

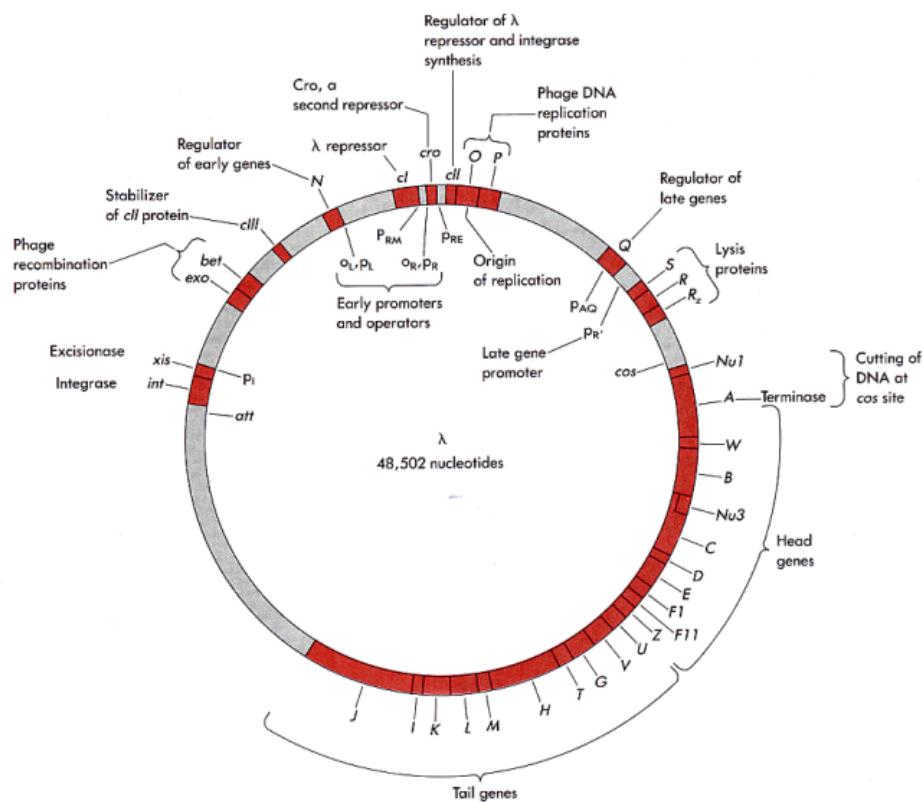
Practicum: het maken van een DNA profiel

Achtergrondinformatie

Met welk genoom wordt er gewerkt tijdens het practicum?

We gaan tijdens dit practicum werken met het genoom van een λ faag. Deze bestaat uit een dubbelstrengige DNA helix in circulaire vorm met 48.502 baseparen.

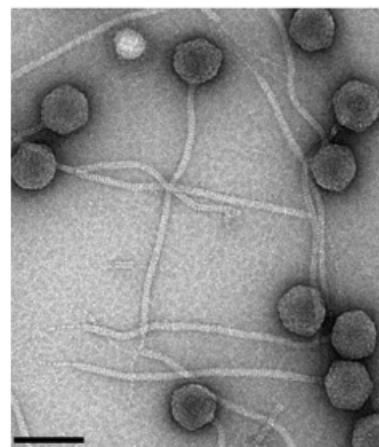
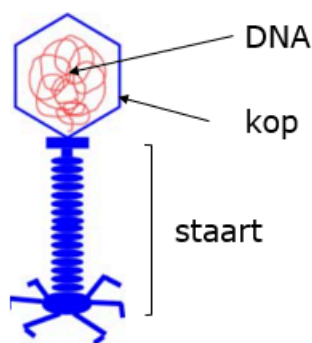
Een schematische voorstelling van de genetische en moleculaire map van de λ faag wordt hieronder weergegeven.



Figuur 1: genetische map van de λ faag

Wat is een faag?

Een bacteriofaag, kortweg faag genoemd, is een type virus dat bepaalde specifieke bacteriën aantast en deze meestal ook vernietigt. Virussen hebben een eiwitmantel rondom een DNA of RNA streng. Wanneer we de algemene vorm van de eiwitmantel bekijken, komen er bij de bacteriofagen meestal twee delen voor nl. de kop en de staart.



elektronenmicroscop foto van een λ faag

Fagen kunnen zichzelf niet vermenigvuldigen en zijn voor hun voortplanting afhankelijk van bacteriën. Hiervoor hechten ze zich mbv. hun staart vast aan de celwand van de bacterie. De staart heeft de vorm van een holle koker die samentrekt om de inhoud van het kop, met 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 open, 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 heeft een diameter van 64 nm 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 zijn geïsoleerd uit bacteriën. Daar hebben ze

de functie om vreemd DNA, bijvoorbeeld van een aanvallend virus, onschadelijk te maken.

In dit practicum wordt oa. 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/AATTC (of CTAA/G in de complementaire streng) voorkomt. Op de plaats van de / wordt geknipt. Enkel het virale DNA wordt geknipt. In het eigen bacteriële DNA zit een soort bescherming gecodeerd tegen dit knipenzym. De EcoRI-herkenningsequentie is in het λ DNA aanwezig op 5 verschillende plaatsen. Na de inwerking van dit enzym op het λ DNA ontstaan er dus 6 verschillende DNA fragmenten.

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

Gelelektroforese

Gelelektroforese wordt gebruikt om de lengte van de bekomen DNA fragmenten te bestuderen en te vergelijken met elkaar. Hiervoor worden de geknipte DNA stalen aangebracht in een agarose gel. Agarose is een natuurlijk polysaccharide dat, opgelost in buffer, vloeibaar is op hoge temperatuur en gelvormig wordt bij afkoeling.

Wanneer op de gel een elektrisch veld wordt aangelegd, migreert het DNA owv zijn negatieve lading naar de positieve pool. Tijdens deze migratie ondervindt het DNA een weerstand, afhankelijk van de grootte van de DNA molecule. Kleine DNA fragmenten ondervinden minder weerstand en migreren sneller naar de andere kant van de gel. Grote DNA fragmenten migreren minder snel en gaan over een zelfde 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.

De 2 geknipte DNA stalen en een controle DNA staal (niet geknipt DNA staal), worden vergeleken met een referentiestaal. In dit referentie DNA staal (DNA ladder genoemd), zitten verschillende fragmenten waarvan de lengte perfect gekend is. De gebruikte DNA ladder is samengesteld uit fragmenten met lengten van veelvouden van 500 baseparen (500 – 1000 – 1500 – 2000... - 12000). Het fragment van 5000 bp levert na de gelelektroforese de meest duidelijke band.

Maken van een DNA profiel van de λ faag – practicum

Gebruik van micropipetten

We werken met zeer kleine hoeveelheden DNA en restrictie enzymen, een grootte orde van enkele μl . Vandaar dat we ook pipetten gebruiken waarmee we dergelijke kleine hoeveelheden kunnen afmeten – micropipetten. Verder hebben we ook kleine recipiënten nodig om de kleine volumes in te pipetteren. Hiervoor gebruiken we eppendorfbuisjes of 'epjes'. We starten eerst met het leren werken met een micropipet.

De eerste handeling is het aanbrengen van een pipettipje op de pipet. Open de box met pipettipjes en duw de pipet in een tipje tot het goed vastzit. Raak het tipje niet aan met je handen. Voor elke nieuwe vloeistof gebruiken we een nieuw tipje.

We starten met het oefenen van pipetteren:

- Stel je pipet in op 4.0 μl met de draaiknop bovenop.
- Neem het epje met water.
- Druk de knop op de pipet met je duim in tot je een 1e weerstand voelt.
- Breng de pipet met tipje in het epje met vloeistof. Best houd je het epje op ooghoogte om een beter zicht te hebben op je pipetteertechniek.
- Laat de knop nu langzaam los en de vloeistof wordt opgezogen in het pipettipje.
- Haal de pipet uit het epje en check of de vloeistof in het tipje zit. Kijk ook naar het vloeistofniveau in het tipje, zodat je een idee hebt van de hoeveelheid.
- Pipetteer dit volume terug in het epje 'water' – plaats het tipje tegen de wand, net boven de vloeistof.
- Druk de knop volledig in tot de 2e weerstand. De pipettip is nu leeg.
- Met de schuifknop, aan de zijkant van de pipet, kan je de pipettip verwijderen na gebruik.
- Herhaal enkele keren om de techniek goed te oefenen.
- Laat iedereen van je groepje dit uitvoeren.



Restrictie enzymen laten knippen in de λ faag

Kijk eerst goed wat er allemaal op je werkbench klaarstaat voor jullie.

In de epjes vind je het volgende:

- ✓ λ DNA (kleurloze epje)
- ✓ EcoRI: restrictie enzym uit de bacteriestam R van E. coli (gele epje)
- ✓ HindIII: restrictie enzym uit H. influenzae (blauwe epje)
- ✓ Buffer 1 (gele epje)
- ✓ Buffer 2 (blauwe epje)

We maken 3 DNA profielen van het λ DNA:

- ✓ Profiel 1: EcoRI enzym laten inwerken en knippen op het DNA
- ✓ Profiel 2: HindIII enzym laten inwerken en knippen op het DNA
- ✓ Profiel 3: het DNA wordt niet bewerkt en geknipt – dit is het controle DNA

1. Label de lege epjes voor deze 3 profielen.

Het gele epje waar het EcoRI enzym aan toegevoegd gaat worden.

Het blauwe epje voor HindIII.

Het kleurloze epje voor de controle.

2. Pipetteer 4.0 μ l λ DNA in elk epje.

3. Voeg nu 5.0 μ l toe van buffer 1 in het EcoRI epje (geel) en 5.0 μ l buffer 1 in het controle epje (kleurloos).

Gebruik een nieuw pipettipje en pipetteer 5.0 μ l buffer 2 in het HindIII epje (blauw).

reagentia	Epje EcoRI (geel)	Epje HindIII (blauw)	Epje controle (kleurloos)
λ DNA	4.0 μ l	4.0 μ l	4.0 μ l
Buffer 1	5.0 μ l	-	5.0 μ l
Buffer 2	-	5.0 μ l	-

4. Vervolgens pipetteer je 1.0 μ l van het nodige restrictie enzym (zie tabel) in het juiste epje. In het controle epje gebruik je water ipv een restrictie enzym.

Gebruik telkens een nieuw pipettipje!

reagentia	Epje EcoRI (geel)	Epje HindIII (blauw)	Epje controle (kleurloos)
λ DNA	4.0 μ l	4.0 μ l	4.0 μ l
Buffer 1	5.0 μ l	-	5.0 μ l
Buffer 2	-	5.0 μ l	-
EcoRI	1.0 μ l	-	-
HindIII	-	1.0 μ l	-
water	-	-	1.0 μ l

5. Sluit de epjes, tik met de epjes op de labotafel en centrifugeer in de minispin (15 sec. – 13200 rpm), zodat alle vloeistof op de bodem zit. Plaats de epjes tegenover elkaar in de rotor van de centrifuge (in balans). Sluit de rotor met het dekseltje en sluit de minispin. Druk op start.
6. De epjes worden daarna in een waterbad op 37 °C geplaatst. Dit is de optimale temperatuur voor de werking van de restrictie enzymen. Het λ DNA wordt geknipt door de restrictie enzymen, zodat er meerdere DNA fragmenten met verschillende lengte bekomen worden. De incubatie (restrictie) duurt minimum 20 minuten.

Gieten van de agarose gel voor elektroforese

De verschillende DNA fragmenten worden gescheiden dmv gelelektroforese.

1. Plaats de gelhouder in de elektroforesekamer, zodat de inkepingen overeenkomen.
2. Plaats de 2 zwarte tussenschotten.
3. Breng de kam aan.
4. Giet nu de warme agarose gel langzaam (zodat er geen luchtballen gevormd worden) in de elektroforesekamer.
5. Laat de gel ongeveer 20 min. opstijven.

Het kammetje zorgt ervoor dat er openingen (slotjes) in de gel ontstaan. In deze slotjes worden later de 3 DNA stalen en de DNA ladder gepipetteerd.

PAUZE (20 min.)

Aanbrengen van de DNA stalen

1. Overgiet de gel met TAE buffer oplossing.
2. Aan de 3 DNA stalen wordt telkens 2.0 μ l laadkleurstof (paarse epje) toegevoegd, om de migratie van de stalen te kunnen volgen tijdens de elektroforese.
3. Centrifugeer de epjes kort om al de vloeistof naar de bodem te brengen.
4. Pipetteer in het 2^e slotje 10.0 μ l van de DNA ladder (roze epje). In de volgende slotjes breng je telkens 10.0 μ l van de 3 geknipte en gekleurde stalen. Best laat je telkens een slotje vrij.

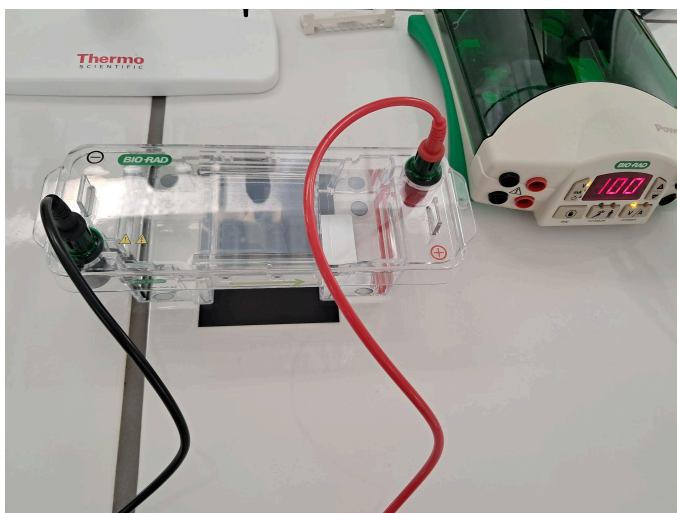
5. Noteer hieronder, in welk slotje het staal hebt aangebracht.

staal	DNA ladder	EcoRI	HindIII	controle
nr slotje				



6. Sluit de elektroforesekamer en sluit aan op de stroombron. Schakel de stroombron aan (spanning: 100 V).
7. De elektroforese duurt tot de laadkleurstof ongeveer 2/3^e van de gel doorlopen heeft (kleurstoffen migreren sneller dan de DNA fragmenten, waardoor je kan zien, wanneer de elektroforese gestopt moet worden. Als de elektroforese te lang loopt, migreren de DNA fragmenten uit de gel). De totale duur van de elektroforese duurt 30 min.

PAUZE (30 min.)



Kleuring van de gel

Na de elektroforese wordt de gel gekleurd (minimum 30 min.)

1. Doe een handschoenen aan (1 persoon) en breng de gel in het plastic bakje
2. Overgiet met de methyleenblauw kleurstof
3. Laat minimum een half uur kleuren
4. Giet de methyleenkleurstof voorzichtig terug in de erlenmeyer
5. Spoel de gel enkele malen met water

De gel mag mee naar school genomen worden.

Tijdens de kleuring, vergelijk je de experimenteel bekomen DNA patronen met deze die je voorspeld hebt adhv de theoretische berekeningen mbv de computer.