

Voedselinfectie

Een feestje met een bijsmaak



Doelgroep

vwo 5/6



Vak

Biologie



Duur

3 lesuren



Vaardigheden

Onderzoeksvaardigheden
Pipetteren

Deze docentenhandleiding is een toelichting bij de les 'Voedselinfectie: Een feestje met een bijsmaak'. 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 leerlingen een voedselgerelateerde uitbraak op een feestje. Ze proberen te achterhalen welk gerecht de bron was door het eetgedrag van de gasten te analyseren en bacterie-DNA op te sporen in het voedsel. Hierbij gebruiken ze hun kennis over DNA, kiezen ze zelf hun samples voor een gelelektroforese en trekken ze conclusies uit hun resultaten.

Inhoudsopgave

Didactische verantwoording.....	blz 3
Lesopzet.....	blz 4
Voorbereiding practicum.....	blz 5
Begeleiding practicum.....	blz 7
Antwoordmodel.....	blz 8
Achtergrondinformatie.....	blz 11
Bijlage I: Shigella sonnei.....	blz 12
Bijlage II: PCR.....	blz 13
Bijlage III: Gelelektroforese.....	blz 15

Didactische verantwoording



Leerdoelen

- » Leerlingen maken kennis met het begrip voedselgerelateerde uitbraak.
- » Leerlingen kunnen data ordenen om het systematisch te analyseren.
- » Leerlingen kunnen een hypothese opstellen en een experiment bedenken om deze te testen.
- » Leerlingen kunnen een experiment met gelelektroforese uitvoeren en begrijpen.
- » Leerlingen kunnen aan de hand van hun resultaten conclusies trekken.



Aansluiting syllabus

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

- » A5. Onderzoeken
- » B1. Eiwitsynthese: nucleotide, basenparing, dubbelstrengs, PCR, primer
- » C1. Zelforganisatie van cellen: DNA, gen

Benodigde voorkennis

Voorafgaand aan het practicum is het belangrijk dat leerlingen enige voorkennis hebben over de bouw van DNA, gelelektroforese, PCR, primers en de natuurwetenschappelijke methode. 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, II en III op blz. 12-15 gebruiken.

Inbedding curriculum

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

Moleculaire biologie

Moleculaire biologie is de afgelopen jaren een steeds belangrijker deel geworden van het biologiecursus. 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 lessen. Dit kan natuurlijk ook anders worden ingedeeld.

Vorbereiding 60 min. ⌵

- Lees deze handleiding door.
- Lees de leerlingenhandleiding door. Let op: er zijn 2 delen. Deel 2 geeft het antwoord van deel 1 weg.
- Zet het practicum klaar (zie 'Vorbereiding practicum', blz. 5).

Introductie* 5-30 min. ⌵

Afhankelijk van de voorkennis van de leerlingen kan een theoretische uitleg nodig zijn voorafgaand aan het practicum (zie 'Didactische verantwoording', blz. 3). Bespreek in ieder geval de context van het practicum. Indien dit de eerste keer is dat leerlingen gaan werken met een pipet, raden we aan ook het gebruik hiervan kort toe te lichten.

Theoretisch gedeelte* 45 min. ⌵

Leerlingen analyseren de interviews met de gasten (handleiding deel 1), lezen aanvullende informatie en maken de voorbereidende vragen, waarbij ze nadenken over de opzet van hun experiment (handleiding deel 2).

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 en reflectievragen, waarbij ze conclusies trekken op basis van hun resultaten en terugkijken naar het practicum. We raden aan het practicum klassikaal na te bespreken.

Suggestie lesindeling

Les 1:

- Introductie
- Theoretische gedeelte

Les 2:

- Practicum

Les 3:

- Afsluitende vragen
- Reflectievragen
- Nabespreking

* Let op: als zowel de theorie als het pipetteren volledig nieuw zijn voor de leerlingen, duurt de introductie mogelijk langer dan een half uur.

* Bij weinig tijd kun je ervoor kiezen de analyse van de interviews over te slaan en de leerlingen te vertellen welk gerecht de bron van de uitbraak was.

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)

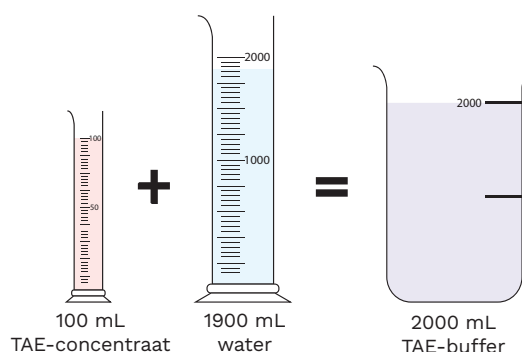
$$V_{\text{TAE}} = V_{\text{buffer}} / 20$$

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

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 11 DNA samples is 125 μL geleverd. Elk groepje heeft hiervan 10 μL nodig.

1 Label per groepje 11 microcentrifugebuisjes (kleine epjes) met de namen van de DNA samples (M1M, 1Kb, SRS, +LC, -C, 5L, C, SC, B, S, G).

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

Benodigheden klaarzetten

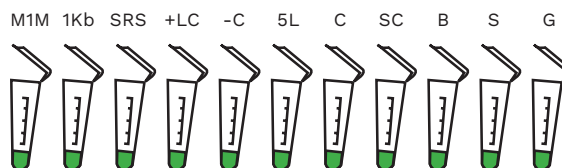
1 Zet de benodigheden per groepje klaar met behulp van het lijstje hiernaast.

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

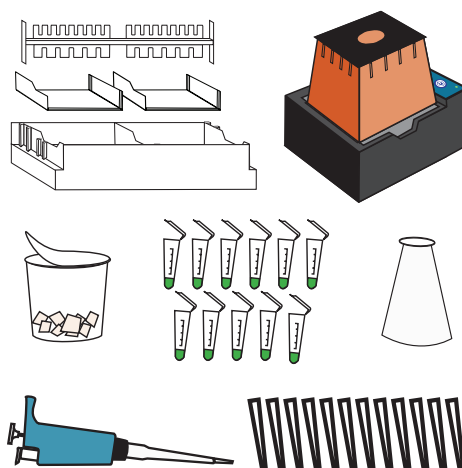
Benodigheden

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



Benodigheden per groepje

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



Benodigheden 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 gasten

1. Twee voorbeelden van een correct ingevulde tabel zijn te vinden op blz. 10. Er zijn andere goede antwoorden mogelijk.
2. Een juiste hypothese wijst de kapsalon aan als bron van de uitbraak. Als je kijkt naar het eetgedrag van de klachtenvrije gasten, dan valt het op dat geen van hen kapsalon of koolsalade heeft gegeten. Slechts 3 van de 6 zieke mensen hebben koolsalade gegeten, tegenover 5 van de 6 voor de kapsalon. Het is dus waarschijnlijker dat de kapsalon de bron van de uitbraak is.
3. Er zijn verschillende mogelijke verklaringen voor het ziek worden van de zesde persoon:
 - a) Hij is door iemand anders besmet met de bacterie.
 - b) Hij heeft wel kapsalon gegeten, maar herinnerde zich dit niet en heeft het daarom niet verteld tijdens het interview.
 - c) Hij heeft de kapsalon niet gegeten, maar wel aangeraakt, waarbij de bacterie op zijn handen terecht is gekomen. Toen hij later iets anders at, is toch infectie opgetreden.
 - d) Hij heeft gewoon teveel gegeten (zie interview) en het feit dat hij zich niet lekker voelde kwam daardoor en niet door de bacterie.
4. Voorbeelden van goede antwoorden:
Hoe is het voedsel bereid en bewaard?
Was één van de gasten misschien al ziek voordat hij/zij naar het feestje kwam?
Welke gerechten hebben de gasten aangeraakt?

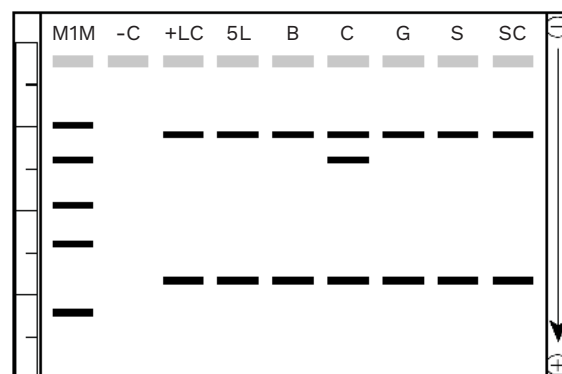
Vorbereidende vragen

1. Een juiste hypothese wijst één van de vijf lagen (friet, shoarma, kaas, salade of knoflooksaus) aan als bron van de uitbraak. De kans dat de bacterie in alle lagen zat, lijkt na het eerdere onderzoek van het team klein. Leerlingen kunnen de keuze voor een specifieke laag baseren op de informatie over het productie- en bewaarproces, hoewel op basis daarvan nog geen duidelijke boosdoener is aan te wijzen.

2. Antwoord kan per groepje verschillen. De meest logische keuze is: M1M, +LC, -C, 5L, C, SC, B, S en G.
3. Antwoord kan per groepje verschillen. In het geval van de gekozen samples hierboven kan de keuze als volgt gemotiveerd worden. M1M is de beste DNA-ladder, omdat je DNA-fragmenten verwacht van 175, 1000 en 1800 bp. Daarnaast is het verstandig om een positieve en negatieve controle mee te nemen in het experiment. Tot slot wil je een gemengd sample en een sample per afzonderlijke laag meenemen om de kapsalon zo grondig mogelijk te onderzoeken.
4. Antwoord afhankelijk van vraag 1 en 2. Bij DNA-ladders moeten meerdere bandjes getekend worden. Bij de referentiestandaard en positieve controle moeten 2 bandjes getekend worden bij de verwachte lengtes (175 en 1000 respectievelijk 1800 bp). Bij de negatieve controle moeten geen bandjes getekend worden. Bij elk van de samples afkomstig van de kapsalon moeten 2 bandjes getekend worden bij 175 en 1800 bp, omdat deze ook de positieve controle bevatten. Afhankelijk van de hypothese (opgesteld bij vraag 1) zal daarnaast een extra bandje van 1000 bp worden verwacht bij het geïnfecteerde sample. Let op de plaats van de DNA-bandjes op de gel: kleine fragmenten onderaan en grotere fragmenten bovenaan.

Voorbeeld resultaat

Het resultaat hangt af van de gekozen samples. Het kan er bijvoorbeeld zo uitzien:



Afsluitende vragen

1. Antwoord kan per groepje verschillen.
2. Ja, in de kaaslaag.
3. Antwoord kan per groepje verschillen.
4. Antwoord kan per groepje verschillen. De positieve controle kan gekozen worden om te bevestigen dat het experiment succesvol was. Je weet dan dat je negatieve resultaten kunt vertrouwen. De negatieve controle kan gekozen worden om te bevestigen dat er geen vervuiling van het experiment is geweest. Je weet dan dat je positieve resultaten kunt vertrouwen. De *Shigella* referentiestandaard laat zien waar je bandjes kunt verwachten als er wildtype *Shigella*-DNA aanwezig is in een sample. De laatste is het minst belangrijk, omdat je al weet dat je een bandje bij 1000 bp verwacht en deze goed is af te lezen met de DNA-ladder.
5. De concentratie *Shigella*-DNA in het gemengde sample was waarschijnlijk te laag om aan te tonen. Omdat de infectieuze dosis van de bacterie laag is, zou het kunnen dat er maar weinig *Shigella*-bacteriën in de kapsalon zaten. Als je dan een klein gemengd sample neemt, is de kans op aanwezigheid van een aantoonbare hoeveelheid *Shigella*-DNA klein.
6. Om te bepalen welke laag van de kapsalon de bron van de uitbraak was. Als de besmetting afkomstig was uit één bepaalde laag, dan zal de concentratie *Shigella*-DNA in een sample uit die laag groter zijn dan in een gemengd sample. Door de afzonderlijke lagen te checken is de kans op het aantonen van de bacterie dus groter. Daarnaast is het belangrijk om te weten welke laag de bron was, omdat dit ingrediënt mogelijk ook gebruikt wordt in andere gerechten.

Reflectievragen

1. 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 dit DNA sample.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. (geen goed of fout antwoord)
6. (geen goed of fout antwoord)

Gast

Voedingsmiddel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aardappelchips		x	x	x			x		x		x	
Dipsaus met ui		x		x			x		x		x	
Tortillachips	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
Tomatensalsa		x	x		x		x			x		
Guacamole	x			x	x	x	x		x			x
Aardappelsalade		x				x	x					
Hamburgers	x	x	x	x		x	x		x	x	x	x
Hotdogs					x		x	x				x
Kapsalon	x		x						x	x	x	
Groene salade			x			x			x		x	
Sladressing			x			x	x		x		x	
Gevulde eieren	x	x	x	x			x	x		x	x	
Koolsalade	x		x							x		
Taco's met kip	x				x		x	x		x		x
Ziek?	x		x				x		x	x	x	

Gast

Voedingsmiddel	1	3	7	9	10	11	2	4	5	6	8	12
Aardappelchips		x	x	x		x	x	x				
Dipsaus met ui			x	x		x	x	x				
Tortillachips	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Tomatensalsa		x	x		x		x		x			
Guacamole	x		x	x				x	x	x		x
Aardappelsalade			x				x			x		
Hamburgers	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x
Hotdogs			x						x		x	x
Kapsalon	x	x		x	x	x						
Groene salade		x		x		x				x		
Sladressing		x	x	x		x				x		
Gevulde eieren	x	x	x		x	x	x	x			x	
Koolsalade	x	x			x							
Taco's met kip	x		x		x				x		x	x
Ziek?	x	x	x	x	x	x						

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 voedselgerelateerde uitbraken in Nederland:](#)

Friesema, I.H.M., Slegers-Fitz-James, I.A., Wit, B. & Franz, E. (2020). *Voedselgerelateerde uitbraken in Nederland: 2006-2017*. Bilthoven: RIVM.

[Meer over voedselinfecties \(publieksinformatie\):](#)

Wat je moet weten, om veilig te eten! Informatie over voedselinfecties (2015). Bilthoven: RIVM.

[Meer over Shigella-bacteriën:](#)

Richtlijn shigellose (laatst gewijzigd 2019). <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/shigellose>. Bilthoven: RIVM.

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?
- » Crime Scene Investigation: Wie is de dader?
- » Huntington: Een ziekte in de stamboom.
- » De beste koeien: Een boer met keuzestress.
- » Proeven aan genetica: Onderzoek je eigen DNA!

Bijlage I

Shigella sonnei

Shigella sonnei is een bacteriesoort uit het geslacht *Shigella*. Er zijn nog drie andere *Shigella*-soorten: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* en *Shigella boydii*. Deze bacteriën horen bij de familie Enterobacteriaceae. 'Entero' betekent 'darm' en bacteriën van deze familie komen dan ook voor in onze normale darmflora of ze veroorzaken darminfecties. In het geval van *Shigella*-bacteriën gaat het om darminfecties. *Shigella*-bacteriën zijn staafvormig en kunnen zowel met als zonder zuurstof leven. Genetisch gezien lijken deze bacteriën sterk op *E. coli*.

Besmetting met *Shigella*-bacteriën treedt op door direct contact met een geïnfecteerd persoon of door indirect contact via voedsel, water of voorwerpen. De kans op besmetting via voedsel is het grootst bij producten die rauw worden gegeten. Het ziektebeeld dat wordt veroorzaakt door *Shigella*-bacteriën wordt shigellose genoemd. Het wordt gekenmerkt door o.a. koorts, buikkrampen en diarree. De klachten worden veroorzaakt doordat de bacteriën de epitheelcellen van de darm binnendringen en zich daar vermenigvuldigen. Dit gaat gepaard met een ontstekingsproces en het afsterven van epitheelcellen. Ook kunnen de bacteriën toxines produceren die klachten veroorzaken. Meestal is voor shigellose geen behandeling nodig, maar bij een ernstige infectie kunnen antibiotica worden voorgeschreven. Net als bij veel andere bacteriën is resistentie tegen antibiotica een steeds groter probleem.

Het genetisch materiaal van de *Shigella*-bacteriën bepaalt of de bacterie ziekteverwekkend is. De betreffende genen liggen op een plasmide. Dat is een klein stukje cirkelvormig DNA, dat los van het chromosoom in de cel ligt. We noemen dit het virulentieplasmide. Als een *Shigella*-bacterie het virulentieplasmide verliest of er treden mutaties op in deze genen, dan kan de bacterie geen ziekte veroorzaken.

De genen die we in deze les gebruiken als genetische markers om *Shigella sonnei* mee te identificeren zijn *ipaH* en *mxiC*. Deze genen zijn uniek voor *Shigella* en daarom geschikt om als marker te gebruiken. Het *ipaH*-gen komt meerdere keren voor in de bacterie, zowel op het virulentieplasmide als op het chromosoom. Dit is handig voor de PCR-reactie, omdat het DNA dat je wilt kopiëren dus vaker voorkomt per cel en de kans dat je het DNA kunt detecteren dus groter is. Het *mxiC*-gen ligt op het virulentieplasmide en is essentieel voor *Shigella* om ziekteverwekkend te zijn. Daarnaast is *mxiC* het gen dat is aangepast bij de *Shigella*-bacteriestam uit het laboratorium die in deze les als positieve controle wordt gebruikt. Een DNA-bandje van 1800 bp op de gel wijst op het kopiëren van dit *mxiC*-gen tijdens de PCR-reactie en hieruit kunnen we afleiden dat de PCR-reactie succesvol was.

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 is de DNA-template het bacterie-DNA dat is geïsoleerd uit het besmette voedsel.
- » **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.



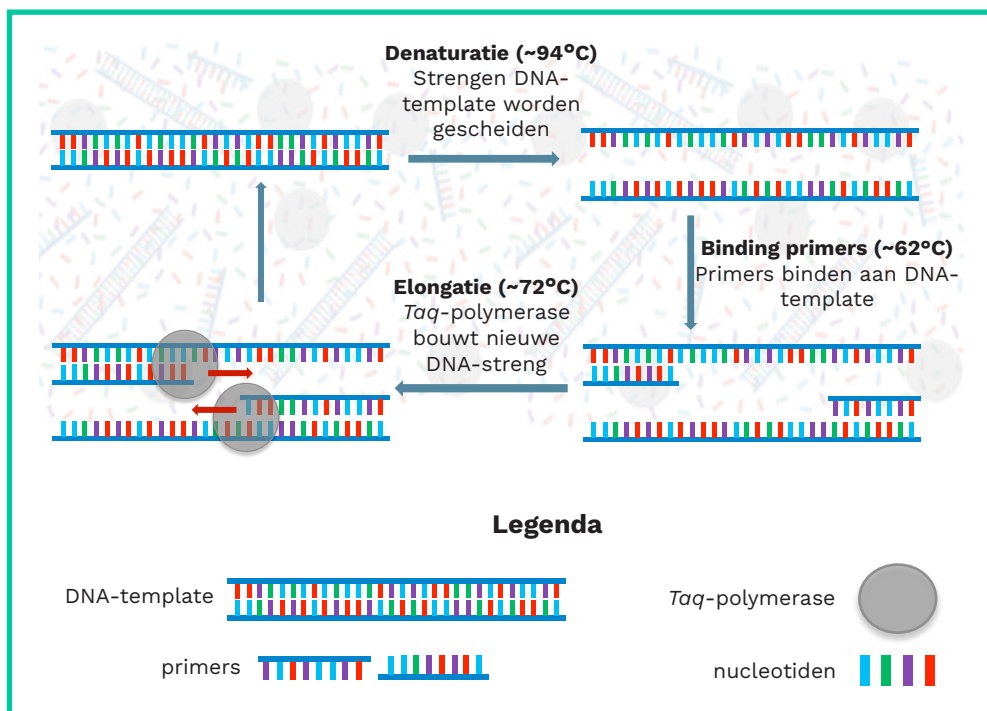
Stappen van een PCR-reactie

De PCR-reactie bestaat uit onderstaande stappen. Zie ook de afbeelding op blz. 14 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

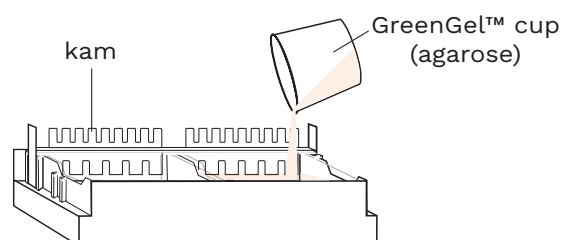
Het doorlopen van deze drie stappen wordt één cyclus genoemd. Door de cyclus te herhalen wordt steeds meer DNA geproduceerd. Meestal worden 10 tot 45 cycli uitgevoerd, met als resultaat een gigantische hoeveelheid DNA-kopieën. Deze kunnen gebruikt worden in vervolgstappen van het onderzoek. Het DNA kan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



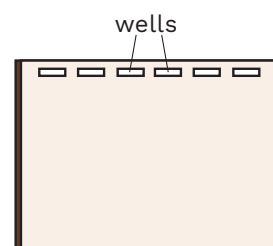
Bijlage III

Gelelektroforese

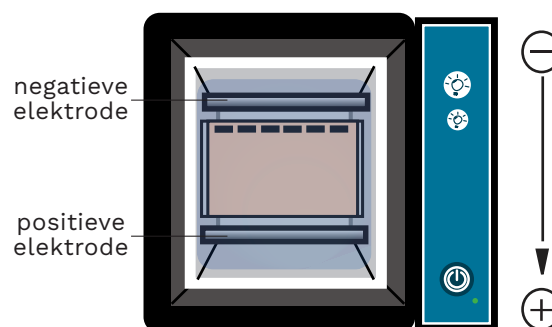
Gelelektroforese is een techniek waarmee je de componenten van een mengsel kunt scheiden. Dit kunnen mengsels zijn van DNA, RNA, eiwitten of kleurstoffen. De componenten worden gescheiden op basis van de grootte, lading en vorm van de moleculen. Hierbij wordt een gel gebruikt, waar de moleculen doorheen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



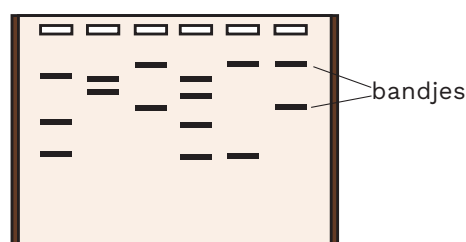
Voor het scheiden van DNA, zoals in dit practicum, wordt vaak een agarosegel gebruikt. Deze wordt gemaakt door gesmolten agarose in een bakje te gieten en hier een kam in te plaatsen. Als de agarose is gestold, wordt de kam verwijderd en heb je een gel met aan één zijde een rij wells (putjes). In deze 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.

