

Proeven aan genetica

Onderzoek je eigen DNA!



Doelgroep

vwo 5/6



Vak

Biologie



Duur

3-5 uren



Vaardigheden

Onderzoeksvaardigheden
Pipetteren

Omschrijving van de les

Wist je dat jouw DNA soms bepaalt wat je proeft? In deze les onderzoeken we de genetica achter smaak. Aan de hand van je eigen DNA bepaal je jouw genotype voor een receptor van bittere stoffen. Hierbij analyseer je je DNA met behulp van PCR, restrictie-enzymen en gelelektroforese. Ook doe je een smaaktest met de bittere stof PTC. Kun jij wat je proeft terugvinden in je eigen DNA?

Weetje

Naast het voorbeeld uit deze les, worden meer smaakwaarnemingen beïnvloed door onze genen. Zo zijn er aanwijzingen dat de zeepachtige smaak van koriander te linken is aan bepaalde genetische variaties. Hierdoor proeven sommige mensen dit wel en anderen niet. In het geval van koriander spelen echter ook andere factoren een rol, zoals cultuur en gewenning.

Introductie



Leerdoelen

Je maakt kennis met de werking van het smaakzintuig.
Je maakt kennis met de genetica van smaakwaarneming.
Je past jouw kennis over genetica en DNA-technieken toe in een nieuwe context.
Je bepaalt je eigen genotype m.b.v. PCR, restrictie-enzymen en gelelektroforese.
Je kunt reflecteren op je experiment en waar nodig aangeven wat er fout ging.



Benodigde voorkennis

Bouw DNA, genetische code, fenotype, genotype, gen, allel, dominant, recessief, homozygoot, heterozygoot, PCR, gelelektroforese



Aansluiting SLO/syllabus

DNA, nucleotide, basenparing, gen, allel, dominant, recessief, genotype, fenotype, genetische code, eiwit, receptor, genoom, genetische variatie, PCR, primer, restrictie-enzym

Ik proef, ik proef wat jij niet proeft

Iedereen neemt de wereld op een iets andere manier waar. Dit heeft soms te maken met onze eerdere ervaringen, maar soms heeft het een genetische basis. Er bestaan genetische verschillen in onze zintuigstelsels en dit heeft invloed op hoe we de wereld zien, horen en proeven. In een aantal gevallen kennen we de specifieke genen en eiwitten die hierbij betrokken zijn. Dat geldt o.a. voor de smaakreceptor die we in deze les gaan onderzoeken. Deze receptor, gecodeerd door het TAS2R38-gen, is verantwoordelijk voor het waarnemen van de stof fenylthiocarbamide (PTC). Er bestaan variaties in dit gen, die ervoor zorgen dat sommige mensen PTC proeven als bittere stof, terwijl anderen het ervaren als smaakloos. Voordat we hier verder op ingaan, kijken we eerst even naar de smaakwaarneming van de mens.

Smaakwaarneming

Onze smaakwaarneming ontstaat door binding van stoffen uit ons voedsel aan receptoren in onze mond en neus, en het verwerken van deze signalen in de hersenen. De tong is bedekt met kleine bultjes, die we smaakpapillen noemen. Elke papil bevat smaakknopjes, die bestaan uit smaakreceptorcellen. Deze cellen hebben membraanreceptoren die gespecialiseerd zijn in het binden van stoffen met verschillende smaken: zoet, zout, zuur, bitter en umami (een hartige smaak). De PTC-receptor uit deze les is zo'n receptor op de tong. Als een stof bindt aan zijn receptor, ontstaat een respons in de smaakreceptorcel. Bindt er voldoende van deze stof, dan is de respons sterk genoeg en geeft de cel neurotransmitters af aan sensorische neuronen, die het signaal doorgeven aan de hersenen. Hier wordt het verwerkt als smaak.

Fenylthiocarbamide (PTC)

De smaakwaarneming van PTC is dus een bijzonder geval. Dit werd voor het eerst ontdekt in de jaren 30 van de vorige eeuw. Een scheikundige, Arthur Fox, liet toen per ongeluk wat PTC-poeder ontsnappen in een ruimte waar ook een collega aan het werk was. Deze collega klaagde dat de stof erg bitter smaakte, maar Fox zelf proefde niets. Fox werd nieuwsgierig naar dit fenomeen en besloot het verder te onderzoeken. Dit bevestigde dat sommige mensen PTC proeven als bittere stof, terwijl anderen het ervaren als smaakloos. Later onderzoek in families heeft aangetoond dat het kunnen proeven van PTC erfelijk is. De overerving van deze eigenschap volgt de wetten van Mendel, hoewel de mate van gevoeligheid voor PTC (hoe bitter het smaakt) kan variëren. Dit suggereert dat er misschien ook andere genen betrokken zijn bij het bepalen van deze eigenschap. In deze les beschouwen we het proeven van PTC voor het gemak als een eigenschap die de wetten van Mendel volgt. Meer informatie hierover vind je op de volgende bladzijde.

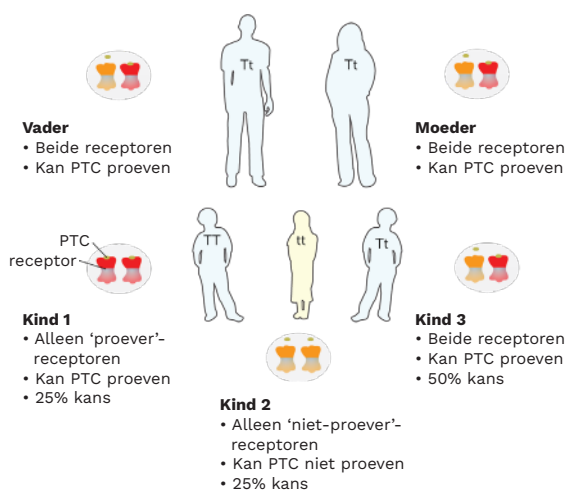
Wat is jouw genotype?

Tijdens deze les onderzoek je eerst je eigen fenotype: kun jij PTC proeven of niet? Daarna isoleer je je eigen DNA, zodat je kunt onderzoeken wat jouw genotype is. De DNA-analyse doen we met behulp van PCR, restrictie-enzymen en gelelektroforese. Meer informatie over hoe deze technieken worden gebruikt om je genotype te bepalen, vind je op bladzijde 4.

Genetica van PTC-waarneming

Genotypes

Zoals gezegd, beschouwen we het proeven van PTC in deze les als een eigenschap die de wetten van Mendel volgt. Dat betekent dus dat van het gen voor de PTC-receptor twee varianten bestaan: een dominant allel (T) en een recessief allel (t). Het kunnen proeven van PTC is een dominante eigenschap. Daarom is het genotype van een zogenaamde 'proever' dus homozygoot dominant (TT) of heterozygoot (Tt). Iemand die PTC niet kan proeven noemen we een 'niet-proever' en deze persoon heeft homozygoot recessief (tt) genotype. In onderstaande afbeelding is weergegeven welke genotypes de kinderen van twee heterozygote ouders kunnen hebben en hoe groot de kans hierop is.



Verskil tussen de allelen

Het TAS2R38-gen op chromosoom 7 codeert voor de membraanreceptor die PTC bindt in de mond, hierop reageert en uiteindelijk zorgt voor de smaakwaarneming. Dit is dus het gen waarvan de allelen T en t bestaan, die in combinatie zorgen voor verschillende genotypes. Als jij straks wilt bepalen welke allelencombinatie je hebt, moet er een

manier zijn om de twee allelen van elkaar te onderscheiden. Wetenschappers hebben de DNA-sequenties van proevers en niet-proevers met elkaar vergeleken om te achterhalen wat precies het verschil is tussen de twee allelen. Er blijken drie kleine variaties te bestaan die het proever-allel (T) onderscheiden van het niet-proever-allel (t). Dit soort variaties wordt aangeduid met de Engelse term 'single-nucleotide polymorphisms' (SNP's).

SNP

Een SNP is een genetische variatie waarbij één nucleotide kan verschillen tussen personen. Het verschil met een mutatie is dat een SNP vaker voorkomt in de populatie (bij minstens 1%). Het genoom van de mens bevat ongeveer 10 miljoen SNP's en ieder individu heeft een uniek SNP-patroon in zijn DNA.

Verskillende receptoren

In de tabel hieronder kun je zien welke 3 SNP's zorgen voor het verschil tussen het proever-allel (T) en het niet-proever-allel (t). Het volledige TAS2R38-gen is 1143 basenparen (bp) lang. In de tabel is aangegeven op welke positie in deze nucleotidesequentie de variatie voorkomt. Daarnaast zie je welk nucleotide op die plaats voorkomt bij proevers en niet-proevers. Ook is aangegeven hoe dit het codon verandert waar dit nucleotide onderdeel van is. Zoals je kunt zien, leiden de SNP's tot het inbouwen van verschillende aminozuren bij het proever- en niet-proever-allel. Hierdoor zal de aminozuurvolgorde van de PTC-receptoren enigszins verschillen en dit heeft invloed op de functie: het wel of niet proeven van PTC. In theorie zijn 8 verschillende combinaties van deze 3 SNP's mogelijk, maar in de praktijk komen de AVI-combinatie (niet-proever) en PAV-combinatie (proever) het meest voor.

| Positie (bp) | Veranderingen | | | | | |
|--------------|---------------|---------|--------------|---------|--------------------|---------------|
| | Nucleotide | | Codon | | Aminozuur | |
| | niet-proever | proever | niet-proever | proever | niet-proever (AVI) | proever (PAV) |
| 145 | G | C | GCA | CCA | alanine (A) | proline (P) |
| 785 | T | C | GTT | GCT | valine (V) | alanine (A) |
| 886 | A | G | ATC | GTC | isoleucine (I) | valine (V) |

Jouw fenotype en genotype bepalen

Voordat het TAS2R38-gen werd ontdekt, zou je het genotype van een PTC-proever alleen kunnen achterhalen door de fenotypes van familieleden te analyseren. Tegenwoordig kunnen we dit echter bepalen met een DNA-analyse en dat gaan we in deze les doen. We beginnen met een smaaktest om jouw fenotype te bepalen. Daarna isoleer je DNA uit je eigen wangcellen. Met behulp de technieken in de afbeelding hieronder onderzoek je vervolgens welk genotype jij hebt. Hoe helpen PCR, restrictie-enzymen en gelelektroforese ons om het genotype te bepalen?

PCR

Het DNA dat je isoleert uit je wangcellen is je volledige genoom, terwijl we alleen geïnteresseerd zijn in een bepaalde regio van het TAS2R38-gen. Dit is een regio van 221 bp lang, die de SNP op nucleotidepositie 145 bevat. Van dit stukje DNA hebben we ook veel kopieën nodig. Dit probleem lossen we op door met PCR miljarden kopieën te maken van deze specifieke regio.

Restrictie-enzymen

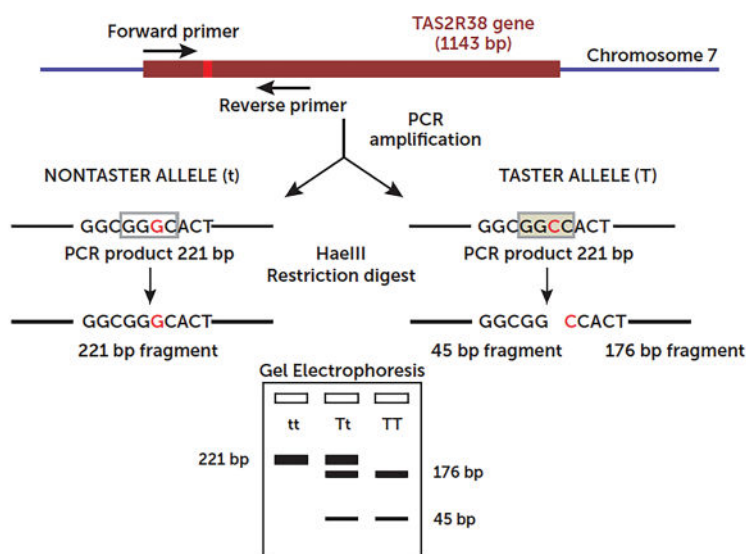
De restrictie-enzymen gebruiken we om de twee allelen van elkaar te onderscheiden. Een restrictie-enzym is een enzym dat een specifieke sequentie in het DNA herkent en het DNA daar knipt. Deze plek noemen we de herkenningsplaats. In deze les gebruiken we het restrictie-enzym HaeIII, dat de sequentie GGCC als herkenningsplaats heeft. Als het

enzym deze sequentie tegenkomt in het DNA, zal het beide DNA-strengen knippen tussen de G- en C-nucleotiden. Hierbij ontstaan dan twee DNA-fragmenten. Dit principe gebruiken we in deze les om de twee allelen van elkaar te onderscheiden, zoals te zien is in de afbeelding hieronder. Het proever-allel bevat de herkenningsplaats en zal dus in tweeën geknipt worden, terwijl het niet-proever-allel niet zal worden geknipt.

Gelelektroforese

De DNA-fragmenten maken we zichtbaar met gelelektroforese. DNA dat geknipt is, zal als twee bandjes te zien zijn op de gel, terwijl ongeknipt DNA één bandje vormt. Dit leidt tot een uniek bandenpatroon voor elk genotype, zoals is weergegeven in de afbeelding hieronder. Bij niet-proevers (tt) zien we één bandje, bij homozygoot dominante proevers (TT) zien we twee bandjes en bij heterozygote proevers (Tt) zien we drie bandjes. Dit is nog eens samengevat in de tabel hieronder.

| Genotype | Fenotype | Bandjes |
|---------------------------|--------------|---------------------------|
| Homozygoot dominant (TT) | proever | 176 bp 45 bp |
| Heterozygoot (Tt) | proever | 221 bp 176 bp 45 bp |
| Homozygoot recessief (tt) | niet-proever | 221 bp |





Vorbereidende vragen

Voordat we aan het practicum beginnen, kijken we even terug naar wat we tot nu toe geleerd hebben. Beantwoord de volgende vragen.

1 Als een persoon PTC kan proeven, wat zijn dan zijn of haar mogelijke genotypes?

2 Kunnen twee ouders die PTC niet kunnen proeven samen een kind krijgen dat wel PTC kan proeven? Leg je antwoord uit.

3 Als één ouder homozygoot is voor het niet-proever-allel van TAS2R38 en de andere ouder is heterozygoot, wat is dan de kans dat hun volgende kind een proever is?

4 De 3 SNP's van het TAS2R38-gen erven meestal samen over. Er zijn echter uitzonderingen. Beschrijf een situatie waarin een kind een set SNP's van zijn moeder kan erven, die anders is dan elk van de sets op de chromosomen van zijn moeder.

5 PTC is een stof die niet voorkomt in de natuur. Denk je dat het hebben van het proever-allel een evolutionair voordeel kan zijn? En zou het niet hebben van het proever-allel ook voordelig kunnen zijn?

6 In deze les kijken we naar de invloed van je genotype op het wel of niet proeven van PTC. Kun je naast genetica andere verklaringen bedenken waardoor de ene persoon PTC kan proeven en de ander niet?

7 Leg uit hoe we gelelektroforese gaan gebruiken om DNA-fragmenten te scheiden en een specifiek bandenpatroon te produceren voor elk genotype.



Practicum 1

Smaaktest en DNA-isolatie

Benodigheden

MiniOne® centrifuge
MiniOne® PCR-apparaat
Telefoon met MiniOne® PCR app
Pipetten (2-20 µL en 20-200 µL) en puntjes
3 mL zoutoplossing (1 bekertje per leerling)
Extractie-oplossing (250 µL)
Teststrips voor smaaktest (controle en PTC)
Lege PCR-epjes (0,2 mL) (2 per leerling)
Dunne stift (permanent marker)
Rekje voor epjes
Afvalbeker

Denk om de veiligheid

Draag een labjas,
handschoenen en een
veiligheidsbril tijdens dit
practicum.

Smaaktest

We beginnen met de PTC-smaaktest om
jouw fenotype te bepalen.

- 1 Plaats de controle-teststrip op je tong
en noteer hieronder wat je proeft. Plaats
daarna de PTC-teststrip op je tong en
noteer weer je waarneming.

Controle:

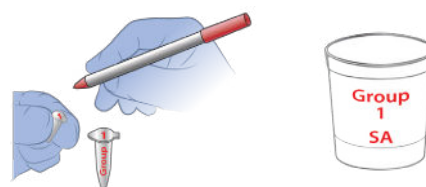
PTC:



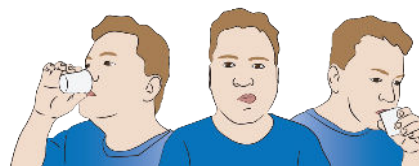
Wangcellen vrijmaken

We gaan nu met behulp van een
zoutoplossing cellen uit je wangslimvlies
vrijmaken, zodat we hieruit DNA kunnen
isoleren.

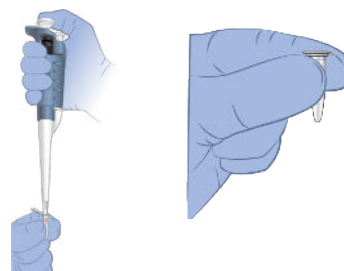
- 1 Label per persoon 2 PCR-epjes (de
kleinste epjes) met je groepsnummer
en initialen. Label per persoon ook
1 bekertje met zoutoplossing met je
groepsnummer en initialen.



- 2 Giet de zoutoplossing in je mond en
spoel 2 minuten. Zorg dat je de vloeistof
goed krachtig rond beweegt in je mond.
Spuug daarna de zoutoplossing voorzichtig
terug in het bekertje.



3 Pipetteer 200 μ L van de uitgespuugde vloeistof in één van de gelabelde PCR-epjes. Heb je geen 20-200 μ L pipet? Gebruik dan een 2-20 μ L pipet om 10 keer 20 μ L te pipetteren. Doe daarna je PCR-epje goed dicht. **Let op: knijp niet te hard in de wand van het epje, anders kunnen hierin scheurtjes ontstaan.**



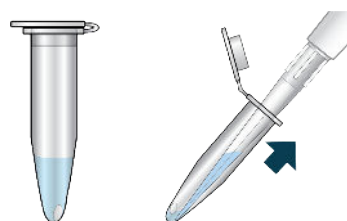
4 Centrifugeer de epjes 3 minuten op 10.000 rpm. **Let op: zet de epjes in de gaatjes waar ze precies in passen. Gebruik waar nodig een inzetstukje om het gaatje kleiner te maken. Verdeel de epjes ook goed over de centrifuge (niet alles aan één kant), zodat hij in balans is.**



Tip

Onthoud welke kant van het epje naar buiten is gericht. Hier verschijnen onderin straks de cellen.

5 Haal de epjes uit de centrifuge. Zoek onderin je epje naar de cellen van je wangslimvlies. Deze zijn zichtbaar als een witte neerslag, die we een celpellet noemen. De vloeistof die boven de celpellet ligt, noemen we het supernatant. Verwijder voorzichtig het supernatant door deze eraf te gieten of eraf te pipetteren in een afvalbeker. **Let op: zorg dat je de celpellet niet verstoord!**



DNA isoleren

We gaan nu DNA isoleren uit jouw wangcellen, zodat we hiermee later je genotype kunnen bepalen. We maken de cellen kapot door ze in een omgeving met een hoge pH en een hoge temperatuur te brengen in het PCR-apparaat.

1 Gebruik een 20-200 μ L pipet om 50 μ L van de extractie-oplossing (epje met 'EO') toe te voegen aan het PCR-epje met de celpellet. Maak de cellen los uit de celpellet en breng ze weer in suspensie door voorzichtig op en neer te pipetteren. We noemen dit resuspenderen. Ga hiermee door tot er geen celklompjes meer te zien zijn. Doe het PCR-epje daarna goed dicht.

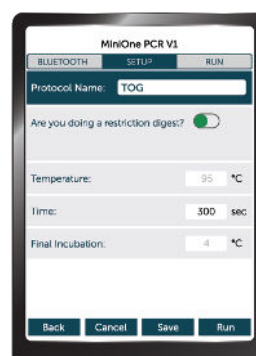


2 Plaats het PCR-epje in het PCR-apparaat. We gaan de samples 5 minuten (300 seconden) bij 95°C incuberen, zodat de cellen openbreken en het DNA vrijkomt in de oplossing. Gebruik de (Engelstalige) MiniOne® PCR app op je telefoon en de instellingen hieronder om het PCR-apparaat in te stellen. De eindincubatie bij 4°C zorgt ervoor dat je samples koud blijven totdat je er weer mee verder gaat. Je kunt tijdens het wachten het temperatuur- en tijdsverloop volgen in de app.



Instellen PCR-apparaat

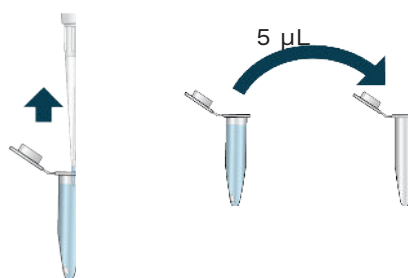
- New protocol
- Constant temperature mode
- Temperature: 95°C
- Time: 300 sec
- Final incubation: 4°C
- Run



3 Als de 5 minuten voorbij zijn, druk je op 'Stop' in de app. Haal je epje uit het PCR-apparaat en zet hem in de centrifuge. Centrifugeer 1 minuut op 10.000 rpm. De restanten van de cellen slaan nu neer als celpellet op de bodem van het epje, terwijl het DNA in het supernatant terecht komt.



4 Pipetteer voorzichtig 5 µL van het supernatant (met daarin het DNA) in je tweede gelabelde PCR-epje. **Let op: zorg dat je de celpellet onderin niet verstoort!**



5 Je kunt het DNA nu direct gebruiken om je PCR-reactie voor te bereiden of je kunt het DNA in de vriezer bewaren tot de volgende les.



Afsluitende vragen

Kijk even terug naar het practicum van vandaag en beantwoord de volgende vragen.

1 Smaakte de PTC-teststrip bitter? Wat is of zijn op basis van deze waarneming jouw mogelijke genotype(s)?

.....

2 Je hebt vandaag DNA geïsoleerd. Leg van onderstaande stappen uit het practicum uit wat er gebeurt op cel- en/of molecuulniveau.

Je mond goed spoelen met zoutoplossing:

.....

Het zout in de zoutoplossing:

.....

Verhitten van het sample tot 95°C:

.....

Centrifugeren van het sample na verhitten:

.....

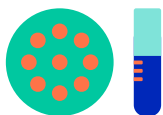
3 Als je DNA isoleert volgens het door ons gebruikte protocol, wat komt er dan nog meer vrij uit de cellen behalve DNA?

.....

4 We hebben DNA geïsoleerd om het TAS2R38-gen te onderzoeken. Bedenk twee andere onderzoeksvragen die je zou kunnen onderzoeken met jouw DNA-sample.

.....

.....



Practicum 2

PCR

Benodigheden

MiniOne® centrifuge
 MiniOne® PCR-apparaat
 Telefoon met MiniOne® PCR app
 Pipet (2-20 µL) en pipetpuntjes
 Leeg PCR-epje (0,2 mL) (1 per leerling)
 Geïsoleerd DNA practicum 1 (1 per leerling)
 Taq PCR master-mix (45 µL)
 Primer-mix (25 µL)
 Dunne stift (permanent marker)
 Rekje voor epjes
 Afvalbeker

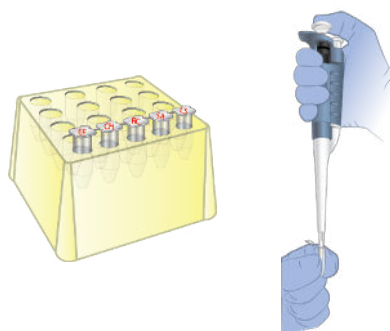
Denk om de veiligheid

Draag een labjas,
 handschoenen en een
 veiligheidsbril tijdens dit
 practicum.

PCR

Tijdens practicum 1 heb je DNA geïsoleerd uit je wangcellen. We gaan nu een PCR-reactie uitvoeren om een specifieke regio van het TAS2R38-gen te kopiëren, zodat we deze verder kunnen analyseren.

- 1 Pak je geïsoleerde DNA-sample van de vorige keer erbij. Pipetteer per persoon alle componenten uit de tabel hieronder in een schoon PCR-epje.

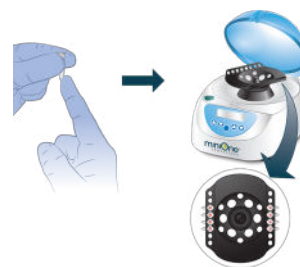


| Component | Volume |
|-----------------------|--------------|
| Geïsoleerd DNA-sample | 5 µL |
| Primer-mix | 5 µL |
| Taq PCR master-mix | 10 µL |
| Totaal | 20 µL |

Tip

Pipetteer kleine volumes op de bodem van het PCR-epje. Zo voorkom je dat er luchtbelletjes onderin komen.

- 2 Doe je PCR-epje goed dicht en tik er een aantal keer tegenaan om de inhoud te mengen. Centrifugeer de epjes 15 seconden op 10.000 rpm. **Let op: knijp niet te hard in de wand van het epje en zorg dat de centrifuge in balans is.**



- 3 Verplaats de PCR-epjes van de centrifuge naar het PCR-apparaat. Doe de deksel dicht als alle samples erin staan. **Let op: onthoud waar je je epje neerzet, want soms gaat de stiftmarkering eraf tijdens de PCR-reactie.**



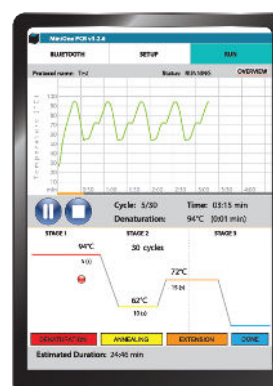
4 Gebruik de MiniOne® PCR app op je telefoon en de instellingen hieronder om het PCR-apparaat in te stellen en de PCR-reactie te starten. De eindincubatie bij 4°C zorgt ervoor dat de samples koud blijven totdat je er weer mee verder gaat. Je kunt tijdens het wachten het temperatuur- en tijdsverloop volgen in de app.



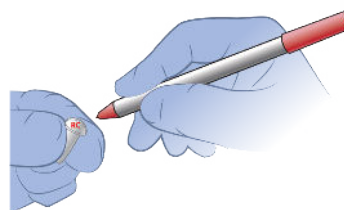
Instellen PCR-apparaat

- New protocol
- PCR
- Initial denaturation: ja
- Final extension: nee
- Vul tijden, temperaturen en aantal cycli per stap in (zie tabel)
- Run

| Stap | t (s) | T (°C) | Cycli |
|------------------------|-------|--------|-------|
| 1 Initial denaturation | 30 | 94 | |
| Denaturation | 5 | 94 | |
| 2 Annealing | 10 | 62 | 30 |
| Extension | 15 | 72 | |
| 3 Final incubation | ∞ | 4 | |



5 Als de PCR-reactie klaar is, druk je op 'Stop' in de app. Als je dit wilt, kun je de informatie over de PCR-reactie opslaan en naar jezelf mailen door op 'Save' te drukken. Haal je PCR-epje uit het apparaat en label deze opnieuw met stift als dat nodig is. Bewaar je gekopieerde DNA-sample in de vriezer tot de volgende les.





Afsluitende vragen

Kijk even terug naar het practicum van vandaag en beantwoord de volgende vragen.

1 Wat is het doel van een PCR-reactie? Beschrijf drie situaties waarin een wetenschapper PCR zou kunnen gebruiken.

.....

.....

2 Welke component van het PCR-reactiemengsel maakt de reactie specifiek voor het TAS2R38-gen? Hoe werkt dit?

.....

.....

3 Waarom kunnen we niet direct na de DNA-isolatie verder gaan met de analyse, maar is eerst de PCR-reactie nog nodig?

.....

.....

4 Het komt weleens voor dat de primers van een PCR-reactie aan elkaar binden en een zogenaamde 'primer-dimeer' vormen. Deze wordt dan gekopieerd in de volgende PCR-cycli en kan na gelelektroforese zichtbaar worden als een extra bandje op de gel. Is de kans op vorming van primer-dimeren groter of kleiner als je lange primers gebruikt? Leg je antwoord uit.

.....

.....



Practicum 3

Restrictie en gelelektroforese

Benodigheden

MiniOne® centrifuge
 MiniOne® PCR-apparaat
 Telefoon met MiniOne® PCR app
 MiniOne® Casting System (gelgietsysteem)
 MiniOne® Elektroforesesysteem
 Magnetron
 1 agarose GreenGel™ cup (2%)
 Bekerglas met TAE-buffer (135 mL)
 Pipet (2-20 µL) en pipetpuntjes
 Leeg PCR-epje (0,2 mL) (1 per leerling)
 Gekopieerd DNA practicum 2 (1 per leerling)
 HaeIII restrictie-enzym, verdund (25 µL)
 Enzym-verdunningsbuffer (25 µL)
 DNA-kleuring (30 µL)
 MiniOne® DNA marker (12 µL)
 Dunne stift (permanent marker)
 Rekje voor epjes
 Afvalbeker
 Foto toestel of telefoon met camera
 Demiwater of gedistilleerd water

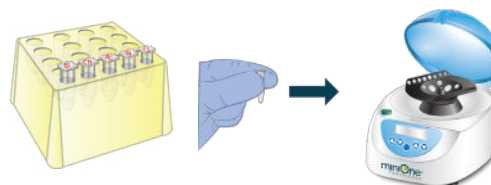
Denk om de veiligheid

Draag een labjas,
 handschoenen en een
 veiligheidsbril tijdens dit
 practicum.

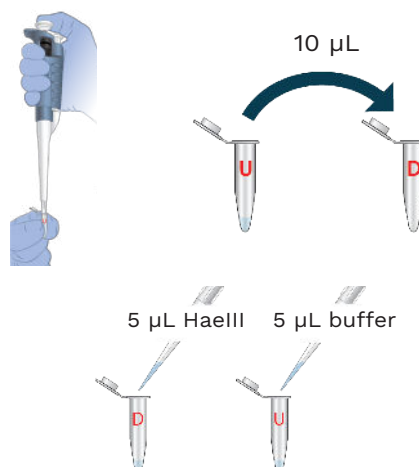
Restrictie-enzymen

Tijdens practicum 2 heb je een specifieke regio van het TAS2R38-gen gekopieerd met PCR. We gaan dit DNA nu knippen met restrictie-enzymen, zodat we daarna met gelelektroforese je genotype zichtbaar kunnen maken.

1 Pak je gekopieerde DNA-sample van de vorige keer erbij. Centrifugeer deze kort, zodat de vloeistof goed onderin het epje zit.

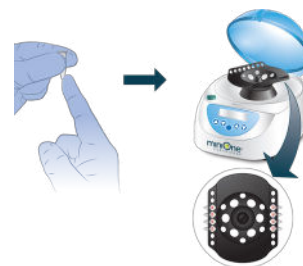


2 Pipetteer 10 µL van je gekopieerde DNA-sample in een schoon PCR-epje. Label het nieuwe epje met 'D' (voor 'digested' = geknipt) en het oude epje met gekopieerd DNA met 'U' (voor 'undigested' = ongeknipt). Zet ook je initialen op beide epjes.



3 Voeg 5 µL van het HaeIII restrictie-enzym toe aan epje 'D' en 5 µL van het verdunningsbuffer aan epje 'U'. **Let op: gebruik voor epje 'U' het verdunningsbuffer en niet het TAE-buffer! Deze hebben we later pas nodig.**

4 Doe je PCR-epjes 'D' en 'U' goed dicht en tik er een aantal keer tegenaan om de inhoud te mengen. Centrifugeer de epjes 15 seconden op 10.000 rpm. **Let op: knijp niet te hard in de wand van het epje en zorg dat de centrifuge in balans is.**

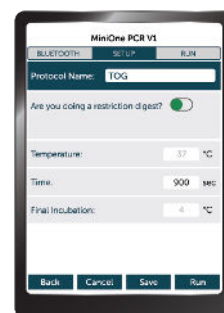


5 Plaats de PCR-epjes in het PCR-apparaat. We gaan de samples 15 minuten (900 seconden) bij 37°C incuberen, zodat de restrictie-enzymen het DNA kunnen knippen. Gebruik de MiniOne® PCR app op je telefoon en de instellingen hieronder om het PCR-apparaat in te stellen. De eindincubatie bij 4°C zorgt ervoor dat je samples koud blijven totdat je er weer mee verder gaat. Je kunt tijdens het wachten het temperatuur- en tijdsverloop volgen in de app. **Let op: ga alvast verder met de volgende stap!**



Instellen PCR-apparaat

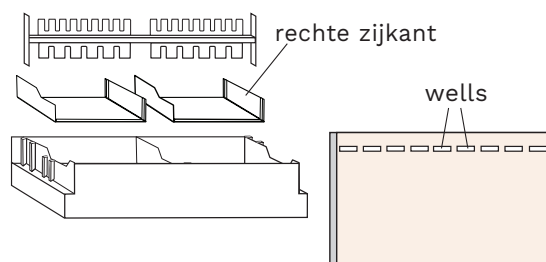
- New protocol
- Constant temperature mode
- Temperature: 37°C
- Time: 900 sec
- Final incubation: 4°C
- Run



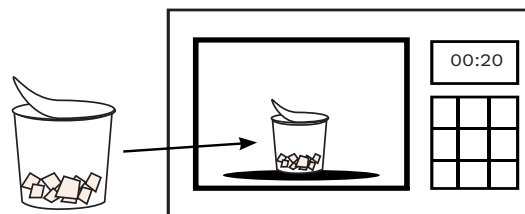
Agarosegel maken

Terwijl je wacht op de restrictie-enzymen, kun je alvast een gel maken. Deze hebben we straks nodig om de DNA-fragmenten te scheiden met gelelektroforese.

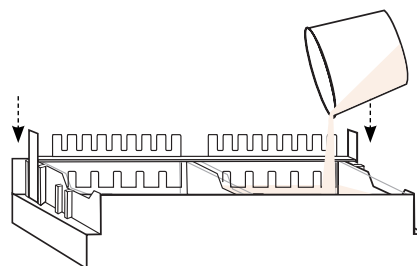
1 Zet het MiniOne® Casting systeem op een vlakke ondergrond en plaats de doorzichtige bakjes erin. Zorg dat de rechte zijkant rechts zit. Plaats de kam in de achterste gleufjes bovenaan het systeem. Zorg dat de kant met 9 tanden naar beneden wijst. Zo krijg je een gel met 9 putjes erin. Deze putjes noemen we wells.



2 Haal het folie gedeeltelijk van de agarose GreenGel™ cup en zet deze 20 seconden in de magnetron. Laat de cup daarna 15 seconden afkoelen voordat je hem aanraakt. **Let op: zet niet meer dan 5 gel cups tegelijk in de magnetron!**



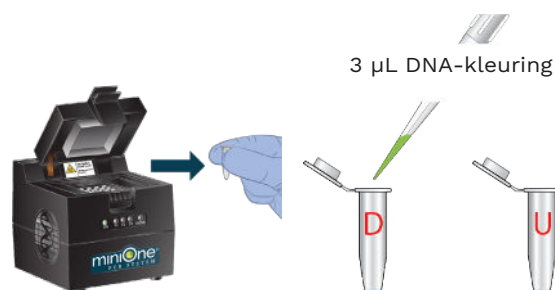
- 3 Let op: de gel cup kan heet zijn!** Giet de hete agaroseoplossing langzaam in één van de bakjes. Eén gel cup is genoeg voor het maken van één agarosegel. Zorg dat er geen luchtbelletjes in de oplossing zitten. Laat de agarosegel stollen totdat deze ondoorzichtig is geworden. Dit duurt ongeveer 10 minuten. **Let op: laat de gel met rust tot de tijd voorbij is!**



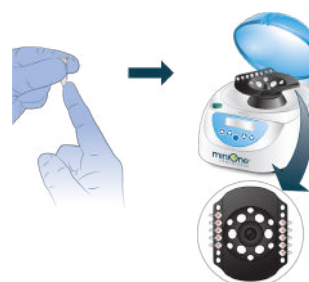
DNA-kleuring toevoegen

We gaan nu verder met de epjes uit het PCR-apparaat. Voor de gelelektroforese voegen we eerst nog een DNA-kleuring toe. Deze zorgt ervoor dat we het DNA straks goed kunnen zien op de gel. Het bevat ook een stof die zorgt dat het DNA goed naar de bodem van de wells zakt.

- 1** Als de incubatie met restrictie-enzymen klaar is, haal je samples dan uit het PCR-apparaat. Voeg 3 µL van de DNA-kleuring (epje met 'DK') toe aan alle epjes 'D' en 'U'.



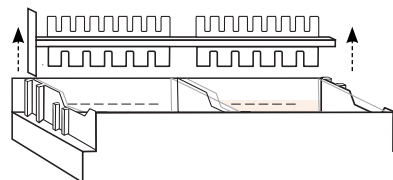
- 2** Doe je PCR-epjes 'D' en 'U' goed dicht en tik er een aantal keer tegenaan om de inhoud te mengen. Centrifugeer de epjes 15 seconden op 10.000 rpm. **Let op: knijp niet te hard in de wand van het epje en zorg dat de centrifuge in balans is.**



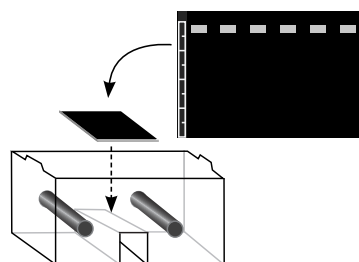
De gel laden

We gaan het elektroforesesysteem nu klaarzetten voor het scheiden van het DNA. Het 'laden' van de gel betekent dat we de DNA-samples in de wells pipetteren.

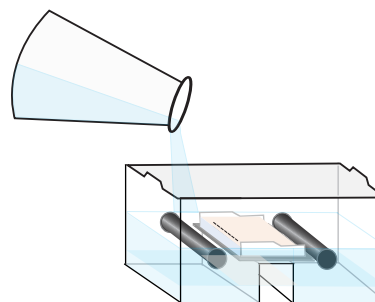
- 1** Verwijder de kam voorzichtig uit de gel. Haal het bakje met de gel uit het MiniOne® Casting systeem. Als er nog agarose aan de onderkant van het bakje zit, veeg dit dan af.



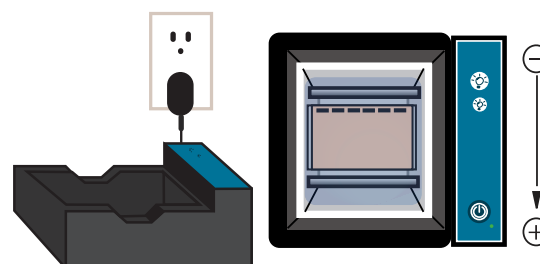
- 2** Pak het MiniOne® Elektroforese-systeem erbij. Leg de zwarte ondergrond in de tank, met de ⊕ en ⊖ symbolen op de juiste plek. Zet de gel (nog in het bakje) hierbovenop. Zorg dat de wells van de gel overlappen met de vakjes bij het ⊖ symbool op de ondergrond.



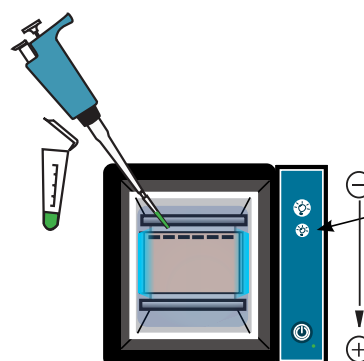
3 Meet 135 mL TAE-buffer af en giet dit in één helft van de tank tot de vloeistof de onderkant van de gel bereikt. Wacht even tot de lucht onder de gel is verdwenen, anders kun je straks het resultaat niet goed zien. Giet daarna het resterende buffer in de andere helft van de tank. De gel moet volledig bedekt worden met buffer.



4 Steek de stekker van het elektroforesesysteem in het stopcontact. Zet de tank op de juiste manier in de zwarte houder: de elektroden (zwarte staafjes) moeten contact maken met de gouden puntjes en de tank moet recht in de houder staan.




5 Druk op het tweede  knopje van boven op de houder. Hierdoor gaat het blauwe lampje aan op lage intensiteit, waardoor je de wells goed kunt zien. Gebruik de pipet om 10 µL van elk sample te laden. Alle samples van je hele groepje passen op één gel. Zorg dat je per gel één well vult met 10 µL DNA-ladder (MiniOne® DNA marker). Pipetteer daarnaast per persoon 10 µL van je 'D' en 'U' samples in twee naast elkaar gelegen wells. Houd in de tabel hieronder bij welke samples in welke well zijn gepipetteerd. **Let op: gebruik voor elk sample een nieuw pipetpuntje en beweeg de gel niet meer als deze eenmaal geladen is!**



| Well | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sample | | | | | | | | | |

Het DNA scheiden

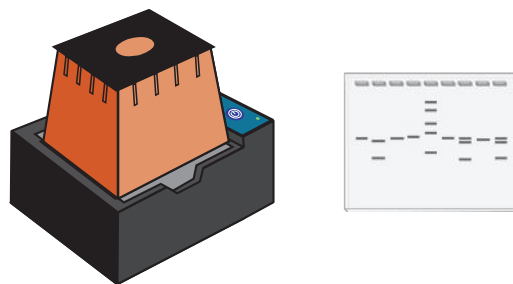
We gaan nu de DNA-fragmenten scheiden met het elektroforesesysteem, zodat jouw genotype en dat van je groepsgenoten zichtbaar wordt.

1 Zet de oranje kap op de houder. Zet het elektroforesesysteem aan door op de  knop te drukken. Naast de knop gaat nu een groen lampje branden. De gelelektroforese is nu gestart.



Geen groen lampje? Check:

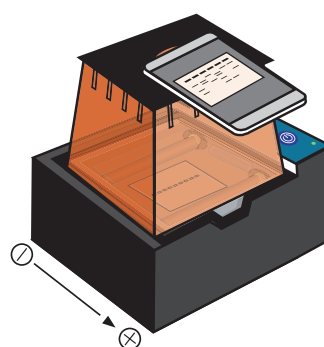
- Zit de tank goed in de houder?
- TAE-buffer in de tank?
- Teveel of te weinig buffer?
- Is de bufferconcentratie goed?
- Oranje kap op de houder?
- Stekker in het stopcontact?

2 Wacht tot het DNA voldoende is gescheiden. Je kunt dan losse bandjes zien, zoals op de afbeelding hiernaast. Dit duurt ongeveer 25 minuten. Check af en toe het bewegen van de bandjes (ongeveer elke 5 minuten). **Let op: als je tijdens het wachten naar de gel wilt kijken, gebruik dan het lampje met lage intensiteit en laat deze niet te lang aan! Licht verzwakt het fluorescente signaal van het DNA.**



Het resultaat vastleggen

1 Als het klaar is, zet dan het elektroforesesysteem uit door op de  knop te drukken. Veeg eventuele condens aan de binnenkant van de kap af met een doekje. Zet de kap weer terug op de houder. Druk op het eerste  knopje op de houder. Hierdoor gaat het blauwe lampje aan op hoge intensiteit.



2 Gebruik je telefoon of een fototoestel om via het venstertje in de kap een foto te maken van het resultaat. **Let op: zoom niet in, dan krijg je wazige foto's!**

Opruimen

1 Verwijder alle onderdelen van het elektroforesesysteem: haal de oranje kap van de houder, trek de stekker uit het stopcontact, haal het snoertje uit de achterkant van de houder, verwijder de tank uit de houder en haal het doorzichtige bakje met de gel eruit.

2 Giet het gebruikte TAE-buffer door de gootsteen of in een afvalbeker. Gooi de gel weg. Spoel de tank, de bakjes, de kam en het Casting systeem af met demiwater of gedistilleerd water. Laat de onderdelen aan de lucht drogen voordat je ze opbergt.

3 Gebruik een papieren doekje of tissue om de zwarte houder schoon te maken. Veeg voorzichtig de gouden contactpuntjes droog en veeg eventueel gemorst buffer op.

4 Was je handen als je klaar bent met opruimen.



Afsluitende vragen

Bekijk de resultaten van je gelelektroforese en beantwoord de volgende vragen.

1 Hebben alle samples van jouw groepje PCR-producten opgeleverd? Zo niet, leg dan uit wat er fout kan zijn gegaan.

.....

.....

.....

2 De lengtes van de bandjes in de DNA-ladder zijn 100, 300, 500, 1000 en 2000 bp. Lees met behulp hiervan af hoe lang de DNA-fragmenten in jouw samples ongeveer zijn. Komt dit overeen met de lengtes die je verwacht na de behandeling met restrictie-enzymen? Zo niet, wat kan ervoor hebben gezorgd dat het anders is?

.....

.....

.....

3 Zijn er naast de verwachte PCR-producten nog andere bandjes zichtbaar op de gel? Zo ja, leg dan uit wat hiervan de oorzaak kan zijn.

.....

.....

.....

4 Wat is op basis van jouw resultaten je TAS2R38-genotype? Komt dit overeen met je fenotype uit de smaaktest?

.....

.....

.....

Begrippenlijst

| | |
|---------------------|---|
| Allel | Variant van een gen. |
| Aminozuur | Bouwsteen van een eiwit. |
| Basenpaar | Twee nucleotiden in dubbelstrengs DNA, aan elkaar gekoppeld met waterstofbruggen tussen de stikstofbasen. Het aantal basenparen (bp) wordt gebruikt om de lengte van een DNA-fragment aan te geven. |
| Chromosoom | DNA dat om eiwitten (histonen) heen is gewikkeld en compact is opgerold, zodat het in de celkern past. |
| Complementair | In dubbelstrengs DNA zitten altijd dezelfde nucleotiden tegenover elkaar: adenine tegenover thymine en cytosine tegenover guanine. Twee sequenties die precies op deze manier op elkaar passen noemen we complementair. |
| DNA | Desoxyribonucleïnezuur, de drager van erfelijke informatie in organismen. |
| DNA-ladder | Een mengsel van DNA-moleculen met verschillende, bekende lengtes dat gebruikt wordt bij gelelektroforese om de lengte van andere DNA-fragmenten aan af te lezen. |
| Dominant allel | Een allel dat altijd tot uiting komt in het fenotype. |
| Fenotype | De waarneembare eigenschappen van een individu. |
| Gelelektroforese | Een techniek waarmee je DNA-fragmenten kunt scheiden op basis van hun lengte. |
| Gen | Gedeelte van het DNA dat codeert voor één eiwit. |
| Genetische variatie | Het bestaan van verschillende genotypen binnen een populatie of soort. Een grote genetische variatie is gunstig voor het overleven van de soort. |
| Genoom | Alle genetische informatie van een organisme. |
| Genotype | De genetische informatie die codeert voor een fenotype. |
| Heterozygoot | Een organisme heeft twee verschillende allelen van een gen. |

| | |
|------------------|--|
| Homozygoot | Een organisme heeft twee dezelfde allelen van een gen. |
| Mendel (wetten) | Wetten voor overerving van erfelijke eigenschappen. Er zijn dominante en recessieve allelen voor een eigenschap. Individuen hebben twee allelen die samen het fenotype bepalen. |
| Mutatie | Verandering in het DNA. |
| Nucleotide | Bouwsteen van DNA, bestaande uit een suikergroep, fosfaatgroep en stikstofbase. |
| PCR | Polymerase chain reaction, een techniek waarmee je DNA kunt vermenigvuldigen. |
| Primer | Een kort stukje enkelstrengs DNA dat als startpunt wordt gebruikt bij PCR. Het bindt specifiek aan de DNA-sequentie die je wilt vermenigvuldigen. |
| Primer-dimeer | Twee aan elkaar gebonden primers. Bijproduct van een PCR-reactie als primers deels complementair zijn aan elkaar. |
| PTC | Fenylthiocarbamide, een stof die voor sommige mensen bitter smaakt en voor anderen smaakloos is. |
| Receptor | Eiwit waaraan specifieke moleculen kunnen binden, waarna een reactie optreedt. |
| Recessief allel | Allel dat alleen tot uiting komt in het fenotype als er geen dominant allel aanwezig is. |
| Restrictie-enzym | Enzym dat een specifieke sequentie in het DNA herkent en het DNA daar knipt. |
| Smaakreceptorcel | Cel op de tong met membraanreceptoren waaraan stoffen uit voedsel binden. Nodig voor smaakwaarneming. |
| SNP | Genetische variatie waarbij één nucleotide kan verschillen tussen personen. Komt voor bij minstens 1% van de populatie. |
| Taq-polymerase | Speciaal DNA-polymerase, geïsoleerd uit een bacterie, dat de hoge temperaturen van een PCR-reactie kan weerstaan. Bouwt nucleotiden in, zodat een nieuwe DNA-streng wordt gevormd. |