



HANDLEIDING VOOR DOCENTEN

Versie maart 2017

DNAbAND[®] is aanvankelijk ontwikkeld voor 1^e jaars modules moleculaire biologie binnen de unit Life Sciences and Technology, een samenwerking tussen Hogeschool Van Hall Larenstein en de NHL Hogeschool in Leeuwarden. Ook voor middelbare scholieren en leerlingen binnen het MBO is het een aantrekkelijk leermiddel.

Life Sciences & Technology

is gehuisvest in het gebouw van hogeschool Van Hall Larenstein,
Agora 1 8935CJ LEEUWARDEN
Tel. 058 2846450

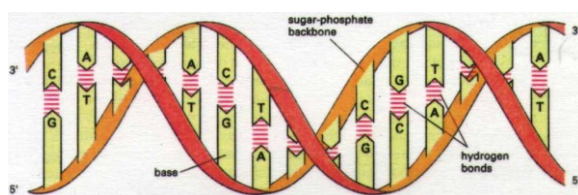
© **Copyright sinds 2008**

Feike R. van der Leij
Van Hall Larenstein

www.hvhl.nl

www.lstleeuwarden.nl

DNAbAND[®] is een gedeponeed handelsmerk



DNABAND® is een kit waarmee je kunt uitleggen hoe DNA vermeerdering werkt. Dit is de basis van de Polymerase Kettingreactie (PCR). Je kunt in de klas de leerlingen erbij betrekken. Afhankelijk van de diepgang kunnen ze o.a. leren dat:

- DNA strengen elk hun eigen richting hebben, in de dubbele helix lopen ze "tegen elkaar in"
- DNA strengen door polymerase verlengd worden (aangroei aan de 3'-kant)
- Bij het polymeriseren sterke covalente bindingen worden gemaakt. Dat kost energie ("twee fosfaatjes" van de losse bouwstenen, de dNTPs).
- Basenparing gebeurt via waterstofbruggen. Daarbij komt energie vrij, je moet de boel weer verhitten ("energie insteken") om de waterstofbruggen te verbreken.
- De covalente bindingen vele malen sterker zijn dan de H-bruggen.
- DNA een erg sterk molecuul is, dat jarenlang ongewijzigd kan blijven

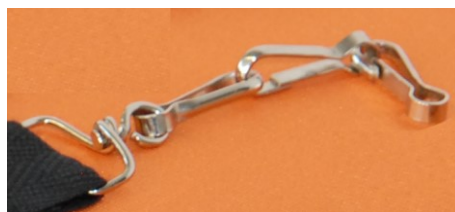


1. De kit bestaat uit zes stukken textielband waarop klittenband is bevestigd. De langste band bevat 8 groepjes gekleurd klittenband. De "primer" bevat vier groepjes, en er zijn vier losse "desoxy-nucleotiden" (base bouwstenen). Elk klittenbandje stelt een helft van een waterstofbrug voor. De kleuren zijn complementair, net als de basen die gaan paren. Voor de kleuren is het handig steeds dezelfde basen aan te houden. Elk groepje van twee of drie stelt dus een base voor.

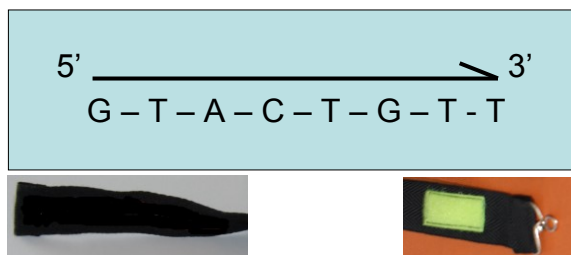
3x Groen = Guanine oftewel een "G-tje"
3x Rood (rose) = Cytosine (C-tje)

2x BlAuw = Adenine (A-tje)
2x Geel = Thymine (T-tje)

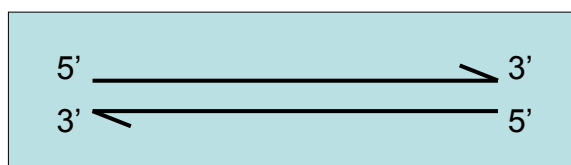
Groen en rose zijn steeds in groepjes van drie (de G-C paring bestaat uit 3 waterstofbruggen), blauw en geel gaan per twee (A-T binding bevat 2 H-bruggen).



2. **Voorbereiding:** haal alle strengen los van elkaar. De korte stukjes textielband voorzie je aan één kant van drie metalen klipjes. (de eerste keer heb je een tang nodig want die klipjes zijn als ze nieuw zijn lastig los te maken van het oogje) Dit zijn de enkele basen die als nucleotide-**TR**ifosfaat (dNTP's) in het spel komen. De drie klipjes zijn de drie "fosfaatjes".

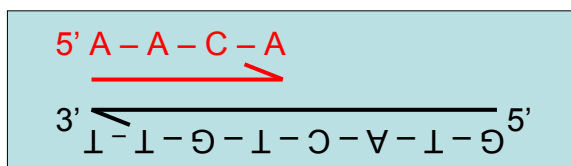
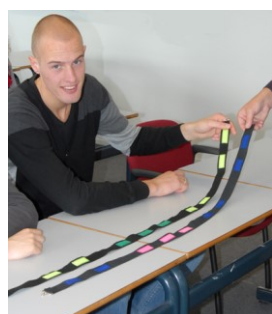


3. De langste band stelt een enkelstrengs DNA molecuul voor. Belangrijk is dat je uitlegt dat DNA een **richting** heeft. Op het bord leg je uit dat de standaard manier van schrijven van 5' naar 3' is. Aan de 3'-kant zit een OH-groep. Het OH-tje is het metalen oogje. Aan de 5'-kant zit géén OH-tje, hier zit het oranje logo "DNABAND".



Als je op het bord dubbelstrengs DNA tekent kun je laten zien dat de onderste streng van achter naar voren loopt (met een pijl).

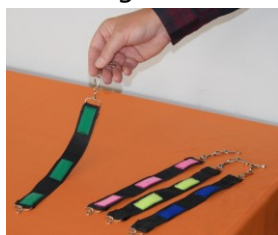
De term 5' of 3' heeft te maken met het koolstofatoom binnen de desoxy-ribose van de ruggengraat. Aan het 5' koolstofatoom zit de fosfaatgroep en aan de 3' kant een OH. Het voert wat ver om er hier diep op in te gaan.



4. In de klas ga je de enkele streng nu van achter naar voren laten vasthouden, zodat de **primer** van vier basen (5'- A-A-C-A- 3') er bovenop past.

Vervolgens vertel je dat JIJ de rol van een eiwit gaat spelen: **DNA polymerase**. Je legt uit dat DNA polymerase van losse bouwstenen (monomeren) een lange sliert (polymeer) kan maken, maar daarbij wat hulp nodig heeft. Allereerst moet er een voorbeeld streng zijn (de **template**) en je moet een "beginnetje" hebben (de primer) waar de monomeren aan geknoopt kunnen worden. Misschien kun je uitleggen dat DNA polymerase een **enzym** is, en dat jij dat enzym voorstelt.

Je gaat een "reactie" uitvoeren, en daarvoor moet de primer eerst de juiste plek herkennen om goed te kunnen hechten ("annealen"). Je gaat kijken wat de eerstvolgende base is die ingebouwd moet worden. Dat is een "G".

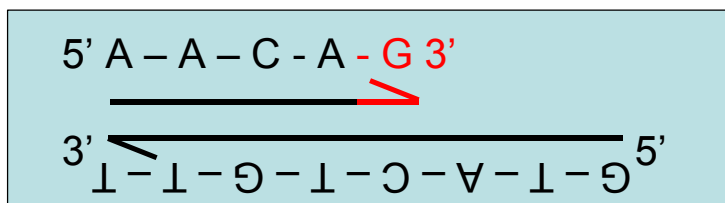
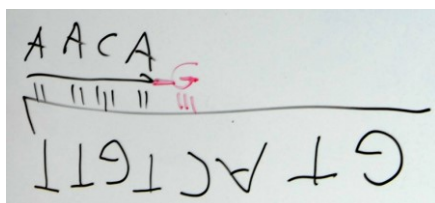




5. Bij het vastklippen van de "G" maak je twee klipjes los. Het maken van de verbinding kost energie, het kost "twee fosfaatjes."

Aan gevorderde leerlingen kun je uitleggen dat de dNTP's erg lijken op ATP (adenosinetriphosfaat) en ATP bevat immers energierijke fosfaatbindingen. De "N" van dNTP staat voor elke letter, dus dNTP staat voor dATP, dTTP, dGTP of dCTP.

Bij de nieuw gevormde binding is dus één fosfaat ingebouwd, deze is onderdeel van de "**ruggengraat**" (backbone).



Al met al is de primer nu een bouwsteen langer geworden. DNA kan maar aan één kant "aangroeien": alleen de 3'-OH is aanknopingspunt voor DNA polymerase, dus het lijkt net alsof de streng langer wordt in de richting van 5' naar 3'



6. Nu wordt het tijd de leerlingen er wat actiever bij te betrekken. Vraag iemand de volgende stap uit te voeren. Op de template streng zitten twee blauwe stukjes klittenband (A-tje) en hierop past een T-tje, dus de gele dTTP is aan de beurt. Daarna de blauwe dATP en tot slot de rose dCTP. Elke stap kan door iemand anders worden gedaan. **En vergeet vooral niet:** elke keer kost het twee fosfaatjes!

De dubbele streng is nu gevormd, eventueel kun je op het bord nog de tekening bijwerken

Dit is ook een moment om te kijken of er vragen zijn...



Vertel dat het energie kost om een nieuwe streng te maken (vertel eventueel dat bij de basenparing zelf wel een heel klein beetje energie vrijkomt, die je er weer in moet stoppen om de basenparen uit elkaar te "smelten").

Bij de volgende stap gaan we er nog meer energie in stoppen!
Je kunt vervolgens naar de radiator lopen en de klas vertellen dat je de temperatuur omhoog brengt. Het gaat heel warm worden. **We gaan naar 95 graden Celsius!**



7. Vraag drie leerlingen om elk een eindpunt van een streng te pakken en pak zelf de vierde.

Trek met enig bombarie (het klittenband zal hoorbaar uiteengaan) de strengen van elkaar. Je hebt nu twee enkele strengen. De moraal is dus dat de klipjes veel sterkere verbindingen maken dan waterstofbruggen (het kostte behoorlijk wat energie maar dan heb je ook wat!).

Covalente bindingen zijn duizenden keren sterker dan waterstofbruggen.

8. Ja dat is zweten bij 95°C!
Leg uit dat het polymerase een heel speciaal enzym is en bij 95°C **niet** kapot gaat.
Vertel ook dat dit speciale DNA polymerase het liefst werkt bij zo'n 70°C, en dat bij die temperatuur ook de primers kunnen hechten. Als je dus genoeg primer molekulen hebt, genoeg bouwstenen, en de temperatuur naar 70°C brengt zou je de truuk kunnen herhalen.



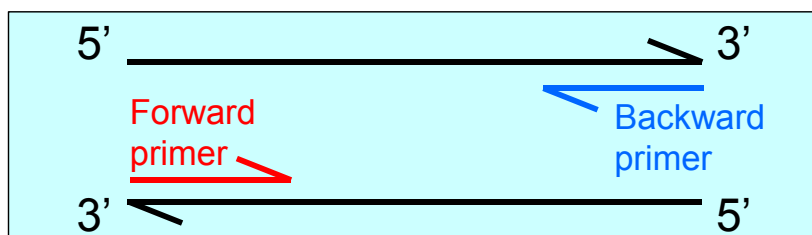
En dat is nu precies wat er in de **Polymerase Kettingreactie** (PCR) gebeurt! Bij de PCR worden **twee** specifieke primers gebruikt, voor elke streng één, en die zijn meestal zo'n 20 basen lang.

Wanneer je dertig keer de truuk herhaalt heb je ipv 2 strengen er **2³⁰** en dat zijn er meer dan je je voor kunt stellen!* Zo kun je van een enkele haar, huidschilfer of neuspulkje dus een heleboel DNA fabriceren.



Vergeet vooral niet de klipjes weer aan de dNTP's te zetten voor je het opruimt!

* In de praktijk haal je dat niet: je hebt daarvoor te weinig bouwstenen en primers



© Feike van der Leij; layout Feike van der Leij, met dank aan Jos Krabbe (foto's) en Mark Ros. Tevens dank aan Paula Karsten en naai-atelier "de Gouden Schaar" te Leeuwarden, en de klassen FS1H1 en FS1H5 (2010/11) van Forensic Sciences, Life Sciences & Technology, Leeuwarden. De dubbele helix figuur op pagina 2 is afkomstig uit Alberts *et al*: Molecular Biology of the Cell.

