

Practicum: het maken van een DNA-profiel

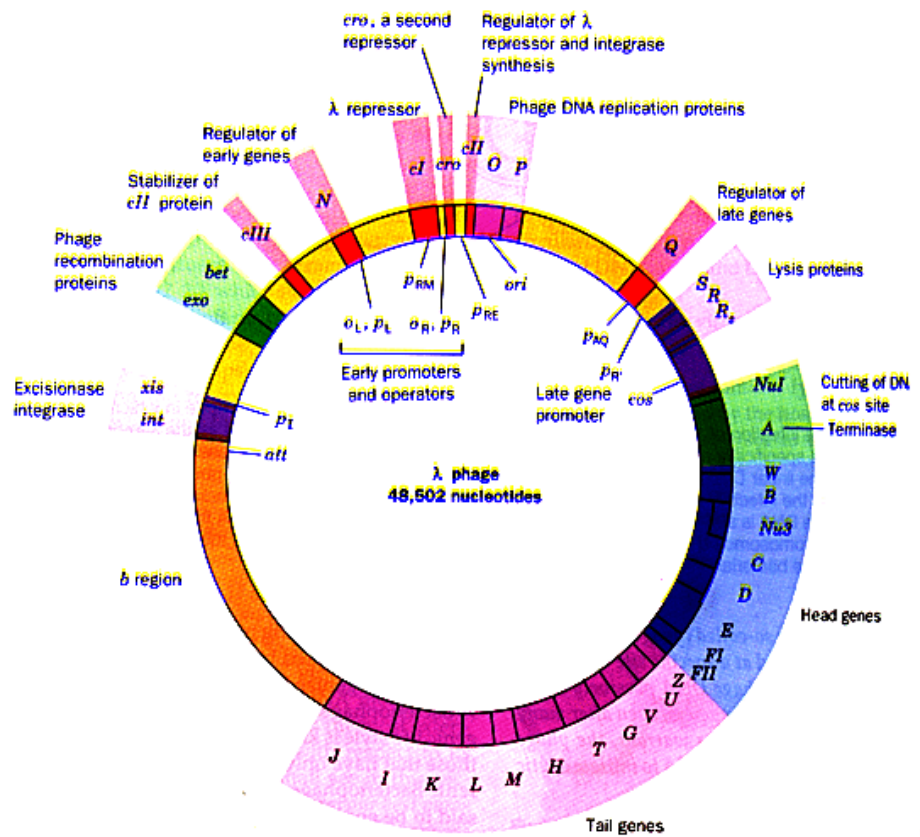
(Met dank aan Jo Bloemen voor zijn basisversie van dit practicum en aan Brigitte Vanacken voor de technische uitwerking)

Achtergrondinformatie

Met welk genoom wordt gewerkt tijdens dit practicum?

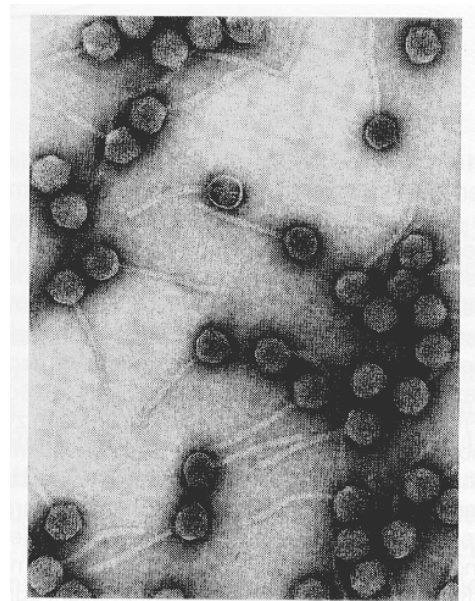
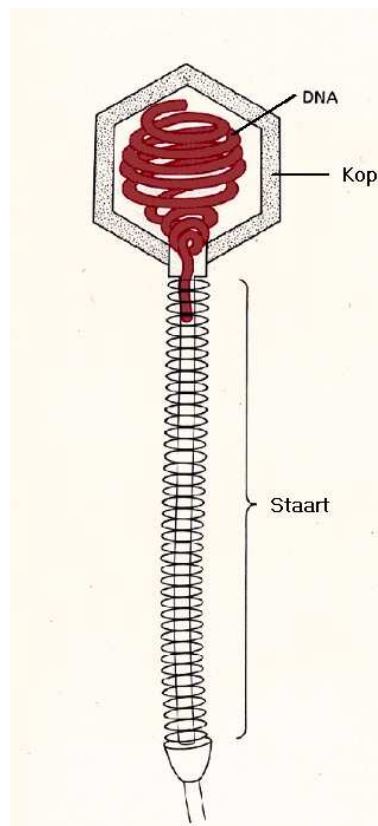
Wij gaan tijdens deze praktische sessie werken met het genoom van de λ -faag. Dit bestaat uit een dubbelstrengige DNA-helix in circulaire vorm, met 48.502 basenparen.

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 polysaccharide 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 samengesteld uit fragmenten met lengten van veelvoud 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> (geel)	4 μ l	5 μ l (buffer 1)
2. met <i>HindIII</i> (blauw)	4 μ l	5 μ l (buffer 2)
3. controle-epje (kleurloos)	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 20 minuten.

Gieten van de agarosegel voor elektroforese

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

- In de elektroforesekamer wordt eerst de gelhouder geplaatst, zodanig dat de inkepingen overeenkomen met de inkepingen in de kamer zelf
- Daarna worden de twee zwarte tussenschotten geplaatst.
- Giet nu de warme gel langzaam (zodat er geen luchtballen 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 bufferoplossing.
- Aan de 3 DNA-stalen wordt telkens 2 μ l **laadkleurstof** 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 of **ruler**. 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.

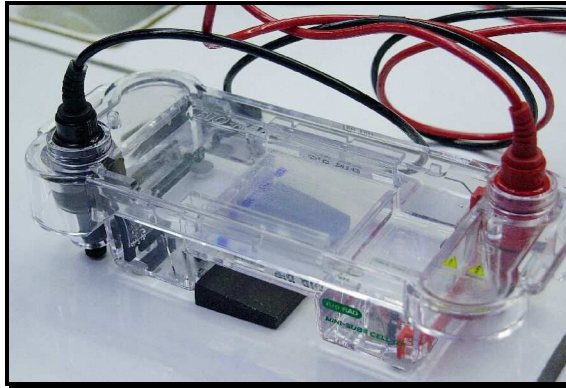
Staal	referentie (ruler)	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	controle
Sleuf nr.				



- 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.

Deze gel kan in de kleurstof mee naar school genomen worden.

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