

Crime Scene Investigation

Wie is de dader?



Doelgroep

havo 4/5
vwo 4/5



Vak

Biologie



Duur

2/3 lesuren



Vaardigheden

Onderzoeksvaardigheden
Pipetteren

Deze docentenhandleiding is een toelichting bij de les 'Crime Scene Investigation: Wie is de dader?'. Deze les is een onderdeel van WisMon's Schoollabs. De lessen in deze leerlijn sluiten aan bij de vakleerdoelen van het SLO en de syllabus van het CvTE.

In deze les onderzoeken de leerlingen als forensisch specialisten de dood van een dokter. Door analyse van haren, vingerafdrukken en DNA-fingerprinting proberen ze te achterhalen of het gaat om een moordzaak en wie de eventuele dader is. Hierbij gebruiken ze hun kennis over DNA, voeren ze zelf een gelelektroforese uit en trekken ze conclusies uit hun resultaten.

Inhoudsopgave

Didactische verantwoording.....	blz 2
Lesopzet.....	blz 3
Vorbereiding practicum.....	blz 4
Begeleiding practicum.....	blz 6
Antwoordmodel.....	blz 7
Achtergrondinformatie.....	blz 9
Bijlage I: Gelelektroforese.....	blz 10
Bijlage II: PCR.....	blz 11

Didactische verantwoording



Leerdoelen

- » Leerlingen maken kennis met de analyse van haren en vingerafdrukken.
- » Leerlingen kunnen hun kennis over DNA toepassen in een nieuwe context.
- » Leerlingen kunnen een experiment met gelelektroforese uitvoeren en begrijpen.
- » Leerlingen kunnen aan de hand van hun resultaten een persoon identificeren.



Aansluiting syllabus

Deze les sluit aan bij de volgende subdomeinen en deelconcepten uit de syllabi biologie voor havo en vwo van het College voor Toetsen en Examens (CvTE):

- » A5. Onderzoeken
- » B1. Eiwitsynthese: PCR, restrictie-enzym (vwo)
- » C1. Zelforganisatie van cellen: DNA, chromosoom, niet-coderend DNA
- » F1. Selectie: DNA, chromosoom, mutatie

Benodigde voorkennis

Voorafgaand aan het practicum is het belangrijk dat leerlingen enige voorkennis hebben over de bouw van DNA, mutaties, erfelijkheid en chromosomen. In de leerlingenhandleiding zijn voorbereidende vragen opgenomen om deze voorkennis op te frissen. Als hieruit blijkt dat bepaalde kennis mist, is het verstandig dit voor het practicum nog eens te herhalen. Daarnaast gaat de leerlingenhandleiding uit van enige voorkennis over DNA-technieken (gelelektroforese, PCR en restrictie-enzymen). Mocht dit nog niet in de reguliere lessen aan bod zijn gekomen, dan raden wij aan dit voor het practicum te behandelen. Je kunt hierbij Bijlagen I en II op blz. 10-12 gebruiken.

Inbedding curriculum

Deze les kan worden ingezet als vervanging van een (theorie)les over DNA-fingerprinting en gelelektroforese, of als aanvulling hierop.

Moleculaire biologie

Moleculaire biologie is de afgelopen jaren een steeds belangrijker deel geworden van het biologiecurriculum. De bijbehorende DNA-technieken kunnen worden ervaren als abstracte, lastige onderwerpen als deze puur theoretisch worden behandeld. Als leerlingen de technieken echter zelf kunnen uitvoeren, zoals in dit practicum, zullen zij het gemakkelijker begrijpen en onthouden.

Organisatieniveaus

Cruciaal voor een goed begrip van moleculaire biologie is het leggen van de link tussen de verschillende organisatieniveaus van de biologie: welk effect hebben

moleculaire processen op het organisme? Hier wordt in WisMon's Schoollabs continu naar gestreefd.

Concept-contextmethode

Elk practicum van WisMon's Schoollabs is gekoppeld aan een relevante context, waardoor het nut van de DNA-technieken meteen duidelijk wordt. De practica sluiten daarom naadloos aan bij de concept-contextmethode die de afgelopen jaren in het voortgezet biologieonderwijs is geïmplementeerd. Deze methode houdt in dat concepten uit de lesstof gekoppeld worden aan een maatschappelijke context. Dit kan een context zijn uit de leefwereld van leerlingen, een beroepscontext of een wetenschappelijke context. Het doel hiervan is de samenhang en relevantie van de lesstof te vergroten. De concept-contextmethode draagt bij aan de motivatie en wetenschappelijke vaardigheden van leerlingen. In de practica van WisMon's Schoollabs worden concepten rondom DNA-technieken daarom gekoppeld aan uiteenlopende contexten uit het dagelijks leven, beroepen en de wetenschap.

Practicumonderwijs met WisMon

Bij WisMon zien we practica als essentieel onderdeel van het bètaonderwijs. We streven er daarom naar om practicumonderwijs makkelijk, modern en motiverend te maken. WisMon's Schoollabs past binnen deze visie door het aanbieden van moderne, eenvoudig te bedienen apparatuur en kant-en-klaar lesmateriaal, waarbij de contexten tot de verbeelding spreken en leerlingen lekker zelf aan de slag gaan.

Lesopzet

Hieronder vind je een indicatie van de tijdsduur van de verschillende onderdelen van de les. In het kader hiernaast is een voorbeeld gegeven van hoe dit verdeeld kan worden over verschillende lesuren. Dit kan natuurlijk ook anders worden ingedeeld.

Vorbereiding

60 min. ⌚

- Lees deze handleiding door.
- Lees de leerlinghandleiding door.
- Zet het practicum klaar (zie 'Vorbereiding practicum', blz. 4).

Introductie

15-30 min. ⌚

Afhankelijk van de voorkennis van de leerlingen kan een theoretische uitleg nodig zijn voorafgaand aan het practicum (zie 'Didactische verantwoording', blz. 2). Bespreek in ieder geval de context van het practicum en de voorbereidende vragen. Indien dit de eerste keer is dat leerlingen gaan werken met een pipet, raden we aan ook het gebruik hiervan kort toe te lichten.

Theoretische analyse*

45 min. ⌚

Leerlingen lezen de informatie over het analyseren van haren en vingerafdrukken en voeren de analyse uit.

Practicum

50 min. ⌚

Leerlingen voeren in groepjes het practicum uit, leggen hun resultaten vast en ruimen alle materialen weer op na afloop. Let op: het practicum bevat een paar momenten waar leerlingen even moeten wachten. Je kunt hen waar mogelijk alvast wat laten opruimen of aan hun eigen biologieopdrachten laten werken.

Afsluiting

15 min. ⌚

Leerlingen maken met hun groepje de afsluitende vragen, waarbij ze conclusies trekken op basis van hun resultaten. Ook maken ze de reflectievragen. We raden aan het practicum klassikaal na te bespreken.

Suggestie lesindeling

Les 1:

- Introductie context
- Theoretische analyse

Les 2:

- Vorbereidende vragen
- Practicum

Les 3:

- Afsluitende vragen
- Reflectievragen
- Nabespreking

* Bij weinig tijd kun je ervoor kiezen de theoretische analyse weg te laten en alleen het practicum te doen. De resultaten van de gelelektroforese zijn voldoende om de moordzaak op te lossen.

Vorbereiding practicum

Algemeen

- » Voorafgaand aan het practicum moet een aantal zaken worden voorbereid en klaargezet. De benodigdheden hiervoor zijn steeds per stap aangegeven.
- » De doos bevat genoeg materiaal om 7 experimenten uit te voeren.
- » Ons advies is om groepjes van maximaal 4 leerlingen te maken. In dat geval kunnen dus 28 leerlingen deelnemen.

TAE-buffer maken

Voor de gelelektroforese is een Tris/ Acetaat/EDTA (TAE)-buffer nodig. Het TAE is geleverd in een flesje gelabeld 'TAE concentrate'. Hiervan moet een 1:20 verdunning gemaakt worden.

1 Bereken de benodigde hoeveelheden TAE-concentraat en water met behulp van de formules hiernaast. Het geleverde TAE-concentraat is 100 mL. Voor elk experiment is 135 mL TAE-buffer nodig.

2 Meet (bijvoorbeeld) 100 mL TAE-concentraat en 1900 mL demiwater of gedistilleerd water af in geschikte maatcilinders. Voeg dit bij elkaar in een bekglas om 2000 mL TAE-buffer te verkrijgen.

3 Als je het TAE-buffer alvast wilt klaarzetten voor de leerlingen, meet dan per groepje 135 mL buffer af in een geschikte maatcilinder en giet dit in bekglazen of erlenmeyers.

4 Als je het resterende buffer wilt bewaren, giet het dan in een laboratoriumfles en bewaar het op kamertemperatuur.

Benodigdheden

- » TAE-concentraat
- » Demiwater of gedistilleerd water
- » Maatcilinders
- » Bekerglazen of erlenmeyers (Laboratoriumfles)

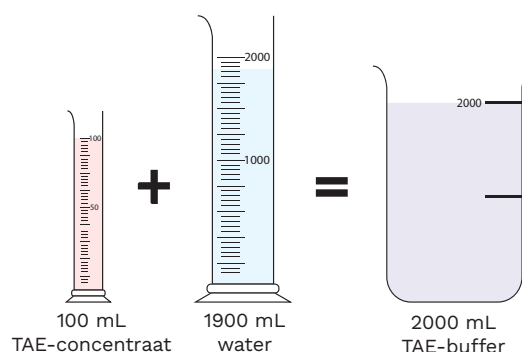
$$V_{\text{TAE}} = V_{\text{buffer}} / 20$$

$$V_{\text{water}} = V_{\text{buffer}} - V_{\text{TAE}}$$

V_{TAE} = benodigd volume TAE-concentraat
 V_{buffer} = gewenst eindvolume buffer
 V_{water} = benodigd volume water

Voorbeeldberekening:

$V_{\text{buffer}} = 2000 \text{ mL}$
 $V_{\text{TAE}} = 2000/20 = 100 \text{ mL}$
 $V_{\text{water}} = 2000 - 100 = 1900 \text{ mL}$



DNA samples

Van elk van de 5 DNA samples is 125 μL geleverd. Elk groepje heeft hiervan 10 μL nodig.

1 Label per groepje 5 microcentrifugebuisjes (kleine epjes) met de namen van de DNA samples (V, S1, S2, S3 en H).

2 Pipetteer voor elk groepje 10 μL van elk sample in de juiste microcentrifugebuisjes. Gebruik voor elk sample een nieuw pipetpuntje.

Benodigdheden klaarzetten

1 Zet de benodigdheden per groepje klaar met behulp van het lijstje hiernaast.

2 Elk groepje moet daarnaast zelf zorgen dat het een fototoestel of telefoon met camera heeft om de resultaten vast te leggen.

3 Zet de benodigdheden per klas klaar met behulp van het lijstje hiernaast. Het demiwater of gedistilleerd water is alleen nodig bij het opruimen.

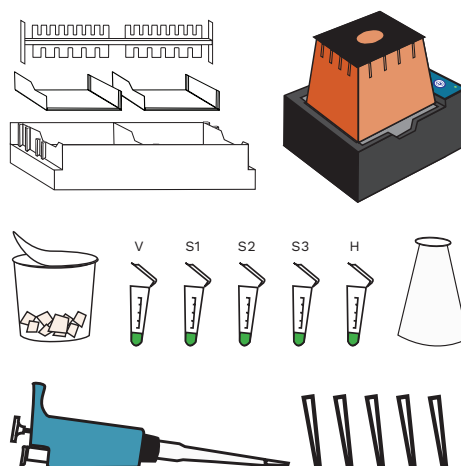
Benodigdheden

- » 5 DNA samples
- » 1 pipet (2-20 μL)
- » Pipetpuntjes
- » Microcentrifugebuisjes (epjes)
- » Stift



Benodigdheden per groepje

- » 1 MiniOne® Casting System
- » 1 MiniOne® Elektroforese-systeem
- » 1 agarose GreenGel™ cup (1%)
- » 5 DNA samples (10 μL)
- » TAE-buffer (135 mL)
- » 1 pipet (2-20 μL)
- » 5 pipetpuntjes



Benodigdheden per klas

- » Magnetron
- » Demiwater/gedistilleerd water

Begeleiding practicum

Denk om de veiligheid

- » Bij verwarmen of smelten van stoffen
- » Bij het werken met elektrische apparatuur
- » Gebruik handschoenen en een veiligheidsbril waar nodig, met name bij het werken met vloeistoffen (bijv. maken en laden van de agarosegel)
- » Was je handen na het practicum

Algemeen aandachtspunt

- » Zorg dat leerlingen alle informatie bij een stap lezen voordat ze het uitvoeren.

Een aantal aandachtspunten bij specifieke stappen van het practicum zijn hieronder verder toegelicht.

De gel maken

2 Zet niet meer dan 5 gel cups tegelijk in de magnetron. Als leerlingen de stappen met de gel cups zelf uitvoeren, is toezicht van een volwassene aan te raden.

3 De gel cups zijn heet als ze uit de magnetron komen en er kan hete stoom uit komen. Laat na het gieten de gel met rust tot hij gestold is.

De gel laden

4 Als leerlingen niet eerder een pipet hebben gebruikt, laat ze dan eerst even oefenen met bijvoorbeeld water. Verdere aandachtspunten bij het laden van de gel zijn:

- » Voor elk DNA sample een nieuw pipetpuntje gebruiken.
- » Het puntje goed op de pipet drukken.
- » Met de pipet voelen of deze goed in de well zit, voordat je pipetteert.
- » Na het pipetteren de knop van de pipet ingedrukt houden totdat de punt weer volledig uit de vloeistof in de tank is gehaald.
- » De gel niet meer bewegen als deze eenmaal geladen is.

Het DNA scheiden

2 Zorg dat leerlingen het lampje met lage intensiteit gebruiken als ze tijdens het wachten naar de gel willen kijken. Zorg dat ze dit ook niet te lang doen, want het licht verzwakt het fluorescente signaal van het DNA.

Opruimen

2 Dit practicum is zodanig aangepast dat alle stoffen ongevaarlijk zijn. Daarom mag de gel gewoon in de prullenbak en het TAE-buffer door de gootsteen.

Antwoordmodel

Analyse haren

1. Mens

Cuticula: niet duidelijk zichtbaar, glad.
Cortex: duidelijk zichtbaar, veel pigment.
Medulla: aanwezig, gefragmenteerd, dun, zonder duidelijke structuur.

Hond

Cuticula: niet duidelijk zichtbaar, glad.
Cortex: duidelijk zichtbaar, ovale structuurtjes aanwezig.
Medulla: aanwezig, aaneengesloten, breed, zonder duidelijke structuur.

Kat

Cuticula: afzonderlijke schubben duidelijk zichtbaar, stekelig.
Cortex: niet duidelijk zichtbaar.
Medulla: aanwezig, aaneengesloten, breed, met duidelijk geordende structuur.

Konijn

Cuticula: niet duidelijk zichtbaar, glad.
Cortex: niet duidelijk zichtbaar.
Medulla: aanwezig, aaneengesloten, breed, met duidelijk geordende structuur.

- Mens: redelijk egaal van kleur, met een gladde cuticula en dunne medulla.
Hond: gladde cuticula en brede medulla zonder bijzondere structuur.
Kat: stekelige cuticula en brede medulla met duidelijk geordende structuur.
Konijn: gladde cuticula en brede medulla met duidelijk geordende structuur.
- Haar 1 is afkomstig van een kat, want deze heeft een stekelige cuticula. Daarnaast zie je ook de brede medulla met duidelijk geordende structuur.
Haar 2 is afkomstig van een mens, want deze is egaal van kleur, heeft een gladde cuticula en heeft een dunne (gefragmenteerde) medulla.
- Haar 1 werd gevonden op de keukenvloer en is afkomstig van een kat. Dokter de Waard had zelf geen huisdieren. In principe kan elk van de verdachten de kattenhaar per ongeluk hebben achtergelaten op de plaats delict, bijvoorbeeld doordat deze van haar kleding is gevallen. Verdachte 1 heeft echter zelf een kat en de vriend van verdachte 3 heeft een kat, dus dit maakt deze verdachten wel extra verdacht.

Verdachte 2 heeft een hond, dus dit is minder waarschijnlijk.

Haar 2 werd gevonden op het zakje en is afkomstig van een mens. De haar heeft een donkerbruine kleur. Dit wijst op verdachten 2 en 3, omdat zij beide donker gekleurd haar hebben. Verdachte 1 heeft lichtbruin haar, dus dit is minder waarschijnlijk.

Alles bij elkaar lijkt dit het meest te wijzen op verdachte 3 (Laura de Wit), maar we hebben nog weinig zekerheid.

Analyse vingerafdrukken

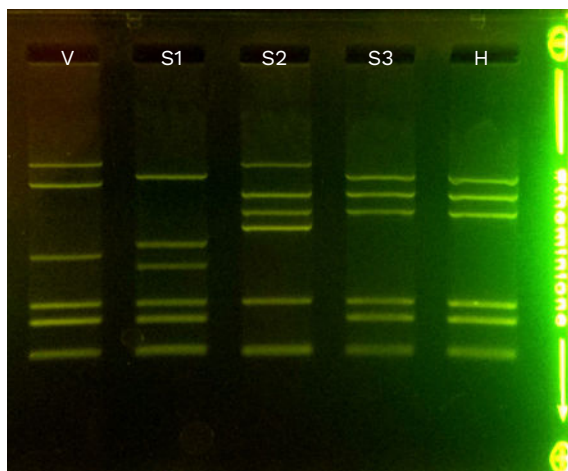
- Verdachte 1: middenzak naar rechts
Verdachte 2: lus naar rechts
Verdachte 3: draaiing
Slachtoffer: middenzak naar links
Kopje (vingerafdruk 1): dit lijkt een mix te zijn van twee of meer vingerafdrukken. De patronen lijken op draaiingen of middenzakken.
Zakje (vingerafdruk 2): draaiing
- Het gemengde patroon bij vingerafdruk 1 lijkt erop te wijzen dat zowel het slachtoffer als iemand anders het koffiekopje hebben aangeraakt. De draaiings- of middenzakpatronen zouden kunnen wijzen op verdachte 1 of 3, maar de vingerafdrukken zijn niet zo goed zichtbaar.
Bij vingerafdruk 2 op het zakje hoort een draaiingspatroon. Dit komt niet overeen met de vingerafdruk van het slachtoffer. Iemand anders heeft dus het zakje aangeraakt. Het draaiingspatroon wijst op verdachte 3.
Alles bij elkaar lijkt dit wederom het meest te wijzen op verdachte 3 (Laura de Wit). Zij heeft hoogstwaarschijnlijk het zakje kaliumcyanide aangeraakt en mogelijk ook het koffiekopje. Misschien heeft zij het gif in het kopje gedaan.

Vorbereidende vragen

- Bijvoorbeeld: DNA is de drager van erfelijke informatie, DNA codeert voor eiwitten, etc.
- Chromosomen bestaan uit DNA dat om eiwitten (histonen) heen is gewikkeld en compact is opgerold, zodat het in de celkern past.

- 46 chromosomen.
- 50%. Eén set van 23 chromosomen heb je gekregen van je moeder en één set van 23 chromosomen van je vader.
- Bijvoorbeeld: een DNA-molecuul heeft de vorm van een dubbele helix, het is dubbelstrengs, het is opgebouwd uit nucleotiden, etc.
- Cytosine (C), guanine (G), adenine (A) en thymine (T).
- DNA is negatief geladen.
- Met behulp van PCR (polymerase chain reaction) wordt het DNA gekopieerd. Deze stap is nodig, omdat het geïsoleerde DNA vaak niet genoeg is om te analyseren. Daarnaast worden met PCR ook specifieke delen uit het DNA geselecteerd. Alleen deze stukken worden dan gekopieerd om te analyseren. Restrictie-enzymen knippen het DNA bij specifieke sequenties. Hierdoor ontstaan kleinere fragmenten, die per persoon verschillen in lengte. Deze verschillen tussen personen leiden tot unieke bandenpatronen op de gel. Deze stap is dus nodig, omdat dit ervoor zorgt dat je straks onderscheid kunt maken tussen personen.

Voorbeeld resultaat



Afsluitende vragen

- Het DNA-profiel van S3 lijkt het meest op dat van de haar (H). Dit betekent dat haar 2, die gevonden is op het zakje kaliumcyanide, vrijwel zeker afkomstig is van verdachte 3 (Laura de Wit).
- Op basis van het bewijsmateriaal kunnen we concluderen dat verdachte 3 (Laura de Wit) waarschijnlijk verantwoordelijk is voor de dood van dokter de Waard. Er is een haar en een vingerafdruk van haar gevonden op het zakje kaliumcyanide. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of zij dit zal bekennen, of zij alleen handelde en wat haar motief is geweest (de levensverzekering?).

Reflectievragen

- Omdat er geen DNA in de well is gepipetteerd, zou je dan geen bandjes zien in het laantje onder deze well. Je zou dan dus geen resultaat hebben voor één van de personen of de haar.
- DNA is negatief geladen en wordt dus aangetrokken tot de positieve elektrode. Om het DNA naar beneden te laten bewegen door de gel, moeten de wells dus aan de kant van de negatieve elektrode liggen.
- Het DNA zou dan aan de bovenkant van de gel af gelopen zijn, omdat het richting de positieve elektrode beweegt. Je zou dan geen bandjes zien in de gel en dus geen resultaten hebben.
- Het DNA zou dan aan de onderkant van de gel af gelopen zijn. Je zou dan geen bandjes zien in de gel en dus geen resultaten hebben.
- (geen goed of fout antwoord)
- (geen goed of fout antwoord)

Achtergrondinformatie

Verder lezen?

Meer over de concept-contextmethode in het biologieonderwijs:

Boersma, K.Th., Kamp, M.J.A., Oever, L. van den, Schalk, H.H. (2010). *Naar actueel, relevant en samenhangend biologieonderwijs*. Utrecht: CVBO.

Meer over DNA-technieken, zoals gelelektroforese en PCR:

Zie hoofdstuk 8 van: Alberts, B., Johnson, A.D., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.). New York: Garland Science.

Meer over haaranalyse:

Deedrick, D.W. & Koch, S.L. (2004). Microscopy of Hair Part II: A Practical Guide and Manual for Animal Hairs. *Forensic Science Communications*, 6(3).

Hulp nodig?

Neem contact op met WisMon:



support@wismon.nl



030-737 0348

Meer van WisMon?

Kijk op www.wismon.nl voor meer informatie over WisMon's Schoollabs en voor het bestellen van materialen.

Andere lessen uit deze reeks:

- » Walvis-DNA: Wie is de vader van Luna?
- » Voedselinfectie: Een feestje met een bijsmak.
- » Huntington: Een ziekte in de stamboom.
- » De beste koeien: Een boer met keuzestress.
- » Proeven aan genetica: Onderzoek je eigen DNA!

Bijlage I

Gelelektroforese

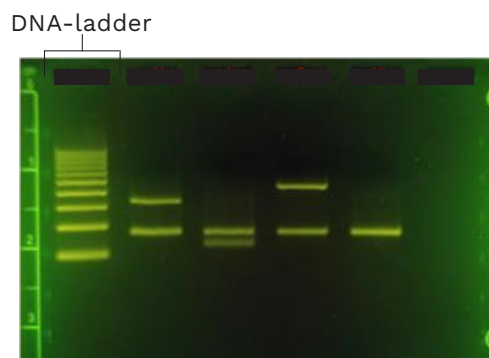
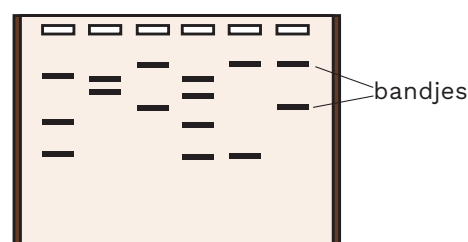
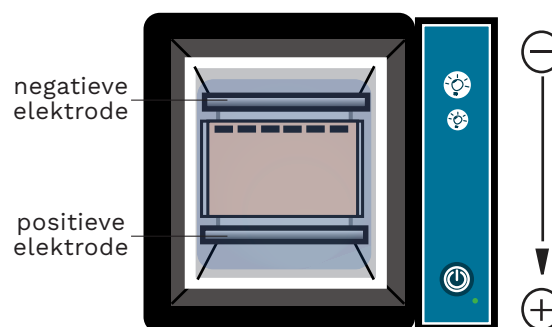
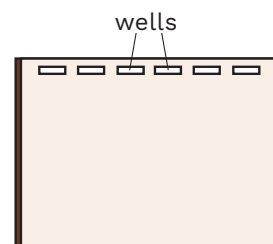
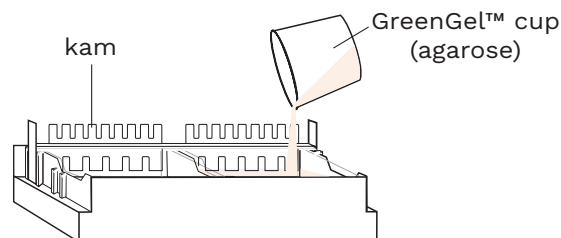
Gelelektroforese is een techniek waarmee je de componenten van een mengsel kunt scheiden. Dit kunnen mengsels zijn van DNA, RNA, eiwitten of kleurstoffen. De componenten worden gescheiden op basis van de grootte, lading en vorm van de moleculen. Hierbij wordt een gel gebruikt, waar de moleculen doorheen bewegen onder invloed van een elektrisch veld.

Voor het scheiden van DNA, zoals in dit practicum, wordt vaak een agarosegel gebruikt. Deze wordt gemaakt door gesmolten agarose in een bakje te gieten en hier een kam in te plaatsen. Als de agarose is gestold, wordt de kam verwijderd en heb je een gel met aan één zijde een rij wells (putjes). In deze wells pipetteer je het DNA dat je wilt scheiden. In dit practicum gebruiken we GreenGel™ cups om de gel te maken. Naast agarose zit hierin ook een DNA-kleuring, om het DNA zichtbaar te maken.

De gel wordt tussen een positieve en een negatieve elektrode geplaatst, zodat een elektrisch veld kan worden aangebracht. Omdat DNA negatief geladen is, zullen de moleculen vanuit de well richting de positieve elektrode bewegen. Hierbij bewegen kleine DNA-fragmenten het gemakkelijkst door de poriën van de gel, waardoor zij een grotere afstand zullen afleggen dan lange DNA-fragmenten.

Het resultaat is een bandenpatroon op de gel. Elk bandje bestaat uit DNA-moleculen met dezelfde lengte. De kortste DNA-fragmenten vormen een bandje onderin, terwijl bandjes van lange DNA-fragmenten meer bovenin zichtbaar zijn. Soms wordt in één van de wells een DNA-ladder gepipetteerd. Dit is een mengsel van DNA-moleculen met verschillende, bekende lengtes. Met de DNA-ladder kun je dan aflezen hoe lang de DNA-fragmenten uit je samples ongeveer zijn.

Gelelektroforese wordt o.a. gebruikt voor DNA-fingerprinting. Hierbij wordt het DNA van individuen vergeleken door de bandenpatronen naast elkaar te leggen, bijvoorbeeld voor forensisch onderzoek, verwantschapsonderzoek, in de gezondheidszorg of voor wetenschappelijk onderzoek.



Bijlage II

Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) is een techniek waarmee je DNA kunt kopiëren. Het lijkt daarom in veel opzichten op de DNA-replicatie die in levende organismen plaatsvindt. Een belangrijk verschil is dat je met PCR specifieke gedeeltes van het DNA kunt selecteren die je wilt kopiëren. Onderzoekers gebruiken PCR om uit zeer kleine hoeveelheden DNA de juiste gedeeltes te vermenigvuldigen, zodat er genoeg van is om te gebruiken in de vervolgstappen van hun onderzoek.

Benodigheden

Voor een PCR-reactie heb je de volgende componenten nodig.

- » **DNA-template:**
Dit is het DNA dat je gaat kopiëren. Vaak is dit DNA dat is geïsoleerd uit het organisme dat wordt bestudeerd. In dit practicum zijn de DNA-templates het geïsoleerde DNA van het slachtoffer, de verdachten en haar 2.
- » **Primers:**
Dit zijn korte stukjes enkelstrengs DNA die als startpunten van het kopiëren worden gebruikt. Ze zijn zo ontworpen dat hun nucleotidesequenties complementair zijn aan de uiteinden van de DNA-sequentie die je wilt kopiëren, waardoor ze specifiek aan dat deel van het DNA binden.
- » **Nucleotiden:**
Dit zijn de bouwstenen om nieuwe DNA-strengen mee te maken.
- » **Taq-polymerase:**
Dit is een speciaal DNA-polymerase. Net als bij de DNA-replicatie in levende organismen is het enzym DNA-polymerase nodig om nucleotiden aan te bouwen aan de nieuwe DNA-streng. Speciaal aan het Taq-polymerase is dat deze in staat is de hoge temperaturen te weerstaan die nodig zijn bij een PCR-reactie.
- » **PCR-buffer:**
Dit is een oplossing die ervoor zorgt dat de juiste pH wordt gehandhaafd voor de PCR-reactie.
- » **Magnesiumionen (Mg^{2+}):**
Dit is een co-factor die ervoor zorgt dat het Taq-polymerase goed zijn werk kan doen.

PCR-apparaat

Alle componenten worden bij elkaar gevoegd in een PCR-buisje (klein epje), dat in het PCR-apparaat wordt geplaatst. Het PCR-apparaat zorgt ervoor dat het reactiemengsel een reeks temperatuurveranderingen ondergaat, waardoor het DNA gekopieerd wordt.



Stappen van een PCR-reactie

De PCR-reactie bestaat uit onderstaande stappen. Zie ook de afbeelding op blz. 12 voor een schematische weergave hiervan.

1. **Denaturatie van het DNA:**
Door een hoge temperatuur (ongeveer 94°C) worden de waterstofbruggen tussen de dubbele DNA-strengen verbroken en ontstaat enkelstrengs DNA.
2. **Binding van de primers:**
De temperatuur wordt verlaagd tot ongeveer 62°C, waardoor de primers binden aan specifieke sequenties in de DNA-template.
3. **Elongatie:**
De temperatuur wordt weer iets verhoogd (tot ongeveer 72°C). Hierdoor bindt het Taq-polymerase aan het DNA en begint het kopiëren. Het polymerase begint vlak naast de primer en de juiste nucleotiden worden ingebouwd op basis van de DNA-template. Het resultaat is dubbelstrengs DNA.

PCR-cycli

Het doorlopen van deze drie stappen wordt één cyclus genoemd. Door de cyclus te herhalen wordt steeds meer DNA geproduceerd. Meestal worden 10 tot 45 cycli uitgevoerd, met als resultaat een gigantische hoeveelheid DNA-kopieën. Deze kunnen gebruikt worden in vervolgstappen van het onderzoek. Het DNA kan bijvoorbeeld worden behandeld met restrictie-enzymen of zichtbaar worden gemaakt met gelelektroforese.

