

NAAM:

KLAS:

PRACTICUM BIOLOGIE

HET MAKEN VAN EEN DNA-PROFIEL

Leerlingenhandleiding



Prof. Dr. Patrick Reygel

Dr. Klaartje Pellens

Dr. Hanne Vercampt

m.m.v. Jo Bloemen, Brigitte Vanacken

INHOUDSOPGAVE

Practicum: het maken van een DNA-profiel.....	3
1. Theoretische achtergrond.....	3
1.1. Met welk genoom wordt gewerkt tijdens dit practicum?.....	3
1.2. Wat is een faag?	4
1.3. Restrictie-enzymen.....	5
1.4. Iets meer over gelelektroforese... ..	5
2. Practicum: maken van een DNA-profiel van de λ -faag	6
2.1. Hanteren van micropipetten.....	6
2.2. Restrictie-enzymen laten inwerken op de λ -faag	7
2.3. Gieten van de agarosegel voor elektroforese	8
2.4. Aanbrengen van de geïncubeerde DNA-stalen en elektroforese.....	9
2.5. Uitbreiding: Theoretische berekening van DNA-profiel van Lambda-faag	11
2.6. Kleuring van de gel	12
Bijlage 1: Theoretische berekening met computer van het DNA-profiel van de λ -faag.....	13
3. Waar knippen de restrictie-enzymen in het Lambda-genoom?	13
3.1. Werkblad 1	14
3.2. Werkblad 2	15

PRACTICUM: HET MAKEN VAN EEN DNA-PROFIEL

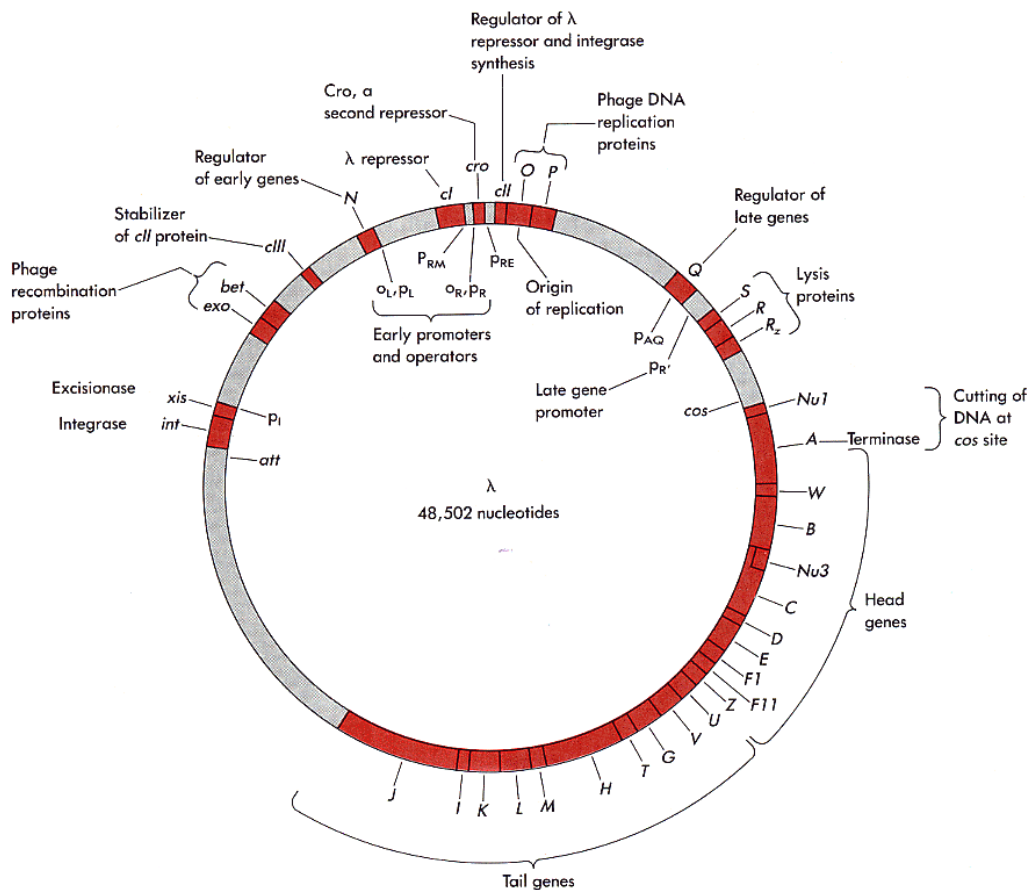
(Met dank aan Jo Bloemen voor zijn basisversie van dit practicum en aan Brigitte Vanacken voor de technische uitwerking)

1. THEORETISCHE ACHTERGROND

1.1. MET WELK GENOOM WORDT GEWERKT TIJDENS DIT PRACTICUM?

Tijdens deze praktische sessie wordt gewerkt met het genoom van de λ -faag. Dit bestaat uit een dubbelstrengige DNA-helix in circulaire vorm, bestaande uit 48.502 basenparen.

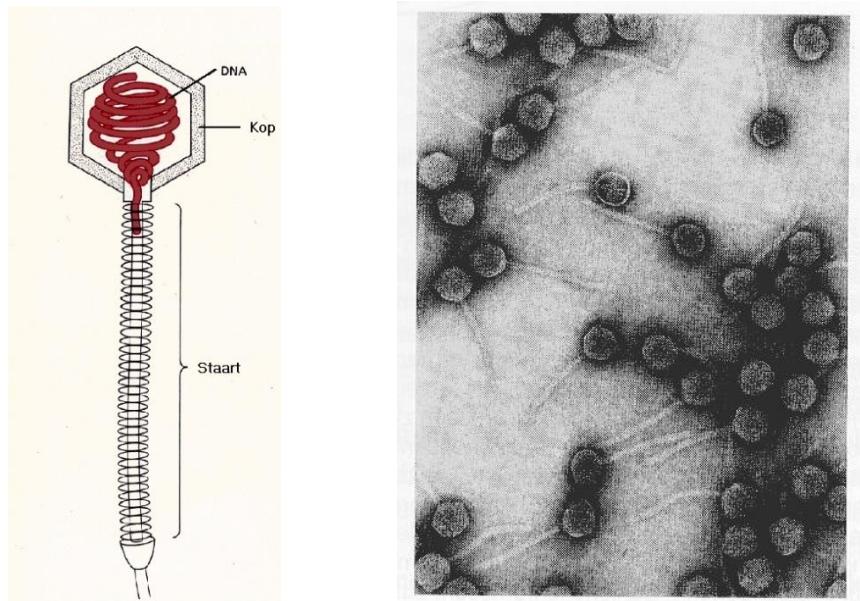
Een schematische voorstelling van de genetische en moleculaire map van de λ -faag wordt hieronder weergegeven (Figuur 1).



Figuur 1 Genetische map van de λ -faag

1.2. 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 rondom een DNA- of RNA-streng. De algemene vorm van de eiwitmantel bestaat bij de bacteriofagen doorgaans uit twee delen: de kop en de staart (Figuur 2).



Figuur 2 Voorstelling en elektronenmicroscopische foto 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 lambda-faag, een virus dat *E. coli* infecteert. De kop is 64 nm in diameter en de staart is 150 nm lang.

1.3. RESTRICTIE-ENZYMEN

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*-enzymen zijn afkomstig van de bacterie *Haemophilus influenzae*. 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 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.

1.4. 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 stalen aangebracht in 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 vervolgens 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-stalen (en een niet geknipt staal) 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 (bp) (... 1000; 1500; 2000; ... 8000; 10000). Het fragment van 1000 en 10000 bp levert na gelelektroforese een extra-heldere band (3.2).

2. PRACTICUM: MAKEN VAN EEN DNA-PROFIEL VAN DE λ -FAAG

2.1. HANTEREN VAN MICROPIPETTEN

Er wordt met zeer kleine hoeveelheden DNA en restrictie-enzymen gewerkt: in de grootteorde van enkele μl . Vandaar dat er ook pipetten gebruikt worden om dergelijke kleine hoeveelheden te kunnen afmeten: "*micropipetten*" genaamd. Verder zijn er ook zeer kleine recipiënten nodig om deze microhoeveelheden in te doen. Deze noemen we eppendorfbuisjes of kortweg "*epjes*".

Er wordt eerst gestart met het leren hanteren van de micropipet.

- Voor elk nieuwe vloeistof wordt een **nieuw tipje** op de pipet gedrukt. *Raak dit tipje niet aan met de handen!*
- Druk de knop boven op de pipet **tot de eerste weerstand** in, vooraleer het tipje in de vloeistof te dompelen. (*Niet indrukken tijdens het onderdompelen; dit veroorzaakt schuimvorming.*)
- Laat na indompelen de knop terug **los** en de vloeistof wordt opgezogen.
- Breng 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 de pipet **volledig in**.
- Na gebruik wordt het tipje verwijderd door de schuifknop opzij van de pipet naar beneden te drukken.

 *Oefen nu eerst het hanteren van de micropipet.*


- Neem het epje met vermelding '**WATER**'
- Stel de pipet in op **4 μl**
- Zuig dit volume water op
- Kijk naar de vloeistof die zich in het tipje bevindt om een idee te krijgen van de te pipetteren hoeveelheden.
- Pipetteer dit volume terug in het epje 'water'. Plaats daarbij het tipje tegen de rand, net boven de aanwezige vloeistof.
- Laat elk groepslid deze handelingen uitvoeren om het gebruik van de micropipet in te oefenen.



2.2. RESTRICTIE-ENZYMEN LATEN INWERKEN OP DE λ -FAAG

Op de werktafel bevinden zich de volgende zaken. Bekijk deze eerst grondig en 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.

Er worden **3 verschillende profielen van het λ -DNA** gemaakt.

- 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**).

 Maak de verschillende λ -DNA-profielen.

- Om deze 3 profielen aan te maken, worden 3 verschillende epjes gebruikt (*kleurloos, geel, groen*).
- Merk deze epjes met een **stift**: duid op het epje aan **welk restrictie-enzym** wordt toegevoegd. (*kleurloos = controle | geel = EcoRI | groen = HindIII*)
- 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.
- 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* (Tabel 1).

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

Tabel 1 Pipetteerschema λ -DNA en buffers

- Voeg vervolgens **1 µl** van het nodige **restrictie-enzym** (Tabel 2) 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	EcoRI	HindIII	H ₂ O
1. met EcoRI	4 µl	5 µl (buffer 1)	1 µl	–	–
2. met HindIII	4 µl	5 µl (buffer 2)	–	1 µl	–
3. controle-epje	4 µl	5 µl (buffer 1)	–	–	1 µl

Tabel 2 Pipetteerschema restrictie-enzymen

- Sluit de 3 epjes af.
- Tik met de buisjes op de labotafel (of centrifugeer ze), 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 meerdere DNA-fragmenten met verschillende lengte bekomen worden.
- ⌚ De incubatie (= restrictie) duurt **20 minuten**.

2.3. GIETEN VAN DE AGAROSEGEL VOOR ELEKTROFORESE

De verschillende DNA-fragmenten worden van elkaar gescheiden d.m.v. gelelektroforese. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van agarosegels. Per 2 groepjes wordt 1 gel gebruikt.

 *Het maken van een agarosegel.*

- Plaats de 2 kleine gelplaatjes in de gelhouder.



- Maak een **1% agarose-oplossing** door 2 AgaTabs, gedurende 1 minuut, al zwenkend, op te lossen in 100 ml TAE-buffer (1X). *Per gel is er 30 ml agarose-oplossing vereist.*
- Verwarm de agarose-oplossing (*microgolfoven, verwarmingsplaat...*) tot alle agarose is opgelost en de oplossing helder is. Laat de oplossing kort doorkoken. (*Richtlijn microgolfoven: 650 W | ± 1 min 20 sec*)
- Giet, per gel, 30 ml van de warme agarose-oplossing langzaam (*zodat er geen luchtballen gevormd worden*) in de houder met het gelplaatje.
- Breng hierin vervolgens, boven de brede donkere band, de kam aan, met de breedste tanden naar beneden.

👁 De kam zorgt ervoor dat er sleuven in de gel ontstaan. In deze sleuven worden dan later de 3 DNA-stalen en een referentiestaal aangebracht.

- Duw met een glazen staaf het gelplaatje in de houder naar beneden, om de lucht onder het gelplaatje te verwijderen.
- ⌚ Laat de gel een **20-tal minuten** opstijven.



2.4. AANBRENGEN VAN DE GEÏNCUBEERDE DNA-STALEN EN ELEKTROFORESE

👁 De geïncubeerde λ -DNA-stalen (2.2) worden vervolgens klaargemaakt om aan te brengen in de sleuven van de agarosegel.

- Verwijder voorzichtig, met beide handen, de kam uit de gel.
- Verwijder het gelplaatje met de agarosegel uit de houder.
- Plaats de gel, met het gelplaatje, in de elektroforesekamer.

👁 Let op de oriëntatie van de gel. DNA is negatief geladen en migreert bijgevolg naar de positieve pool!

- Overgiet de gel in de elektroforesekamer met ± 350 ml **TAE-bufferoplossing (1X)**. Het maximale bufferniveau wordt in de elektroforesekamer aangegeven door de kleine driehoekjes (▶). De gel moet zich ongeveer 3 mm onder het bufferoppervlak bevinden.
- Voeg aan de 3 DNA-stalen telkens **2 μ l laadkleurstof** toe, zodat het migratiepatroon van de stalen tijdens de gelelektroforese gevolgd kan worden.
- De stalen van 2 groepen kunnen samen op 1 gel aangebracht worden.
- Sla de eerste sleuf over en breng in de tweede sleuf voorzichtig **5 μ l aan van het referentiestaal of ruler.**

👁️ *Het staal dient voorzichtig met een micropipet in de sleuf aangebracht te worden. Let er vooral op niet doorheen de gel te prikken met de tip van de micropipet.*

- Breng in 3 andere sleuven telkens **10 μ l van de 3 geknipte en gekleurde DNA-stalen.**
- Noteer hieronder (Tabel 3) in welke sleuf, welk staal werd aangebracht.

Staal	referentie (ruler)	EcoRI	HindIII	controle
Sleuf nr.				

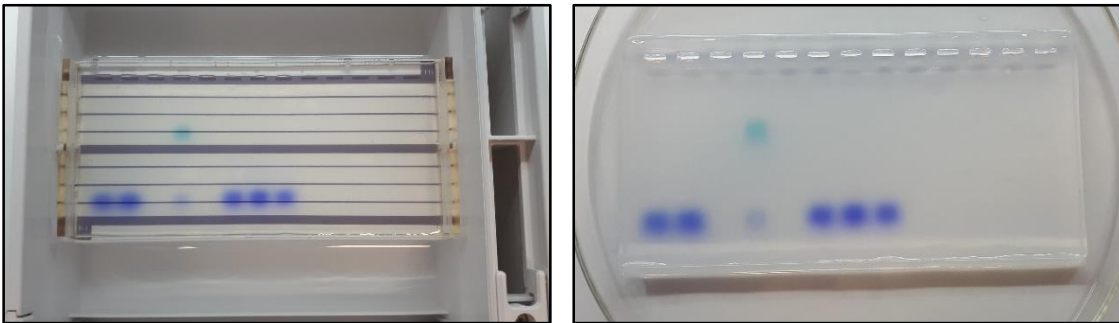
Tabel 3 Volgorde van de DNA-stalen in elektroforesegel



- Plaats het deksel op de elektroforesekamer.
- Sluit de elektroforesekamer aan op de spanningsbron en schakel deze laatste aan.
- Stel de spanning in op **135 V** door op de spanningstoets te drukken.
- De elektroforese duurt tot de kleurstof ongeveer 2/3 van de gel doorlopen heeft en zich ter hoogte van de voorlaatste dunne lijn bevindt.

👁️ *De kleurstoffen migreren iets sneller dan de DNA-fragmenten doorheen de gel. Ze geven dus aan wanneer de elektroforese beëindigd moet worden. Als de elektroforese te lang zou duren, migreren de DNA-fragmenten immers uit de gel.*

- ⌚ De totale duur van de elektroforese bedraagt ongeveer **20 minuten**.



2.5. UITBREIDING: THEORETISCHE BEREKENING VAN DNA-PROFIEL VAN LAMBDA-FAAG


Tijdens de gelelektroforese kan er eventueel een theoretische computerberekening gemaakt worden van het DNA-profiel van de λ -faag.


👁️ *Zie Bijlage 1*

👋 *Vergelijk na het kleuren van de gel (2.6), de experimenteel bekomen DNA patronen met de voorspellingen, bekomen a.d.h.v. de theoretische berekeningen met de computer.*

⌚ De totale duur van deze theoretische berekening bedraagt ongeveer **20 minuten**.

2.6. KLEURING VAN DE GEL

 Na de elektroforese wordt de gel gekleurd met methyleenblauw.

- Haal de gel uit het elektroforesetoestel en plaats deze, *zonder het gelplaatje*, in een plastic bakje.
- Overgiet de gel met **methyleenblauw (1X)**.
-  Het kleuren van de gel duurt ongeveer **20 minuten**.
- Verwijder het methyleenblauw als de bandjes in de gel zichtbaar zijn.
- Spoel de gel een paar keer met kraantjeswater om de gel verder te ontkleuren en het contrast met de bandjes in de gel te vergroten.

BIJLAGE 1: 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 de webpagina <https://www.uhasselt.be/UH/leerkrachten/Lesmateriaal-biologie.html> kan het "Zoekraam lambdafaag.doc" gedownload worden ('De computeroefening met het volledige genoom van de lambdafaag'). Dit document bevat het volledige 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.

3. WAAR KNIPPEN DE RESTRICTIE-ENZYMEN IN HET LAMBDA-GENOOM?



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

- Open het 'Word'-document "*Zoekraam lambdafaag.doc*"
<https://www.uhasselt.be/UH/leerkrachten/Lesmateriaal-biologie.html>
- Ga in de Word-menubalk naar "view" en kies "normal".
- Kopieer de sequentie GAATTC naar het klembord (Ctrl-Ins).
- Druk functietoets F5.
- Selecteer het Tabblad "find" en plak de sequentie in de tekstbalk (Shift-Ins).
- Klik nu op de knop "find next".
- Bij deze positie wordt de eerste knip gegeven. Noteer dit in de tabel van **werkblad 1 (1)**.
- Klik opnieuw "Find next"
- Herhaal de werkwijze tot het einde van het document bereikt is.
- Alle knipplaatsen voor *EcoRI* werden nu gevonden en de lengte van elk fragment kan vervolgens berekend worden.



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 fragmentlengtes, kunnen deze op **werkblad 2 (3.2)** met een streep gesitueerd worden ten opzichte van de DNA-ladder-fragmenten.

3.1.WERKBLAD 1

BEREKEN 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

BEREKEN 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

3.2.WERKBLAD 2

SITUEER MET EEN STREEP DE BEREKENDE RESTRICTIEFRAGMENTEN T.O.V. DE DNA-LADDER.

