







# Proeven aan genetica

## Onderzoek je eigen DNA!

 <b>Doelgroep</b> vwo 5/6	 <b>Vak</b> Biologie
 <b>Duur</b> 3-5 lesuren	 <b>Vaardigheden</b> Onderzoeksvaardigheden Pipetteren

**Deze docentenhandleiding is een toelichting bij de les ‘Proeven aan genetica: Onderzoek je eigen DNA!’. 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 de genetica achter smaak. Ze doen een smaaktest met de bittere stof PTC om hun fenotype te bepalen en isoleren DNA uit hun eigen wangslimvlies om hun genotype voor de PTC-receptor vast te stellen. Hierbij gebruiken ze PCR, restrictie-enzymen en gelelektroforese en reflecteren ze op hun experimenten.

### Inhoudsopgave

Didactische verantwoording.....	blz 2
Lesopzet.....	blz 3
Vorbereiding practicum 1.....	blz 4
Vorbereiding practicum 2.....	blz 6
Vorbereiding practicum 3.....	blz 8
Begeleiding practicum.....	blz 11
Toelichting restrictie-enzym.....	blz 13
Antwoordmodel.....	blz 14
Achtergrondinformatie.....	blz 16
Bijlage I: PCR.....	blz 17
Bijlage II: Gelelektroforese.....	blz 19

# Didactische verantwoording



## Leerdoelen

- » Leerlingen maken kennis met de werking van het smaakzintuig.
- » Leerlingen maken kennis met de genetica van smaakwaarneming.
- » Leerlingen passen hun kennis over genetica en DNA-technieken toe in een nieuwe context.
- » Leerlingen bepalen hun eigen genotype m.b.v. PCR, restrictie-enzymen en gelelektroforese.
- » Leerlingen kunnen reflecteren op hun experiment en waar nodig aangeven wat er fout ging.



## Aansluiting syllabus

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

- » A5. Onderzoeken
- » B1. Eiwitsynthese: nucleotide, basenparing, genetische code, aminozuur, PCR, primer, restrictie-enzym
- » B7. Waarneming door het organisme
- » C1. Zelforganisatie van cellen: DNA, eiwit
- » E3. Reproductie van het organisme: gen, allel, dominant, recessief, genotype, fenotype, genoom
- » F1. Selectie: genetische variatie

## Benodigde voorkennis

Voorafgaand aan het practicum is het belangrijk dat leerlingen enige voorkennis hebben over de bouw van DNA, genetica (monohybride kruisingen), gelelektroforese en PCR. Mocht dit nog niet in de reguliere lessen aan bod zijn gekomen, dan raden wij aan dit voor het practicum te behandelen. Voor de DNA-technieken kun je hierbij Bijlagen I en II op blz. 17-19 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 biologiecurriculum. De bijbehorende DNA-technieken kunnen worden ervaren als abstracte, lastige onderwerpen als deze puur theoretisch worden behandeld. Als leerlingen de technieken echter zelf kunnen uitvoeren, zoals in dit practicum, zullen zij het gemakkelijker begrijpen en onthouden.

## Organisatieniveaus

Cruciaal voor een goed begrip van moleculaire biologie is het leggen van de link tussen de verschillende organisatieniveaus van de biologie: welk effect hebben moleculaire processen op het organisme? Hier wordt in WisMon's Schoollabs continu naar gestreefd.

## Concept-contextmethode

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

## Practicumonderwijs met WisMon

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

# Lesopzet

Hieronder vind je een indicatie van de tijdsduur van de verschillende onderdelen van de les. In het kader hiernaast is een voorbeeld gegeven van hoe dit verdeeld kan worden over verschillende lessen. Dit kan natuurlijk ook anders worden ingedeeld. Alle onderdelen kunnen ook direct achter elkaar worden gedaan.

**Vorbereiding algemeen** 45 min. ⏴  
 - Lees deze handleiding door.  
 - Lees de leerlinghandleiding door.

**Vorbereiding practicum 1** 20 min. ⏴  
 Zet practicum 1 klaar (zie 'Vorbereiding practicum', blz. 4).

**Introductie** minstens 30 min. ⏴  
 Afhankelijk van de voorkennis van de leerlingen kan een theoretische uitleg nodig zijn voorafgaand aan het practicum (zie 'Didactische verantwoording', blz. 2). Bespreek in ieder geval de context van het practicum en de voorbereidende vragen. Indien dit de eerste keer is dat leerlingen gaan werken met een pipet, raden we aan ook het gebruik hiervan kort toe te lichten. Let op: als zowel de theorie als het pipetteren volledig nieuw zijn voor de leerlingen, duurt de introductie langer dan een half uur.

**Practicum 1** 45 min. ⏴  
 Leerlingen doen een smaaktest, isoleren DNA uit hun eigen wangcellen en maken de afsluitende vragen. Let op: het practicum bevat een paar momenten waar leerlingen kort moeten wachten. Je kunt hen waar mogelijk alvast wat laten opruimen of laten beginnen aan de afsluitende vragen.

**Vorbereiding practicum 2** 20 min. ⏴  
 Zet practicum 2 klaar (zie 'Vorbereiding practicum', blz. 6).

**Practicum 2** 45 min. ⏴  
 Leerlingen voeren een PCR-reactie uit en maken de afsluitende vragen. Let op: tijdens het wachten op de PCR-reactie kunnen leerlingen waar mogelijk alvast wat opruimen of beginnen aan de afsluitende vragen.

## Suggestie lesindeling

Les 1: Introductie\*

Les 2: Practicum 1

Les 3: Practicum 2

Les 4: Practicum 3

Les 5: Afsluiting\*

\* Als leerlingen al veel voorkennis hebben, kunnen zij de introductie en afsluiting zelfstandig thuis doen en hoeft dit alleen kort te worden besproken. De hele les past dan in 3 lessen.

**Vorbereiding practicum 3** 30 min. ⏴  
 Zet practicum 3 klaar (zie 'Vorbereiding practicum', blz. 8).

**Practicum 3** 60 min. ⏴  
 Leerlingen knippen het DNA met restrictie-enzymen, voeren een gelelektroforese uit en leggen hun resultaten vast. Let op: het practicum bevat een paar momenten waar leerlingen even moeten wachten. Je kunt hen waar mogelijk alvast wat laten opruimen of aan hun eigen biologieopdrachten laten werken.

**Afsluiting** 15 min. ⏴  
 Leerlingen maken met hun groepje de afsluitende vragen, waarbij ze hun genotype bepalen op basis van hun resultaten en eventuele afwijkende resultaten proberen te verklaren. We raden aan het practicum klassikaal na te bespreken.

# Vorbereiding practicum 1

## Algemeen

- » Voorafgaand aan het practicum moet een aantal zaken worden voorbereid en klaargezet. De benodigdheden hiervoor zijn steeds per stap aangegeven.
- » Ons advies is om groepjes van maximaal 4 leerlingen te maken en onderstaande hoeveelheden zijn hier dan ook op gebaseerd.
- » De doos bevat genoeg materiaal voor 7 groepjes.

## Extractie-oplossing

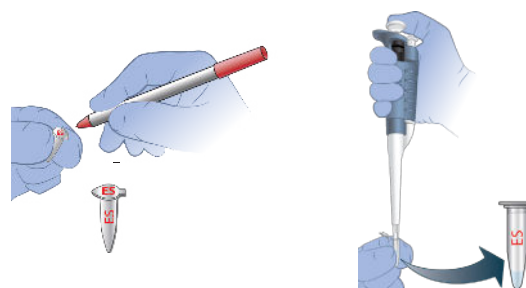
Van de extractie-oplossing ('DNA extraction solution') is 2 x 1,3 mL geleverd. Elk groepje heeft hiervan 250  $\mu$ L nodig.

**1** Label per groepje één epje van 0,65 mL (de grote epjes) met 'EO'.

**2** Pipetteer 250  $\mu$ L extractie-oplossing in elk epje.

## Benodigdheden

- » Extractie-oplossing
- » 1 pipet (20-200  $\mu$ L of groter)
- » Pipetpuntjes
- » Lege epjes (0,65 mL)
- » Dunne stift (permanent marker)



## Zoutoplossing

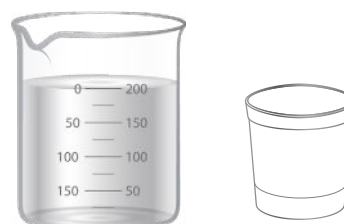
Er is 2 gram zout geleverd om een 1% zoutoplossing mee te maken.

**1** Meet 200 mL water af en voeg hier de 2 gram zout aan toe. Meng totdat het goed is opgelost.

**2** Giet ongeveer 3 mL zoutoplossing in een bekertje voor elke leerling.

## Benodigdheden

- » Zout (2 gram)
- » Water (kraan of fles)
- » Maatbeker/maatcilinder
- » Bekertjes



(Vorbereidingen gaan verder op blz. 5)

## Benodigheden klaarzetten

**1** Zet de benodigheden per groepje klaar met behulp van het lijstje hiernaast. De 20-200  $\mu\text{L}$  pipet en het rekje voor de epjes zijn optioneel, maar wel erg handig.

**2** Zet de benodigheden per klas klaar met behulp van het lijstje hiernaast.

### Benodigheden per groepje

- » 2 pipetten (2-20 en 20-200  $\mu\text{L}$ )
- » Pipetpuntjes
- » Zoutoplossing (1 per leerling)
- » Extractie-oplossing (250  $\mu\text{L}$ )
- » Teststrips smaaktest (1 controle en 1 PTC per leerling)
- » PCR-epjes (2 per leerling)
- » Dunne stift (permanent marker)
- » Rekje voor epjes
- » Afvalbeker



### Benodigheden per klas

- » MiniOne® centrifuge
- » 2 MiniOne® PCR-apparaten
- » Telefoon met MiniOne® PCR app
- » Labjassen
- » Veiligheidsbrillen
- » Handschoenen



# Vorbereiding practicum 2

## Algemeen

- » Voorafgaand aan het practicum moet een aantal zaken worden voorbereid en klaargezet. De benodigdheden hiervoor zijn steeds per stap aangegeven.
- » Ons advies is om groepjes van maximaal 4 leerlingen te maken en onderstaande hoeveelheden zijn hier dan ook op gebaseerd.
- » De doos bevat genoeg materiaal voor 7 groepjes.

## PCR-reagentia

De PCR-reagentia zijn geleverd in twee afzonderlijke buisjes gelabeld 'Taq PCR master mix' en 'PCR Primer Mix'. Dit moet verdeeld worden over de groepjes.

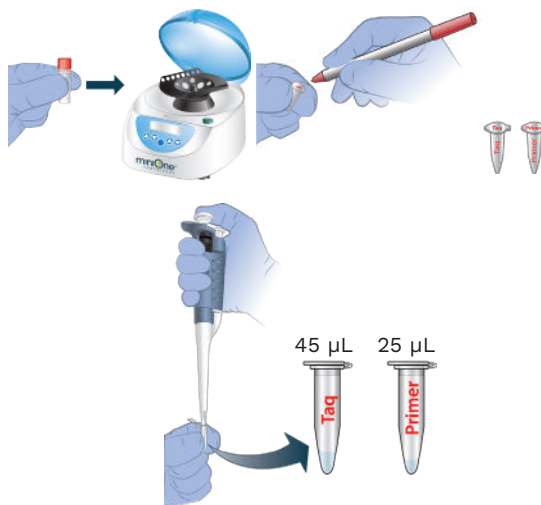
**1** Centrifugeer de twee geleverde buisjes met PCR-reagentia kort, zodat de vloeistof goed naar de bodem gaat.

**2** Label per groepje twee epjes van 0,65 mL (de grote epjes) met 'Taq' respectievelijk 'Primer'.

**3** Pipetteer 45  $\mu\text{L}$  Taq PCR master-mix en 25  $\mu\text{L}$  primer-mix in de juiste epjes.

## Benodigdheden

- » Taq PCR master-mix (475  $\mu\text{L}$ )
- » Primer-mix (275  $\mu\text{L}$ )
- » Centrifuge
- » 1 pipet (20-200  $\mu\text{L}$ )
- » Pipetpuntjes
- » Lege epjes (0,65 mL)
- » Dunne stift (permanent marker)



(Vorbereidingen gaan verder op blz. 7)

## Benodigheden klaarzetten

**1** Zet de benodigheden per groepje klaar met behulp van het lijstje hiernaast. Het rekje voor de epjes is optioneel, maar wel erg handig.

**2** Zet de benodigheden per klas klaar met behulp van het lijstje hiernaast.

### Benodigheden per groepje

- » 1 pipet (2-20  $\mu$ L)
- » Pipetpuntjes
- » Geïsoleerd DNA (1 per leerling)
- » Taq PCR master-mix (45  $\mu$ L)
- » Primer-mix (25  $\mu$ L)
- » PCR-epjes (1 per leerling)
- » Dunne stift (permanent marker)
- » Rekje voor epjes
- » Afvalbeker



### Benodigheden per klas

- » MiniOne® centrifuge
- » 2 MiniOne® PCR-apparaten
- » Telefoon met MiniOne® PCR app
- » Labjassen
- » Veiligheidsbrillen
- » Handschoenen



# Vorbereiding practicum 3

## Algemeen

- » Voorafgaand aan het practicum moet een aantal zaken worden voorbereid en klaargezet. De benodigdheden hiervoor zijn steeds per stap aangegeven.
- » Ons advies is om groepjes van maximaal 4 leerlingen te maken en onderstaande hoeveelheden zijn hier dan ook op gebaseerd.
- » De doos bevat genoeg materiaal voor 7 groepjes.

## Restrictie-enzym verdunnen

Het restrictie-enzym HaeIII moet voor gebruik verdund worden met een buffer.

**Let op: dit dient vlak voor de start van het practicum te gebeuren!**

**1** Centrifugeer de geleverde buisjes met de labels 'HaeIII enzyme concentrate' en 'Enzyme dilution buffer' 15 seconden op 10.000 rpm, zodat de vloeistof goed naar de bodem gaat.

**2** Neem deze buisjes en pipetteer 270  $\mu\text{L}$  van het enzym-verdunningsbuffer in het buisje met restrictie-enzym HaeIII. Pipetteer op en neer om dit goed te mengen. **Let op: bewaar het resterende verdunningsbuffer voor stap 2 hieronder.**

## Benodigdheden

- » Restrictie-enzym HaeIII (30  $\mu\text{L}$ )
- » Verdunningsbuffer (600  $\mu\text{L}$ )
- » Centrifuge
- » 1 pipet (20-200  $\mu\text{L}$  of groter)
- » Pipetpuntjes



## Reagentia verdelen

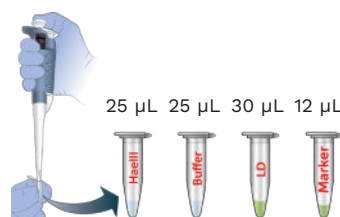
De reagentia zijn geleverd in vier buisjes gelabeld 'HaeIII enzyme concentrate', 'Enzyme dilution buffer', 'Sample Loading Dye' en 'MiniOne® DNA Marker'. Dit moet verdeeld worden over de groepjes.

**1** Label per groepje vier epjes van 0,65 mL (de grote epjes) met 'HaeIII', 'Buffer', 'DK' en 'Marker'.

**2** Pipetteer 25  $\mu\text{L}$  verdund restrictie-enzym HaeIII in epje 'HaeIII', 25  $\mu\text{L}$  verdunningsbuffer in epje 'Buffer', 30  $\mu\text{L}$  DNA-kleuring (loading dye) in epje 'DK' en 12  $\mu\text{L}$  van de DNA-ladder (DNA marker) in epje 'Marker'.

## Benodigdheden

- » Verdund restrictie-enzym HaeIII
- » Verdunningsbuffer
- » DNA-kleuring
- » DNA-ladder
- » 2 pipetten (2-20 en 20-200  $\mu\text{L}$ )
- » Pipetpuntjes
- » Lege epjes (0,65 mL)
- » Dunne stift (permanent marker)



(Vorbereidingen gaan verder op blz. 9)

## 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 bekeerglas 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 bekeerglazen of erlenmeyers.

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

### Benodigheden

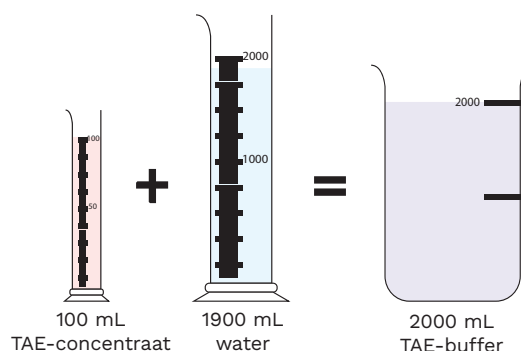
- » TAE-concentraat
- » Demiwater of gedistilleerd water
- » Maatcilinders
- » Bekerglazen of erlenmeyers
- » (Laboratoriumfles)

$$\begin{aligned} V_{\text{TAE}} &= V_{\text{buffer}} / 20 \\ V_{\text{water}} &= V_{\text{buffer}} - V_{\text{TAE}} \end{aligned}$$

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

#### Voorbeeldberekening:

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



(Vorbereidingen gaan verder op blz. 10)

## Benodigheden klaarzetten

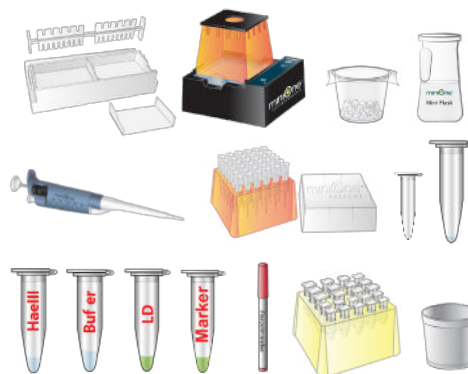
**1** Zet de benodigheden per groepje klaar met behulp van het lijstje hiernaast.

**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.

## Benodigheden per groepje

- » 1 MiniOne® Casting System
- » 1 MiniOne® Elektroforese-systeem
- » 1 agarose GreenGel™ cup (2%)
- » TAE-buffer (135 mL)
- » 1 pipet (2-20 µL)
- » Pipetpuntjes
- » PCR-epjes (1 per leerling)
- » Gekopieerd DNA (1 per leerling)
- » Verdund restrictie-enzym (25 µL)
- » Enzym-verdunningsbuffer (25 µL)
- » DNA-kleuring (30 µL)
- » MiniOne® DNA marker (12 µL)
- » Dunne stift (permanent marker)
- » Rekje voor epjes
- » Afvalbeker



## Benodigheden per klas

- » MiniOne® centrifuge
- » 2 MiniOne® PCR-apparaten
- » Telefoon met MiniOne® PCR app
- » Magnetron
- » Labjassen
- » Veiligheidsbrillen
- » Handschoenen
- » Demiwater/gedistilleerd water (alleen nodig bij opruimen)



# Begeleiding practicum

## Denk om de veiligheid

- » Bij verwarmen of smelten van stoffen (met name agarose)
- » Bij het werken met elektrische apparatuur
- » Gebruik labjassen, handschoenen en veiligheidsbrillen
- » Het PCR-apparaat heeft oppervlakten die heet kunnen worden
- » 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.

## Practicum 1

### Wangcellen vrijmaken

**3** Als leerlingen niet eerder een pipet hebben gebruikt, laat ze dan eerst even oefenen met bijvoorbeeld water. Dit is één van de stappen waarbij een 20-200 µL handig is, maar leerlingen kunnen ook meerdere keren pipetteren met een 2-20 µL pipet. De PCR-epjes hebben dunne wanden, dus hier moet niet te hard in geknepen worden.

**4** Afhankelijk van het type centrifuge kan een inzetstukje nodig zijn om de gaatjes passend te maken voor PCR-epjes. Zorg ook dat de epjes goed over de centrifuge verdeeld zijn, zodat hij in balans is.

### DNA isoleren

**2** We raden aan de MiniOne® app voor het practicum al te installeren op je eigen telefoon of die van een leerling. Test ook de Bluetooth-verbinding. Per PCR-apparaat is één telefoon met de app nodig. De app is Engelstalig.

**5** Aan het eind van practicum 1 kan het geïsoleerde DNA bewaard worden in de vriezer tot de volgende les.

## Practicum 2

### PCR

**1** Als leerlingen weinig ervaring hebben met pipetteren, kan het pipetteren van kleine hoeveelheden lastig zijn. Wat kan helpen is om kleine volumes goed op de bodem te pipetteren en epjes eventueel kort te centrifugeren om alle vloeistof omlaag te krijgen als dat nodig is.

**3** Zorg dat leerlingen onthouden waar ze hun epjes in het PCR-apparaat hebben gezet of maak hiervan een foto, want afhankelijk van de gebruikte stift gaan de labels er soms af tijdens de PCR-reactie.

**5** Aan het eind van practicum 2 kan het gekopieerde DNA bewaard worden in de vriezer tot de volgende les.

## Practicum 3

### Restrictie-enzymen

**3** Er staan twee buffers op tafel. Tijdens deze stap moet het verdunningsbuffer gebruikt worden en niet het TAE-buffer.

**5** Leerlingen kunnen tijdens het wachten alvast verder gaan.

### Agarosegel 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

**5** Let er bij het laden van de gel op dat leerlingen:

- » 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 ze pipetteren;
- » 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** De materialen die gebruikt worden in dit practicum mogen in de prullenbak en het TAE-buffer mag door de gootsteen.

# Toelichting restrictie-enzym

In dit practicum onderzoeken we een regio van het TAS2R38-gen die 221 bp lang is en de SNP op nucleotidepositie 145 bevat. Deze regio bevat echter niet exact de herkenningsplaats voor restrictie-enzym HaeIII. De primers van de PCR-reactie worden daarom gebruikt om een substitutie van één basenpaar te introduceren. Deze is onafhankelijk van de SNP op positie 145, maar wel

onderdeel van de herkenningsplaats (zie onderstaande afbeelding). Deze methode, waarmee je een mutatie introduceert op een specifieke positie in een DNA-sequentie, wordt aangeduid met de Engelse term 'site-directed mutagenesis'. Met deze kleine verandering zorgen we ervoor dat het proever-allel wel wordt geknipt door HaeIII en het niet-proever-allel niet.

Gedeelte van het TAS2R38-gen met de positie van de SNP in rood:

```

5' - . . CCAATGCCTTCGTTTTCTTGGTGAATTTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCAGCCACTGA . . -3'
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3' - . . GGTTACGGAAGCAAAAGAACCACTTAAAAACCTACATCACTTCTCCGTCGGTGACT . . -5'
  
```

Herkennings- en knipplaats voor HaeIII:  $\overline{\text{GGCC}}$   
 ||||  
 CCGG

Sequentie van de (voorwaartse) primer:

```
5' - CCTTCGTTTTCTTGGTGAATTTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCGG - 3'
```

Primer gebonden aan de complementaire sequentie in het gen, met de mismatch in groen:

```

5' - CCTTCGTTTTCTTGGTGAATTTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCGG - 3'
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3' - GGTTACGGAAGCAAAAGAACCACTTAAAAACCTACATCACTTCTCCGTCGGTGACT . . -5'
  
```

Na een aantal PCR-cycli is de G in de primer onderdeel geworden van het TAS2R38-fragment. De herkenningsplaats voor HaeIII is nu aanwezig in het fragment (rode kader):

```

5' - CCTTCGTTTTCTTGGTGAATTTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCGGCCACTGA . . -3'
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3' - GGAAGCAAAAGAACCACTTAAAAACCTACATCACTTCTCCGTCGGTGACT . . -5'
  
```

# Antwoordmodel

## Vorbereidende vragen

1. Iemand die PTC kan proeven heeft genotype TT of Tt, omdat het proever-allel dominant is.
2. Nee. De ouders kunnen PTC niet proeven en hebben dus beide genotype tt. De kinderen kunnen dan alleen genotype tt hebben en zij kunnen geen PTC proeven.
3. 50%. Dit kun je laten zien met een kruisingsschema.
4. Als er tijdens de meiose recombinatie plaatsvindt in het TAS2R38-gen, bijvoorbeeld door crossing-over. Hierbij wisselen twee homologe chromosomen stukken DNA uit. Er kan dan een nieuwe set SNP's ontstaan die niet bij de moeder aanwezig was. Daarnaast kunnen spontane puntmutaties er ook voor zorgen dat het kind een andere set SNP's heeft dan de moeder.
5. Als er in de natuur giftige bittere stoffen voorkomen die op PTC lijken en aan dezelfde receptor binden, zou het hebben van het proever-allel een evolutionair voordeel kunnen zijn, omdat dat ervoor zorgt dat je deze gifstoffen kunt detecteren in je voedsel.  
Het proever-allel niet hebben kan het voordeel hebben dat je bepaalde bittere stoffen niet proeft en daardoor meer soorten voedzame groenten kunt eten. Het is overigens niet bekend waarom deze variatie in het TAS2R38-gen is blijven bestaan, maar hier wordt onderzoek naar gedaan.
6. Bijvoorbeeld een ziekte, beschadiging van de tong (zoals je tong branden) of net bepaalde dingen gegeten of gedronken hebben.
7. Het gebruik van restrictie-enzymen zorgt voor het ontstaan van DNA-fragmenten van specifieke lengtes voor elk genotype. Bij gelelektroforese bewegen korte DNA-fragmenten sneller door de gel dan langere fragmenten. Op deze manier ontstaat voor elk genotype een kenmerkend bandenpatroon op de gel.

## Afsluitende vragen practicum 1

1. Antwoord verschilt per leerling. Als de teststrip bitter smaakte zijn de mogelijke genotypes TT of Tt. Als de teststrip niet bitter smaakte is het mogelijke genotype tt.
2. Mond spoelen: dit maakt cellen los uit je wangslimvlies.  
Zout: dit zorgt ervoor dat de cellen intact blijven. Als je gewoon water gebruikt, is de osmotische waarde buiten de cellen lager dan in de cellen en zou water de cellen in gaan door osmose. De cellen barsten dan open en hun inhoud (o.a. DNA) komt vrij in de oplossing, voordat je de kans hebt gehad om de cellen te isoleren.  
Verhitten: dit helpt om de cel- en kernmembraan kapot te maken, waardoor het DNA vrijkomt in de oplossing.  
Centrifugeren: dit zorgt ervoor dat de restanten van de cellen een pellet vormen op de bodem, terwijl de oplosbare componenten (zoals het DNA) in het supernatant komen. Het is belangrijk om celrestanten te verwijderen, omdat deze de PCR-reactie kunnen hinderen.
3. RNA, eiwitten en kleine moleculen. Dit protocol maakt niet specifiek DNA vrij, maar ook veel andere celcomponenten.
4. Verschillende antwoorden mogelijk. Bijvoorbeeld onderzoeksvragen gerelateerd aan genetische ziektes, je familiegeschiedenis/afkomst of je genotype voor een ander fenotype.

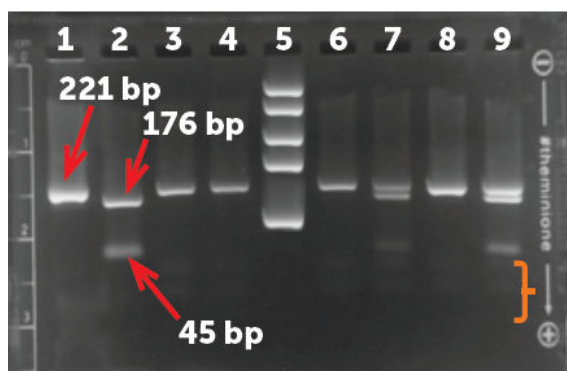
## Afsluitende vragen practicum 2

1. Het doel van een PCR-reactie is om veel kopieën te maken van een specifieke regio van het DNA. Wetenschappers gebruiken PCR in veel verschillende situaties. Bijvoorbeeld bij medische diagnostiek, forensisch onderzoek, identificatie van een soort, verwantschapsonderzoek, etc.
2. Primers. Dit zijn korte stukjes enkelstrengs DNA die complementair zijn aan de uiteinden van de DNA-sequentie die je wilt kopiëren (in dit geval het TAS2R38-gen). De primers binden hier en dienen als startpunt voor het *Taq*-polymerase voor het kopiëren van het DNA.

3. Verschillende antwoorden mogelijk.  
Het DNA dat we hebben geïsoleerd is het volledige genoom (miljoenen basenparen). Dit is te lang voor analyse met gelelektroforese. Bovendien knipt het restrictie-enzym dit DNA waarschijnlijk op veel meer plekken naast de plek waarin wij geïnteresseerd zijn, omdat de herkenningsplaats veel vaker voorkomt. Daarnaast is de hoeveelheid geïsoleerd DNA waarschijnlijk te laag om het zichtbaar te maken op de gel.
4. De kans op primer-dimeren is groter als je lange primers gebruikt. Als de primers uit meer nucleotiden bestaan, is de kans namelijk groter dat er complementaire stukjes voorkomen in hun sequenties.

### Voorbeeld resultaat

Hoe het resultaat er precies uitziet, hangt af van welke samples waar zijn gepipetteerd en de genotypes van de leerlingen. Het kan er bijvoorbeeld zo uitzien:



- 1: Leerling 1, ongeknipt.
- 2: Leerling 1, geknipt. Wijst op genotype TT.
- 3: Leerling 2, ongeknipt.
- 4: Leerling 2, geknipt. Wijst op genotype tt.
- 5: DNA-ladder (100, 300, 500, 1000 en 2000 bp).
- 6: Leerling 3, ongeknipt.
- 7: Leerling 3, geknipt. Wijst op genotype Tt.
- 8: Leerling 4, ongeknipt.
- 9: Leerling 4, geknipt. Wijst op genotype Tt.

Bandjes ter hoogte van de oranje haak wijzen op korte DNA-fragmenten (primer-dimeren).

### Afsluitende vragen practicum 3

1. Antwoord kan per groepje verschillen. Veelvoorkomende redenen voor een mislukte PCR-reactie zijn: een te lage startconcentratie DNA, pipetteerfouten bij het samenstellen van het PCR-reactiemengsel, de verkeerde reactiecomponenten toevoegen of de componenten niet goed samen naar de bodem van het epje krijgen.
2. Antwoord kan per groepje verschillen. Als er fouten zijn gemaakt bij de PCR-reactie of de behandeling met restrictie-enzymen, kunnen de bandjes een andere lengte hebben dan verwacht of helemaal afwezig zijn.
3. Antwoord kan per groepje verschillen. Onverwachte bandjes zouden verklaard kunnen worden door een onjuiste voorspelling van het genotype aan het begin van het practicum. Primer-dimeren (onderin de gel) komen ook regelmatig voor bij dit PCR-protocol.
4. Antwoord verschilt per leerling.

# 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.

## Hulp nodig?

Neem contact op met WisMon:



support@wismon.nl



030-737 0348

## Meer van WisMon?

Kijk op [www.wismon.nl](http://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?
- » Voedselinfectie: Een feestje met een bijsmak.
- » Huntington: Een ziekte in de stamboom.
- » De beste koeien: Een boer met keuzestress.

# Bijlage I

## 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 geïsoleerde DNA uit wangslimvlies.
- » **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.



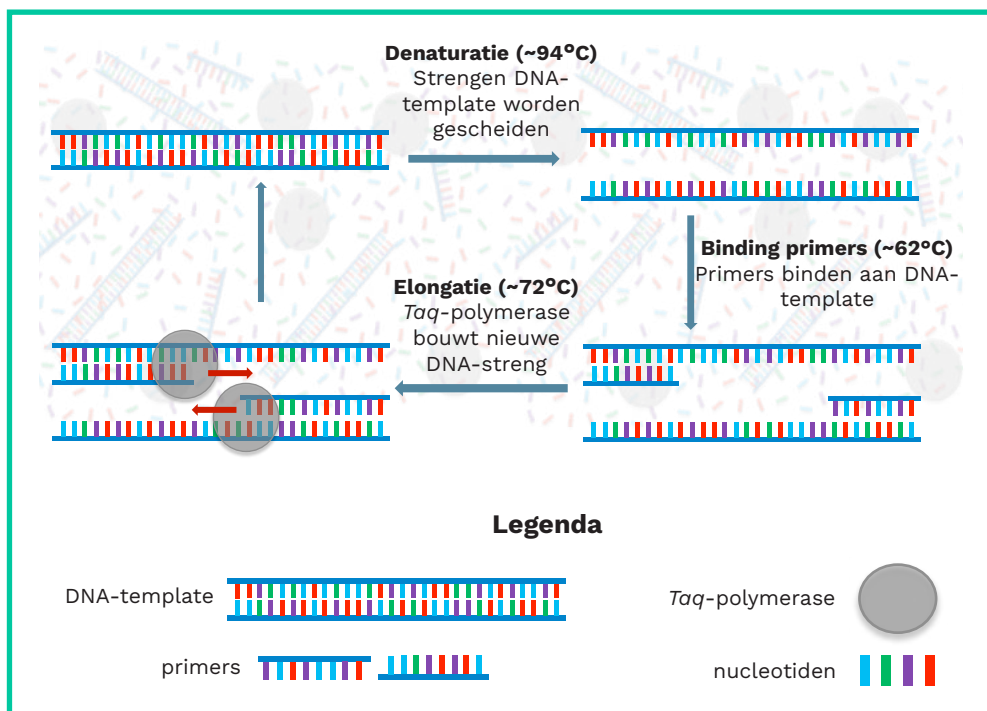
### Stappen van een PCR-reactie

De PCR-reactie bestaat uit onderstaande stappen. Zie ook de afbeelding op blz. 18 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

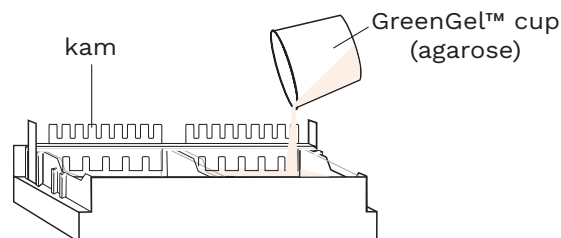
Het doorlopen van deze drie stappen wordt één cyclus genoemd. Door de cyclus te herhalen wordt steeds meer DNA geproduceerd. Meestal worden 10 tot 45 cycli uitgevoerd, met als resultaat een gigantische hoeveelheid DNA-kopieën. Deze kunnen gebruikt worden in vervolgstappen van het onderzoek. Het DNA kan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



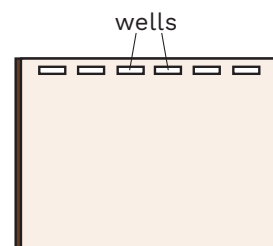
# Bijlage II

## Gelelektroforese

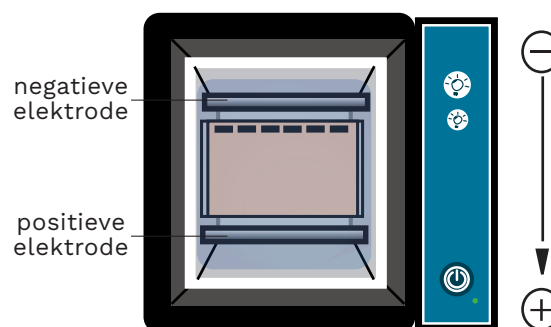
Gelelektroforese is een techniek waarmee je de componenten van een mengsel kunt scheiden. Dit kunnen mengsels zijn van DNA, RNA, eiwitten of kleurstoffen. De componenten worden gescheiden op basis van de grootte, lading en vorm van de moleculen. Hierbij wordt een gel gebruikt, waar de moleculen doorheen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



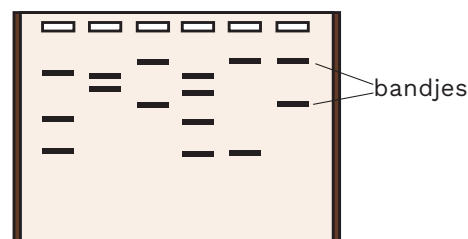
Voor het scheiden van DNA, zoals in dit practicum, wordt vaak een agarosegel gebruikt. Deze wordt gemaakt door gesmolten agarose in een bakje te gieten en hier een kam in te plaatsen. Als de agarose is gestold, wordt de kam verwijderd en heb je een gel met aan één zijde een rij wells (putjes). In deze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

