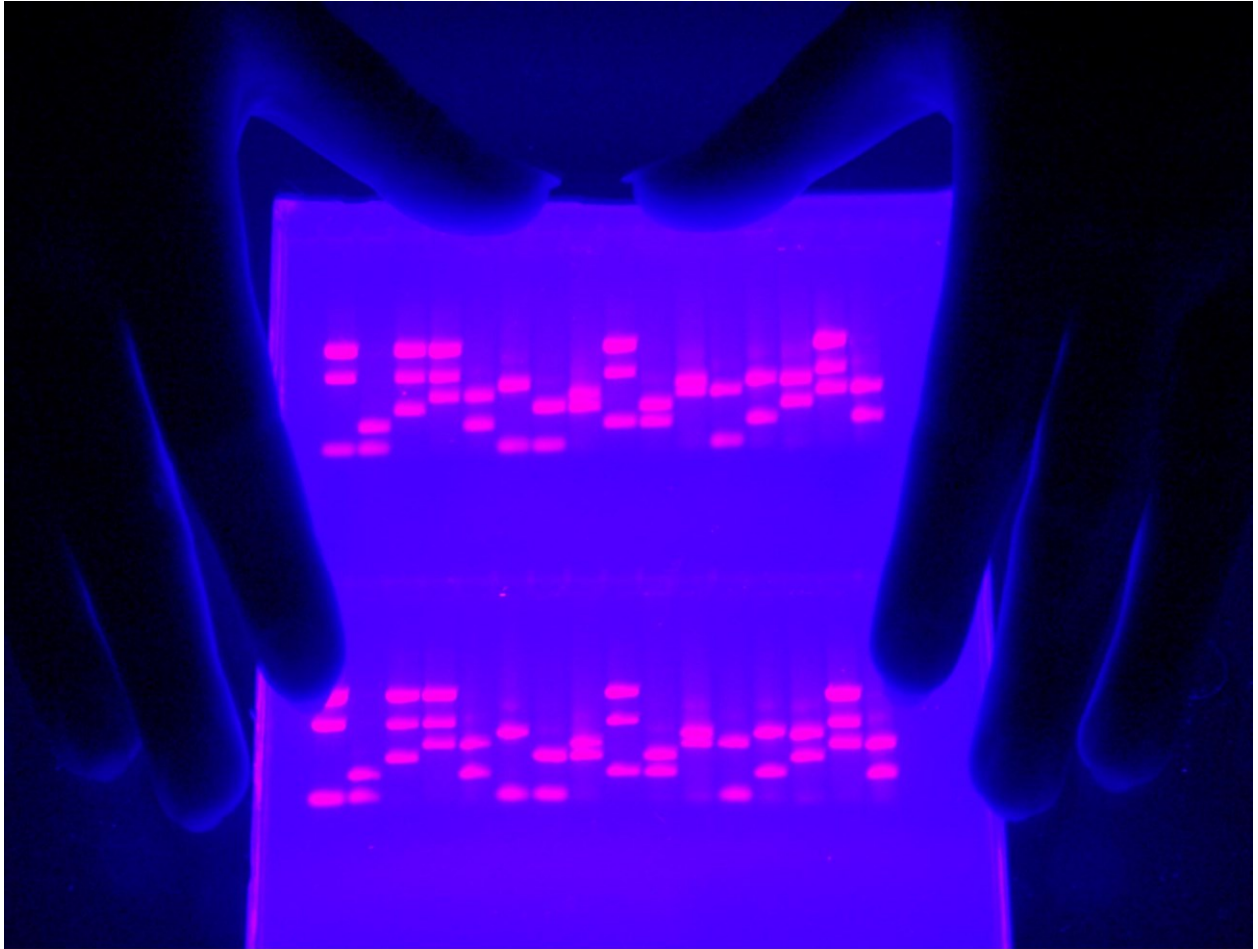


Handleiding

Wie is de vader? Realtime gelektroforese DNA kit (VOS-038)



VOS instrumenten

Sylphium
molecular biology

#VOS-038
versie 3.1

Inhoudsopgave

1.	Beschrijving experiment	3
1.1	Samenstelling kit	3
1.2	Benodigdheden	3
2.	Achtergrond	4
2.1	DNA fingerprinting	4
2.2	Elektroforese	4
3	Proefopzet en tips	6
4	Vorbereiding en practicum	7
4.1	Vorbereiding	7
4.2	Uitvoering van de proef	9
5	Het resultaat	10

1. Beschrijving experiment

Deze 2 x 15 profielen DNA kit laat leerlingen het principe zien van DNA fingerprinting, zoals dit wordt uitgevoerd binnen het forensisch onderzoek. Door de unieke “real time gelelektroforese kleuring” zien de leerlingen de scheiding van het DNA direct plaatsvinden. Een aparte stap voor kleuren en ontkleuren van de gel na de elektroforese is niet nodig. De gel is af te lezen bij gewoon daglicht. Duur van het experiment ca. 45 minuten. Leerlingen kunnen terwijl de gel loopt direct zien dat kleine stukken DNA sneller door de gel migreren dan grotere stukken DNA. Tevens zien ze dat het DNA afkomstig van verschillende individuen verschillende patronen (profielen) op de gel laten zien.

De leerlingen werken in 2 groepen van maximaal 16 leerlingen en elke groep krijgt 15 DNA profielen van mogelijke daders. Elke groep krijgt ook een DNA daderprofiel afkomstig van het plaats delict. De leerlingen vergelijken in dit experiment het DNA afkomstig van het plaats delict met dat van de verdachten. De kit bevat voldoende materiaal om het experiment in twee groepen van 16 leerlingen uit te kunnen voeren.

1.1 Samenstelling kit

- 2 x 15 DNA profielen
- 2 x Dader profiel
- 2 x 1 ml loading dye (kleurloze vloeistof)
- 3 g agarose
- 400 µl blauwe gel dye (1000x)
- 100 ml elektroforese buffer (20x)

1.2 Benodigheden

- Elektroforese opstelling inclusief voeding voor minimaal 32 monsters (20 µl)
- Magnetron of kookplaat
- Analytische balans of weegschaal
- Pipetten instelbaar op 20 µl (voor leerlingen) en instelbaar op 300 µl (voor docenten)
- Pipetpuntjes
- Lab glaswerk (bekerglas, maatscilinder, erlenmeyer, etc.)
- Demiwater of anders gewoon kraanwater
- Eventueel waterbad of oven op 55 °C

2. Achtergrond

Hieronder wordt een korte theoretische achtergrond gegeven die van belang is om de werking en het doel van de kit te begrijpen. Op internet, bijvoorbeeld Wikipedia, kan aanvullende informatie worden gevonden over de verschillende onderwerpen.

2.1 DNA fingerprinting

Menselijk DNA bestaat uit drie miljard basenparen, verspreid over 23 paar chromosomen. Op éénenige tweelingen na, is geen enkel mens hetzelfde. Dit wordt veroorzaakt doordat er binnen die drie miljard basenparen verschillen bestaan. Die zijn niet evenredig verdeeld over het gehele genoom, doordat sommige delen (genen) een bepaalde functie hebben. Deze genen kunnen bijvoorbeeld coderen voor een eiwit. Een verandering in een gen coderend voor een eiwit zou dodelijk kunnen zijn voor het individu. Het grootste deel van het genoom is echter niet coderend en veranderingen hierin hebben dan ook geen directe invloed op het leven van het individu. Hier zullen dan ook variaties optreden tussen de verschillende individuen binnen dezelfde soort.

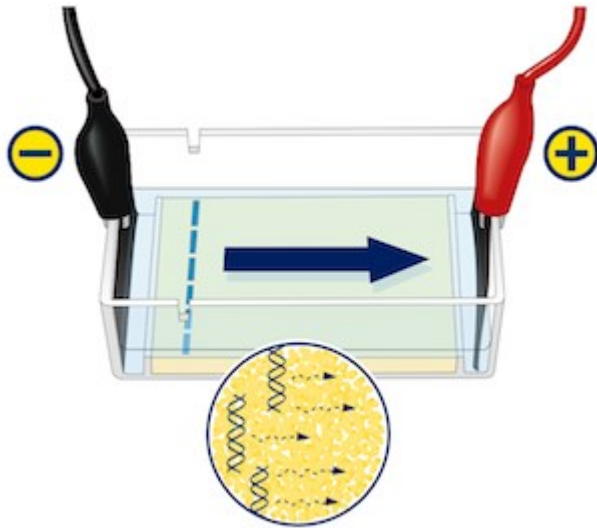
In forensisch onderzoek wordt gebruikgemaakt van deze genetische verschillen tussen individuen. Zo kan met DNA analysetechnieken een hard bewijs worden verkregen of een spoor (bijvoorbeeld bloed, sperma of haar) gevonden op een plaats delict toebehoort aan een bepaalde verdachte. Omgekeerd kunnen met deze techniek onterecht veroordeelden met deze techniek worden vrijgepleit. De bewijskracht van DNA fingerprinting is zeer groot en heeft voor zowel recherche als rechtspraak voor een revolutie gezorgd.

Een andere toepassing van DNA fingerprinting is het aantonen van familiale banden. Tot voor kort on-identificeerbare lichamen of delen daarvan kunnen met DNA fingerprinting worden geïdentificeerd door de DNA patronen te vergelijken met die van nog levende familieleden. Een voorbeeld hiervan is de identificatie van de stoffelijke overblijfselen van de MH17 slachtoffers. Ook na 100 jaar zijn stoffelijke overblijfselen vaak nog met DNA fingerprinting te identificeren. Zo konden de lichamen van de Russische Tsaar Nicolaas II en zijn familieleden, die een jaar na de Oktoberrevolutie van 1917 waren vermoord, op deze wijze worden geïdentificeerd door daaruit verkregen DNA met dat van nog levende familieleden te vergelijken. Van een vrouw die decennia lang geclaimd had prinses Anastasia te zijn kon worden aangetoond dat dit niet waar was. Ook van de beruchte Duitse kamparts Josef Mengele kon door DNA-analyse worden bewezen dat hij in Brazilië was overleden en begraven was onder de naam Wolfgang Gerhard.

2.2 Elektroforese

Sinds de ontdekking van het DNA zijn er talloze methoden ontwikkeld die gebruikt kunnen worden om DNA te onderzoeken. DNA-elektroforese is één van deze technieken. Inmiddels wordt DNA-elektroforese in laboratoria over de gehele wereld gebruikt. Maar wat is DNA-elektroforese precies?

Gelelektroforese is een techniek waarmee moleculen, zoals DNA, RNA en eiwitten, op grootte kunnen worden gescheiden. Bij elektroforese is er sprake van een gel met uitsparingen (slotjes) waarin de te analyseren moleculen worden geplaatst en een elektrische stroom die door de agarosegel wordt geleid. DNA is van zichzelf negatief geladen en zal zich dus richting de positieve pool bewegen. Agarosegel heeft een sponsachtige structuur, bestaande uit strengen agarose polymeer. Kleine DNA moleculen kunnen makkelijker en dus sneller door dit net van agarose strengen bewegen dan grote DNA moleculen.



Schematische weergaven van een gelelektroforese opstelling

Kleine DNA moleculen migreren dus sneller door de gel dan grotere DNA moleculen. Na verloop van tijd is dit verschil in migratiesnelheden als een bandenpatroon op de gel zichtbaar. Kleine DNA moleculen zijn relatief ver gemigreerd vanaf het slotje (startpunt) terwijl de grote DNA moleculen nog relatief dicht bij het startpunt zitten.

DNA is zonder behandeling echter niet zichtbaar. Om deze reden wordt er een kleurstof toegevoegd aan de gel. Deze kleurstof bindt aan het DNA, waardoor het DNA specifiek zichtbaar wordt.

3 Proefopzet en tips

- Met deze kit kunnen in totaal 2 groepen van maximaal 16 leerlingen onafhankelijk van elkaar werken. Elke leerling kan zelf een monster op gel zetten en dan gezamenlijk het resultaat uitwerken.
- De monsters kunnen geladen worden op één grote agarosegel met ruimte voor minimaal 32 monsters.
- De leerlingen kunnen het pipetteren oefenen met water. Op die manier krijgen ze enige vaardigheid in het pipetteren van kleine volumes met een pipet. Dit zal de slagingskans van het experiment vergroten. In de handleiding, behorende bij de pipet, zal het juiste gebruik van de micropipet uitgelegd worden. Op YouTube zijn goede informatieve video's te vinden, waarin wordt uitgelegd hoe te pipetteren. Gebruik hierbij bijvoorbeeld de zoekterm "micropipette". De QR-code hiernaast is gekoppeld aan een video, waarin het gebruik goed en duidelijk wordt uitgelegd.
- De gebruikte chemicaliën zijn, voor zover bekend, niet toxisch. Het gebruik van beschermende middelen zoals een labjas en handschoenen is aan te raden. De kleurstoffen zijn moeilijk te verwijderen (kleding, huid, etc.).
- Let op dat het oppervlak, waarop de elektroforesetray staat waterpas is.



4 Voorbereiding en practicum

De verschillende onderdelen zijn verdeeld in een stuk voorbereiding, welke uitgevoerd kan worden door de docent en/of TOA. Leerlingen kunnen dit onderdeel eveneens uitvoeren als er voldoende tijd beschikbaar is. Het practicumdeel wordt uitgevoerd door de leerlingen.

4.1 Voorbereiding

Stap 1 tot en met 8 beschrijven alle voorbereidende handelingen die uitgevoerd dienen te worden voor het experiment daadwerkelijk start. De voorbereiding van het experiment neemt in totaal ongeveer een half uur in beslag. Het klassikale deel kan binnen een lesuur (ongeveer 50 minuten) worden voltooid.

1. Maak 2 L elektroforese buffer (1x) door de geconcentreerde 100 ml buffer (20x) over te brengen naar een erlenmeyer, maatcilinder of bekersglas en deze aan te vullen tot 2 L met water. De buffer kan eventueel verdeeld worden over kleinere volumes, zolang het eindresultaat een 20x verdunning is van de meegeleverde elektroforese buffer.



2. Maak een 1% agarose gel door 3 g agarose op te koken in 150 ml elektroforese (1x) buffer op een verwarmingsplaat met magnetische roerder (of in een magnetron: géén dop op de fles en de magnetron op halve kracht). Meng en verhit de geloplossing totdat alle deeltjes goed zijn opgelost. De geloplossing moet na het koken volledig helder zijn. Voeg hierna de 150 ml **niet** opgewarmde elektroforese buffer (1x) (kamertemperatuur) toe en meng. De temperatuur zal dan ca. 55°C zijn. De gel kan in een waterbad of stoof van 55 °C worden bewaard.



3. Voeg vervolgens 300 µl gel dye (1000x) toe aan de geloplossing en mix door de fles te zwenken, totdat er een homogene verdeling van de kleurstof ontstaat.

Let op: De concentratie van de kleurstof is heel belangrijk. Bij een te hoge concentratie zal het DNA niet goed gescheiden worden (smeur) en bij een te lage concentratie zullen de bandjes niet goed zichtbaar worden.



4. Plaats de kammen in de houders zoals beschreven in de handleiding van de elektroforese opstelling en giet voorzichtig de warme geloplossing in de elektroforesetray met daarin de geplaatste kammen. Laat de gel gedurende ongeveer 20 minuten stollen.



5. Nadat de geloplossing gestold is, kan de tray met de agarosegel geplaatst worden in de elektroforesetank volgens het protocol van de elektroforese opstelling. Zorg ervoor dat de kam aan de zijde van de negatieve pool (zwart) in de elektroforese opstelling is geplaatst. Plaats het geheel op een witte ondergrond, zodat de scheiding van de bandjes goed te zien is.



6. Vul de elektroforesetank met de resterende elektroforese (1x) buffer, totdat er een dun laagje elektroforese buffer boven de gels staat. De gels kunnen eventueel enkele uren bewaard worden in de elektroforesetank, voordat het experiment uitgevoerd wordt.

7. Verwijder de kammen voorzichtig uit de agarosegel door deze rechtstandig omhoog te trekken.



8. Verdeel de leerlingen in 2 groepen en geef iedere groep een zakje met DNA profielen (buisjes met gedroogd DNA) en loading dye. Het DNA bevat oranje kleurstof, zodat het te zien is in het buisje.

4.2 Uitvoering van de proef

1. Pipetteer 20 μ l loading dye uit het meegeleverde buisje en voeg dit toe aan het buisje met gedroogd DNA (oranje). Zet het buisje vervolgens in heet water (kokend) en laat het geheel minimaal 5 minuten staan om het DNA de tijd te geven om op te lossen.



2. Zuig het opgeloste DNA voorzichtig een aantal keer op en neer in de pipetpunt om het DNA te mengen. De kleurstof zal samen met het DNA oplossen en de vloeistof oranje kleuren. Dit is een indicatie dat het DNA goed is opgelost.



3. Zuig de gehele vloeistof met het opgeloste DNA op in de pipetpunt en breng deze over in een leeg slotje van de gel. Herhaal deze handeling totdat alle monsters geladen zijn. Noteer de volgorde van de monsters op de gel.

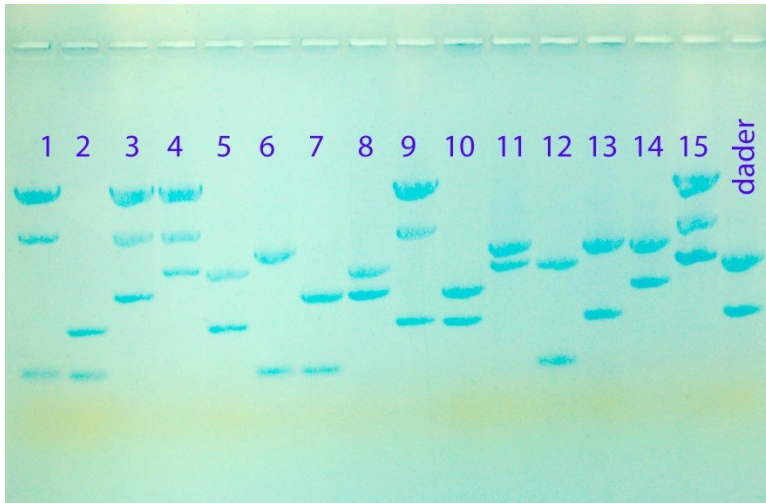


4. Stel de voeding in op 70 mA (of op 100 Volt) en volg de scheiding van de DNA fragmenten met het blote oog bij daglicht. Zie handleiding van de elektroforese opstelling voor de juiste instellingen. Na ongeveer 20 à 30 minuten zal het DNA voldoende gescheiden zijn om duidelijke profielen te kunnen onderscheiden.

5. Als de profielen ver genoeg gescheiden zijn kan er een foto genomen worden van de gel. Het contrast van de DNA profielen kan verhoogd worden door de gel uit de elektroforese opstelling te halen en op een witte ondergrond te plaatsen. Vergelijk de verkregen DNA profielen met het daderprofiel.

5 Het resultaat

Als alles goed is gegaan, zullen er bandjes ontstaan op de gel, zoals hieronder weergegeven. Door de bandenprofielen van de verdachten te vergelijken met het profiel van de dader kan bepaald worden wie van de verdachten de dader is. In dit voorbeeld is dat dader 5.



Figuur 1: Het resultaat na scheiding van de DNA profielen. 1 t/m 15 zijn profielen van verdachten, dader is het profiel van het DNA gevonden op het plaats delict. De volgorde van de monsters zijn hier anders weergegeven dan in de kit.