

Voedselinfectie

Een feestje met een bijsmaak



Doelgroep

vwo 5/6



Vak

Biologie



Duur

3 lesuren



Vaardigheden

Onderzoeksvaardigheden
Pipetteren

SPOILER ALERT

Kapsalon

Als het goed is heb je uit de interviews met de gasten kunnen afleiden dat de kapsalon hoogstwaarschijnlijk de bron van de uitbraak is geweest. Hier vind je meer informatie over dit gerecht.

Wat is kapsalon?

Kapsalon is een populair gerecht in Nederlandse snackbars en shoarmazaken. Het is ontstaan in Rotterdam. Kapsalon wordt meestal geserveerd in een aluminium bakje en bestaat uit verschillende lagen. Onderop ligt eerst een laag friet, daarboven shoarma of döner kebab, dan een laag kaas, daarop salade en tot slot knoflooksaus.

Hoe wordt het gemaakt?

Elke laag van de kapsalon wordt afzonderlijk geproduceerd en bewaard totdat het gerecht wordt bereid. Het productie- en bewaarproces van elke laag is van belang in het onderzoek naar de *Shigella*-uitbraak. Hieronder vind je daar meer informatie over.

- » Friet: Aardappelen worden in een fabriek gewassen, geschild, gesneden, kort voorgegaard en ingevroren. Later wordt het gefrituurd.
- » Shoarma: Het vlees wordt in een fabriek ontbeend, in dunne plakjes gesneden, gemarineerd, op een spies gestapeld en ingevroren. Later wordt het gegrild en gesneden.
- » Kaas: De Goudse kaas wordt in een fabriek geproduceerd uit melk door hieraan melkzuurbacteriën en stremsel toe te voegen, deze zogenaamde wrongel samen te persen tot kaas en deze te pekelen en te rijpen. De kaas wordt in een fabriek geraspt. Het wordt bewaard in de koelkast.
- » Salade: Gemaakt met verse, rauwe ingrediënten zoals tomaat, sla en komkommer, die worden bewaard in de koelkast.
- » Knoflooksaus: Geproduceerd in een fabriek uit o.a. yoghurt, knoflook, ei, olie, azijn, mosterd, zout, suiker en kruiden. Bewaard in de koelkast.

Weetje

Dit gerecht heet 'kapsalon', omdat de Rotterdamse eigenaar van een kapsalon dit gerecht heeft bedacht en altijd bestelde bij een shoarmazaak in de buurt.



Voedselonderzoek

Hieronder lees je welk onderzoek het team al heeft gedaan naar de kapsalon en met welk resultaat, zodat jij daarna kunt bedenken welk vervolgonderzoek je nog wilt doen.

Overall of in één laag?

De kapsalon bestaat uit verschillende lagen, die afzonderlijk worden geproduceerd en bewaard totdat de kapsalon bereid wordt (zie blz. 3). Daarom moet onderzocht worden of besmetting met *Shigella* heeft plaatsgevonden na samenstelling van het gerecht (in dat geval zit de bacterie in alle lagen) of dat de besmetting afkomstig was van een afzonderlijke laag. Zo kan men beter beslissen welke vervolgstappen genomen moeten worden. Moet er bijvoorbeeld een waarschuwing uitgaan over het hele gerecht of alleen over een ingrediënt ervan?

Bacteriën kweken

Het team heeft al geprobeerd om uit de kapsalon als geheel bacteriën te isoleren en deze te kweken in het laboratorium. Om dit sample te verkrijgen, sneden ze door alle vijf de lagen van de kapsalon heen en mixten dit tot een homogeen mengsel. Helaas leverde de kweek niets op.

Wat nu?

Om de volgende stap te bepalen, kijkt het team naar de gebruikte technieken en de bacterie waar ze mee te maken hebben. We weten dat de feestgangers ziek zijn geworden van *Shigella sonnei*. Deze bacterie heeft een lage infectieuze dosis. Dat betekent dat er weinig bacteriën nodig zijn om je ziek te maken (in dit geval zo'n 100 bacteriën). Misschien waren er dus maar weinig bacteriën in de onderzochte kapsalon aanwezig. Het team besluit daarom een gevoeliger techniek te gebruiken: PCR in combinatie met gelelektroforese.

Vingerafdruk van een bacterie

Je kunt PCR gebruiken om de aanwezigheid van een bepaalde bacterie aan te tonen, door gebruik te maken van genetische markers. Dit zijn DNA-sequenties die uniek zijn voor een specifieke soort. In dit geval gaan we dus op zoek naar DNA-sequenties die alleen voorkomen bij *Shigella sonnei*. Door in de PCR-reactie de juiste primers te gebruiken, worden alleen deze unieke stukjes DNA gekopieerd (als ze tenminste aanwezig zijn in het sample). We kunnen de DNA-fragmenten die met PCR zijn vermenigvuldigd zichtbaar maken met

gelelektroforese. Hierbij worden de fragmenten gescheiden op lengte. Als je een DNA-ladder toevoegt, kun je van de DNA-fragmenten ook hun lengte in basenparen (bp) aflezen. Van de genetische markers is de lengte bekend. Je kunt nu dus controleren of de genetische markers van de bacterie aanwezig zijn op de gel. We noemen dit unieke bandenpatroon waarmee je een organisme kunt identificeren ook wel een DNA-fingerprint.

Shigella aantonen

De genetische markers die we gebruiken voor *Shigella sonnei* zijn de genen *ipaH* en *mxuC*. We gebruiken bij de PCR-reactie dus primers die specifiek zijn voor deze genen. Zelfs als er maar een klein spoortje *Shigella*-DNA aanwezig is in het sample, zal een PCR-reactie DNA-fragmenten opleveren van 175 bp voor het *ipaH*-gen en van 1000 bp voor het *mxuC*-gen. Dit noemen we de referentiestandaard voor *Shigella* (zie onderstaande tabel onder 'SRS'). Deze karakteristieke fragmenten kun je dan zien op de gel en hieruit kun je afleiden dat de *Shigella*-bacterie aanwezig was in het voedsel.

Positieve controle

Bepaalde moleculen uit voedsel kunnen de PCR-reactie remmen en deze laten mislukken. Er wordt dan geen DNA gekopieerd en je ziet niets op de gel. Als dit gebeurt, weet je als onderzoeker niet zeker of je geen DNA ziet door een mislukte PCR-reactie of doordat er geen *Shigella*-bacterie in het sample aanwezig was. Om zeker te weten dat de PCR werkt, gebruiken onderzoekers een positieve controle. Dit is een *Shigella*-bacteriestam uit het laboratorium die aan alle samples wordt toegevoegd. Om onderscheid te kunnen maken tussen een signaal van de positieve controle en een signaal van wildtype *Shigella*-bacteriën, gebruiken de onderzoekers de informatie uit onderstaande tabel. Een DNA-bandje van 1800 bp op de gel zou er dus op wijzen dat het *mxuC*-gen van de positieve controle is gekopieerd, wat duidt op een succesvolle PCR-reactie. Aan- of afwezigheid van bandjes van 175 en 1000 bp geeft vervolgens aan of er wel of geen DNA van wildtype *Shigella*-bacteriën aanwezig is in het sample.

Gen	+LC	SRS
<i>ipaH</i>	175 bp	175 bp
<i>mxuC</i>	1800 bp	1000 bp

+LC = positieve (lab)controle

SRS = *Shigella* referentiestandaard

PCR van vijf lagen

Het team heeft een PCR-reactie uitgevoerd met het sample waarin alle lagen van de kapsalon gemengd waren. Tot hun verbazing was na gelelektroforese geen DNA van de *Shigella*-bacterie te zien. De onderzoekers vermoeden dat dit niet per se betekent dat de bacterie nergens aanwezig was in de kapsalon, maar dat het iets te maken heeft met de lage infectieuze dosis.

Laatste poging

Het team wil nu een laatste poging doen om de *Shigella*-bacterie op te sporen. In de tabel hieronder zie je de verschillende DNA-samples die hiervoor beschikbaar zijn. Dit zijn DNA-ladders en de producten van verschillende PCR-reacties die zijn uitgevoerd. Al deze DNA-samples zouden gebruikt kunnen worden voor gelelektroforese. Het is aan jou om te bepalen welke samples je wilt gebruiken.

DNA sample	Omschrijving	Hoeveelheid
M1M	MiniOne® DNA Marker: Bevat 5 DNA-fragmenten van verschillende lengtes: 100, 300, 500, 1000 en 2000 bp	10 µL
1 Kb Ladder	1 Kb DNA Ladder: Bevat 15 DNA-fragmenten met lengtes tussen 1000 en 15.000 bp	10 µL
SRS	<i>Shigella</i> referentiestandaard: PCR-product van wildtype <i>Shigella sonnei</i> , dat twee DNA-fragmenten bevat van 175 en 1000 bp	10 µL
+LC	Positieve (lab)controle: PCR-product van een <i>Shigella</i> -stam uit het lab, dat twee DNA-fragmenten bevat van 175 en 1800 bp	10 µL
-C	Negatieve controle: PCR-product van het reactiemengsel dat bij PCR wordt gebruikt, maar zonder DNA-template	10 µL
5L	PCR-producten verkregen met de volgende DNA-templates: de 5 lagen van de kapsalon (gemengd) en de positieve controle (+LC)	10 µL
C	PCR-producten verkregen met de volgende DNA-templates: de kaaslaag van de kapsalon en de positieve controle (+LC)	10 µL
SC	PCR-producten verkregen met de volgende DNA-templates: de shoarmalaag van de kapsalon en de positieve controle (+LC)	10 µL
B	PCR-producten verkregen met de volgende DNA-templates: de frietlaag van de kapsalon en de positieve controle (+LC)	10 µL
S	PCR-producten verkregen met de volgende DNA-templates: de saladelaag van de kapsalon en de positieve controle (+LC)	10 µL
G	PCR-producten verkregen met de volgende DNA-templates: de knoflooksauslaag van de kapsalon en de positieve controle (+LC)	10 µL



Voorbereidende vragen

Voordat je aan het practicum begint, moet je eerst bepalen welke DNA-samples je het best kunt gebruiken om de *Shigella*-bacterie op te sporen. Beantwoord hiervoor de volgende vragen.

- 1 Na het analyseren van de interviews heb je een hypothese opgesteld. Kun je deze hypothese aanscherpen nu je meer informatie hebt? Welke laag van de kapsalon heeft voor de voedselinfectie gezorgd? Schrijf je nieuwe hypothese hieronder op.

.....

.....

- 2 Je gaat straks een gelelektroforese doen. De gel heeft plek voor 9 DNA-samples. Welke 9 samples uit de tabel op blz. 5 wil je testen?

1: 4: 7:
2: 5: 8:
3: 6: 9:

- 3 Waarom kies je voor deze samples?

.....

.....

- 4 Hieronder zie je een schematische weergave van de gel die wordt gebruikt bij gelelektroforese. Vul in het lijstje ernaast in welke DNA-samples je waar gaat pipetteren. Teken daarna op de gel de DNA-bandjes die je verwacht te zien als resultaat. Ga hierbij uit van je antwoorden op vraag 1 en 2.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Locatie DNA-samples

1:
2:
3:
4:
5:
6:
7:
8:
9:



Practicum

Gelelektroforese

Benodigheden

1 MiniOne® Casting System (gelgietsysteem)
1 MiniOne® Elektroforesesysteem
1 agarose GreenGel™ cup (1%)
11 DNA samples (zie blz. 5)
Bekerglas met TAE-buffer (135 mL)
1 pipet (2-20 µL) en 12 pipetpuntjes
Magnetron
Fototoestel of telefoon met camera
Demiwater of gedistilleerd water

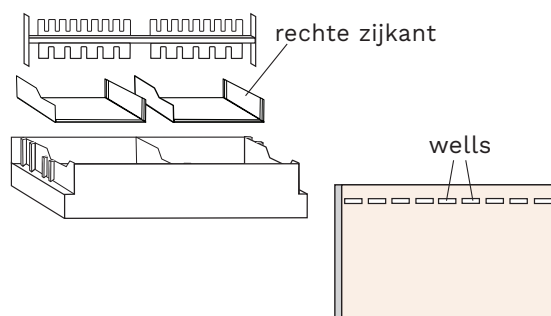
Denk om de veiligheid

Gebruik handschoenen en een veiligheidsbril als je werkt met vloeistoffen, bijvoorbeeld bij het maken en laden van de agarosegel.

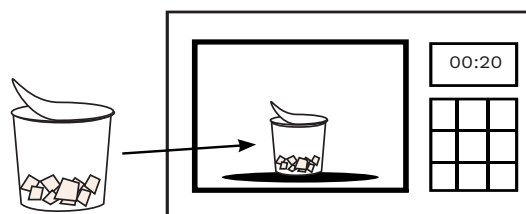
De gel maken

We beginnen met het maken van een agarosegel. Deze hebben we straks nodig om de DNA-fragmenten te scheiden.

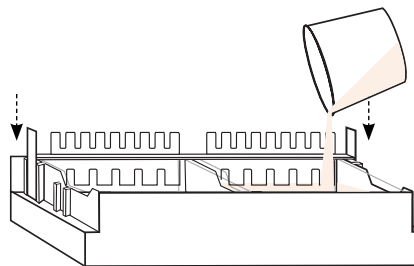
1 Zet het MiniOne® Casting systeem op een vlakke ondergrond en plaats de doorzichtige bakjes erin. Zorg dat de rechte zijkant rechts zit. Plaats de kam in de achterste gleufjes bovenaan het systeem. Zorg dat de kant met 9 tanden naar beneden wijst. Zo krijg je een gel met 9 putjes erin. Deze putjes noemen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



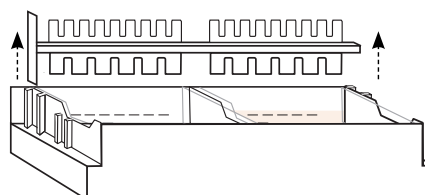
2 Haal het folie gedeeltelijk van de agarose GreenGel™ cup en zet deze 20 seconden in de magnetron. Laat de cup daarna 15 seconden afkoelen voordat je hem aanraakt. **Let op: zet niet meer dan 5 gel cups tegelijk in de magnetron!**



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!**



4 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.




De gel laden

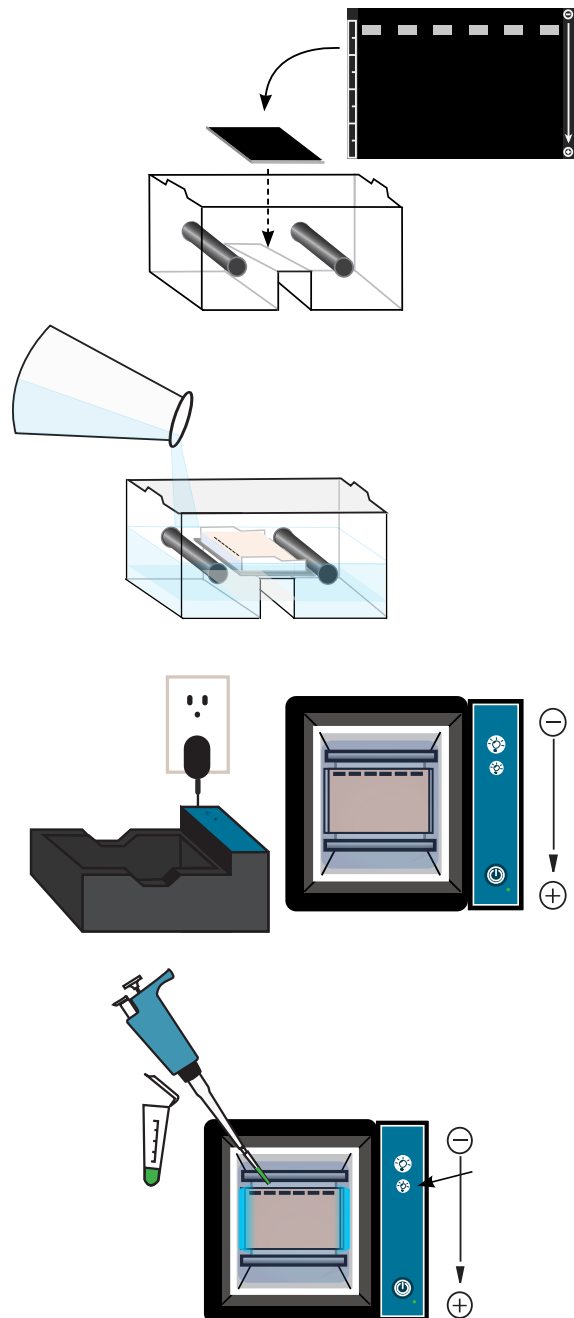
We gaan het elektroforesesysteem nu klaarzetten voor het scheiden van het DNA. Het 'laden' van de gel betekent dat we de DNA samples in de wells pipetteren.

1 Pak het MiniOne® Elektroforesesysteem 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.

2 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.


3 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.

4 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 de gel te laden. Doe dit zoals je op blz. 6 hebt aangegeven. Pipetteer dus 10 µL van DNA sample 1 in well 1, 10 µL van DNA sample 2 in well 2, etc. Gebruik voor elk sample een nieuw pipetpuntje. **Let op: beweeg de gel niet meer als deze eenmaal geladen is!**



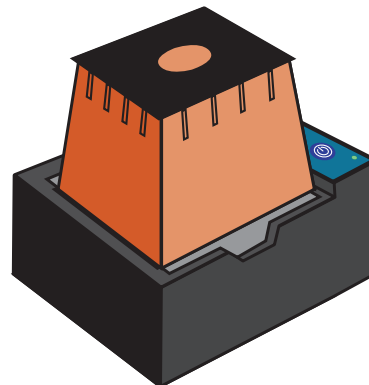
Het DNA scheiden

We gaan nu de DNA-fragmenten scheiden met het elektroforesesysteem, zodat we de bandenpatronen kunnen vergelijken.

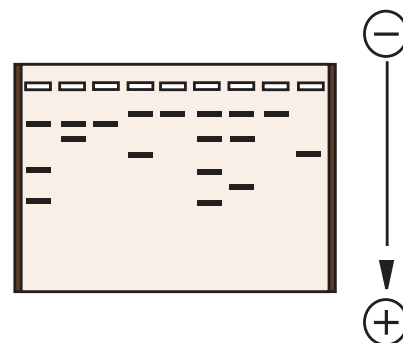
- 1 Zet de oranje kap op de houder. Zet het elektroforesesysteem aan door op de  knop te drukken. Naast de knop gaat nu een groen lampje branden. De gelelektroforese is nu gestart.

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?



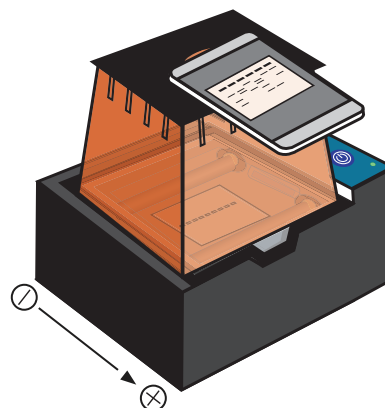
- 2 Wacht tot het DNA voldoende is gescheiden. Je kunt dan losse bandjes zien, zoals op de afbeelding hiernaast. Dit duurt ongeveer 20 minuten. Check af en toe het bewegen van de bandjes (ongeveer elke 5 minuten). **Let op: als je tijdens het wachten naar de gel wilt kijken, gebruik dan het lampje met 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 snoetje 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 contactpuntes droog en veeg eventueel gemorst buffer op.

- 4 Was je handen als je klaar bent met opruimen.

Weetje

In echte labs worden bij gelelektroforese vaak gevaarlijke stoffen gebruikt, zoals ethidiumbromide. Dit is een giftige stof die kanker kan veroorzaken. Gelukkig is dit practicum zo aangepast dat alle stoffen ongevaarlijk zijn. Daarom mag alles gewoon in de prullenbak of door de gootsteen.

Notities

Hier kun je tijdens het practicum notities maken.

[illegible]



Afsluitende vragen

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

1 Komen al jouw resultaten overeen met je hypothese? Leg je antwoord uit.

2 Bevestigen jouw resultaten de aanwezigheid van de *Shigella*-bacterie in de kapsalon? Zo ja, in welke laag was de bacterie aanwezig?

3 Welke controles heb je gebruikt in je experiment?

4 Waarom heb je deze controles gekozen? Als er ook controles zijn die je niet hebt meegenomen in het experiment, leg dan uit waarom je die niet hebt gekozen.

5 Waarom denk je dat het onderzoeksteam geen *Shigella*-DNA kon aantonen in het gemengde sample met alle lagen van de kapsalon?

6 Waarom was het nuttig om alle lagen van de kapsalon afzonderlijk te checken op aanwezigheid van *Shigella*-DNA?



Reflectievragen

Kijk even terug naar dit practicum en beantwoord de volgende vragen.

- 1 Bij het laden van de gel heb je het DNA in de wells van de gel gepipetteerd. Stel dat je een DNA sample per ongeluk naast de well zou pipetteren, hoe zou je dit dan terugzien in je resultaten?

- 2 Tijdens dit practicum lag de gel met de kant van de wells bij de negatieve elektrode. Waarom is het belangrijk dat de gel op deze manier in het elektroforesesysteem ligt?

- 3 Wat zou er gebeurd zijn als je de gel andersom in het elektroforesesysteem had gelegd? Hoe zou je dat terugzien in je resultaten?

- 4 Wat zou er gebeurd zijn als je het elektroforesesysteem veel langer dan 20 minuten aan had laten staan bij het scheiden van het DNA? Hoe zou je dat terugzien in je resultaten?

- 5 Wat ging bij jouw groepje goed bij het uitvoeren van dit practicum?

- 6 Zijn er dingen die je de volgende keer anders zou doen?

Begrippenlijst

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.
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.
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 marker	DNA-sequentie die uniek is voor een specifiek individu of specifieke soort.
Hypothese	Een stelling over de verwachte uitkomst van een experiment.
Infectieuze dosis	De hoeveelheid die je van een ziekteverwekker binnen moet krijgen om er ziek van te worden.
Negatieve controle	Een controle in een experiment waarvan je weet dat het een negatief resultaat zal geven. Als deze inderdaad negatief is, is er geen vervuiling of verstoring van het experiment geweest. Een positief resultaat van een sample is dan echt positief.
PCR	Polymerase chain reaction, een techniek waarmee je DNA kunt vermenigvuldigen.
Positieve controle	Een controle in een experiment waarvan je weet dat het een positief resultaat zal geven. Als deze inderdaad positief is, weet je dat het experiment succesvol was. Een negatief resultaat van een sample is dan echt negatief.
Primer	Een kort stukje enkelstrengs DNA dat als startpunt wordt gebruikt bij PCR. Het bindt specifiek aan de DNA-sequentie die je wilt vermenigvuldigen.

Begrippenlijst

Shigella sonnei

Een bacteriesoort uit het geslacht *Shigella*. Infectie zorgt voor o.a. koorts, buikkrampen en diarree en treedt op door direct contact met een geïnfecteerd persoon of indirect contact via voedsel, water of voorwerpen.

Voedselgerelateerde
uitbraak

Het ziek worden van meerdere mensen nadat zij hetzelfde voedsel hebben gegeten.

Voedselinfectie

Infectie met een ziekteverwekker door het eten van besmet voedsel.

Voedselvergiftiging

Ziekteverschijnselen veroorzaakt door in voedsel aanwezige gifstoffen, die meestal geproduceerd zijn door bacteriën.

Notities

Hier kun je tijdens de les notities maken.

