

Beta Excellent Klas 4 2011-2012

DNA

PRACTICUM

PROTOCOL

Inleiding

Het experiment bestaat uit twee delen. Het eerste deel omvat het in stukken knippen van de DNA-monster door restrictie-enzymen. In het tweede deel worden de stukken DNA op grootte gescheiden. Hierna worden de DNA-fragmenten gekleurd door de TOA. De gels worden bewaard tot het moment waarop ze geanalyseerd kunnen worden.

Tijdens de uitvoering van deze proef moeten enkele netheidsregels in acht worden genomen. Er wordt tijdens het experiment gewerkt met een micro-injectiespuit, waarop puntjes passen, om 2 of 10µl op te zuigen (zie figuur 1). Bij iedere nieuwe actie met de micro-injectiespuit gebruik je een schoon puntje. Zo voorkom je besmetting van je buisjes met DNA uit andere buisjes. De gebruikte puntjes gooi je weg. Daarnaast luisteren de hoeveelheden nauw: reacties kunnen gemakkelijk mislukken als bijvoorbeeld te veel of te weinig water wordt toegevoegd. Schrijf in je logboek per stap op wie wat doet en noteer het als je handelingen afwijken van het protocol.

Je werkt in deze proef met relatief ongevaarlijke stoffen. Maar het is nodig om met handschoenen te werken, omdat op je handen DNase zit wat het DNA zou afbreken. Bovendien wil je niet dat je DNA-monster met jouw DNA vervuild wordt.

LET OP: Dit is het PROTOCOL. Begin het practicum niet hiermee, maar met de leerlingenhandleiding. In die handleiding word je op gezette tijden naar dit protocol verwezen om praktische handelingen uit te voeren. Heb je ze uitgevoerd, lees dan weer verder in de leerlingenhandleiding.

OEFENPRACTICUM DNA

Je werkt in groepjes van 4 die voor het oefenpracticum weer verdeeld worden in 2 groepjes van 2.

In de volgende les ga je met drie verschillende restrictie-enzymen DNA knippen en dit laten runnen over een gel. Om dit practicum soepel te laten verlopen oefen je een aantal praktische vaardigheden.

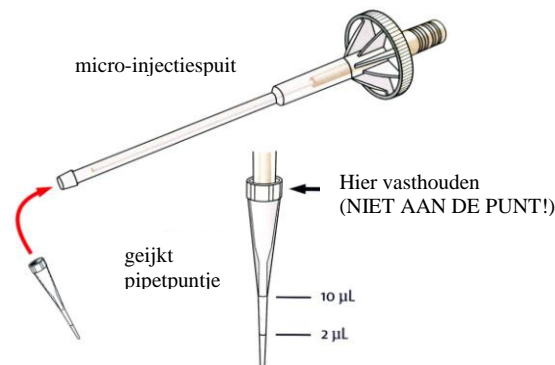
OEFENEN MET DE MICROPIPET

Eerst ga je oefenen met de micropipet om nauwkeurig 2 μ l en 10 μ l af te meten met een blauwe kleurstof.

De micro-injectiespuit

Met behulp van de micro-injectiespuit kunnen kleine hoeveelheden vloeistof heel nauwkeurig worden toegevoegd aan reactiemengsels. Voordat je gaat werken met de micro-injectiespuit en de plastic puntjes die erop passen, moet je het volgende in de gaten houden:

- Trek **nooit** de zuiger helemaal uit de micro-injectiespuit. Hiermee kun je de spuit onherstelbaar beschadigen.
- Trek de zuiger een heel klein stukje omhoog voordat je vloeistof opzuigt met de micro-injectiespuit. Het kleine beetje lucht dat je nu opzuigt, kun je later gebruiken om de laatste druppel vloeistof uit het puntje te krijgen.
- Houd, bij het toevoegen van vloeistof, de injectiespuit zo verticaal mogelijk en op ooghoogte. Zo kun je goed zien wat je aan het doen bent.
- De laatste druppel blijft vaak aan het puntje zitten. Om die ook in de reactie te krijgen, kun je heel voorzichtig met het uiteinde van het puntje de binnenkant van het buisje aanraken. Dan blijft de vloeistof daarop achter.
- Raak **nooit** het uiteinde van de micro-injectiespuit aan met blote vingers. Je kunt de reacties vervuilen met DNA dat aan je handen zit.



Figuur 1.

Oefenen

Als je de bovenstaande voorzorgsmaatregelen hebt gelezen, kun je oefenen met de micro-injectiespuit.

Neem hiervoor de micro-injectiespuit, 2 of 3 puntjes, een leeg epje en een beetje kraanwater waaraan een druppel inkt is toegevoegd. Meet met de micropipet nauwkeurig 2 μ l en 10 μ l af en doe dit in het epje totdat er 24 μ l in het epje zit.

Het laden van de oefengel

Zet de oefengel met de slotjes op de zwarte strook onder de tekst, de slotjes worden dan goed zichtbaar.

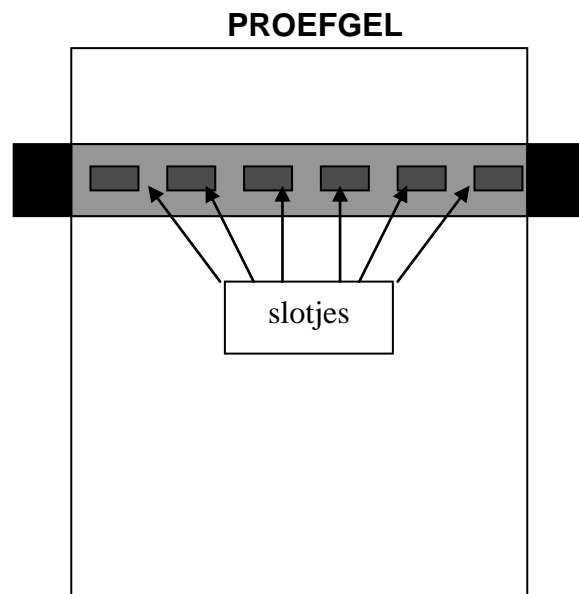
Neem het epje, zuig met de micro-injectiespuit (met een schoon puntje) de inhoud op en spuit het **heel voorzichtig** in een slotje (zie afbeelding).

Je zult de inhoud niet in een keer op kunnen zuigen met de micropipet, je mag bij een volgende keer hetzelfde puntje gebruiken.

Houd het uiteinde van het puntje hierbij onder het vloeistofoppervlak, maar **boven** het slotje. Dit is erg moeilijk, probeer zo rustig mogelijk te werken en steun met je elleboog op tafel.

Doe je dit onvoorzichtig, dan kun je het slotje aan de onderkant lek steken.

Ook moet je het puntje voorzichtig leegdrukken; doe je dit te heftig, dan kun je de laadvloeistof weer uit het slotje spuiten.



DEEL A knippen van het DNA

Materiaal

- 1 buisje met gedroogd DNA (doorzichtig wit plastic)
- 4 buisjes met de verschillende restrictie-enzymen (*rood* = *EcoRI*; *blauw* = *BamHI*; *groen* = *HindIII*, *geel* = leeg (controle))
- gedestilleerd water
- micro-injectiespuit
- puntjes
- rekje om buisjes in te zetten
- stiften (watervast) om buisjes te merken
- 37°C-waterbad met drijvertjes (piepschuim)
- handschoenen

Methode

- 1 Voeg 100 µl gedestilleerd water toe aan het buisje met DNA. Gebruik hiervoor de 10 µl aanduiding op de puntjes en voeg 10 keer water toe met hetzelfde puntje.
- 2 Sluit het buisje af met een dop en laat 5 minuten bij kamertemperatuur staan.

5 minuten wachten
- 3 Houd je duim op de dop en tik met een vinger tegen de zijkant van het buisje. Herhaal dit totdat alle blauwe kleurstof onderin het buisje is gemengd met het water. Het DNA is nu opgelost. Er mag na het mengen **absoluut geen** blauwe kleurstof meer onderin het buisje zichtbaar zijn. De vloeistof wordt wel een beetje blauw. Zie je nog iets, herhaal dan stap 3 en 4.
- 4 Mocht je het buisje per ongeluk laten vallen of zie je dat er druppels tegen de zijkant plakken, tik dan de onderkant van het buisje op je tafel totdat alle vloeistof weer onderin het buisje zit.
- 5 Laat het buisje weer 5 minuten staan bij kamertemperatuur.

5 minuten wachten
- 6 Open de 4 gekleurde buisjes die voor je staan.
- 7 Zet een nieuw puntje aan de micro-injectiespuit. **Zuig de vloeistof in het buisje een paar keer voorzichtig op en neer.** Voeg vervolgens 20 µl van deze DNA-oplossing toe aan het rode buisje met restrictie-enzym *EcoRI* (VERGEET NIET OM NA 10 µl VAN PUNTJE TE WISSELEN!). Sluit het rode buisje af met een dop en tik met een vinger tegen de zijkant totdat het enzym is opgelost. Doe dit gedurende minimaal een minuut.
- 8 Herhaal stap 6 voor de andere buisjes (blauw, groen en geel voor de andere restrictie-enzymen en de controle) en gebruik elke keer uiteraard een nieuw puntje op de micro-injectiespuit.
- 9 Pak het piepschuimen drijvertje met je groepsnummer, druk de 4 buisjes in het drijvertje en leg het in het 37°C-waterbad. Het is belangrijk dat de onderkant van de buisjes contact maken met het water. Noteer de tijd.

30-45 minuten wachten
- 10 Haal na 30 - 45 minuten de buisjes weer uit het waterbad. Noteer de tijd.

DEEL B uitvoeren elektroforese

Materiaal

Geknipt DNA

Laadbuffer (broomfenol *loading dye*, een donkerblauwe vloeistof in grotere buisjes)

Micro-injectiespuit

Puntjes

Agarosegel in een elektroforesebakje

Spanningsbron 30 Volt

Methode

- 1 Voeg aan alle vier de epjes met geknipt DNA 2 μ l laadbuffer toe.
Gebruik telkens een schoon puntje. Meng goed (schudden, tikken) en tik het mengsel daarna weer terug naar de bodem van het epje.
- 2 Noteer in het logboek welk van de monsters je in welk slotje van de gel gaat doen.
- 3 Neem een buisje, zuig met de micro-injectiespuit en een schoon puntje de inhoud op en spuit het **heel voorzichtig** in een kuiltje (slotje). Houd het uiteinde van het puntje hierbij onder het vloeistofoppervlak, maar boven het kuiltje. Doe je dit onvoorzichtig, dan kun je het kuiltje aan de onderkant lek steken. Ook moet je het puntje voorzichtig leeg drukken; doe je dit te heftig, dan kun je het DNA-laadbuffermengsel weer uit het kuiltje spuiten.
- 4 Als **al** het geknipte DNA 'geladen' is worden de elektroforesebakjes in de TOA-werkplaats op een voeding van 30 Volt aangesloten. Het runnen van het DNA duurt 2 tot 2,5 uur.
Het bakje wordt van de voeding afgehaald als de laadbuffer het einde van de gel heeft bereikt. Dit kun je zien doordat de buffer nog niet gekleurd is, je weet dan zeker dat het DNA niet van de gel afgelopen is.
- 5 Het gerunde DNA moet voor een zo goed mogelijk resultaat zo snel mogelijk gekleurd worden. Dit wordt aansluitend gedaan door de TOA. Mocht je tegen die tijd nog op school zijn en dit graag zelf willen doen, maak dan een afspraak.

De gel wordt tot de toetsles bewaard in de koelkast.

Einde protocol