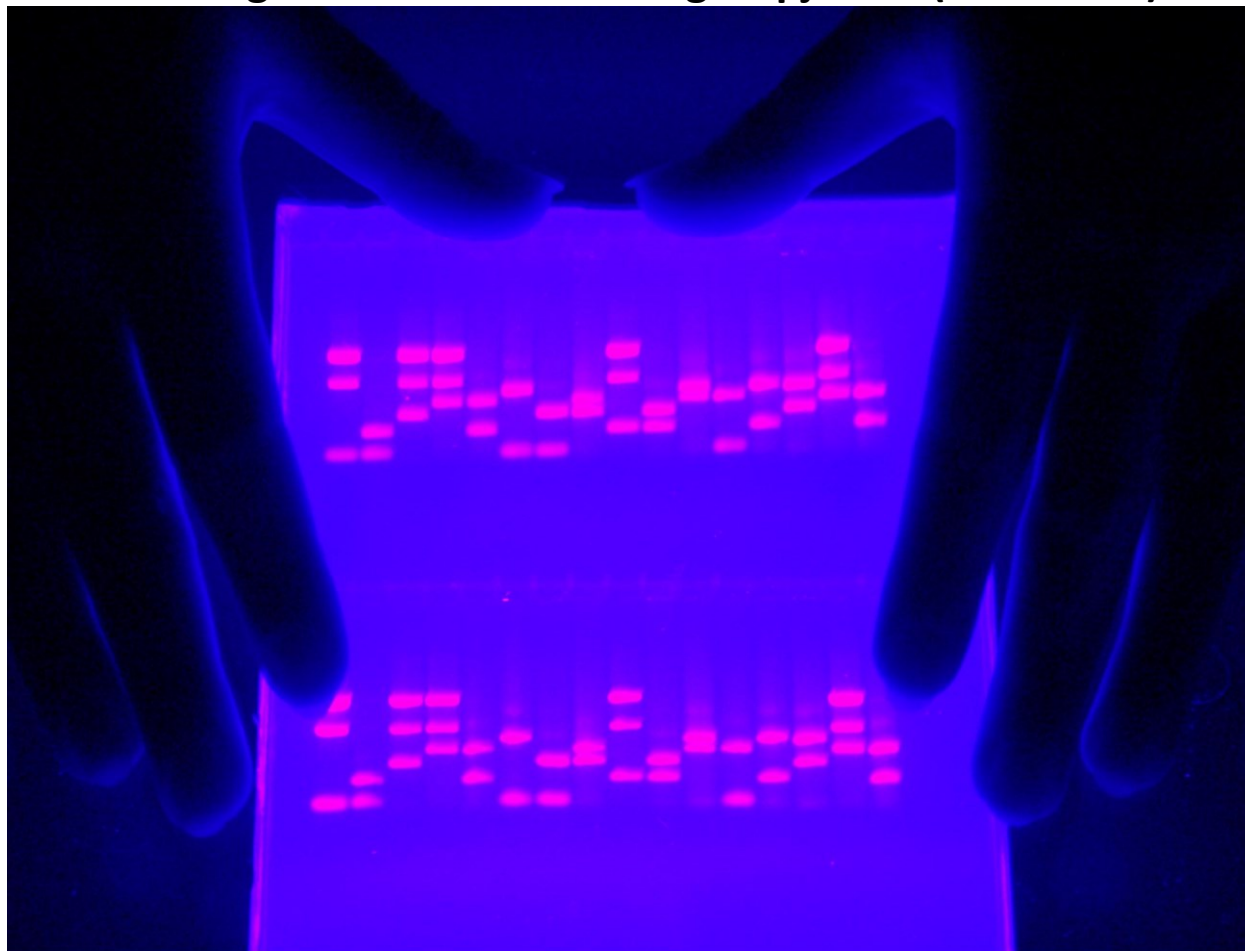


Handleiding

Realtime gelelektroforese DNA groepjes kit (VOS-038A)



VOS instrumenten

Sylphium
molecular biology

#VOS-038A
versie 3.0

Inhoudsopgave

1.	Beschrijving experiment	3
1.1	Inhoud 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	Experimenteel deel	9
5	Het resultaat	10

1. Beschrijving experiment

Deze 6 x 5 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 plaats vinden. 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 6 groepen van maximaal 5 leerlingen en elke groep krijgt 5 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 6 groepen van 5 leerlingen uit te kunnen voeren.

1.1 Inhoud kit

- 6 x 5 DNA profielen
- 6 x dader profiel
- 6 x 200µl loading dye (kleurloze vloeistof)
- 4 g agarose
- 400µl gel dye (1000x)
- 100ml elektroforese buffer (20 x)

1.2 Benodigheden

- Elektroforeseopstelling(en) inclusief voeding(en) voor minimaal 36 (6*6) monsters (20µl)
- Analytische balans of weegschaal
- Magnetron of kookplaat
- Pipetten instelbaar op 20µl (voor leerlingen) en instelbaar op 300µl (voor docent)
- Pipetpuntjes
- Lab glaswerk (bekerglas, maatcilinder, erlenmeyer, etc.)
- Demiwater of anders gewoon kraanwater
- Eventueel waterbad of stoof 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 één enkele 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.

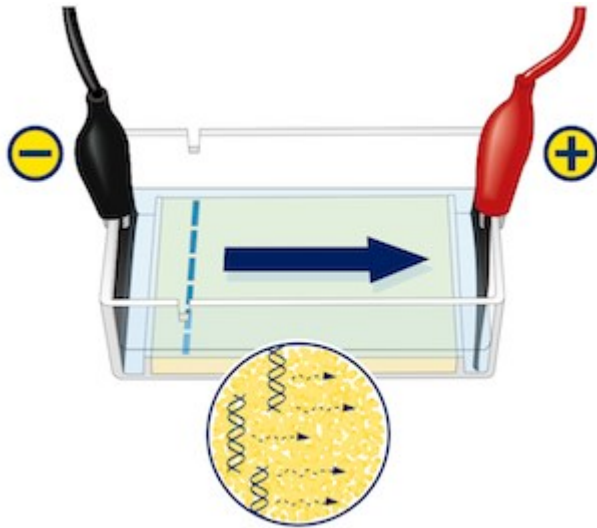
Een andere toepassing van DNA fingerprinting is het aantonen van familiale banden. Tot voor kort on-identificeerbare lichamen of delen daarvan kunnen met DNA fingerprinting worden geïdentificeerd door de DNA patronen te vergelijken met die van nog levende familieleden. Een voorbeeld hiervan is de identificatie 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 zes groepen leerlingen onafhankelijk van elkaar werken.
- De monsters kunnen zowel geladen worden op zes kleine agarose gels (één gel per groep) of alle groepen op één grote agarose gel. De voorkeur gaat echter uit naar 6 kleine gels.
- 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.
- Na afloop van het experiment moet het materiaal gereinigd worden met ethanol om de blauwe kleurstof te verwijderen. Gebruik geen ander oplosmiddel dan ethanol. Perspex, waarvan de elektroforeseopstelling is opgebouwd, kan kapot gaan bij gebruik van andere oplosmiddelen. Het is belangrijk dat het materiaal gereinigd wordt, anders zal de blauwe kleurstof storingen veroorzaken bij volgende experimenten.
- 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 het elektroforese tray 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 2L elektroforese buffer (1x) door de geconcentreerde 100ml elektroforese buffer (20x) over te brengen naar een erlenmeyer, maatcilinder of bekglas en deze met water aan te vullen tot 2L. De elektroforese buffer kan eventueel verdeeld worden over kleinere volumes, zolang het eindresultaat een 20x verdunning is van de meegeleverde elektroforesebuffer.



2. Maak een 1% agarose gel door 4g agarose op te koken in 200 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 200 ml **niet** opgewarmde elektroforese buffer (1x) toe en meng. De temperatuur zal dan circa 55°C zijn. De geloplossing kan in waterbad of stoof van 55 °C bewaard worden.



3. Voeg vervolgens 400µl gel dye (blauw) 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 (smeer) en bij een te lage concentratie zullen de bandjes niet goed zichtbaar worden.



4. Plaats de kam(men) in de houder(s) zoals beschreven in de handleiding van de elektroforeseopstelling en giet voorzichtig de warme geloplossing in de elektroforese tray(s) met daarin de geplaatste kam(men). Laat de gel(en) gedurende ongeveer 20 minuten stollen.



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



6. Gebruik de resterende 1,6L elektroforese buffer (1x) om de elektroforese tank(s) te vullen, totdat er een dun laagje TAE buffer boven de gels staat. De gels kunnen eventueel enkele uren bewaard worden in de elektroforese tank, voordat het experiment uitgevoerd wordt.

7. Verwijder de kam(men) voorzichtig uit de agarosegel(en) door deze rechtstandig omhoog te trekken.



8. Verdeel de leerlingen in 6 groepen en geef iedere groep een zakje met DNA profielen (gekleurde buisjes met gedroogd DNA) en loading dye. Elk DNA profiel heeft een eigen kleur buisje. Het daderprofiel zit in het kleurloze buisje.

4.2 Experimenteel deel

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. Meng door een aantal keren de vloeistof met de pipet op en neer te zuigen.



2. Zuig het opgeloste DNA voorzichtig een aantal keer op en neer in de pipetpunt om het DNA te homogeniseren. Het mengsel zal oranje kleuren door de kleurstof in het DNA monster. Dit geeft eveneens aan 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 ca. 30 mA / 50V (kleine gel) of ca. 70 mA / 100V (grote gel) en volg de scheiding van de DNA fragmenten met het blote oog bij daglicht. Zie handleiding van de elektroforeseopstelling voor de juiste instellingen. Na ongeveer 25 minuten zal het DNA voldoende gescheiden zijn om duidelijke profielen te kunnen onderscheiden.

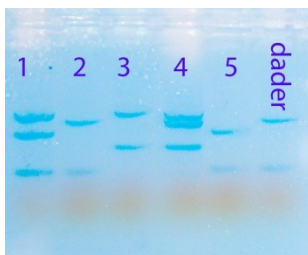
5. Als de profielen ver genoeg gescheiden zijn kan er een foto genomen worden van de gel. Het contrast van de DNA profielen kan verhoogd worden door de gel uit de elektroforeseopstelling te halen en op een witte ondergrond te plaatsen. Vergelijk de verkregen DNA profielen met het daderprofiel.

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 profiel 2 (geel).

Kleurcodering en profielen:

profiel 1	blauw
profiel 2	geel
profiel 3	paars
profiel 4	rood
profiel 5	groen
daderprofiel	kleurloos



Figuur 1: Het resultaat na scheiding van de DNA profielen. 1 t/m 5 zijn profielen van verdachten, dader is het profiel van het DNA gevonden op het plaats delict