



DNA-
elektroforese

INHOUD

1.	Een voorbeeld uit de praktijk	3
1.1.	Ontmasker de misdadiger	
1.2.	PCR-techniek	4
2.	Materiaal	5
2.1.	Labomateriaal	
2.2.	Plastic-labomateriaal	
2.3.	Chemicaliën & DNA-stalen	
3.	Gebruik materiaal	6
3.1.	Gebruik Finnpijette (micropipet)	
3.2.	Gebruik Mupid-21	7
4.	Werkwijze proef	8
5.	Principe	10
5.1.	DNA knippen	
5.2.	DNA-elektroforese	
6.	Resultaat	12
7.	Veiligheidsmaatregelen	12
8.	Bron 'Voorbeeld uit de praktijk'	12

DNA-elektroforese*

Met deze proef kan je DNA-fragmenten zichtbaar maken, een techniek die onderzoekers dagelijks gebruiken om DNA-stalen met elkaar te vergelijken.

1. Een voorbeeld uit de praktijk

Om het DNA met DNA-elektroforese te visualiseren is er relatief veel DNA nodig. In de praktijk is er (bv. op de plaats van een misdaad) niet altijd voldoende DNA beschikbaar. Met de PCR-techniek (zie verder) kan je de vereiste hoeveelheid genereren uit een kleine hoeveelheid DNA. Na vermeerdering levert een haarwortel, bloed- of spermavlek voldoende biologisch materiaal op. Soms vind je op de plaats van de misdaad of op het slachtoffer immers nog weefselresten van de dader. Dit kan sperma zijn, maar kunnen ook huidresten zijn afkomstig van onder de nagels van het slachtoffer dat zich tegen zijn belager heeft verweerd. Als je het DNA-beeld van het aangetroffen weefsel vergelijkt met het biologisch materiaal van de verdachtes, kom je te weten wie de dader is.

1.1. Ontmasker de misdadiger



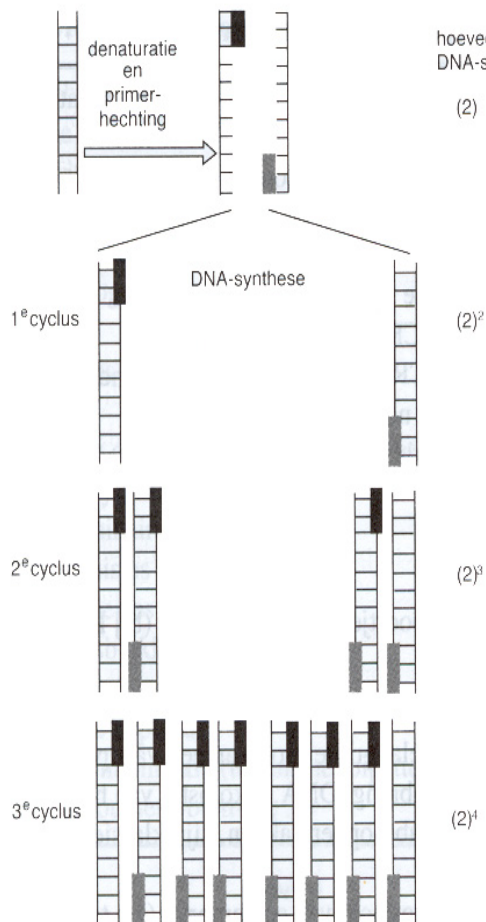
DNA-patronen (na PCR en DNA-elektroforese) van het biologische materiaal (gevonden op de plaats van misdaad) van de dader (referentiestaal) en van de 2 verdachten.

Vraag: Welke verdachte is de dader?

Antwoord: Verdachte 1

Deze kit bevat alle DNA-stalen om dit experiment na te bootsen!

1.2. PCR-techniek



De PCR-techniek (Polymerase Chain Reaction) laat toe om in enkele uren tijd stukjes DNA (DNA-fragmenten) exponentieel te vermeerderen. Het uitvoeringsprincipe is eenvoudig en imiteert ten dele de natuurlijke DNA-duplicatie of -replicatie.

Bij PCR wordt een dubbelstrengige DNA-helix verwarmd tot 94 °C, dit zorgt ervoor dat de streng openbreekt tot 2 (complementaire) enkelstrengige DNA-moleculen. Voor elke streng wordt een nieuwe complementaire streng aangemaakt met behulp van primers (korte DNA-fragmenten als startpunt van de DNA-synthese), een DNA-polymerase en de juiste bouwstenen.

De primers zoeken op de opengebroken DNA-strengen hun complementaire deel. Het DNA-polymerase-enzym zal - vanaf de primers - het complementaire deel van de twee strengen opbouwen met behulp van de toegevoegde bouwstenen.

Er zijn nu twee dubbele DNA-strengen ontstaan uit één streng. Deze twee strengen geven na een volgende cyclus vier strengen en na nog een cyclus acht strengen,... Op deze manier wordt een specifieke DNA-regio, die afgebakend wordt door de twee primers, gesynthetiseerd en gerepliceerd.

2. Materiaal

Ingesloten vind je het nodige materiaal om de proef uit te voeren uitgezonderd enkele bekertjes, een plastic container (petrischaal), gedestilleerde ethanol (70 %), water (indien mogelijk best gedistilleerd water gebruiken), een weegschaal en een microgolfoven.

2.1. Labomateriaal

- **Twee DNA-elektroforesetoestellen**
de Mupid is een compact elektroforesetoestel dat dagelijks in vele biotechlabo's wordt gebruikt.
- **Vier micropipetten** (Finnpipette of andere):
met een Finnpipette kan je volumes tussen 5 en 50 µl opnemen.

2.2. Plastic labomateriaal

- **Tipjes:** deze 'plastic tipjes' (polypropyleen) of 'puntjes' moet je op de pipet plaatsen. De op te nemen vloeistof komt terecht in de tipjes. Voor elke nieuwe handeling neem je een nieuw tipje, zodat contaminatie (ongewenste vermenging van vloeistoffen) van de stalen in de pipet niet mogelijk is.
- **Eppendorfbuisjes** of **epjes:** deze plasticbuisjes kunnen 1,5 ml vloeistof bevatten en kan je luchtdicht afsluiten. Ze worden standaard gebruikt in alle biotechlabo's.

2.3. Chemicaliën & DNA-stalen

- **Referentie-DNA** of DNA-Smartladder (REF - 1 x 75 µl)
- **Twee DNA-stalen** in 2 epjes:
 1. DNA-staal verdachte 1 (V1 - 1x 75 µl) = bevat eigenlijk referentie-DNA
 2. DNA-staal verdachte 2 (V2 - pVIB-LES EcoRI - 1 x 50 µl)
Circulair stukje DNA (plasmide), geknipt met restrictie-enzym EcoRI

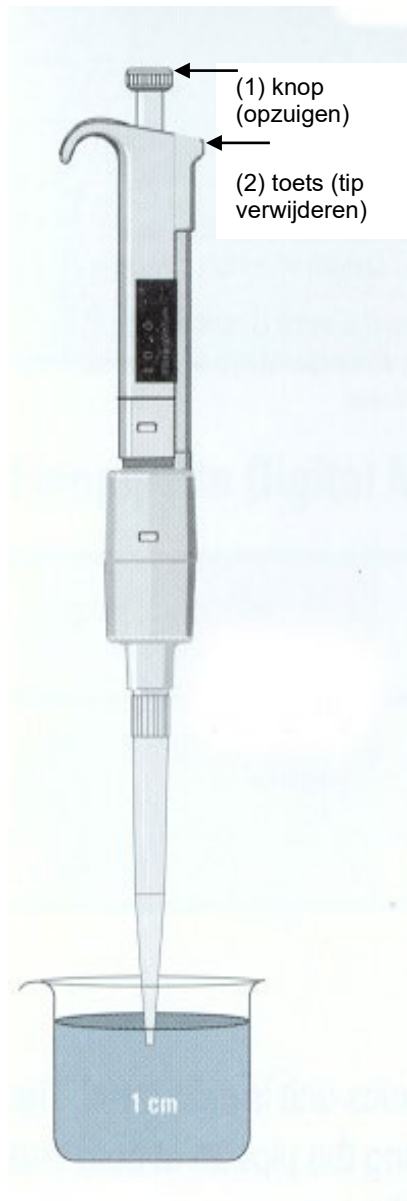
OPGELET! De DNA-stalen worden het best bewaard in de ijskast

- (5x) Geconcentreerde **DNA-ladingsbuffer** in 1 epje (5xLB - 200 µl)
- **DNA-kleuringsbuffer** (kleurstof Azure A in 1 flesje van ± 125 ml)
- (10x) geconcentreerde **TAE-buffervloeistof** in 1 flesjes (van ± 125 ml)
TAE-buffer (=Tris-Acetaat-EDTA-buffer):
De TAE-buffer zorgt voor de stroomgeleiding. Het basische karakter van de buffer zorgt ervoor dat de fosfaatgroepen van het DNA negatief geladen zijn, waardoor het DNA naar de positieve elektrode (anode) migreert.
- **Agarose**
Agarose is een zeer dure grondstof en wordt gewonnen uit zeewier. De hoeveelheid nodig voor deze proef moet je zelf afwegen.

3. Gebruik materiaal

3.1. Gebruik Finnpiquette (micropipette)

OPGELET! Deze pipetten zijn heel nauwkeurig; het is immers belangrijk dat steeds dezelfde hoeveelheden vloeistof worden opgenomen. De accuraatheid van de pipet kan alleen gegarandeerd worden als ze met omzichtigheid worden behandeld.



1. Stel het op te nemen volume in door aan de oranje (of blauwe) knop te draaien.

OPGELET! Zorg steeds dat je binnen de aangeduide hoeveelheden blijft! Draai de pipet dus nooit onder 5 μl of boven 50 μl , zoniet blokkeert de pipet en wordt ze onbruikbaar!

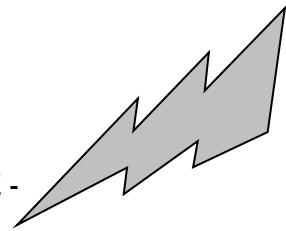
2. Neem de pipet in de palm van je hand, zorg ervoor dat de ronde haak over je wijsvinger hangt en je met je duim makkelijk op de oranje knop kan duwen.
3. Plaats een tipje op het fijne uiteinde van de pipet.
4. Druk voorzichtig de bovenste (1) knop in, tot je een eerste weerstand voelt: op dit moment is, de juiste hoeveelheid lucht, overeenkomstig met het ingestelde volume, uit de pipet gedrukt.
5. Houd de knop ingedrukt (niet harder duwen!) en plaats de pipet in de op te zuigen vloeistof.

OPGELET! Bij het opzuigen, moet alleen de punt van het tipje in de vloeistof worden gedoopt!

6. Laat de knop voorzichtig naar boven komen: de vloeistof wordt in de tip opgezogen. Neem de pipet uit de vloeistof.
7. Laat de vloeistof er uitlopen door de knop volledig in te drukken (voorbij de eerste weerstand). Hierdoor wordt er een extra hoeveelheid lucht door de pipet gestuurd waardoor zeker al de opgezogen vloeistof uit de pipet wordt geduwd.

8. Verwijder het gebruikte tipje door met je duim de toets (2) naar beneden te duwen. Het tipje wordt nu van de pipet geduwd.

TIP: In plaats van onmiddellijk met het DNA-materiaal aan de slag te gaan. Probeer met de pipet bij wijze van test, eerst enkele waterstaaltjes op te nemen. Zo word je snel handig genoeg om het experiment precies uit te voeren.

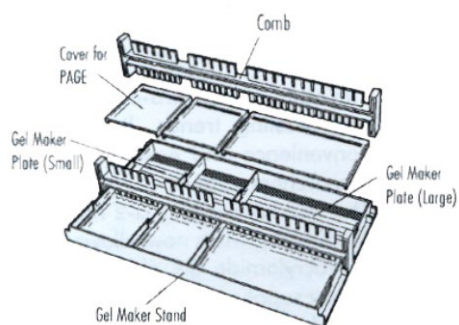


3.2. Gebruik Mupid-21

- DANGER: HIGH VOLTAGE -

Het is zeer belangrijk om bij het gebruik van een Mupid-elektroforesetoestel alle geldende veiligheidsvoorwaarden te respecteren. In de elektroforesetoestellen zit een veiligheidssysteem dat voorkomt dat de gebruiker blootgesteld wordt aan een elektrische schok. Het gebruik van het toestel moet steeds gebeuren onder begeleiding van een leerkracht of persoon die ervaring heeft met het Mupidsysteem.

- Schakel steeds de stroombron uit en verwijder stroombron en transformator alvorens het deksel op te lichten. Door een veiligheidsslot kan je het deksel niet oplichten voor de stroombron is verwijderd.
- Raak nooit het toestel aan met natte handen.
- Open nooit de transformator of de stroombron. Voer zelf geen reparaties uit.
- Houd de transformator en de stroombron verwijderd van vloeistoffen.



De bijgevoegde set laat toe om tegelijkertijd gels van verschillende grootte aan te maken (4 kleine en 2 grote). Plaats de gelplaatjes (gel maker plates) en de kam (comb) in de gelhouder (gel maker stand) zoals op de tekening.

Plaats de kam ter hoogte van de zwarte band van het gelplaatje; dit maakt later het laden van het staal gemakkelijker doordat de gaatjes dan duidelijker zichtbaar zijn.

Plaats de kam met de breedste tanden in de gelhouder, dit maakt het uitvoeren van de proef een stuk eenvoudiger. De 'cover for PAGE' (aangeduid op de tekening) is niet nodig voor het DNA-experiment.

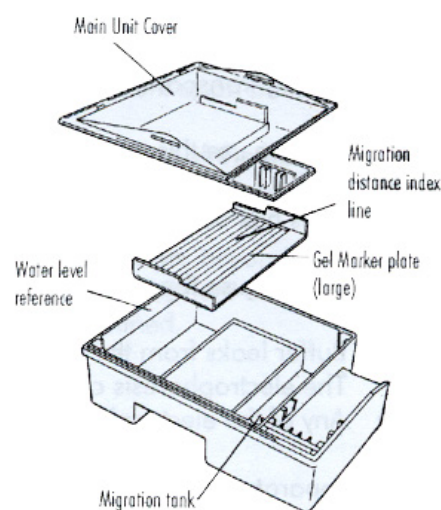
Plaats, na aanmaak van de gel en het verwijderen van de kam (zie werkwijze), de gelplaat met gel in de tank. Overgiet de gel met buffer en sluit de tank met het deksel, zoals aangeduid op de tekening.

OPGELET! Stel de stroom correct in! DNA is negatief geladen en migreert naar de positieve pool. (zie punt 4.12.)

Mogelijke problemen:

De zekering begeeft het:

- de concentratie van de TAE-buffer is te hoog, verdun zoals beschreven.



4. Werkwijze proef

TIP: *Stap 4.1. tot 4.5. beschrijft alle voorbereidende stappen die moeten worden genomen voor de proef kan worden uitgevoerd. De voorbereiding van de proef neemt in totaal ongeveer een half uur in beslag. Indien het voorbereidende werk is gebeurd, kan de verdere uitwerking van de proef binnen het lesuur (ongeveer 50 minuten) worden voltooid.*

- 4.1. Maak 200 ml (1x) TAE-buffervloeistof aan door het concentraat aan te lengen met water.

OPGELET! *De aangeleverde TAE-buffer is (10x) geconcentreerd; neem dus 20 ml van het concentraat en vul dit aan met water tot 200 ml.*

Meng daarna in een bekersglas de 200 ml (1x) TAE-buffervloeistof met 2 g agarose (zelf af te wegen).

- 4.2. Maak nog 400 ml (1x) TAE-buffervloeistof aan om later te gebruiken.

OPGELET! *De aangeleverde buffer is (10x) geconcentreerd; neem dus 40 ml van het concentraat en vul dit aan met water tot 400 ml.*

- 4.3. Breng het mengsel (zie stap 4.1.) aan de kook op een verwarmingsplaat met magnetische roerder (of in een microgolfoven: géén stop op de fles en de microgolfoven op halve kracht!). Meng het mengsel regelmatig en zorg ervoor dat alle klontertjes goed zijn opgelost. De geloplossing moet na het koken volledig helder zijn.
- 4.4. Koel het agarosemengsel tot 55 à 60°C (je kan het in een oven of warmwaterbad op deze temperatuur verschillende dagen bewaren). Na verdere afkoeling stolt het agarosemengsel volledig. Je kan het ook laten stollen en (alvorens opnieuw te gebruiken) terug opkoken in de microgolfoven.
- 4.5. Plaats de kam in de houder zoals beschreven in 'Gebruik Mupid-21', met de breedste tanden naar beneden, en giet voorzichtig een beetje van de nog warme (maar niet hete!) agarosevloeistof in een van de plaatjes, zodat de tanden van de kam voor de helft in de agarosevloeistof hangen. Laat de gel gedurende ongeveer 20 minuten opstijven.

OPGELET! *Indien de proef niet onmiddellijk kan worden uitgevoerd na het opstijven van de gel, breng de gel dan eerst over in de buffertank. (zie stap 4.8. tot 4.10.) Op deze manier kan de gel gedurende enkele uren op kamertemperatuur worden bewaard.*

- 4.6. Maak de stalen klaar voor gebruik;
- Pipetteer 15 μl van het referentie-DNA (REF) over in een nieuw epje (deze staal bevat reeds ladingsbuffer en is klaar voor gebruik)
 - Pipetteer 15 μl van staal verdachte 1 (V1) over in een nieuw epje (deze staal bevat ook al ladingsbuffer en is klaar voor gebruik)
 - Pipetter 24 μl van het staal verdachte 2 (V2) in een nieuw epje en maak het staal gebruiksklaar (zie stap 4.7. en stap 4.8.)

TIP: *De leerlingen kunnen het pipetteren en het laden van de gel (zie stap 4.11.) oefenen met een mengsel van water en ladingsbuffer. (bv. 12 μl water + 5 μl ladingsbuffer) Op die manier krijgen ze het pipetteren goed onder de knie en verhogen de slaagkansen van de proef drastisch!
Per proef is het voldoende dat 1 persoon de DNA-stalen laadt om het effect met de hele klas te kunnen bekijken.*

- 4.7. Voeg aan het epje met de 24 μl staal van verdachte 2 (V2), 6 μl ladingsbuffer (blauwe kleuringsvloeistof) toe en meng goed: dit kan door het mengsel verschillende malen na elkaar op te zuigen in de pipet.

TER INFO: *Door deze buffer (ladingsbuffer) te mengen met het DNA, kan het elektroforeseproces makkelijk worden gevolgd. De buffer bevat twee kleurstoffen die geen invloed hebben op het DNA. De kleurstoffen worden ook gescheiden door de elektroforese. De buffer bevat Ficoll - een stof zwaarder dan water - waardoor het staal makkelijk in het gelgaatje kan worden gebracht: het zinkt onmiddellijk naar de bodem van het gaatje.*

- 4.8. Giet een beetje (1x) TAE-buffer (zie stap 4.2.) op de gel zodra deze gestold is en verwijder de kam voorzichtig, zodat de buffer in de gaatjes (putjes, slotjes) loopt.
- 4.9. Neem het gelplaatje met de gestolde gel uit de houder en plaats het in de elektroforesetank.
- 4.10. Vul de tank met (1x) TAE-buffer (zie stap 4.2.) ongeveer 225 ml (5 mm bovenop de gel). De agarosegel moet volledig ondergedompeld zijn in buffer.
- 4.11. Breng van zowel het referentie-DNA (REF) als van beide stalen (DNA-V1, zie stap 4.6., DNA-V2, zie stap 4.7.) telkens 15 μl in een gelgaatje (1 staal per gaatje).

OPGELET! *Het laden van de stalen moet zeer voorzichtig gebeuren. Zorg ervoor dat je niet prikt in de bodem van de gelgaatjes; de gel is immers uiterst kwetsbaar.
Breng elk staal (telkens 15 μl) aan in een ander gaatje. Je noteert best schematisch wie wélk staal, wáár heeft geladen in de gel.*

- 4.12. Sluit de stroom aan (ON/OFF knop aanzetten) en stel 50 V in. (Opgepast: DNA migreert van negatief naar positief). Dit doe je door op de knop SET te drukken, dan op de knop VOLTAGE waarbij het lichtje verspringt van 35V naar 50V. Om dit te 'vast' te zetten, druk je op SET.

Na 10 minuten mag je overgaan naar 100 V. Terug op SET drukken, VOLTAGE indrukken zodat het lichtje verspringt naar 100V, en dan terug op SET drukken. Het experiment zou sneller verlopen indien het toestel vanaf de start op 100 V wordt ingesteld, maar de DNA-fragmenten zouden zich in dit geval minder mooi scheiden.

- 4.13. Schakel het toestel uit zodra de eerste kleurmerker halverwege de gel is (na ongeveer 20 minuten) en verwijder stroombron en transformator.
- 4.14. Neem de gel in zijn houder uit de tank (de TAE-buffer kan je recycleren en verschillende malen gebruiken).

OPGELET! *Verwijder eerst de stroombron, anders is er gevaar voor een elektrische schok.*

- 4.15. Plaats de gel in een plastic container (bv. een petrischaaltje) en giet kleurvloeistof (DNA-kleuringsbuffer) over de gel zodat de gel volledig bedekt is. Wacht 6 minuten.
- 4.16. Giet de overtollige kleurvloeistof af en recycleer ze voor de volgende gel.
- 4.17. Was de gekleurde gel even met 10 à 20 ml gedenatureerde ethanol (70 %).
- 4.18. Spoel de gel drie- tot viermaal met koud leidingwater en laat de gel daarna 10 minuten (voor een optimaal resultaat laat je de gel enkele uren in het waterbad liggen) onder water staan. Dankzij dit waterbad zal de blauwe kleur langzaam uit de gel wegtrekken: de gel verbleekt terwijl alleen de DNA-fragmenten blauw-paars gekleurd achterblijven.
Het DNA wordt zichtbaar na een tiental minuten en de kleuring wordt daarna steeds sterker. Giet het water af als het DNA goed zichtbaar is.

TIP: *De gekleurde gel kan in een plasticzakje in de koelkast worden bewaard. Het resultaat van de proef zal echter na enkele dagen minder zichtbaar worden.*

- 4.19. Reinig de elektroforesetank en gelhouders (goed spoelen met water) en berg alles op. Tipjes en eppendorpjes mag je weggooien. Buffers kan je steeds recycleren, maar scheid steeds de nieuwe stocks van de oude.

5. Principe

5.1. DNA knippen

De DNA-keten in één cel is veel te lang om in één stuk te worden onderzocht (in een menselijke cel zit meer dan 2 m DNA!). Met behulp van restrictie-enzymen wordt het DNA in bruikbare stukjes geknipt. Deze enzymen knippen het DNA volgens een bepaald patroon. Bijvoorbeeld: telkens als de zes basen GAATTC achter elkaar voorkomen, kan het knipeiwit EcoRI het DNA knippen. Het pVIB-LES DNA-staal (V2) is reeds geknipt met dit restrictie-enzym.

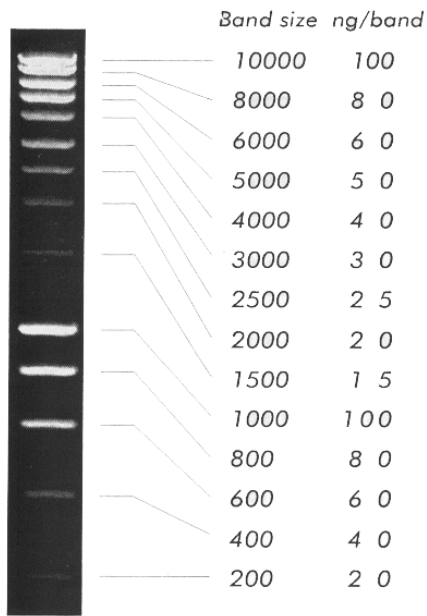
5.2. DNA- elektroforese

DNA-elektroforese laat toe om verschillende DNA-fragmenten zichtbaar te maken. De test zorgt ervoor dat de stukjes DNA van verschillende lengte die aanwezig zijn in één staal, uit elkaar worden getrokken. DNA is negatief geladen door de aanwezigheid van fosfaatgroepen in de DNA-keten. Er wordt een constante stroom gestuurd doorheen de gel. Aan beide kanten van de gel bevinden zich de elektroden (verbonden met de stroombron), die hiervoor verantwoordelijk zijn. De buffervloeistof zorgt voor een goede geleiding van de stroom door de gel.

Zodra de stroom wordt ingeschakeld, verplaatsen de DNA-fragmenten zich naar de positieve elektrode. Kleine stukjes verplaatsen zich snel doorheen de gel (doordat ze klein zijn, worden ze bijna niet tegengehouden door de gel). Grote stukken DNA blijven makkelijker hangen en zijn dus veel trager. Op deze manier worden de verschillende stukjes DNA gescheiden. DNA fragmenten met dezelfde grootte blijven bij elkaar. Door verschillende stalen DNA naast elkaar op de gel te vergelijken (zijn de aanwezige fragmentjes in de stalen gelijk of niet?), kan je nagaan of de knipeiwitten het DNA in de stalen op dezelfde plaats knippen. Is het resultaat verschillend, dan hebben we twee verschillende DNA-patronen. Is het resultaat gelijk, dan zie je geen verschil in de patronen.

6. Resultaat

De bijgeleverde DNA-stalen zijn enerzijds de referentie (REF) en anderzijds het te testen DNA (V1 en V2). Het referentie-DNA (REF) vertoont een reeks van banden met welgekende grootte (zie figuur 1). Het te testen DNA (V2) vertoont een ander patroon (zie figuur 2). Je kan de grootte van de banden van het te testen DNA (V2) bepalen, door ze op de gel te vergelijken met het referentie-DNA (REF).



Figuur 1: Referentie-DNA (REF – V1)

Figuur 2: Te testen DNA (V2)

Figuur 2: Toont het resultaat van de DNA-elektroforese van het staal V2. Het DNA, een circulair stuk DNA of plasmide, was vooraf geknipt met het restrictie-enzym EcoRI. Na DNA- elektroforese zijn er 3 banden zichtbaar. Het enzym knipt het DNA immers op 3 plaatsen.

7. Veiligheidsmaatregelen

De gebruikte materialen vereisen geen specifieke veiligheidsmaatregelen. Je moet wel zeer nauwkeurig en netjes werken, om het experiment te doen slagen. We moeten immers vermijden dat jouw DNA in het experiment terecht komt! Indien beschikbaar, draag je best een labo jas en handschoenen. Deze beschermen ook je kleding en handen tegen mogelijke vlekken van de DNA-kleurstof. Deze stof is ontvlambaar: houd ze uit de buurt van open vuur!

8. Bron 'Een voorbeeld uit de praktijk'

Harry Robberecht

PCR - Exponentiële vermeerdering van erfelijk materiaal, *Kluwer Editorial*, 1999

Meer info via vib.be