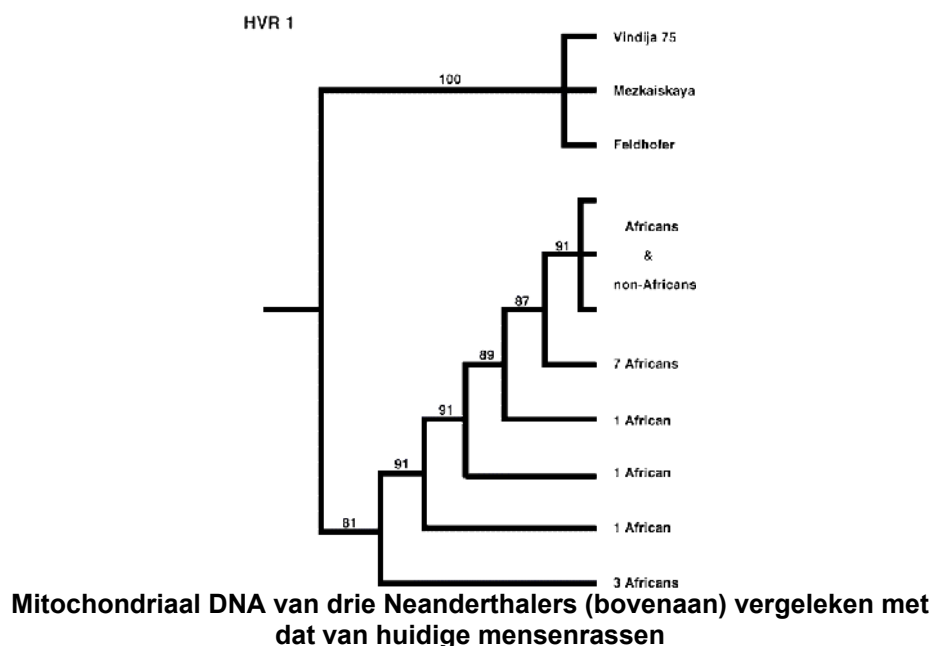
Wat betreft de huidige mensenrassen zijn er twee theorieën. De multiregionale theorie stelt dat elk menselijk ras een plaatselijke variant is van *Homo erectus*, die 1,7 miljoen jaar geleden vanuit Afrika over de wereld uitzwierf. Daarnaast is er de "Out-of-Africa"-theorie. Volgens deze theorie zou de huidige mens zo een 100 000 jaar geleden, eveneens vanuit Afrika, maar dan in een tweede en vrij recente migratiegolf, de wereld veroverd hebben. Daarbij zou hij plaatselijke nakomelingen van *H. erectus*, zoals de Neanderthaler in Europa, volledig verdrongen hebben.

Men heeft het mtDNA van alle menselijke rassen over heel de wereld met elkaar vergeleken, en men heeft op basis van de verschillen een "stamboom" opgesteld. Toevallige mutaties in het mtDNA zullen zich namelijk accumuleren en nemen dus toe in de loop der tijd. Mensenpopulaties die pas onlangs van elkaar gescheiden werden zullen onderling minder verschillen vertonen dan populaties die al langer van elkaar gescheiden werden. Men kent ook de gemiddelde duur tussen twee mutaties in mtDNA.

Aan de hand van deze mutatiefrequentie en aan de hand van het vergelijkingspatroon van mtDNA van de huidige menselijke rassen blijkt het dat alle mensen afstammen van een Afrikaanse vrouw die zo tussen de 140 000 en de 200 000 jaar geleden geleefd moet hebben. Ouderdom en locatie van deze "mitochondriale Eva" versterken dus de "Out-of-Africa-theorie".

Een later onderzoek naar bepaalde DNA-regio's op het Y-chromosoom bij mannen van alle rassen leidde tot analoge conclusies.

Achteraf is men er ook in geslaagd mtDNA te isoleren uit drie verschillende skeletten van Neanderthalers. De afwijkingen met dit mtDNA zijn groter dan tussen de huidige mensenrassen onderling, maar kleiner dan de afwijkingen van ons mtDNA en dat van de chimpansee. Anderzijds blijken de afwijkingen tussen de Neanderthalerskeletten onderling wel zeer klein. De stelling dat de huidige Europese mens geen afstammeling is van de Neanderthaler wordt door dit onderzoek dus zeer aannemelijk.



Bronnen

DNA als gerechtelijk bewijsmateriaal Drs. Ate Kloosterman Nederlands
Forensisch Instituut www.dnasporen.nl

Unit 2: DNA profiling European Initiative for Biotechnology Education
<http://www.rdg.ac.uk/EIBE/home.html>

Using DNA for examining lineage's <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/mitovarn.htm>

Een DNA-practicum uitvoeren in het eigen schoollaboratorium

Misschien is het om de een of andere reden onmogelijk om het DNA-practicum met je klas in het labo van het LUC te komen uitvoeren.

Mits de nodige investeringen kan het practicum DNA-profilering in het eigen schoollabo gebeuren.

Wij geven hieronder een materiaallijst en tevens tips voor een goedkopere alternatieve stroombron.

1 Materiaallijst

Toestellen en materialen			
	Leverancier	Bestelnr.	Prijs (april 2003)
aut.pipet 0,5-10 µl digital	VWR International	labs4500010	€ 160,01
tip 10µl FT10 bulk	VWR International	labs9400310	€ 25,72 / 1000stuks
Microbuisen Kartell 1,5 ml	VWR International	Nr 298 00 neutraal	€ 8,82
Electroforesekamer: Mini-Sub cell GT System 7 x 7 cm	Biorad laboratories	nr. 170-4406EOY	€ 258
Stroombron POWERPAC 300	Biorad laboratories	Nr.165-5051	€ 398
Producten			
Lambda-DNA 5 units	Roche Diagnostics	Nr. 745782	€ 88,57
Restrictie-enzym EcoRI	Sigma-Aldrich	R - 6265	€ 30,79
Restrictie-enzym HindIII	Sigma-Aldrich	R - 1137	€ 23,03 / 5000 Units
Molecular-Biology certified agarose	Biorad laboratories	nr. 162-0133	€ 103 / 100 g
500 bp EZ load Molecular Ruler	Biorad laboratories	nr. 170-8354	€ 98 / 500 µl
TAE - buffer 50 x	Biorad laboratories	Nr. 161-0743	€ 73 / liter
Methyleenblauw	VWR International	velc3470.0010	€ 8,23 / 10 g

Prijzen exclusief BTW

Leveranciers

Biorad Laboratories
Begoniastraat 5
9810 NAZARETH EKE 09/3855511

Roche Diagnostics
Oorlogskruisenlaan 90
1120 BRUSSEL 02/2474930

Sigma-Aldrich
K. Cardijnplein, 8
2880 Bornem 03/8991301

VWR International
Geldenaaksebaan 464
3001 LEUVEN 016/385011

2. Alternatieve stroombronnen voor de elektroforese

Zowel de elektroforesekamer als de stroombron zijn vrij duur. Wat de elektroforesekamer betreft bestaan er waarschijnlijk wel goedkopere typen, dan degene die in het LUC gebruikt worden.

Voor de stroombron zijn er alternatieven. Overleg hiervoor met de collega fysica. De kans is groot dat hij geschikte toestellen heeft voor demonstratie- en leerlingenproeven elektriciteit. Tijdens onze practica verloopt de elektroforese het best bij een maximale spanning van 125 V en met een constante stroomsterkte van 75 mA. In dertig minuten krijg je dan een goede scheiding tussen de DNA-fragmenten.

Zowel de spanning als de stroomsterkte moeten begrensd worden. Indien dit niet gebeurt zal de buffer opwarmen en kortsluiting veroorzaken.

Een goedkoop alternatief, eenvoudig en toch veilig voor de leerlingen, bestaat uit 5 batterijen van 9V. Gezien de kosten en de milieubezwaren adviseren wij oplaadbare batterijen te gebruiken.

Deze opstelling werd uitgetest in het LUC, door de gebruikelijke elektroforesekamer te verbinden aan vijf in serie geplaatste 9V-batterijen. Dit zijn de bevindingen.

- Door de opstelling is de spanning is uiteraard beperkt tot $5 \times 9 \text{ V} = 45 \text{ V}$.
- De stroomsterkte is beperkt tot wat de goed opgeladen batterijen kunnen leveren. Bij aanvang van het experiment was dat 29mA.
- Door lagere spanning en stroomsterkte is de elektroforesesnelheid uiteraard beduidend lager dan bij de optimale waarden van de gebruikelijke stroombron.
- Na 105 minuten was er echter een perfecte scheiding tussen de fragmenten, vergelijkbaar met het resultaat van de gewone stroombron na 30 minuten.
- Het is aangewezen om de batterijen telkens volledig te herladen vooraleer een nieuwe elektroforese uit te starten.

Kortom, dit is een uitvoering die werkbaar en veilig is, een kleinere investering vergt en die een mooi compromis geeft tussen een redelijke snelheid en een goede scheiding.

3. Enkele leerlingen-tips voor een optimaal practicum

Leer de leerlingen op voorhand het micropipet juist te gebruiken.

Oefen eerst met water totdat de leerlingen de techniek beheersen. De meest fouten zijn te wijten aan het indrukken/loslaten van de pipetteerknop op een verkeerd moment.

Bij het opzuigen van vloeistof moet men de knop **eerst halfweg indrukken, vooraleer de tip in de vloeistof te dompelen**. Door de knop pas in te drukken op het ogenblik dat de tip zich in de vloeistof bevindt ontstaat er schuim. Bij het lossen van de knop wordt er dan ook een gedeelte lucht opgezogen en bijgevolg klopt het volume aan vloeistof niet meer.

Bij het ledigen van de vloeistof in een epje plaatst men de tip **zo dicht mogelijk bij de bodem van het epje**, enigszins schuin ten opzichte van de wand van het epje. Dan drukt men de knop bovenaan het pipet volledig in. Deze knop mag men **pas weer lossen als de tip volledig uit de vloeistof verwijderd is**. Doet men dit te vroeg, dan zuigt men een gedeelte van de gepipetteerde hoeveelheid terug op.

Bij het aanbrengen van een tweede vloeistof in een epje plaatst men de tip schuin ten opzichte van de wand, **zo dicht mogelijk bij het oppervlak van de al aanwezige vloeistof**. Dan vervloeien de twee vloeistoffen gemakkelijk met elkaar. Pipetteert men de tweede vloeistof te hoog in het epje, dan blijft de druppel daar door adhesie hangen. De reagentia vermengen zich dan onvolledig of niet en de reactie zal niet of onvoldoende doorgaan. Door een kort en niet te hevig tikje op de labotafel kan je een hangende druppel toch op de bodem van het epje krijgen.

Het uitgieten van de agarosegel

Let er vooral op dat dit traag en geleidelijk gebeurt, zodat er geen luchtbellen ontstaan ten gevolge van het gieten.

Het aanbrengen van de DNA-stalen in de sleuven van de gel

Het staal moet met een micropipet voorzichtig in de sleuf aangebracht worden. Hier moet men vooral opletten niet doorheen de gel te prikken met de tip van het micropipet. Een zwart voorwerp onder de elektroforesekamer levert ietwat meer contrast.