

# *Docentenhandleiding*

***Proef je PTC?***

# AMGEN<sup>®</sup> Biotech Experience

## Scientific Discovery for the Classroom

Nederland



## BÈTAPARTNERS

Ontwikkeld door de Reizende DNA-labs Amsterdam, Nijmegen, Utrecht, Leiden en ABE Nederland in samenwerking met Bètapartners

### Tekst

Marlinde Schoonbeek, Melanie Rosenhart, Cathelijne Reincke, Charlotte Zwetsloot, Cathelijne Kool, Ellen van de Logt & Iris Verhoeff

Op alle lesmaterialen is de Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland Licentie van toepassing (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl/>).  
**CC BY-NC-SA 2023 – Universiteit van Amsterdam**

Met vragen en/of opmerkingen kunt u contact opnemen met de Reizende DNA-labs & ABE Nederland ([info@dnalabs.nl](mailto:info@dnalabs.nl)).

Disclaimer: Alle meningen, bevindingen en conclusies of aanbevelingen in dit materiaal zijn die van de auteur(s) en komen niet noodzakelijk overeen met de opvattingen van de Amgen Foundation of Education Development Center, Inc.

## Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	3
De Reizende DNA-labs en de ABE leskist	4
Samenwerking Amgen Biotech Experience	4
LabXchange	4
De ABE leskist	4
Opbouw	5
Doelgroep	5
Aansluiting eindexamen eindtermen	5
Voorkennis	6
Leerdoelen inleidende les en practicum	6
Verantwoordelijkheid Leskist	8
Inleidende les: Proef je PTC?	9
Pipetteren	12
Virtueel pipetteeroefening - LabXchange	13
Antwoorden werkblad	18
Vooraf het practicum	20
Materialenlijst	20
MiniPCR	21
Vorbereidingen	23
Docentenprotocol	26
Globale proefopzet	26
Stap 1: Pipetteeroefening	27
Stap 2: DNA-isolatie	29
Stap 3: Polymerase Chain Reaction (PCR)	31
Stap 4: Restrictie digestie	33
Stap 5.1: Gel-elektroforese - gel gieten	35
Stap 5.2: Gel-elektroforese	36
Stap 6: Smaaktest	39
Bijlagen	40
Bijlage 1: werkblad leerlingen	40

## ***De Reizende DNA-labs en de ABE leskist***

---

De Reizende DNA-labs slaan een brug tussen biologie en scheikunde op school en de nieuwste ontwikkelingen rond genomics, door leerlingen zelf aan de slag te laten gaan met geavanceerde technieken en actuele onderwerpen uit het hedendaagse wetenschappelijk onderzoek. De DNA-labs zijn ontwikkeld door Nederlandse universiteiten en de Genomics Centres of Excellence.

Er zijn verschillende DNA-labs, die ieder een verschillend aspect van het moderne DNA-onderzoek behandelen. Stuk voor stuk laten de DNA-labs zien dat kennis van genen en de moleculen in een cel een grote rol spelen in gebieden die voor iedereen belangrijk zijn: veiligheid, voeding, ethiek, gezondheid en het milieu. Daarnaast maken de practica duidelijk dat wetenschappelijke vooruitgang soms maatschappelijke vragen oproept.

### **Samenwerking [Amgen Biotech Experience](#)**

Sinds 2017 is er een samenwerking tussen de Reizende DNA-labs en Amgen Biotech Experience (ABE). ABE is een wereldwijd wetenschapsonderwijsprogramma die het mogelijk maakt om de wetenschap te introduceren op middelbare scholen, en scholieren te interesseren voor de biotechnologie. ABE zorgt onder andere voor geavanceerde apparatuur en lesmateriaal. Het lesprogramma van ABE wordt in achttien landen over de hele wereld gegeven. ABE ondersteunt de Reizende DNA-labs met laboratoriumuitrusting en onderwijsmaterialen, zodat verschillende practicumlessen voor middelbare scholieren gegeven kunnen worden. Sinds 2019 is ons aanbod uitgebreid met de ABE leskist 'Proef je PTC?'. Deze is nu vanuit drie universiteiten te leen: bij Bètapartners Universiteit van Amsterdam, Radboud PUC of Science Nijmegen en bij het TU Delft Science Centre.

### **LabXchange**

LabXchange is een gratis open Virtual Lab Platform opgezet in samenwerking met de Amgen Foundation door Harvard University. Het is voor biologie/scheikunde docenten, leerlingen en studenten. Met dit platform kunnen docenten klassen creëren die o.a. uit virtuele practica, filmpjes en opdrachten over een bepaald thema bestaan die leerlingen/studenten kunnen doorlopen. Ook kunnen leerlingen en studenten zelf virtuele practica uitvoeren b.v. voor hun profielwerkstuk en studie. De voertaal van LabXchange is voornamelijk in het Engels, maar de onderdelen van het [Amgen Biotech Experience \(ABE\)](#) practicum zijn in het Nederlands. Maak een gratis account aan en volg [deze stappen](#) hoe LabXchange als docent of leerling te gebruiken is.

## De ABE leskist

Om een langer durend practicum met geavanceerde apparatuur te kunnen bieden, is er de ABE leskist ontwikkeld. De leskist biedt voordelen om een langdurend practicum zoals het 'Proef je PTC?' practicum mogelijk te maken. Ook kan een leskist meerdere klassen binnen één school bedienen; klassen van hetzelfde niveau, maar ook kunnen lagere klassen kennis maken met bijvoorbeeld de **pipetteoefening**. De leskist kan gratis 1x per schooljaar gereserveerd worden door een school, en mag maximaal vier weken gehouden worden. De docent kan dit practicum zelf geven, na de kennismakingsbijeenkomst te hebben gevolgd. Deze wordt tweemaal per jaar gegeven en is toegankelijk voor docenten en toa's.

De ABE leskist bestaat uit drie rolbare kisten compleet met alle benodigde apparatuur, downloadbare handleidingen via de website [www.dnalabs.nl](http://www.dnalabs.nl) en de benodigde reagentia en consumables. Per reservering ontvangt u voor één klas (maximaal 32 leerlingen) gratis de reagentia en consumables. Mocht u meerdere klassen bedienen dan is het mogelijk om reagentia en consumables tegen betaling bij te boeken.

### *Opbouw van het practicum*

De handleiding bestaat uit:

- **Inleidende les:** met (hierin genoteerde) theorie, pipetteeroefening en opgaven; 45 minuten
- **Vorbereiding practicum:** uitpipetteren van DNA-extractie en PCR voor per groepje van max. 8 leerlingen, gieten van oefengels, oplossen van TBE buffer en e.v.t. gels voor de gelelektroforese. ~60 minuten
- **Practicum: Proef je PTC?:** DNA-extractie, PCR, restrictie digestie, gelelektroforese met tussentijdse opgaven. En de smaaktest. Het practicum duurt 4 uur incl. 1,5 uur PCR.

### *Doelgroep*

De ABE leskist is ontwikkeld voor leerlingen van bovenbouw havo en vwo. De leskist sluit goed aan bij de vakken biologie\* (hoofdstuk over DNA en Erfelijkheid) en natuur, leven en technologie (nlt) (modules Moleculen in leven en Moleculaire gastronomie), mits leerlingen de basiskennis over DNA en erfelijkheid op zak hebben).

Bij deze lesmethodes sluit deze ABE leskist goed aan:

- havo 4: Genetica (Biologie voor jou, thema 3), Cellen (Nectar thema 2),
- havo 5: DNA (Biologie voor jou, thema 2), Erfelijkheid (Nectar thema 9)
- vwo 4: Genetica (Biologie voor jou, thema 3), Cel en leven (Nectar thema 2), Erfelijkheid (Nectar thema 5)
- vwo 5: DNA (Biologie voor jou, thema 4)
- vwo 6: DNA (Nectar, thema 1)

### *Aansluiting eindexamen eindtermen*

Voor zowel vwo- als havo-leerlingen sluit dit practicum aan bij de eindtermen\* in:

- Subdomein B1: Eiwitsynthese
- Subdomein E1: DNA-replicatie
- Subdomein E4: Erfelijke eigenschap
- Subdomein F1: Selectie

\*Uit examenprogramma's biologie havo en vwo.

In het tweede tijdvak van de biologie vwo-eindexamen 2022 zat een vraag in het examen. Via deze link is het examen te zien:

<https://www.examenblad.nl/2022/vwo/vakken/exacte-vakken/biologie-vwo>

## Voorkennis

Om dit practicum goed te kunnen uitvoeren, dienen de leerlingen wel over een zekere voorkennis van DNA te beschikken. De leerlingen moeten in elk geval bekend zijn met de informatie in box 1.

### Genen en DNA

- DNA bevat erfelijke informatie
- Bij een menselijke cel ligt het DNA opgeslagen in de kern.
- Elke cel van een organisme bevat hetzelfde DNA en dezelfde genen, m.u.v. geslachtscellen
- DNA bevat een aantal genen die informatie bevatten voor het goed functioneren van een cel
- Menselijk DNA bevat ongeveer 22.000 genen verdeeld over 23 chromosoomparen
- Bij bevruchting levert elke ouder 23 chromosomen (geslachtscellen bevatten dus 23 chromosomen en lichaamscellen 46)
- De geslachtschromosomen zijn de chromosomen die het geslacht bepalen. Een vrouw heeft XX, een man heeft XY
- Als een organisme voor een bepaald gen twee gelijke DNA-kenmerken voor genen heeft, dan noemt men dit een homozygoot organisme. Als het twee verschillende DNA-kenmerken voor genen heeft, noemt men het organisme heterozygoot.
- Bij celdeling wordt het DNA verdubbeld (replicatie) en vervolgens gelijk verdeeld over de twee dochtercellen (mitose)
- Ieder mens heeft een unieke genetische code

### De moleculaire structuur van DNA

- Een DNA-molecuul heeft een dubbele helixvorm
- DNA is opgebouwd uit 4 basen (A, T, G, C)
- Een basenpaar wordt gevormd door A/T of C/G
- Een nucleotide is opgebouwd uit een suiker, fosfaat en een base

Box 1. Voorkennis die nodig is om het practicum te kunnen uitvoeren.

## Leerdoelen inleidende les en practicum

### Inhoudelijke leerdoelen

Na afloop van de lesmodule kunnen leerlingen begrijpen:

- Dat elke cel hetzelfde DNA heeft m.u.v. geslachtscellen.
- Welke informatie je uit een DNA-profiel kunt halen.

### Praktische leerdoelen

Na afloop van de lesmodule kunnen leerlingen uitleggen dat:

- DNA-isolatie noodzakelijk is als je het DNA wilt bestuderen.
- Polymerase Chain Reaction (=Polymerase kettingreactie) (PCR) gebruikt wordt om een specifiek stukje op het DNA te vermeerderen om het te kunnen vergelijken of te gebruiken voor experimenten.
- Gelelektroforese, een techniek is om stukjes DNA na PCR zichtbaar te maken en te vergelijken op hoeveelheid en grootte. Ook kunnen leerlingen na de lesmodule zelf een gelelektroforese uitvoeren.

## ***Verantwoordelijkheid ABE leskist***

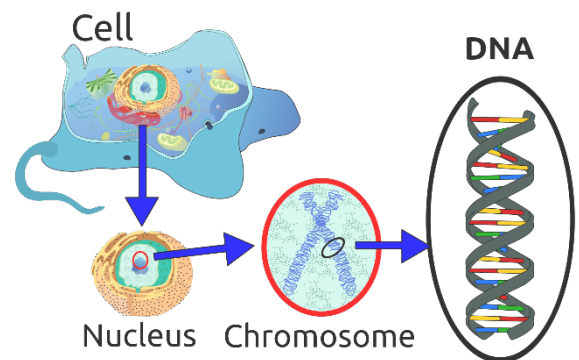
Middels ondertekening van het boekingsformulier verklaart de contactpersoon dat de leskist is meegenomen en dat de school vanaf dit moment verantwoordelijk is voor de kist en haar inhoud totdat zij is teruggebracht. Na inlevering van de leskist zal de inhoud worden gecontroleerd. Eventueel ontstane schade aan de kist en/of haar inhoud en/of vermissing van onderdelen uit de leskist welke wordt geconstateerd bij het controleren zal worden verhaald op de school. Mist de leskist materiaal mail dan direct naar [info@dnalabs.nl](mailto:info@dnalabs.nl). Reizende DNA-labs & ABE Nederland is niet verantwoordelijk voor letsel en/of schade voortkomend uit het gebruik van de materialen behorend bij de leskist. Gebruik van de leskistmaterialen geschiedt op eigen verantwoordelijkheid.



## Inleidende les: Proef je PTC?

De onderstaande theorie en pipetteoefening zijn de basis voor een inleidende les. Op de website staat een opzet voor een presentatie die hierbij gebruikt kan worden. Docenten mogen de presentatie naar eigen inzicht aanvullen en aanpassen. Naast klassikaal les, is het de bedoeling dat een deel van de theorie tijdens het practicum aan bod komt (onder andere over de PCR-techniek). In de tekst staan enkele (blauwgekleurde) vragen. Deze staan ook op een apart werkblad waardoor ze tijdens de presentatie behandeld kunnen worden, maar ook meegegeven kunnen worden als huiswerkopdracht.

In dit practicum gaan de leerlingen hun eigen DNA onderzoeken. DNA-onderzoek kent vele toepassingen, zo kan er onderzoek worden gedaan aan de hand van DNA naar (erfelijke) ziektes en wordt DNA gebruikt voor forensisch onderzoek. In dit practicum gaan de leerlingen hun eigen genotype bepalen voor het gen *TAS2R38*. Zij maken hierbij kennis met moleculaire technieken die op grote schaal worden toegepast in laboratoria over heel de wereld. Eerst wordt dit gen geamplificeerd met behulp van de **PCR** (polymerase chain reaction) techniek. Vervolgens worden de resultaten van de PCR gevisualiseerd door middel van **gelelektroforese**.



Afbeelding 1. Elke lichaamscel bevat DNA, wat georganiseerd is in chromosomen.

### Voorkennis

*Dit stuk theorie zou in een klassikale les kort genoemd kunnen worden ter herhaling.*

In elke levende cel zit DNA, zie afbeelding 1. Dit DNA komt bij verwante soorten sterk overeen, en binnen soorten lijkt het DNA van verschillende individuen sterk op elkaar. Toch zijn er ook verschillen tussen individuen binnen soorten. Jouw DNA zal niet 100% overeenkomen met dat van jouw buurman.

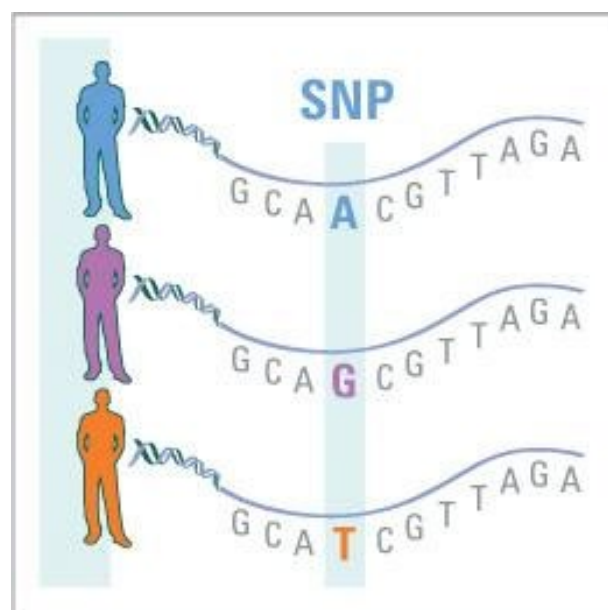
Je kan dit vergelijken met fenotypische verschillen, bijvoorbeeld oogkleur. Vaak zijn verschillen in genotype (DNA) juist waarneembaar in het fenotype, verschillende soorten oogkleur. Eigenschappen die binnen een populatie

variabel zijn, noemen we *polymorf*. Zo een eigenschap kan zijn oogkleur, maar op DNA-niveau: een gen. Een polymorf gen heeft dus meerdere varianten van dat gen. Die varianten worden *allelen* genoemd. Met behulp van de technieken die jullie vandaag ook gaan gebruiken, kan die variatie in genotype in kaart worden gebracht. Elk persoon heeft zijn eigen specifieke 'fingerprint'. Dit kent vele toepassingen.

Zo kan er aan de hand van DNA onderzoek gedaan worden naar erfelijke ziektes. Hier wordt bijvoorbeeld gezocht naar een allel dat verantwoordelijk is voor een bepaalde ziekte, en daarmee kunnen die ziektes prenataal worden gediagnosticeerd. Ook worden DNA-profielen gebruikt in forensisch onderzoek: als jouw DNA overeenkomt met het DNA-sporen op een plaats delict, dan heb je wat uit te leggen! Tot slot wordt DNA ook gebruikt voor verwantschapsonderzoek. Dit kan op het niveau van een stamboom van een ras, tot een evolutionaire stamboom waarin de afstamming van de mens of andere diersoorten in kaart wordt gebracht.

### **TAS2R38 gen**

Het *TAS2R38* gen codeert voor een smaakreceptor voor de organische, bittere verbinding PTC (Phenylthiocarbamide). Sommige mensen proeven PTC heel intens en anderen proeven helemaal niets. De smaakervaring van deze stof is genetisch bepaald op het gen *TAS2R38*. In dit gen zit een SNP (single nucleotide polymorphism), zie afbeelding 2. Dit betekent dat het verschil tussen iemand die wél bitter proeft en iemand die geen bitter proeft komt doordat er slechts één nucleotide anders is. Dit ene verschil in nucleotiden zorgt ervoor dat het aminozuur Valine wordt gevormd in plaats van Alanine (Ala785Val), met als gevolg een niet functionele smaakreceptor. Dit is dus het genotype van iemand die fenotypisch geen bitter proeft.



Afbeelding 2. Polymorfisme op DNA niveau binnen verschillende soorten, waarbij één nucleotide verschilt.

Dit gen komt tot expressie in de smaakreceptoren van de tong. Er zijn binnen de TAS2 receptoren 43 verschillende receptoren voor het proeven van bitter. *TAS2R38* is hier dus één van, en onder andere PTC bindt hieraan. Ook binden liganden uit bitter smakende groenten aan deze receptor. Door een conformatieverandering in de receptor wordt een signaaltransductie route in gang gezet wat zorgt voor een actiepotentiaal die de hersenen vertelt dat iets bitter smaakt. Vandaag gaan we kijken naar de SNP op het 785<sup>e</sup> basenpaar in

het DNA (zie afbeelding 3). Wanneer een leerling PTC heel bitter proeft, heeft het op die positie een cytosine nucleotide (C). Wanneer een leerling PTC juist niet bitter vindt smaken, zal de leerling op die positie een thymine nucleotide (T) hebben. Deze switch van maar één nucleotide zorgt voor een ander aminozuur, en daardoor een totaal ander fenotype (namelijk wel of niet bitter proeven).

```

CCTCACTTCACAGTCACAACCTGTGCTATTCATGAATAACAATACAAGGCTCAACT
GGCAGATTAAAGATCTCAATTTATTTTATTCCTTTCTCTTCTGCTATCTGTGGTC
TGTGCCTCCTTTCCTATTGTTTCTGGTTTCTTCTGGGATGCTGACTGTCTCCCTG
GGAAGGCACATGAGGACAATGAAGGTCTATACCAGAAACTCTCGTGACCCCAGCC
TGGAGGCCACATTAAAGCCCTCAAGTCTCTTGTCTCCTTTTTCTGCTTCTTTGT
GATATCATCCTGTGCTGCCTTCATCTCTGTGCCCTACTGATTCTGTGGCGCGAC
785
T
AAATAGGGGTGATGGTTTGTGTTGGGATAATGGCAGCTTGTCCCTCTGGGCATG

```

Afbeelding 3. DNA-sequentie van het TAS2R38 gen. De groene en rode stukken zijn de fragmenten waar onze primers aan hechten in de PCR: het stuk ertussen wordt dus geamplificeerd. Op positie 785 staat de SNP waar we naar kijken aangegeven.

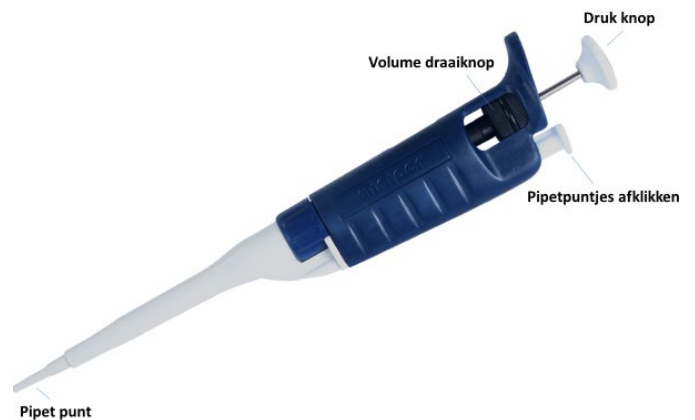
## Pipetteoefeningen

*Dit kan tijdens de inleidende les of vooraf het practicum. Zie oefeningen op bladzijde 27.*

Hoe werkt een micropipet, zie afbeelding 4:

1. Draai met de zwarte volume draaiknop naar de gewenste volume, zie ook afbeelding 5.
2. Draai nooit verder dan het bereik van de micropipet. Het bereik staat op de drukknoop.
3. Steek de punt van de micropipet op een pipetpuntje.
4. Druk de drukknoop aan de bovenzijde van de pipet in tot de eerste stop en voel de weerstand, dit is de eerste stop.
5. Wanneer je nog harder drukt, voel je de tweede stop.
6. Laat de knop weer los en druk tot de eerste stop. Houdt de pipetpunt in de vloeistof en laat de knop rustig los zodat de vloeistof wordt opgezogen door de punt (zonder luchtbellen).
7. Breng de vloeistof over naar een ander epje door de pipetpunt tegen de wand van het epje te houden en de drukknoop tot de eerste stop, druk vervolgens de knop in tot de tweede stop om de vloeistof uit de pipetpunt in het epje te brengen.
8. Verwijder de pipet uit het epje en laat dan pas de drukknoop los, dit om te voorkomen dat de vloeistof opnieuw wordt opgezogen.

De kleinere knop aan de zijkant (afb. 'pipetpuntjes afklikken') wordt gebruikt om de pipetpunt van pipet af te klikken.



*Afbeelding 4. De micropipet met de verschillende knoppen (miniPCR).*

**⚡ Het is van groot belang om voor elke pipetteerstap een nieuw pipetpuntje te gebruiken om contaminatie te voorkomen! ⚡**

## Virtueel pipetteeroefening - LabXchange

Leerlingen kunnen thuis via de website van [labxchange.org](https://www.labxchange.org) een virtueel pipetteeroefening uitvoeren.

Via een gratis account kunnen docenten en leerlingen deze klas:

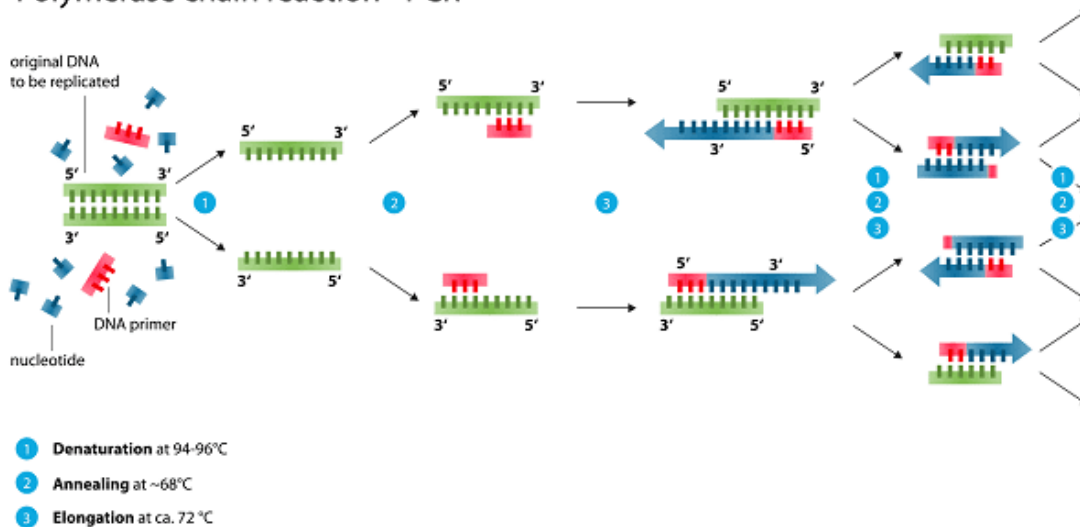
[https://www.labxchange.org/classes/22525967-d134-4e62-ad4d-](https://www.labxchange.org/classes/22525967-d134-4e62-ad4d-b52e4cfda6bc)

[b52e4cfda6bc](https://www.labxchange.org/classes/22525967-d134-4e62-ad4d-b52e4cfda6bc) (class code: BD8068) doorlopen. Deze klas kan ook eigen gemaakt worden, zodat de docent eventueel nog opdrachten kan toevoegen en hiermee controleren of alle leerlingen deze stappen heeft doorlopen.

Vergeet niet uw leerlingen toestemming te geven tot uw klas.

**LabXchange** is een gratis platform met allerlei tools rondom biotechnologie die je in kan zetten in je lessen. Denk hierbij aan simulaties, instructievideo's, virtuele practica en interactieve werkvormen. Zo kunnen leerlingen oefenen met een virtueel PCR lab of een gelelectroforese aflezen als voorkennis voor de ABE leskist: 'Proef je PTC'. Voor de hele klas, maar LabXchange is ook geschikt voor leerlingen die extra ondersteuning of verrijking nodig hebben, of een PWS rondom biotechnologie doen.

## Polymerase chain reaction - PCR



Afbeelding 6. Polymerasekettingreactie. Specifieke primers hechten aan je DNA waardoor de stukken tussen de primers gerepliceerd worden (bron: Routes to Finance).

### PCR: polymerase chain reaction

Deze theorie kan ofwel geheel van te voren behandeld worden, ofwel kort bij de inleidende les en dieper tijdens de wachtstappen van het practicum (na het inzetten van de PCR op 94 °C kan uitgelegd worden / gevraagd worden waarom deze temperatuur wordt gebruikt).

Afbeelding 6 laat schematisch hierboven zien hoe de PCR-techniek in zijn werk gaat. Tijdens de denaturatie stap wordt het dubbelstrengs DNA gesmolten op 94 °C, waardoor het dubbelstrengs DNA uit elkaar valt en enkelstrengs DNA wordt. De waterstofbruggen tussen de basen worden verbroken.

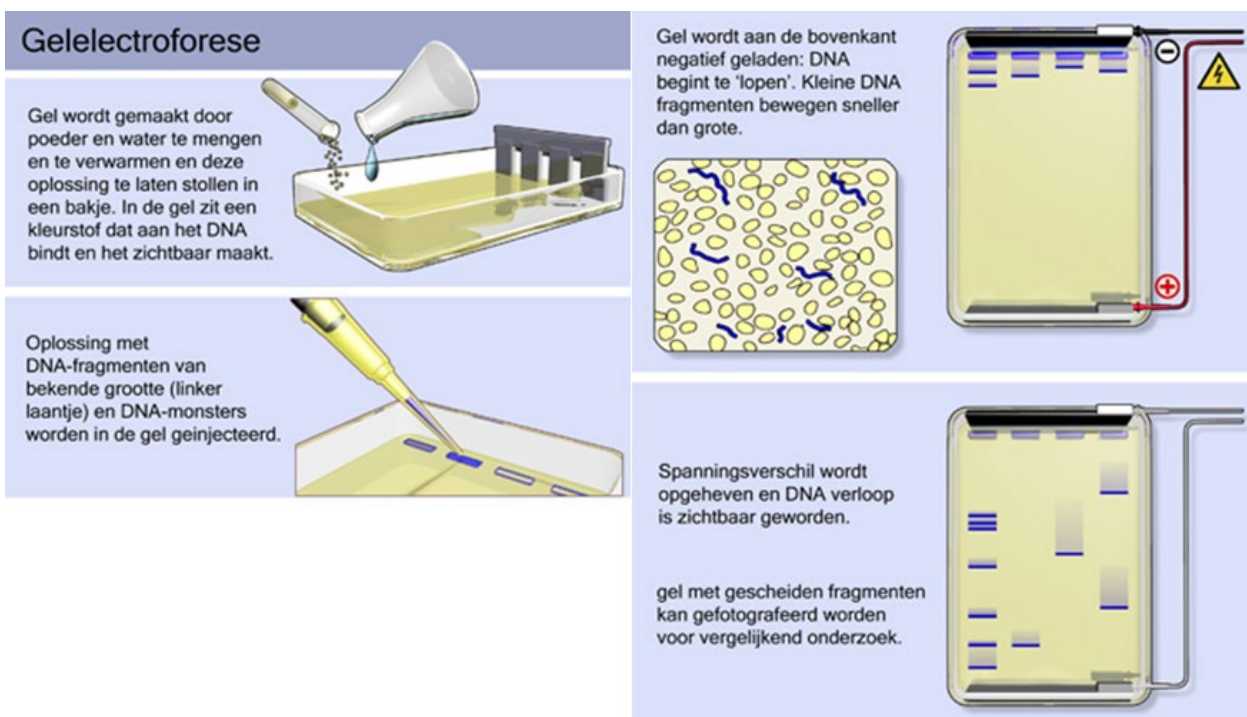
Vervolgens hechten RNA-primers aan het DNA. De primers zijn *specifiek* voor ons stuk DNA gemaakt, waardoor uiteindelijk alleen het stukje met de veranderde nucleotide gekopieerd wordt. Dit komt doordat de primers complementair zijn aan dat specifieke stukje DNA.

Het maken van de nieuwe stukken DNA gebeurt door middel van het enzym Taq-polymerase. Dit enzym is afkomstig uit de bacterie *Thermophilus aquaticus*. PCR verdubbelt elke cyclus de DNA-regio waarin je geïnteresseerd bent. Het is een exponentieel proces. Deze reactie vindt plaats in een PCR apparaat die ervoor zorgt dat de temperatuur steeds optimaal is voor de verschillende reacties.

### Mogelijke vragen tijdens een klassikale les:

- **Waar staat de afkorting PCR voor?**
  - Polymerase chain reaction, in het Nederlands: polymerase kettingreactie.
- **Waarom denatureert DNA op 94 °C?**
  - Verbreken van de waterstofbruggen tussen de basen (tussen C en G zijn er drie waterstofbruggen en tussen A en T twee waterstofbruggen).
- **Waarom voeg je 2 verschillende primers toe?**
  - Omdat de ene primer codeert voor de 3' kant van het te amplificeren DNA, en de andere voor de 5' kant.
- **Wat heb je allemaal nodig om een PCR uit te voeren?**
  - DNA, primers, vrije nucleotiden en Taq polymerase in een buffer.
- **Wat is het uiteindelijke doel van PCR?**
  - Het exponentieel amplificeren (kopiëren van het DNA) van een specifiek stukje DNA.

## Gelelektroforese



Figuur SEQ Figuur \\* ARABIC 7: Verschillende stappen van de gel-elektroforese.

Na de PCR kunnen de DNA-fragmenten zichtbaar worden gemaakt op een gel. Een gel is gemaakt van onder andere agarose. Dit is een polysacharide, gewonnen uit zeewier. De gel wordt geplaatst in een waterige omgeving (TBE buffer), die dus elektriciteit geleidt. DNA is negatief geladen, dus wanneer we DNA-fragmenten in de gel aanbrengen, zullen deze worden aangetrokken door de positieve kant van de stroomkring. DNA ondervindt weerstand van de

polysacharide matrix van agarose. Hoe groter het DNA-fragment, hoe langzamer het zich door de matrix heen beweegt. De fragmenten worden dus gescheiden op grootte. Na een half uurtje kan de gel worden bekeken met UV licht waaronder DNA oplicht.

*Mogelijke vragen tijdens een klassikale les:*

- *Welk deel van DNA is negatief geladen?*
  - *Fosfaatgroep van de backbone.*
- *Wat gebeurt er als je de spanningsbron te lang (bijvoorbeeld 3 uur) aan laat staan?*
  - *Dan loopt het DNA van de gel af de buffer in.*
- *Welke DNA-fragmenten zullen eerder beneden zijn, kortere of langere DNA-fragmenten?*
  - *Kortere moleculen, omdat kleinere moleculen sneller zullen bewegen en minder weerstand ondervinden.*



## Restrictie digestie

Om het genotype te kunnen bepalen, maken we gebruik van een RFLP (restriction fragment length polymorphism) analyse. Nadat we het fragment hebben geamplificeerd, voegen we het restrictie-enzym *Fnu4H1* toe. Dit enzym knipt DNA op de sequentie: 5' – G $\mathbf{C}$ NGC – 3'. Dit is dus het genotype van de *taster*. Een *non-taster* heeft op die positie 5' – G $\mathbf{T}$ NGC – 3'. Wanneer het enzym knipt, hebben we dus meerdere fragmenten van verschillende lengtes, in tegenstelling tot wanneer het enzym niet knipt. Deze verschillen kunnen we zichtbaar maken op gel. Aan het eind van de dag krijgen jullie ook een smaakpapiertje met geconcentreerd PTC erop om te bepalen of je genotype overeenkomt met je fenotype!

*Mogelijke vragen tijdens een klassikale les:*

- De kinderen van twee heterozygote ouders kunnen verschillende genotypes hebben. Welke genotypen zijn er mogelijk? Welk fenotype hoort daarbij? Vul de tabel in. De hoofdletter T staat voor proever, de kleine letter t staat voor niet-proever.*

	Ouder 1	
Ouder 2	T	t
T	TT: proever	Tt: heterozygoot
t	Tt: heterozygoot	tt: niet-proever

- Geef een voorspelling van het bandenpatroon voor homozygoten (taster/taster en non-taster/non-taster) en heterozygoot (taster/non-taster) (het antwoord staat op de volgende pagina).*

## Antwoorden werkblad

Het werkblad staat in de bijlage. Deze kan uitgedeeld worden aan de leerlingen.

### PCR

1. Waar staat de afkorting PCR voor?
  - a. Polymerase chain reaction, in het Nederlands: polymerase kettingreactie.
2. Waarom denatureert DNA op 94 °C?
  - a. Verbreken van de waterstofbruggen tussen de basen (tussen C en G zijn er drie waterstofbruggen en tussen A en T twee waterstofbruggen).
3. Waarom voeg je 2 verschillende primers toe?
  - a. Omdat de ene primer codeert voor de 3' kant van het te amplificeren DNA, en de andere voor de 5' kant.
4. Wat heb je allemaal nodig om een PCR uit te voeren?
  - a. DNA, primers, vrije nucleotiden en Taq polymerase in een buffer.
5. Wat is het uiteindelijke doel van PCR?
  - a. Het exponentieel amplificeren (kopiëren van het DNA) van een specifiek stukje DNA.

### Gelelektroforese

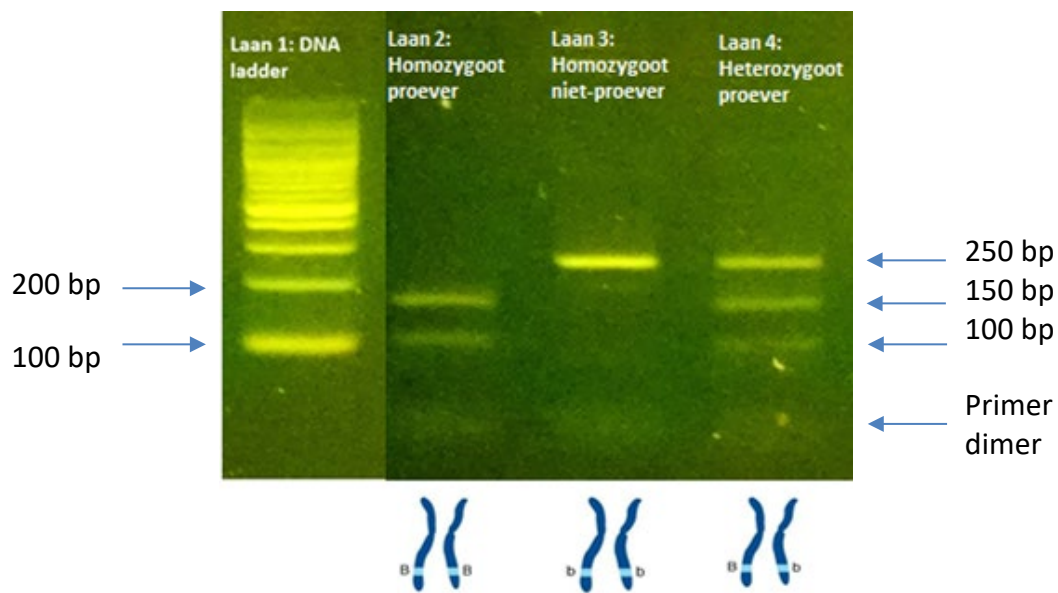
6. Welk deel van DNA is negatief geladen?
  - a. Fosfaatgroep van de backbone.
7. Wat gebeurt er als je de spanningsbron te lang (bijvoorbeeld 3 uur) aan laat staan?
  - a. Dan loopt het DNA van de gel af de buffer in.
8. Welke DNA-fragmenten zullen eerder beneden zijn, kortere of langere DNA-fragmenten?
  - a. Kortere moleculen, omdat kleinere moleculen sneller zullen bewegen en minder weerstand ondervinden.

## Restrictie digestie

9. De kinderen van twee heterozygote ouders kunnen verschillende genotypes hebben. Welke genotypen zijn er mogelijk? Welk fenotype hoort daarbij? Vul de tabel in. De hoofdletter *T* staat voor proever, de kleine letter *t* staat voor niet-proever.

	Ouder 1	
Ouder 2	<i>T</i>	<i>t</i>
<i>T</i>	<i>TT</i> : proever	<i>Tt</i> : heterozygoot
<i>t</i>	<i>Tt</i> : heterozygoot	<i>tt</i> : niet-proever

10. Geef een voorspelling van het bandenpatroon voor homozygoten (proever/proever en niet-proever/niet-proever) en heterozygoot (proever/niet-proever).



a.

De verwachte bandjes na de elektroforese. De hogere bandjes zijn bijvoorbeeld grotere DNA-fragmenten, welke dus niet geknipt zijn door het restrictie-enzym. Deze bandjes horen bij een niet-proever (laan 3 en deels laan 4).

# Vooraf het practicum

## Materialenlijst

Aanwezig in de ABE leskist (3)	
Item	stuks
Microcentrifuge + opzet stukje voor PCR- en 1,5mL-epjes + kabel	1
PCR machine + kabel	4
Gelelektroforese systeem + kabel	4
Micropipet 0,5-10 $\mu$ L	1
Micropipet 2-20 $\mu$ L	16
Micropipet 20-200 $\mu$ L	16
Micropipet 100-1000 $\mu$ L	1
Watervaste pennen	4
Gel-giet-bakjes + kammetjes	4
Epjeshouder	16
MiniPCR PTC-lab kit voor 32 leerlingen + 3 positieve controles (TT, Tt, tt)	1
Tandenstokers	100
PTC-papiertjes	100
Box met pipetpuntjes 0,5-10 $\mu$ L	1
Box met pipetpuntjes 2-200 $\mu$ L	4-6
Box met pipetpuntjes 50-1000 $\mu$ L	1
kabel voor aansluiting laptop/pc	2-4
Schoonmaakdoekjes + spray voor condens GE	1-4
Herbruikbare siliconen gelletjes	16
Mini-koeler -20°C (bij aankomst in de vriezer bewaren)	1

Aanwezig op school	
Item	stuks
Magnetron, waterbad (min. 88 graden) of kookplaat	1
Veiligheidsbrillen	1 of 4
Handschoenen/tang	1 of 4
Prullenbakjes en bakjes voor ijs	16
Erlenmeyer 100 of 250 mL	1 of 4
Maatcilinders 25, 50 en/of 100 mL	1 of 4
Pipetteoefeningen: Ranja, voedingskleurvloeistof en keukenzout	-
Glazen afsluitbare fles 1 L of iets soortgelijks	1
Petrischaaltjes of iets soortgelijks	Max. 16
Optioneel: magneetroerder en roervlo	1
Optioneel: agar (25 mL per petrischaal)	Max. 400 ml

## MiniPCR

De miniPCR is, zoals de naam al doet vermoeden, is een PCR-apparaatje in het klein, zie afbeelding 8. De miniPCR kan opengemaakt worden door de twee knoppen aan de zijkant in te drukken. Er zijn zestien plekjes per miniPCR, voor zestien PCR-epjes. De miniPCR kan m.b.v. de witte kabel aangesloten worden op een pc/laptop. De miniPCR kan ook worden aangesloten op een mobiele telefoon. Dit werkt het best met **Bluetooth, zie hieronder**. Om de miniPCR te kunnen gebruiken, dien je voor de laptop of telefoon de miniPCR applicatie gedownload te hebben. Deze is gratis te vinden op de Google Play/App store (voor de telefoon) of op de miniPCR site (<https://www.minipcr.com/products/apps/>).



Afbeelding 8: Het miniPCR apparaatje (miniPCR).

Op de applicatie kan ingegeven worden hoe lang en op welke temperatuur er geïncubeerd kan worden. Ook kan een PCR-protocol ingevoerd worden (zie de screenshots in het protocol). Wanneer het PCR-protocol is gestart kan de telefoon of laptop weer worden afgekoppeld van de miniPCR, die dan wel doorgaat. De volledige gebruiksaanwijzing kun je hier vinden: [https://www.minipcr.com/wp-content/uploads/MiniPCR\\_Instruction\\_Manual\\_Revised\\_7.pdf](https://www.minipcr.com/wp-content/uploads/MiniPCR_Instruction_Manual_Revised_7.pdf) Meerdere miniPCR apparaten kunnen aangesloten worden aan één computer, laptop of telefoon. Let wel op het serienummer voor het instellen van de juiste miniPCR.



Afbeelding 9: De uitleg van de led-lichtjes op de miniPCR.

## Hoe maak je met de MiniPCR verbinding met je telefoon:

1. Download de miniPCR app.
2. Zet Bluetooth van je telefoon aan.
3. Druk het knopje van de miniPCR apparaat op ON.
4. Druk op het miniPCR icoontje (groen omcirkeld) in de app, zie foto 1.
5. Je telefoon vindt de beschikbare miniPCR's in de app, zie foto 2.
6. Controleer of de juiste miniPCR zichtbaar is, door naar het serienummer te kijken, rood omcirkeld.
7. Druk op het Bluetooth icoontje (groen omcirkeld) om verbinding te maken, zie foto 2.
8. Als het gelukt is staat er CONNECTED (rood omcirkeld), zie foto 3.
9. Zorg dat de Auto start op OFF staat, zie foto 3.
10. Wanneer je terug gaat door op het logo van MiniPCR (blauw omcirkeld) te drukken dan kom je weer op het scherm van foto 1.
11. M.b.v. het plusje (rood omcirkeld in foto 1) kan je een protocol starten.
12. Soms wordt er geen verbinding gemaakt of kan er geen miniPCR gevonden worden. Sluit de app af en start hem opnieuw op.

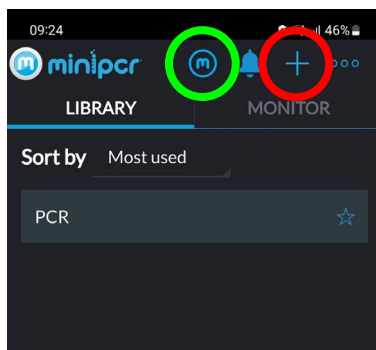


Foto 1.

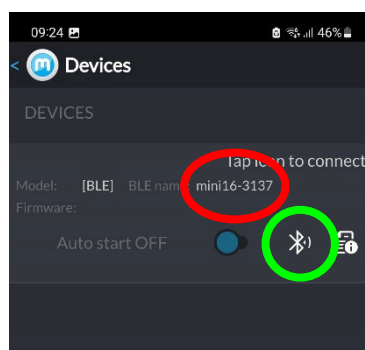


Foto 2.

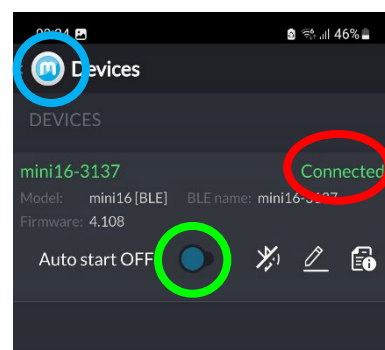
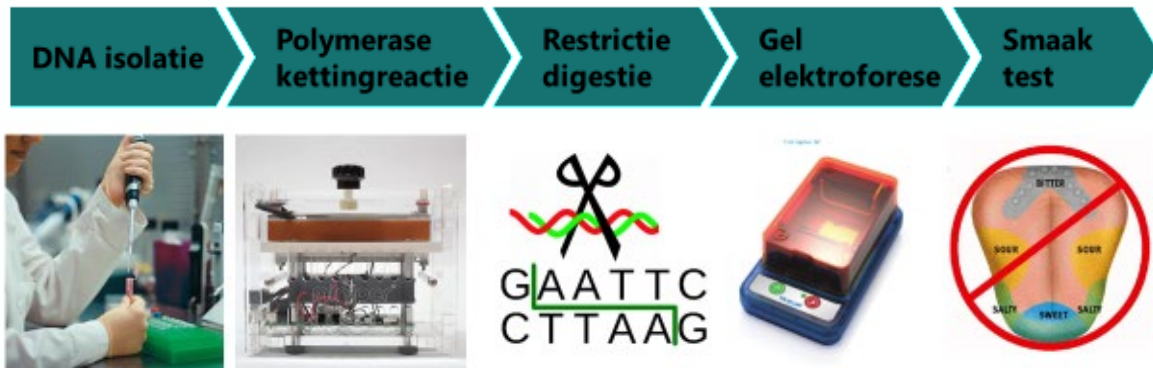


Foto 3.

## Voorbereidingen

Onderstaand zijn voornamelijk voorbereidingen en tips voor tijdens het practicum. Hierna volgt het practicumprotocol.



1. Pipetteoefening: oefengels voorgieten en gekleurde pipetteervloeistof (zout en kleurstof) maken
2. **DNA-isolatie** – Reagentia afdraaien en uitpipetteren
3. **Polymerasekettingreactie (Polymerase chain reaction / PCR)** – uitpipetteren
4. **Restrictie digestie**
5. **Gelelektroforese** – TBE buffer voorbereiden en eventueel gels voorgieten
6. **Smaaktest**

### Algemeen

De leerlingen werken in tweetallen. De groepjes bestaan uit maximaal 8 leerlingen. Dit betekent dat ze samen één PCR, een gelelektroforese systeem, marker en pipetpuntjes delen. Voor de gehele klas is er één microcentrifuge, daarom is het handig om deze op een centrale plek in het practicumlokaal te zetten. Laat de leerlingen een labjournaal behouden. Voor elk tweetal staat het volgende klaar: micropipet 2-20  $\mu\text{L}$ , micropipet 20-200  $\mu\text{L}$ , prullenbakje, rekje voor epjes en bakje met ijs (alleen bij restrictie digestie).

**Voor het gebruik alle reagentia (X-Tract™ DNA extraction buffer (twee epjes), 2X EZ PCR Master Mix, Load-Ready™, PTC Lab Primer Mix, 2X concentrate, Restriction Enzyme Fnu4HI, 100 bp DNA ladder Load-Ready™) eerst kort afdraaien in de minicentrifuge zodat de inhoud onder in de epjes zit. Bijvoorbeeld bij aankomst school. Zet ook wanneer niet nodig de minikoeler in de vriezer.**

### Stap 1: Pipetteoefeningen

Voor de eerste pipetteoefening kan er gebruik gemaakt worden van ranja of voedingskleurstof in water. Voor de tweede pipetteoefening is een gekleurde vloeistof met een hogere dichtheid nodig, zodat de vloeistof in de slotjes zakt.

1. Los in 100 mL water 10% keukenzout op.

2. Voeg hier een druppel voedingskleurstof aan toe (te kopen in de supermarkt).

### **Stap 2: DNA-isolatie**

In deze stap gaan leerlingen al pipetteren. Het is belangrijk dat de leerlingen vooraf de pipetteoefening hebben gehad. Benadruk dat de leerlingen bij het pipetteren een pipetpuntje gebruiken, en bij elke stap een nieuw puntje pakken!

- **Pipetteer per groepje van acht leerlingen 400  $\mu$ L (of per leerling 50  $\mu$ L) DNA-extractiebuffer in een 1,5 mL epje.**

Zorg dat ze écht goed labelen zowel op de dop als op de zijkant, want de epjes komen met zijn allen in de microcentrifuge dus ze moeten hem terug kunnen vinden! Dit kan (bij voorkeur) door de leerlingen te nummeren: bijvoorbeeld PCR machine A, leerling 1 – 8 of initialen van leerlingen. Controleer ook of de epjes geen luchtballen bevatten.

### **Stap 3: PCR**

- **Pipetteer per groepje van acht leerlingen 100  $\mu$ L (of per leerling 12,5  $\mu$ L) PTC-primermix in een 1,5 mL epje.**
- **Pipetteer daarnaast ook per groepje van acht leerlingen 100  $\mu$ L (of per leerling 12,5  $\mu$ L) PCR-mastermix in een 1,5 mL epje.**

Controleer weer of de epjes geen luchtballen bevatten. Luchtballen wegtikken en kort centrifugeren.

De PCR duurt zo'n 75 minuten. Als de PCR-apparaten eenmaal draaien kunnen de laptops/telefoons ontkoppeld worden. Als de PCR klaar is zullen alle ledlampjes constant branden (zie hoofdstuk MiniPCR).



**Het is een logische stap om hier het practicum te stoppen en later te vervolgen.**

Na het afronden van de PCR kunnen de samples in de koelkast worden bewaard als de volgende dag het practicum wordt voortgezet. De samples moeten in de vriezer worden bewaard als dit langer dan een dag duurt.

### **Stap 4: Restrictie digestie**

Het restrictie-enzym is erg gevoelig dus het epje **te allen tijde op ijs of in de minikoeler houden**. Daarnaast gaat het om een kleine concentratie, namelijk 1  $\mu$ L. Draai het epje eerst af in de microcentrifuge. Daarnaast is er ook maar één pipet voor dit volume.



**Voeg zelf bij elke leerling 1  $\mu$ L restrictie-enzym toe. Het is belangrijk dat de docent dit doet! Pas op dat u niet door de weerstand heen duwt. Er is namelijk precies genoeg restrictie enzym voor 32 leerlingen.**



### **Stap 5: Gelelektroforese**

Je kan zelf kiezen of je de gel vooraf al maakt en giet, of dat je dat de leerlingen tijdens het practicum laat doen.

Vooraf:

TBE buffer:

1. Geconcentreerde TBE buffer poeder oplossen in 600 mL demi water, zodat er een oplossing ontstaat van 1x TBE buffer.
2. Schud de vloeistof 10-15 minuten. Gebruik daarbij eventueel een magnetische roerder met roervlo. Het geeft niet als kleine hoeveelheden poeder niet oplossen.
3. Bewaar de 1x TBE buffer in een glazen afsluitbare fles. Dit is 3 maanden te bewaren.

Gel gieten:

1. Bereid eventueel voor elk groepje een 2% agarose gel voor.
2. Los voor 1 gel 1 capsule GelGreen® Agarose Tabs™ op in 20 mL demi water.
3. Zwenk de erlenmeyer zodat de reagentia goed mixen.
4. Verhit de reagentia in een magnetron, waterbad of op de kookplaat totdat de agarose poeder is opgelost en de oplossing helder oogt. Hoe helderder, hoe beter de DNA fragment af te lezen zijn.



**Let op: wanneer er per gel wordt verhit, kookt de vloeistof al na enkele seconde.**

5. Pas op, de oplossing is erg heet. Pak de erlenmeyer met een handschoen en veiligheidsbril op.
6. Laat de oplossing afkoelen totdat de erlenmeyer met de handwarm is.
7. Giet de oplossing in de gel-giet-bak met kammetje voor 13 slotjes.
  - a. **Let op** dat de hoeveelheid goed verdeeld wordt bij het gieten van meerdere gels tegelijk.
8. De GelGreen® Agarose Tabs bevatten al kleuring voor het DNA. Gelgreen is een veilige gelkleuring. Deze is niet giftig.
9. Laat het kammetje zitten totdat de gel hard is.
10. Verwijder voorzichtig het kammetje.
11. Stop de gel in de gelelektroforese bak en vul de bak aan met niet meer dan 25 mL 1x TBE elektroforese buffer.
12. Gels die van tevoren gemaakt worden kunnen, maximaal een week, het best in huishoudfolie gewikkeld in het donker in de koelkast bewaard worden.

Graag al het biologisch materiaal weggooien en de daarvoor bedoelde prullenbak in het practicumlokaal.

#### Gel inzetten:

Laat leerlingen per groepje een schema maken wie in welk slotje zijn samples pipetteert. Er kan bijvoorbeeld gekozen worden om in slotje 1 de DNA ladder te pipetteren, maar ook in slotje 7, zodat het precies in het midden zit.

Wanneer er ruimte genoeg is kan er gekozen worden om het ongeknijpte (MIN) en het geknijpte sample (PLUS) op de gel te laden.

Er worden ook in totaal drie positieve controles (TT, Tt en tt) meegegeven. Die kunnen op een gel meegenomen worden, wanneer daar ruimte voor is.

#### Gel bekijken:

Met behulp van het gloeilamp icoontje kan je het lichtje van de Bluegel aanzetten, hiermee worden de DNA fragmentjes zichtbaar. De gel is goed zichtbaar met een doka om de Bluegel. Op de doka kan je ook je telefoon leggen zodat er gemakkelijk een foto van de gel gemaakt kan worden.

#### **Stap 6: Smaaktest**

Deel tijdens de run van de gel de smaaktest uit. En laat de leerlingen tegelijk de smaak ervaren, zodat dit klassikaal besproken kan worden.

Nadat de gel klaar is, kan er vergeleken worden of het genotype overeenkomt met het fenotype.

## **Opruimen**

Graag alle materialen op de juiste plek plaatsen in de leskist. Er zit een geplastificeerde inhoudsbeschrijving bij.

Let op: De snoeren van de miniPCR's en gelelektroforeses graag oprollen, maar niet om de oplader zelf.

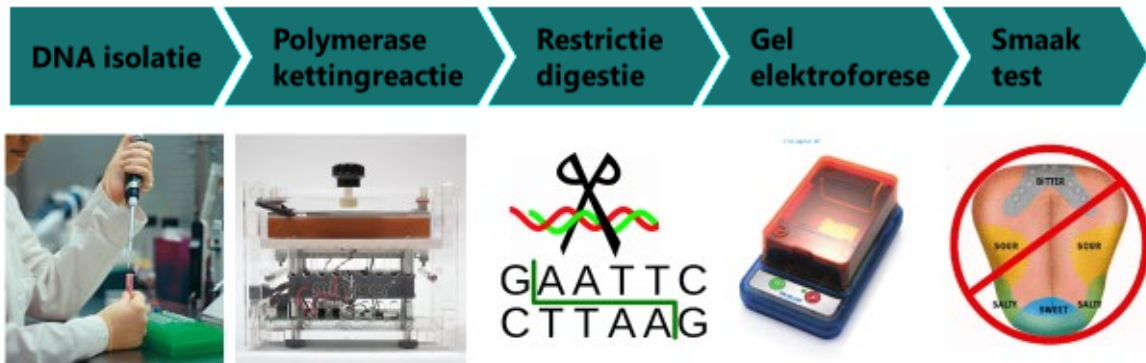
Ongebruikte reagentia en consumables graag terug meegeven als ze ook niet meer op school gebruikt worden. Graag de reagentia dan gekoeld in de minikoeler meegeven.

## Docentenprotocol

Dit is het leerlingenprotocol met een aantal toevoegingen om op te letten. Deze aandachtspunten staan hierboven ook deels al beschreven.

### Globale proefopzet

Dit practicum bestaat uit 6 delen:



1. Pipetteoefening – tijdens de inleidende les of vooraf het practicum
2. **DNA-isolatie** – Neem je eigen DNA af met behulp van een tandenstoker (*25 min*).
3. **Polymerasekettingreactie (Polymerase chain reaction / PCR)** – Specifieke DNA-fragmenten worden vermeerderd (*opzet 10 minuten, PCR 75 minuten*).
4. **Restrictie digestie** – Het knippen van DNA met een restrictie-enzym (*opzet 10 minuten, restrictie 15 minuten*).
5. **Gel-elektroforese** – De (ongeknipte en) geknipte DNA-fragmenten van elkaar scheiden en zichtbaar maken (*opzetten 20 minuten, runnen van de gel 30 minuten*).
6. **Smaaktest** – Proef jij PTC? (*10 minuten*)

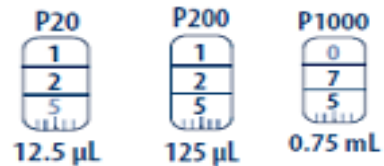
## Stap 1: Pipetteoefeningen

### Pipetteoefening 1:

#### Benodigheden:

- ranja of voedingskleurvloeistof in meerdere kleuren
- 1,5 ml epjes
- micropipetten 20-200  $\mu\text{L}$
- pipetpunten 2-200  $\mu\text{L}$
- rekje
- afvalbakje

1. Gebruik de pipet van 20-200  $\mu\text{L}$ .
2. Draai je pipet naar 75  $\mu\text{L}$ .
3. Druk een pipetpunt op je pipet.
4. Pipetteer 75  $\mu\text{L}$  blauwe vloeistof over naar een 1.5 mL epje.
5. Klik de pipetpunt af in het afvalbakje.
6. Draai je pipet naar 50  $\mu\text{L}$ .
7. Druk een pipetpunt op je pipet.
8. Pipetteer daarna 50  $\mu\text{L}$  gele vloeistof erbij.
9. Meng dit mengsel door op en neer te pipetteren tot het mengsel groen van kleur is.
10. Klik de pipetpunt af in het afvalbakje.
11. Draai je pipet 125  $\mu\text{L}$ .
12. Druk een pipetpunt op je pipet.
13. Pipetteer dit mengsel (125  $\mu\text{L}$ ) nu weer op: als je correct hebt gepipetteerd zou het precies uit moeten komen.
14. Oefen ook met kleinere hoeveelheden met de 2-20  $\mu\text{L}$  pipet: pipetteer 7  $\mu\text{L}$  blauw in een nieuw epje. Pipetteer daarna 3  $\mu\text{L}$  geel erbij. Let erop dat je de goede pipet gebruikt!



Afbeelding 5. De displays van de drie verschillende pipetten. Let op de verschillen! Met de volume draaiknop kan het volume van de pipet veranderd worden.

**⚡ Let op! Draai nooit minder of meer dan het aangegeven volume van de pipet. Hierdoor wordt de pipet onbetrouwbaar. ⚡**

## Pipetteoefening 2

Deze pipetteoefening kan gedaan worden met de siliconen oefengels in de leskist of door zelf oefengels met agar te maken. De siliconen oefengels zijn herbruikbaar, maar wel een stuk steviger dan agarose gels. De siliconen oefengels na gebruik afspoelen en goed afdrogen.

Deze oefening kan ook gedaan worden in een wachtstap, bijvoorbeeld tijdens de PCR of uitharden gel.

### Benodigheden:

- micropipetten 2-20  $\mu\text{L}$
- pipetpunten 2-200  $\mu\text{L}$
- herbruikbare siliconen gelletjes of zelf **vooraf** gegoten gelletjes met alleen agar
- petrischaaltjes of bakjes
- afvalbakjes
- gekleurde vloeistof met hogere dichtheid (**vooraf maken**):

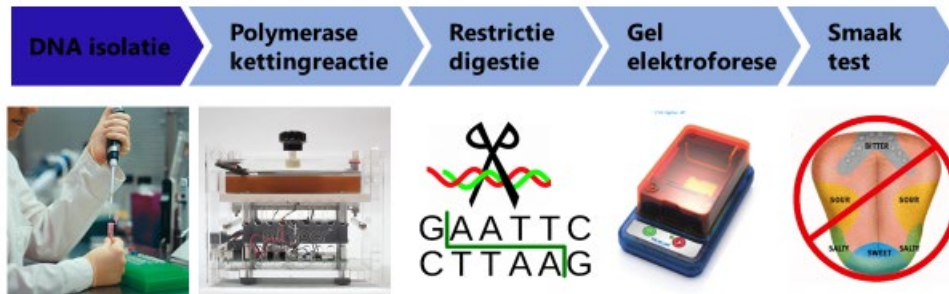
Recept pipetteervloeistof: Deze vloeistof moet een hogere dichtheid hebben t.o.v. water zodat de vloeistof in de welletjes van de gel zakt. Maak voor een vloeistof met kleur 100 mL water en 10% keukenzout oplossing. Voeg hier een druppel voedingskleurstof aan toe (te kopen in de supermarkt).

1. Geef ieder duo een petrischaaltje met herbruikbare siliconen gelletje of vooraf gegoten agar gel en giet er wat water in zodat de slotjes onder water staan.
2. Indien nodig, deel zwart A4 papier uit zodat de slotjes goed te zien zijn.
3. Geef ieder duo een epje met vooraf gemaakt gekleurde pipetteervloeistof.
4. Laat de leerlingen eerst met een pipet met pipetpunt voelen hoe gevoelig een slotje is. Laat ze bijvoorbeeld voelen tot wanneer je bijna het slotje doorprijkt. *De siliconen gels zijn wat harder waardoor de slotjes niet doorgeprijkt kunnen worden met een pipetpunt, de randen kunnen wel duidelijk gevoeld worden.*
5. Gebruik de pipet van 2-20  $\mu\text{L}$ .
6. Draai je pipet naar het juiste volume: 10  $\mu\text{L}$ .
7. Pipetteer 10  $\mu\text{L}$  gekleurde vloeistof in het slotje. Ondersteun de pipet met je niet-pipetterende hand, zoals op de foto hiernaast.
8. Voel met je pipetpunt waar de zijkanten van het slotje zitten en druk niet door de gel heen. Doordat de pipeteervloeistof hoger in dichtheid is, zakt de vloeistof zelf mooi in het slotje. Boven een slotje hangen met de pipetpunt is dus voldoende.
9. Oefen door nog in een paar slotjes te pipetteren tot je het onder de knie hebt.



## Stap 2: DNA-isolatie

Het is verstandig om de leerlingen voor de DNA-isolatie al geoefend te laten hebben met pipetteren. Benadruk nogmaals dat de leerlingen voor elke stap een nieuw puntje moeten pakken (om contaminatie te voorkomen).



1) *Vorbereiding:* zet je persoonlijke code **duidelijk** met een watervaste stift op de **deksel en op de zijkant** van een epje.

Zorg ervoor dat de leerlingen goed labelen door bijvoorbeeld de leerlingen te nummeren: bijvoorbeeld PCR machine A, leerling 1 – 8 en de leerlingen ook de epjes altijd bij het corresponderende nummer te laten plaatsen in de PCR-machine.

2) Download voor je telefoon/computer/laptop de juiste app via <https://www.minipcr.com/products/apps/>.

3) Maak verbinding met je telefoon en de juiste miniPCR, zie stappen op bladzijde: 24

4) Pipetteer 50 µL X-tract DNA-extractiebuffer in het PCR-epje.

5) Spoel je mond met kraanwater, indien nodig

6) Wrijf met de tandenstoker met de brede kant minimaal vijf keer langs de binnenkant van beide wangen. Het zou geen pijn moeten doen! Een klein beetje speeksel is ook prima, maar niet te veel!

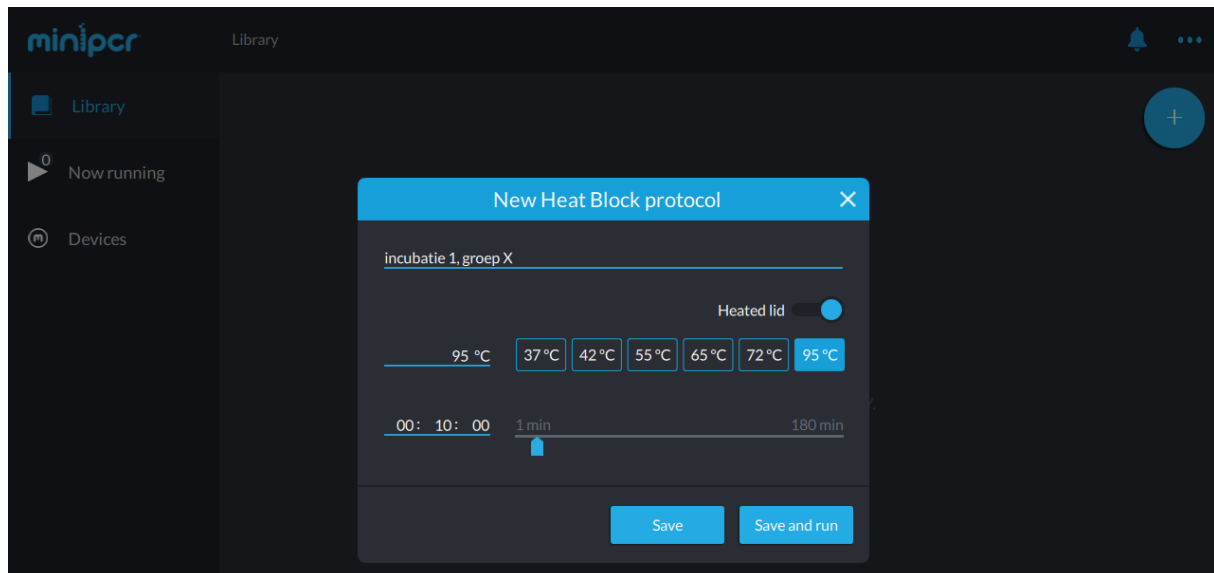
**Zorg ervoor dat de leerlingen dit goed uitvoeren. Deze stap is van groot belang voor het verkrijgen van goede resultaten.**

7) Plaats de tandenstoker in je epje met de DNA-extractiebuffer.

8) Draai de tandenstoker goed in het rond, zodat zoveel mogelijk wangslimvliescellen in de oplossing komen. Haal de tandenstoker er vervolgens uit en sluit het epje. Je kan de tandenstoker weggooien.

9) Incubeer het epje in de miniPCR voor 10 minuten, op 95 °C.

- Open de *protocol library* in de miniPCR app op een telefoon of laptop en druk op het plusje om een nieuw protocol te maken.
- Gebruik miniPCR *Heat Block* modus, vul de onderstaande parameters in en klik op 'save'.
- Zet de epjes in de miniPCR.
- Sluit de miniPCR en draai zachtjes de knop op de deksel aan.
- Druk op Save and Run.



⚡ Soms wordt er geen verbinding gemaakt of kan er geen miniPCR gevonden worden. Sluit de app af en start hem opnieuw op.

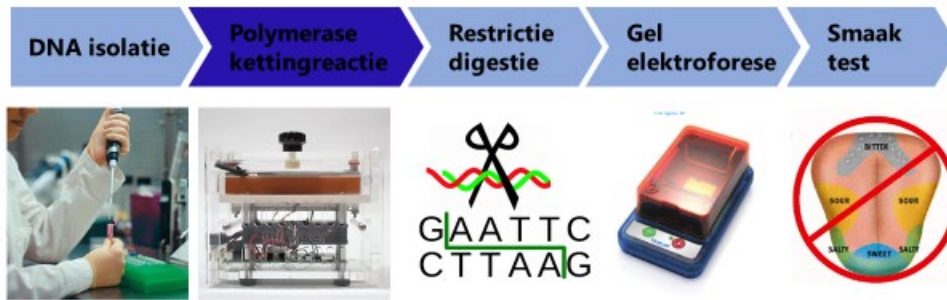
10) Beantwoord in de wachttijd de volgende vragen:

- *Waarom voeg je de X-tract DNA-extractiebuffer toe?  
Om de cellen van je wangslimvlies kapot te maken zodat je het DNA kan isoleren.*
- *Waarom incubeer je het DNA op 95 °C?  
Om de cellen te lyseren (kapot te maken).*

11) Lees alvast het volgende gedeelte van het protocol en verzamel alvast de benodigdheden.

- 12) Haal de epjes uit de miniPCR als die klaar is en zet ze in een rekje. Centrifugeer de epjes 10 seconden in de microcentrifuge.
- *Waarom centrifugeer je?  
Om alle vloeistof onderaan in het epje te hebben en niet aan de wanden.  
Dit is voor de vervolgstap belangrijk.*

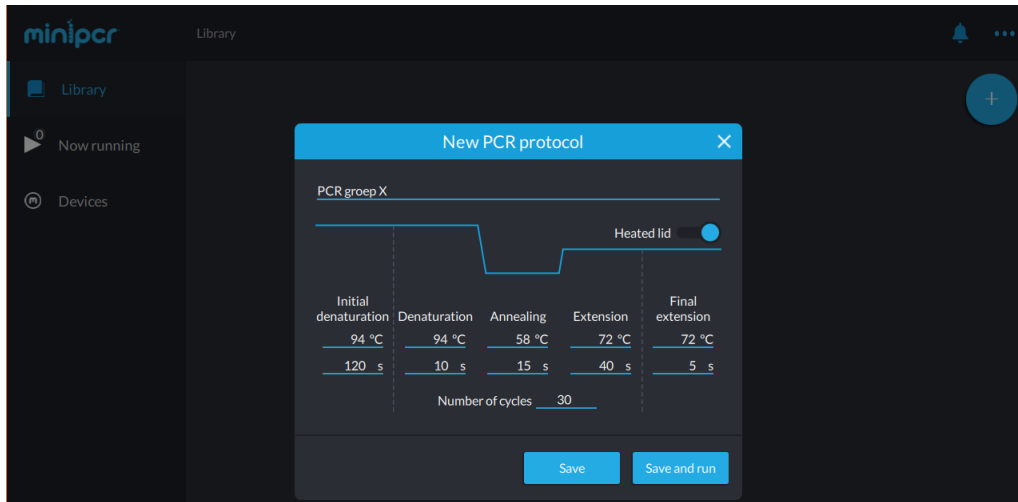
## Stap 3: Polymerase Chain Reaction (PCR)



1. **Vorbereiding:** label een nieuw PCR-epje (200  $\mu$ L) met je persoonlijke code. Draai de PCR-reagentia (PTC-primermix en PCR-mastermix) voor 10 seconden af in de microcentrifuge. Zet bakjes ijs voor de groepjes klaar.
2. Pipetteer de PCR-reagentia in je epje met persoonlijke code en zet het epje daarna weer op ijs. De PCR-reagentia bevatten:
  - 12,5  $\mu$ L PTC-primermix
  - 12,5  $\mu$ L PCR-mastermix
3. Pipetteer 3  $\mu$ L van je eigen DNA sample afkomstig uit het geïsoleerde DNA uit de miniPCR in het nieuwe epje met de PCR-reagentia.
  - Haal de 3  $\mu$ L uit de bovenkant van de oplossing.
  - Pipetteer de vloeistof in het nieuwe epje op en neer zodat je de inhoud meteen mixt. Of gebruik een vortex voor 10 seconden. Zorg ervoor dat er geen luchtballen of vloeistof aan de rand zit. Tik eventuele luchtballen eruit. Draai eventueel je epje af voor enkele seconden in de microcentrifuge.
  - Zet jouw epje voor de PCR direct in de miniPCR.
4. Start de polymerasekettingreactie:
  - Open de *protocol library* en druk op het plusje om een nieuw protocol te maken.
  - Gebruik miniPCR PCR-modus, vul de onderstaande parameters in:
    - Initial denaturation: 94°C voor 120 seconden
    - 30 cycles:
      - ❖ Denaturation: 94°C voor 10 seconden
      - ❖ Annealing: 58°C voor 15 seconden
      - ❖ Extension: 72°C voor 40 seconden
    - Final extenston: 72°C voor 5 seconden



⚡ Let op: de PCR-producten kunnen niet in de miniPCR overnachten. De PCR-producten dienen in de koelkast of vriezer te worden gezet. ⚡

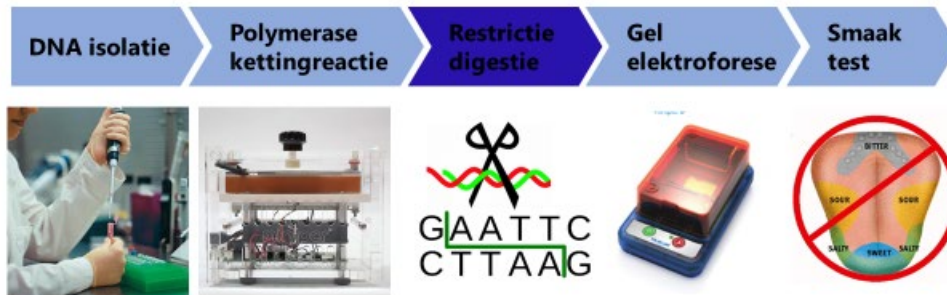


5. Sluit de epjes en centrifugeer de epjes kort met een microcentrifuge. Plaats de epjes in de miniPCR.
6. Klik nu op 'save and run'. Nadat je de PCR hebt aangezet kan je je telefoon, computer of laptop afkoppelen van de PCR.
7. Beantwoord de volgende vragen:
  - *Wat zit er in de PCR-mastermix?*
    - a. *Alles wat er nodig is voor de reactie: nucleotiden (de bouwsteentjes van het DNA), DNA-polymerase en de juiste stofjes zitten in een buffer die de omstandigheden zo optimaal mogelijk maken (bijvoorbeeld magnesium).*
  - *Wat gebeurt er met het DNA op 94°C in de PCR?*
    - a. *Het DNA wordt gedenameerd, de waterstofbruggen worden verbroken.*
  - *Wat gebeurt er op 58°C in de PCR?*
    - a. *Annealing vindt plaats, waarbij de primers binden op het juiste stuk DNA. Nadat de primers gebonden zijn, kan DNA-polymerase hierop binden en de volgende stap uitoefenen.*
  - *Wat gebeurt er op 72°C in de PCR?*
    - a. *Zogenaamde extensie: DNA-polymerase maakt het juiste stukje DNA af. Het dubbelstrengs DNA wordt dan gekopieerd.*
8. Als de PCR klaar is, wordt dat vermeld in het programma. Ook gaan alle led lichtjes aan. Je kan dan de epjes uit de miniPCR halen, let hierbij op dat het metaal nog erg heet kan zijn!

De PCR duurt zo'n 75 minuten. Als de PCR-apparaten eenmaal draaien kunnen de laptops/telefoons ontkoppeld worden. Als de PCR klaar is zullen alle ledlampjes constant branden (zie hoofdstuk MiniPCR).

Na het afronden van de PCR kunnen de samples in de koelkast worden bewaard als de volgende dag het practicum wordt voortgezet. De samples moeten in de vriezer worden bewaard als dit langer dan een dag duurt.

## Stap 4: Restrictie digestie



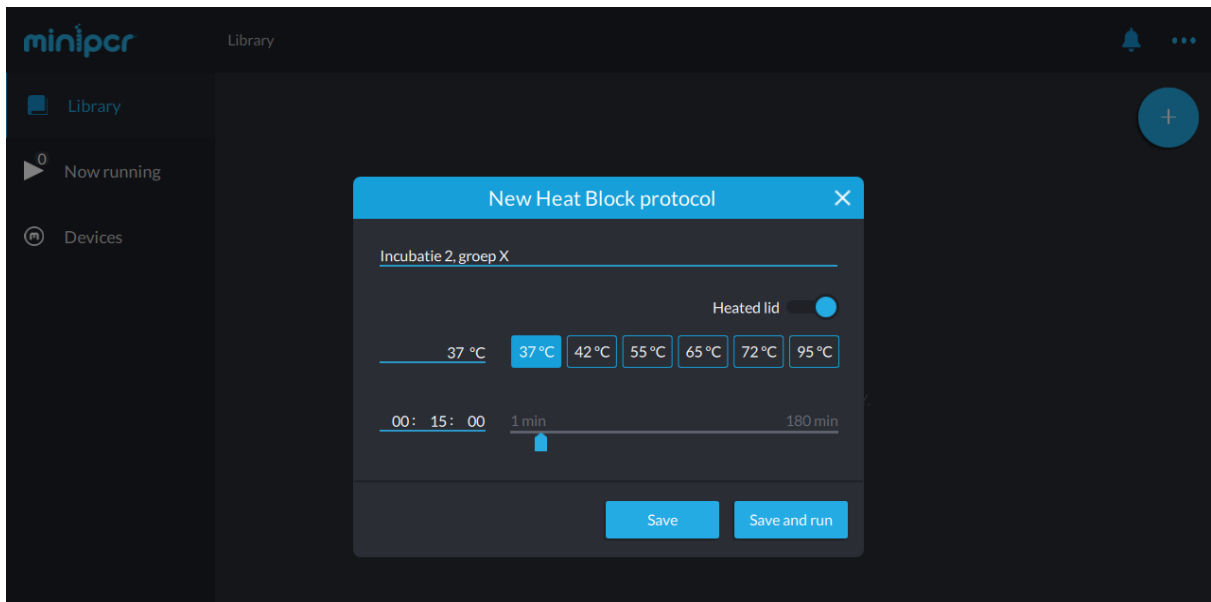
1. **Vorbereiding**: label een schoon PCR-epje (200  $\mu$ L) met je persoonlijke code. Draai het restrictie-enzym voor 10 seconden af in de microcentrifuge en zet op ijs. Zet bakjes ijs per groep klaar.
2. Pipetteer 14  $\mu$ L van het PCR-product in een nieuw PCR-epje met persoonlijke code en een PLUS erop.
3. Bewaar de rest in het andere epje op ijs en zet daar een MIN op (optioneel).
4. De docent pipetteert 1  $\mu$ L van het restrictie-enzym in elk PCR-epje met plus van de leerlingen met het PCR-product. Om het te mixen, pipetteer op en neer in de substantie of vortex voor 10 seconden. Zet daarna het epje op ijs.

**Hou te alle tijden het restrictie-enzym op ijs of in de minikoeler!**

**Voer deze stap zelf uit! Gebruik hierbij de 0,5-10,0  $\mu$ L pipet. Let op! Niet door de weerstand heen pipetteren!**

5. Sluit je epje en centrifugeer voor 10 seconden in de microcentrifuge. Zorg ervoor dat er geen luchtballen of vloeistof aan de rand zit. Herhaal eventueel de centrifugeer stap.
6. Zet de epjes in de miniPCR en incubeer voor 15 minuten op 37°C.

- Open de *protocol library* en druk op het plusje om een nieuw heat block protocol te maken. Vul vervolgens onderstaande parameters in en druk op 'save and run'.

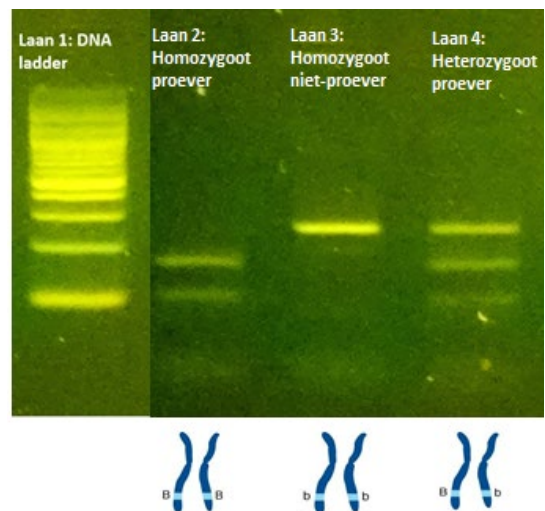


7. Beantwoord tijdens de incubatietijd de volgende vragen:

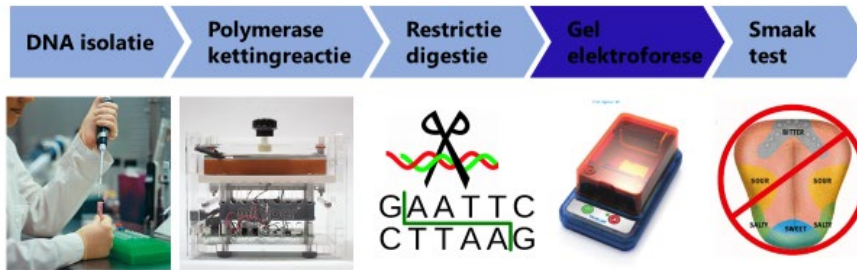
- a) *In de volgende stap gaan we het DNA scheiden met behulp van gelelektroforese. Wat voor bandjes verwacht je te zien bij het DNA van iemand die sterk bitter proeft? En wat verwacht je bij iemand die een beetje bitter proeft?*

*Dit is al in de inleidende les behandeld, maar hierbij nogmaals het plaatje. Je kan hier snel doorheen gaan, of dit nogmaals behandelen. De homozygoot niet-proever heeft het hoogste bandje (en maar een enkele), omdat het DNA-fragment niet geknipt is door het restrictie-enzym. Dit leidt tot een groter DNA-molecuul wat minder snel door de gel beweegt.*

- b) *Wat verwacht je bij iemand die geen bittere smaak proeft? Zie het antwoord hierboven.*



## Stap 5.1: Gel-elektroforese - gel gieten



*Je kan zelf kiezen of je de gel vooraf al maakt en giet, of dat je dat de leerlingen tijdens het practicum laat doen. Als je de gel vooraf maakt kan je deze in huishoudfolie wikkelen en in de koelkast bewaren.*

1. Bereid voor elk groepje een 2% agarose gel voor.
2. Los voor 1 gel 1 capsule GelGreen® Agarose Tabs™ op in 20 mL demi water.
3. Zwenk de erlenmeyer zodat de reagentia goed mixen.
4. Verhit de reagentia in een magnetron, waterbad of op de kookplaat totdat de agarose poeder is opgelost en de oplossing helder oogt.

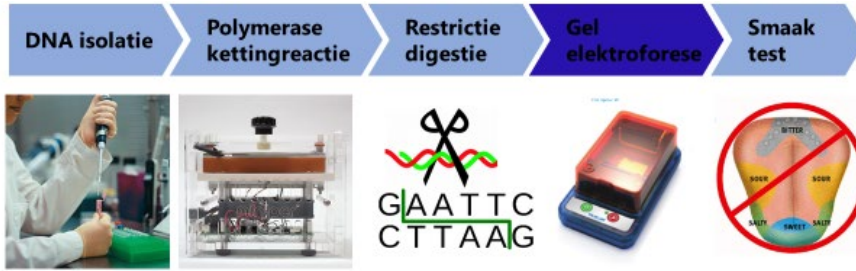
**⚡ Let op: wanneer er per gel wordt verhit, kookt de vloeistof al na enkele seconden.**

5. Pas op, de oplossing is erg heet. Pak de erlenmeyer met een handschoen en veiligheidsbril op.
6. Laat de oplossing afkoelen totdat de erlenmeyer met de handwarm is.
7. Giet de oplossing in de gel-giet-bak met kammetje voor 13 slotjes. Zet het kammetje boven in de gel-giet-bak en niet halverwege.  
**Let op** dat de hoeveelheid goed verdeeld wordt bij het gieten van meerdere gels tegelijk.
8. Laat het kammetje zitten totdat de gel hard is.
9. Verwijder voorzichtig het kammetje.
10. Stop de gel in de gelelektroforese bak en vul de bak aan met ongeveer 25 mL 1x TBE gelelektroforese buffer, zodat de gel net onderwater staat. Mocht dit te weinig zijn, vul aan waar nodig in de juiste concentratie.

\*Gelgreen is een veilige gelkleuring. Deze is niet giftig.

**⚡ Gels die van tevoren gemaakt worden kunnen, maximaal een week, het best in huishoudfolie gewikkeld in het donker in de koelkast bewaard worden. ⚡**

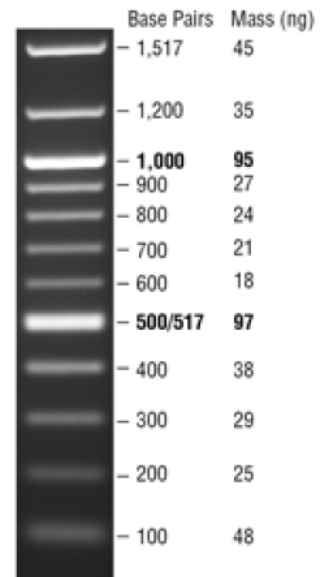
## Stap 5.2: Gel-elektroforese



1. Haal de PCR-epjes uit de miniPCR wanneer de restrictie digestie klaar is. We gaan nu over op de gelelektroforese, waarbij je jouw DNA-monster(s) op een gel gaan pipetteren.

**Zorg ervoor dat de leerlingen niet door de gel heen prikken en ze de vloeistof goed in het slotje pipetteren. Leerlingen kunnen bijvoorbeeld oefenen op zelf**

2. Pipetteer in laan 1 10 $\mu$ L DNA-ladder (draai vooraf de DNA ladder (afbeelding 9) voor 10 seconden af in de microcentrifuge). Met de DNA-ladder kan je de fragmentlengte van jouw DNA-bandjes bepalen, zoals hier in afbeelding 9. **Let op:** De PCR-master mix bevat al loading dye. Dit hoeft **niet** extra toegevoegd te worden.





3. Pipetteer nu van elke leerling uit de groep 12  $\mu$ L het DNA-monster (indien mogelijk ook het ongeknijpte DNA-monster (MIN) en de 3 positieve controles 10  $\mu$ L) in een aparte laan. Schrijf op in welke laan wiens DNA zit. Bijvoorbeeld:
  - (1) Laan 1: DNA-ladder
  - (2) Laan 2: (DNA-monster van leerling 1 ongeknijpt, MIN)
  - (3) Laan 3: DNA-monster van leerling 1 geknijpt, PLUS
  - (4) Etc.

Afbeelding 9. 100 bp DNA ladder (handleiding miniPCR)



Wanneer er op de gel plek genoeg is kan er gekozen worden om ook het ongeknijpte DNA-monster (MIN) op de te gel laden. Dit is tevens een controle stap om te kijken of de restrictie digestie gelukt is (alleen te zien bij homozygoot proevers en heterozygoot proevers. Daarnaast worden 3 positieve controles meegegeven; homozygoot niet-proever, homozygoot proever en heterozygoot proever.

4. Wanneer alle DNA-monsters op de gel geladen zijn, kan de oranje deksel op de gelelektroforesebak.

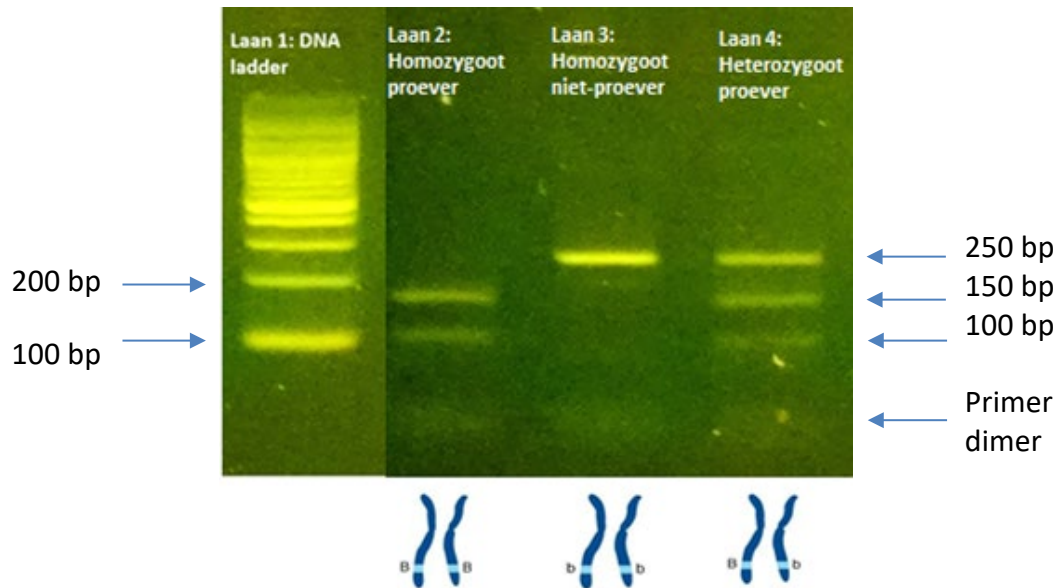
5. Zet de gelelektroforese aan (automatische voltage rond de 100/130 volt). Kijk of er kleine belletjes ontstaan aan de uiteinden van de bak. Zo ja, dan werkt het. De gel moet ongeveer 35 minuten lopen.
6. Voer ondertussen de smaaktest bij stap 6 uit.
7. Kijk na 20 minuten hoe ver de monsters gelopen zijn in de gel. Doe dit door het licht aan te zetten en door het gaatje te kijken (in de onderstaande afbeelding kun je het eindresultaat zien).
8. Zet de gelelektroforese **uit wanneer de onderste vijf bandjes van de ladder goed zijn gescheiden**. Dit is ongeveer na 35 minuten. De DNA-ladder is leidraad. Tussentijds kan er met behulp van het lichtje gekeken worden.

 **Let op! Tijdens de run moet het lichtje uitstaan!** 

9. Klik op de knop met het lampje erop om de resultaten zichtbaar te maken.

 **Condens in de gelelektroforesebak kan ervoor zorgen dat de bandjes niet goed zichtbaar zijn. Neem met een doekje uit de leskist het condens af. Plaats voorzichtig de deksel terug en zorg dat de gel niet breekt!** 

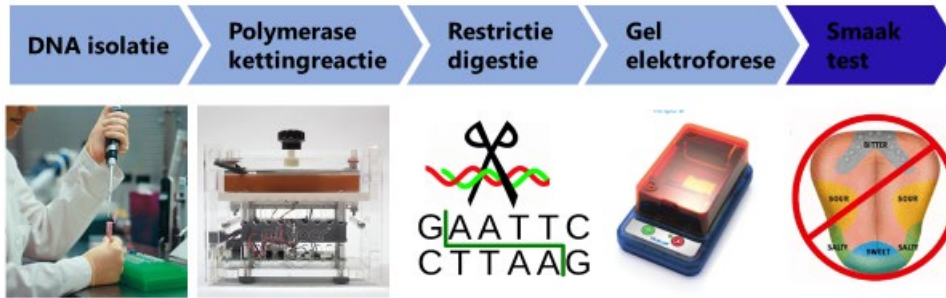
10. Kijk naar de resultaten m.b.v. van de zwarte doka of verduister het lokaal. Maak er een foto van. Met een mobiele telefoon zijn de resultaten vaak beter te zien!
11. Beantwoord de volgende vragen:
  - *Hebben de restrictie-enzymen jouw DNA geknipt?*
    - *Voor alle leerlingen anders. Ook nu kan het plaatje met de verwachte resultaten van pas komen.*



- *Wat is jouw genotype: homozygoot proever, homozygoot niet-proever of heterozygoot? Komt dit overeen met de smaaktest?*
  - *Voor alle leerlingen anders.*
- *Wat zou het voordeel zijn om wel of niet proever te zijn? Waarom is dit handiger?*
  - *Voedsel wat over datum of giftig is proeft vaak bitter. Het voordeel van een proever is om de bittere smaak te proeven, en het giftige/bedorven voedsel dan niet meer te eten. Dit kan een evolutionair voordeel zijn (bij dieren bijvoorbeeld). Zie ook fragment van [De 5 smaken \(https://www.npostart.nl/de-5-smaken-van-joel/03-11-2021/KN\\_1727503\)](https://www.npostart.nl/de-5-smaken-van-joel/03-11-2021/KN_1727503) met de tijden: 03:58-07:55 en 17:14-20:25.*

**⚡ Graag al het biologisch materiaal weggooien in de daarvoor bedoelde prullenbak in het practicumlokaal. Graag alle apparatuur op de juiste plek leggen in de leskist. Er zit een geplastificeerde inhoudsbeschrijving bij. Let op: De snoeren van de miniPCR's en gelelektroforeses graag oprollen, maar niet om de oplader zelf. Ongebruikte reagentia en consumables graag terug meegeven als ze ook niet meer op school gebruikt worden. Graag de reagentia dan gekoeld in de minikoeler meegeven.**

## Stap 6: Smaaktest



*Het is handig om de smaaktest te doen tijdens een wachtstap en om niet beïnvloed te zijn door de resultaten.*

1. Je krijgt van je docent een papiertje, hierop zit de smaak PTC.
2. Leg het papiertje op de tong, probeer je ervaring nog voor je te houden en schrijf uiteindelijk op of je PTC proefde. Je kan het papiertje daarna weggoien.
  - a. 0: ik proefde geen bittere smaak, 1: ik proefde een beetje bitter, 2: ik proefde enorm bitter.
  - b. Bepaal je fenotype. Ben je homozygoot proever, heterozygoot proever of homozygoot niet-proever?
3. Gooi het papiertje in de prullenbak.

*Vragen:*

- *Hoe denk je dat jouw genotype eruitziet na gelelektroforese?*

**Let op:** De smaakbeleving van de smaaktest is subjectief. Het kan zo zijn dat de smaakbeleving niet overeenkomt met de genetische bepaling. Dit heeft vooral te maken dat meerdere genen verantwoordelijk zijn met wat je proeft, maar ook voorgaande ervaringen. Bijvoorbeeld sommige mensen leren een bittere smaak te waarderen waardoor zij de bittere smaak als minder vies ervaren. Laat leerlingen eventueel ook de volgende fragmenten zien: De 5 smaken ([https://www.npostart.nl/de-5-smaken-van-joel/03-11-2021/KN\\_1727503](https://www.npostart.nl/de-5-smaken-van-joel/03-11-2021/KN_1727503)) met de tijden: 03:58-07:55 en 17:14-20:25.



Heb je een leuke foto gemaakt? Deel of tag ons via Instagram, @dnlabs\_abenl



# Bijlagen

## Bijlage 1: werkblad leerlingen

### PCR

1. Waar staat de afkorting PCR voor?
2. Waarom denatureert DNA op 94 °C?
3. Waarom voeg je 2 verschillende primers toe?
4. Wat heb je allemaal nodig om een PCR uit te voeren?
5. Wat is het uiteindelijke doel van PCR?

### Gelelektroforese

6. Welk deel van DNA is negatief geladen?
7. Wat gebeurt er als je de spanningsbron te lang (bijvoorbeeld 3 uur) aan laat staan?
8. Welke DNA-fragmenten zullen eerder beneden zijn, kortere of langere DNA-fragmenten?

### Restrictie-enzymen

9. De kinderen van twee heterozygote ouders kunnen verschillende genotypes hebben. Welke genotypen zijn er mogelijk? Welk fenotype hoort daarbij? Vul de tabel in. De hoofdletter T staat voor proever, de kleine letter t staat voor niet-proever.

	Ouder 1	
Ouder 2	T	t
T		
t		

10. Geef een voorspelling van het bandenpatroon voor homozygoten (proever/proever en niet-proever/niet-proever) en heterozygoot (proever/niet-proever).