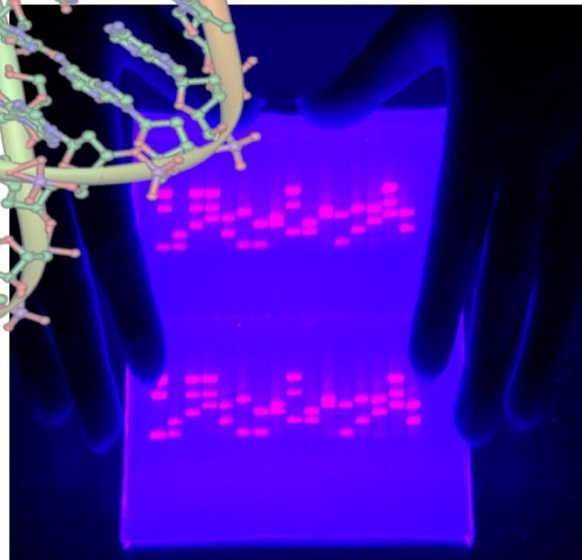
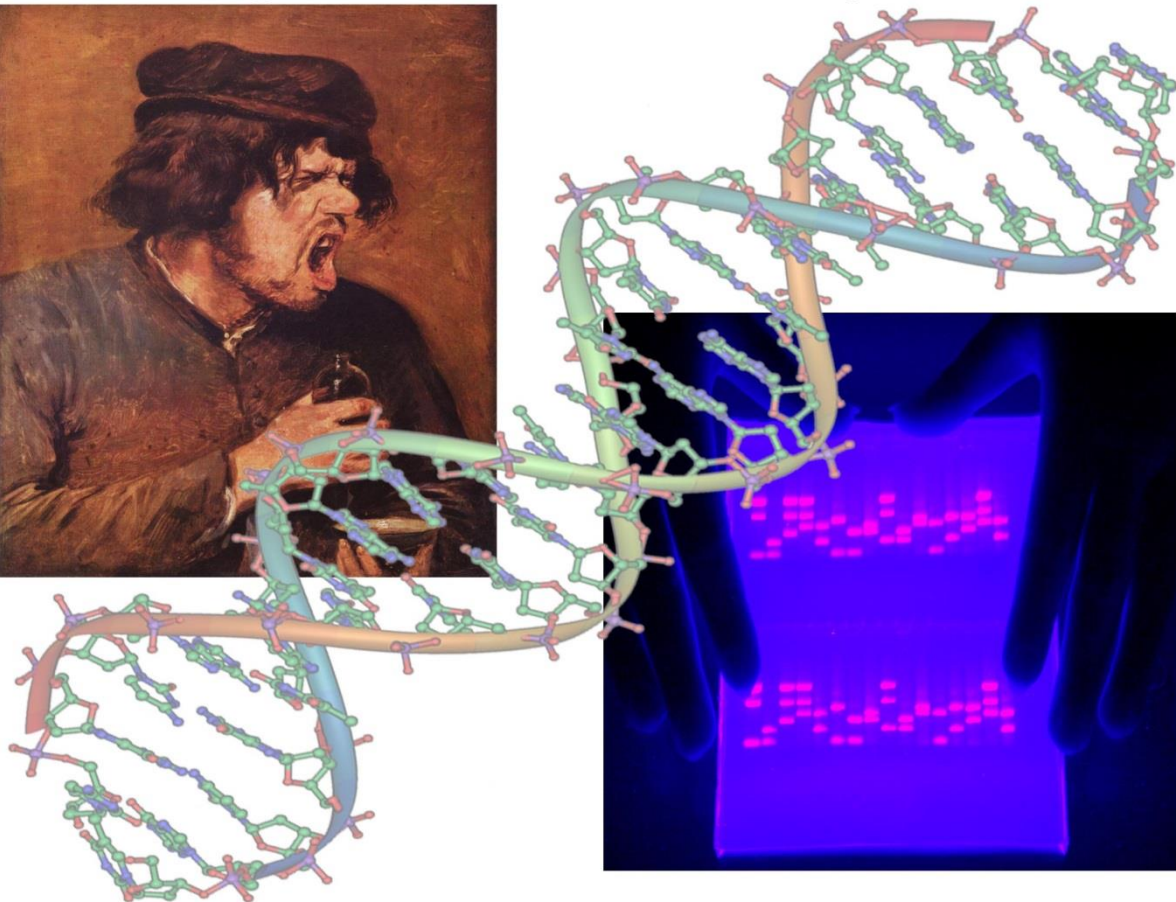
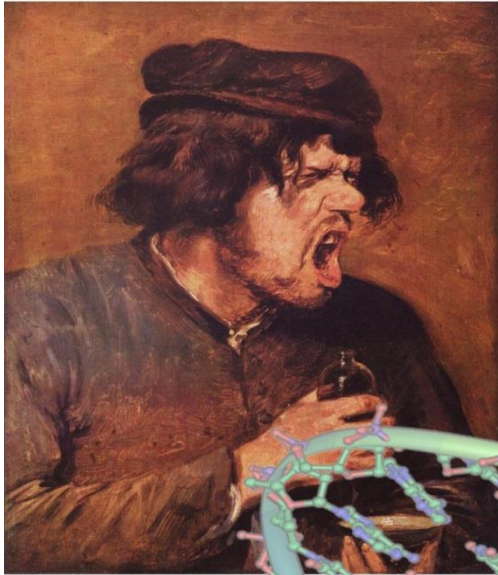


Docentenhandleiding

PCR kit

De genetica achter bitter proeven



VOS instrumenten

Sylphium
molecular biology

Inhoudsopgave

1.	Beschrijving experiment:	3
1.1	Samenstelling kit:	3
1.2	Benodigheden:	3
2.	Achtergrond	5
2.1	Fenylthiocarbamide	5
2.2	Het gen TAS2R38.....	5
2.3	PCR	6
2.4	Electroforese.....	8
3	Proefopzet en tips.....	9
4.1	Vorbereiding eerste les uur:	10
4.2	Uitvoering van de proef: eerste les uur.	12
4.3	Vorbereidingen tweede lesuur:	14
4.4	Uitvoering van de proef: tweede les uur.	16
5	Het resultaat	17

1. Beschrijving experiment:

De chemisch stof fenylthiocarbamide wordt door sommige mensen als extreem bitter ervaren terwijl andere mensen de stof vrijwel niet proeven. Het vermogen om fenylthiocarbamide te kunnen proeven is een dominante genetische eigenschap gelegen op het gen TAS2R38.

Met de PCR kit “De genetica achter bitter proeven” wordt het al dan niet hebben van deze genetische eigenschap op gel zichtbaar gemaakt. Daarnaast laten de resultaten op gel ook zien of je heterozygoot of homozygoot voor deze eigenschap bent. Op eenvoudige wijze nemen leerlingen een “DNA swap” van hun eigen mondslijmvlies waarna het DNA opgezuiverd wordt en toegevoegd aan een kant-en-klaar PCR reactiemengsel. Gelelektroforese van de PCR producten laat voor iedere leerling afzonderlijk zien wat hun genetische achtergrond is met betrekking tot deze eigenschap. De uitkomst kan met een smaakproef worden bevestigd, met de in de kit meegeleverde fenylthiocarbamide test strips. Iedere leerling kan nu voorspellen of de strip voor hem of haar bitter zal smaken of niet.

1.1 Samenstelling kit:

- 2 x gevriesdroogde Taq DNA polymerase (voor 36 reacties)*
- Gevriesdroogd proteïnase K*
- 30 µl positieve controle (voor zowel proever en niet-proever allel reacties)
- 2 ml oranje PCR buffer proever mix
- 2 ml oranje PCR buffer niet-proever mix
- 8 ml lysis buffer
- 3 g agarose
- 400 µl blauwe gel dye (1000x)
- 100 ml elektroforese buffer (20x)
- 36 x 0.2 µl PCR buisjes (kleurloos)
- 36 x 0.2 µl PCR buisjes (gekleurd)
- 32 x 1.5 ml reactievaatjes
- 32 x Roerstaafjes
- 32 x proefstripjes met phenylthiocarbamide (PTC)

*** *Gevriesdroogde componenten voor langere opslag bij voorkeur in vriezer bewaren***

1.2 Benodigheden:

- Elektroforeseopstelling inclusief voeding voor minimaal 70 monsters van 20 µl
- Magnetron of kookplaat en eventueel hitteblok (thermoblock)
- Analytische balans of weegschaal
- Pipetten instelbaar op 5 en 20 µl (voor leerlingen) en instelbaar tussen 100 en 1000 µl (voor docenten)
- Pipet puntjes
- Lab glaswerk (bekerglas, maatcilinder, erlenmeyer, etc)

- Demiwater of anders gewoon kraanwater
- Waterbad, oven of hitteblok op 55 °C
- Waterbad of hitteblok op 99 °C (kokend water in bekeerglas mag ook)
- PCR apparaat
- Watervaste stift om op plastic buisjes te schrijven
- Reactievathouders

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 veel meer informatie gevonden worden over de verschillende onderwerpen.

2.1 Fenylothiocarbamide

Fenylothiocarbamide, meestal afgekort tot PTC (vanuit het Engelse phenylthiocarbamide), is een organische verbinding die ofwel als zeer bitter smakend ofwel als smaakloos wordt ervaren. Deze smaakervaring is genetisch bepaald. De mogelijkheid om PTC te proeven wordt bepaald door een dominante genetische eigenschap. De test waarbij vastgesteld wordt of iemand in staat is PTC te proeven, is bij mensen een van de meest uitgevoerde genetische testen.

Ongeveer 70% van alle mensen is in staat PTC te proeven, maar de verschillen tussen bevolkingsgroepen zijn groot. Bij inheemse bewoners van Nieuw-Guinea en Australische Aborigines is dit slechts 58%. Voor de oorspronkelijke bewoners van de Amerika's geldt dat tot 98% van hen PTC proeft. Aangetoond is dat niet-rokers en diegenen die niet van koffie of thee houden een hoger dan gemiddelde kans hebben PTC te kunnen proeven. PTC komt niet in voedsel voor, maar verwante verbindingen wel. Voedselkeuze is gerelateerd aan de mogelijkheid PTC te proeven.

Het verschijnsel dat de proefbaarheid van PTC een genetische basis had, werd in 1931 letterlijk per ongeluk ontdekt toen een chemicus bij DuPont, Arthur Fox, een wolk fijn poederig PTC uit een opstelling liet ontsnappen. Een ook in de ruimte werkende collega klaagde over de bittere smaak, terwijl Fox, die veel dichterbij de opstelling stond en dus een veel grotere hoeveelheid binnen gekregen moest hebben, zelf niets proefde. Fox ging vervolgens de smaakgevoelens van PTC testen op vrienden en bekenden en legde daarmee de basis voor toekomstige genetische onderzoeken. De genetische correlatie was zo duidelijk, dat het wel of niet kunnen proeven van PTC als vaderschapstest werd gebruikt.

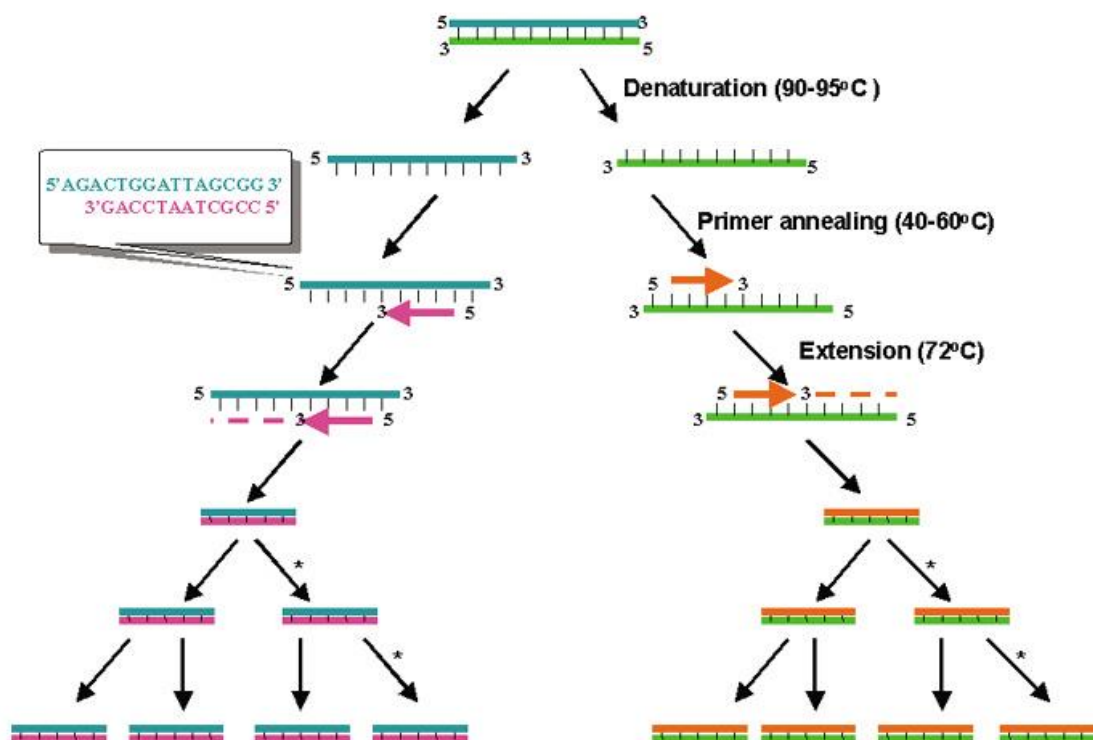
2.2 Het gen TAS2R38

Het vermogen om fenylothiocarbamide te kunnen proeven is een dominante genetische eigenschap gelegen op het gen TAS2R38. De twee meest voorkomende vormen (allelen) van dit gen zijn PAV (proever) en AVI (niet-proever). AVI verschilt op 3 verschillende punten in het gen van PAV. Een persoon met één of twee kopieën van PAV zal PTC kunnen proeven. In 85% van de gevallen zorgen combinaties van beide allelen voor het fenotype, proeven of niet proeven van PTC. In 15% van de gevallen wordt dit veroorzaakt door een andere zeldzamere allelen van dit gen. De kit is niet in staat om deze varianten aan te tonen.

2.3 PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction), is een methode om van DNA miljarden kopieën te maken. Hierbij kan van een zeer kleine hoeveelheid DNA (b.v. één DNA molecuul), specifiek een gedeelte van het DNA molecuul worden gekopieerd (geamplificeerd). Deze miljarden kopieën DNA zijn genoeg om met bijvoorbeeld agarose gelelectroforese of andere DNA detectiemethoden zichtbaar te kunnen maken.

Het kopiëren van DNA middels PCR vindt plaats door gebruik te maken van een thermostabiel DNA polymerase, meestal Taq DNA polymerase. Dit enzym is in staat om zeer snel een enkelstrengs DNA molecuul dubbelstrengs te maken.



Schematische weergave van DNA vermenigvuldiging door PCR

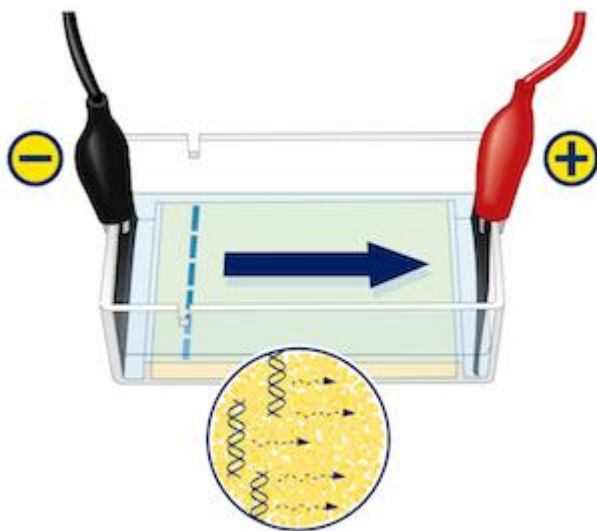
De monsters in het PCR apparaat doorlopen een temperatuurprogramma, waarbij de temperatuur volgens een vast patroon verandert. In de bovenstaande figuur is het PCR proces en het temperatuurprogramma schematisch weergegeven. In de eerste stap van het programma worden de monsters verwarmd tot 90 á 95°C. Bij deze temperatuur valt het dubbelstrengs DNA uit één in 2 enkelstrengs DNA moleculen. In de tweede stap wordt de temperatuur verlaagd naar 40 á 60°C. Bij deze temperatuur kunnen de primers

op een specifieke plaats binden aan de enkelstrengs DNA moleculen. Primers zijn korte stukjes enkelstrengs synthetisch DNA, welke coderen voor klein deel van het te kopiëren stuk DNA en als startpunt dienen voor het Taq DNA polymerase enzym. Tijdens de derde stap worden de monsters verhit tot 72°C. Bij deze temperatuur werkt het Taq DNA polymerase optimaal en zal het DNA verdubbelen. Na deze stap gaat het programma terug naar stap 1 en zal de temperatuur cyclus opnieuw verlopen. Na 50 cycli zijn er op deze manier miljarden DNA kopieën gemaakt die op gel zichtbaar kunnen worden gemaakt

2.4 Electroforese

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

Gelektroforese 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 (slotje) waarin de te analyseren moleculen worden gedaan 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 gelelectroforese opstelling.

Kleine DNA moleculen migreren dus sneller door de gel dan groter 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 32 leerlingen onafhankelijk van elkaar werken. Elke leerling kan zijn eigen DNA isoleren en via PCR, gevolgd door gelelectroforese, uitzoeken of hij/zij de genetische aanleg heeft om de bittere smaakstof te kunnen proeven. Eveneens krijgt de leerling een antwoord of dit voor hem / haar een heterozygote of homozygote eigenschap is.
- De kit bestaat uit twee onafhankelijke PCR analyses voor detectie proever allel en niet-proever allel
- De duur van deze proef zal twee lessen van 45 minuten bestrijken. Dit kunnen geen blokken zijn, omdat het PCR apparaat minimaal 2 uur nodig heeft om de amplificatie van de PCR producten te voltooien. PCR producten kunnen voor langere tijd bewaard worden in de koelkast (≥ 1 maand)
- Het PCR product kan door de leerling zelf op gel worden gezet. De migratie van het PCR product tijdens de gelelectroforese kan door de unieke blauwe kleurstof realtime worden gevolgd.
- De monsters kunnen geladen worden op één grote agarosegel met ruimte voor minimaal 70 monsters.
- In deze handleiding wordt er vanuit gegaan dat het volume van de geltray 300 μ l is. Pas eventueel de hoeveelheid buffer en agarose aan als de gebruikte geltray hiervan afwijkt.
- 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 pipeteren. Gebruik hierbij bijvoorbeeld de zoekterm "micropipette". De QR-code hiernaast is gekoppeld aan een video, waarin het gebruik goed en duidelijk wordt uitgelegd.
- Het spoelen van de mond met leidingwater, voor het nemen van een wangslimvlies monster, heeft altijd een positief effect op de PCR.
- De bij deze kit gebruikte chemicaliën zijn, voor zover bekend, niet toxisch. Dit geldt ook voor de lage hoeveelheid phenylthiocarbamide in de proefstripjes, welke ruim 10.000x onder de LD50 waarde zit. Het gebruik van beschermende middelen zoals een labjas en latex handschoenen is aan te raden. De kleurstoffen zijn moeilijk te verwijderen (kleding, huid, etc.).
- Let op dat het oppervlak, waarop het elektroforesetray staat waterpas is.
- Proteïnase K is thermolabiel. De lysisbuffer met proteïnase K moet dus zo kort mogelijk voor gebruik worden klaar gemaakt.



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 eerste les uur:

Stap 1 tot en met 6 beschrijven alle voorbereidende handelingen die uitgevoerd dienen te worden voor het eerste deel van het experiment daadwerkelijk start. De voorbereiding van het experiment neemt in totaal ongeveer een half uur in beslag. Het klassikale deel (practicum) kan binnen een lesuur (ongeveer 45 minuten) worden voltooid.

1. Vul één van de gevriesdroogde Taq polymerase buisjes aan met 1620 µl PCR buffer **proever** en noteer "proever" op het buisje. Herhaal dit voor het andere buisje met Taq polymerase en vul deze met PCR buffer **niet proever** en noteer "niet proever" op dit buisje. Laat 5 minuten staan bij kamertemperatuur om goed op te lossen. Meng de PCR mixen door de vloeistof (oranje) met een pipetpunt op en neer te pipeteren en plaats de opgeloste PCR mixen in de koelkast of zet op ijs.

2. Verdeel de PCR mixen over de meegeleverde PCR buisjes (45 µl per PCR buisje). Waarbij de proever PCR mix in kleurloos PCR buisje en de Niet-proever PCR mix in de gekleurd PCR buisje wordt gepipetteerd. Na het verdelen worden de PCR buisjes gesloten en gekoeld wegzet (bijvoorbeeld koelkast, of op ijs, maar niet invriezen). Er wordt aanbevolen om de verdeelde PCR mixen niet langer dan 2 uur te bewaren alvorens de experimenten in te zetten. Pas na het isoleren van het wanglijmvlies DNA krijgt iedere leerling 1 kleurloos en 1 gekleurd PCR buisje met daarin de PCR mix.

3. Voor de positieve controle, voeg aan één PCR buisje van beide mixen (proever/piet proever), 5 µl controle DNA toe (groen buisje). Markeer de buisjes, zodat deze in het proces herkenbaar blijven als positieve controle. Deze PCR buisjes bevatten nu het template DNA voor de positieve controle en zijn klaar voor gebruik.

4. Voor de negatieve controle, sluit van beide mixen (proever/niet proever) één PCR buisje **zonder** hier ook maar iets aan toe te voegen. Markeer de buisjes, zodat deze in het proces herkenbaar blijven als negatieve controle. Deze buisjes zijn de negatieve controles en zijn klaar voor gebruik.

5. Neem 1 ml lysisbuffer en voeg deze toe aan het gevriesdroogde proteïnase K (doe dit zo kort mogelijk voor aanvang van de proef). Los het enzym hierin op en voeg daarna de opgeloste proteïnase K toe aan de resterende 7 ml lysisbuffer en meng door te zwenken. Voeg aan ieder reactievaatje (1.5 ml cupje) 200 µl van deze lysisbuffer toe. Geef ieder buisje met lysisbuffer een nummer (1 t/m 32), zodat de leerling zijn/haar buisje terug kan vinden tijdens de proef. Geef iedere leerling hiervan 1 buisje.

6. Verdeel eveneens de roerstaafjes over de leerlingen. Voorkom hierbij DNA contaminatie. Dit wil zeggen dat het roerstaafje enkel aangeraakt mag worden door de gene die zijn eigen wangslimvlies afneemt. Indien een ander het roerstaafje aanraakt, op het deel van het roerstaafje dat in contact komt met de lysisbuffer, ontstaat het risico dat DNA van die persoon in de lysisbuffer terecht komt en dit het PCR resultaat beïnvloed.

4.2 Uitvoering van de proef: eerste les uur.

Het eerste deel van de proef bestaat uit het isoleren van het eigen DNA uit wangslimvlies en het inzetten van de PCR. De analyse van de PCR producten middels elektroforese zal plaats vinden tijdens het volgende lesuur.

1. Spoel je mond een aantal keer met leidingwater om storende stoffen in het speeksel te verwijderen. Vooral koffie heeft een sterk verstrend effect op de PCR.

2. Strijk met de dunne zijde (dus het handvat!) van het roerstaafje over de binnenkant van je wang, zodat er celmateriaal op het staafje achterblijft. Breng dit celmateriaal vervolgens over naar het 1.5 ml buisje (met nummer) met lysisbuffer door het deel van het roerstaafje met daarop het celmateriaal in de lysisbuffer te roeren (draaien) totdat alle cellen in de buffer zijn opgenomen. De vloeistof zal licht troebel worden. Schrijf het nummer op en gebruik deze straks om je PCR buisjes mee te markeren (nummeren).

3. Sluit het buisje en incubeer deze 10 minuten bij 55 °C. Tijdens deze stap zullen de cellen openbreken en de eiwitten denatureren. De DNA gebonden eiwitten (histonen) zullen door het proteïnase K worden afgebroken. De vloeistof zal helder worden.

4. Plaats het buisje 5 minuten bij 99 °C in een hitteblok of in kokend water om het proteïnase K enzym te inactiveren. Laat het DNA isolaat vervolgens afkoelen op tafel. Het DNA isolaat is nu geschikt voor PCR.

5. Schrijf het nummer van het 1.5 ml buisje met het DNA isolaat over op het blanke en het gekleurde PCR buisje. Hieraan kun je straks je eigen buisjes herkennen. Voeg 5 µl van je DNA isolaat toe aan zowel het blanke PCR buisje(proever allel detectie) als het gekleurde PCR buisje (niet-proever allel detectie).

6. Plaats de PCR buisjes terug in de koelkast, of zet ze op ijs, totdat deze in het PCR apparaat worden geplaatst.

7. Het PCR programma ziet er als volgt uit:

5 min	@	94 °C	}	50 cycli
30 s	@	94 °C		
30 s	@	59 °C		
45 s	@	72 °C		
5 min.	@	72 °C		
∞	@	4 °C		

8. Als iedereen zijn/haar DNA heeft toegevoegd aan de PCR mixen, worden deze tegelijk in het PCR apparaat gezet en het apparaat wordt daarna gestart. **Let op: vergeet de controles niet!**

Het PCR programma duurt (afhankelijk van het type apparaat) ongeveer 2 uur. De PCR producten kunnen voor langere tijd bewaard worden in een koelkast of vriezer.

4.3 Voorbereidingen tweede lesuur:

Stap 1 tot en met 8 beschrijven alle voorbereidende handelingen die uitgevoerd dienen te worden voor het experiment door de leerlingen kan worden uitgevoerd. Deze voorbereidingen nemen in totaal ongeveer een half uur in beslag. Het klassikale deel kan binnen een lesuur (ongeveer 45 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 eerst op te koken in 150 ml elektroforese (1x) buffer in een magnetron: géén dop op de fles en de magnetron op halve kracht (of op een verwarmingsplaat met magnetische roerder). 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 van de geloplossing zal dan ca. 55°C zijn.



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 (smeer) en bij een te lage concentratie zullen de bandjes niet zichtbaar worden.



4. Plaats de kammen in de houders zoals beschreven in de handleiding van de elektroforeseopstelling en giet voorzichtig de warme geloplossing in de elektroforese tray met daarin de geplaatste kammen. Laat de gel in ca. 20 minuten stollen.



5. Nadat de geloplossing gestold is, kan de tray met de agarosegel in de elektroforesetank worden geplaatst. 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. Vul de elektroforesetank met de resterende elektroforese (1x) buffer, totdat er een dun laagje elektroforese buffer boven de gelen staat. De gelen kunnen eventueel twee uur bewaard worden in de elektroforesetank, voordat het experiment uitgevoerd wordt.

7. Verwijder de kammen voorzichtig uit de agarosegel door deze rechtstandig omhoog te trekken. De gel is nu gereed om de monsters te laden. Het is aan te raden om de gel binnen twee uur te gebruiken i.v.m. de diffusie van de kleurstof uit de gel.



8. Geef iedere leerling tijdens het runnen van de gel een stripje met PTC. De smaaktest kan dan tussendoor uitgevoerd worden en de resultaten (wel / geen proever) klassikaal worden genoteerd.

4.4 Uitvoering van de proef: tweede les uur.

1. Pipetteer 20 μ l of meer van het PCR product (proever allel) in een leeg slotje van de gel. Het is heel erg belangrijk dat alles in het slotje terecht komt. Herhaal deze handeling voor het tweede (niet proever allel) monster. Noteer de volgorde van de monsters op de gel, zodat je, je eigen monsters terug kunt vinden op de gel.



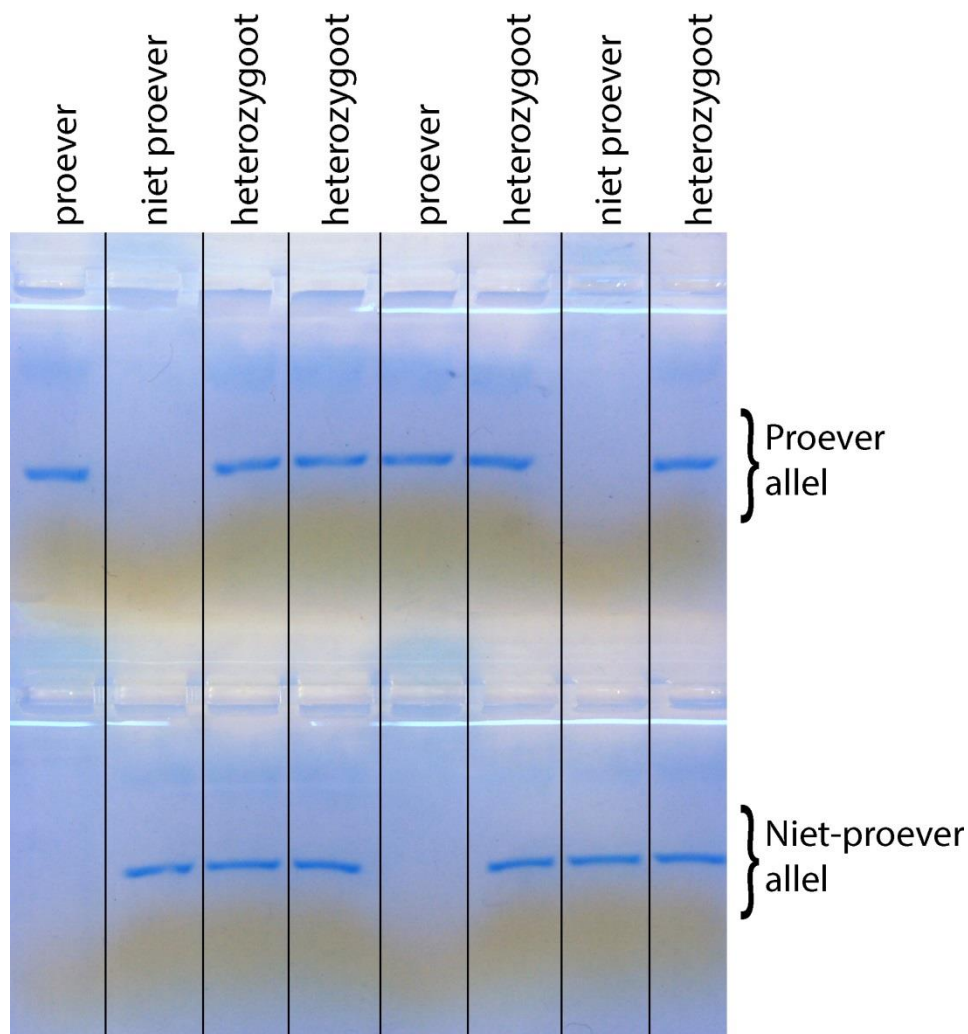
2. Stel de voeding in op 70 mA (of op 100 Volt, zie handleiding van de elektroforeseopstelling voor de juiste instellingen) en volg de scheiding van de DNA fragmenten met het blote oog bij daglicht. Na enkele minuten worden de eerste DNA banden al goed zichtbaar en na ongeveer 20 minuten zal het DNA voldoende gelopen zijn om alle banden duidelijke te kunnen onderscheiden.

3. Als de banden vergenoeg gescheiden zijn kan er een foto genomen worden van de gel. Het contrast van de DNA banden kan verhoogt worden door de gel uit de elektroforeseopstelling te halen en op een witte ondergrond te plaatsen. Het PCR product uit het kleurloze buisje geeft aan of de persoon minimaal 1 copy heeft van het proever allel. Het PCR product uit het gekleurde buisje geeft dit aan voor het niet-proever allel. De foto hieronder geeft een indruk hoe het resultaat eruit zal zien.

4. Met het meegeleverde proefstripje kan de smaaktest uitgevoerd worden. Neem hiervoor het stripje in de mond en maak deze nat met speeksel. Zuig voorzichtig op het stripje en proef of je de bittere smaak kunt proeven. Vergelijk deze met de behaalde PCR resultaten.

5 Het resultaat

Als alles goed is gegaan, zullen er bandjes ontstaan op de gel, zoals hieronder weergegeven. Door nu per leerling te scoren kan bepaald worden wie PTC kan proeven en wie niet en of de leerling homozygoot dan wel heterozygoot is voor de proever eigenschap. Interessant is om te kijken of er leerlingen zijn die tot de 15% behoren die een andere zeldzame variant van het gen hebben, die niet met deze kit is aan te tonen. Deze leerlingen zullen dan een afwijkend fenotype hebben, dan op basis van deze genetische test naar voren komt.



Het te verwachten resultaat, wat behaald wordt met deze kit.