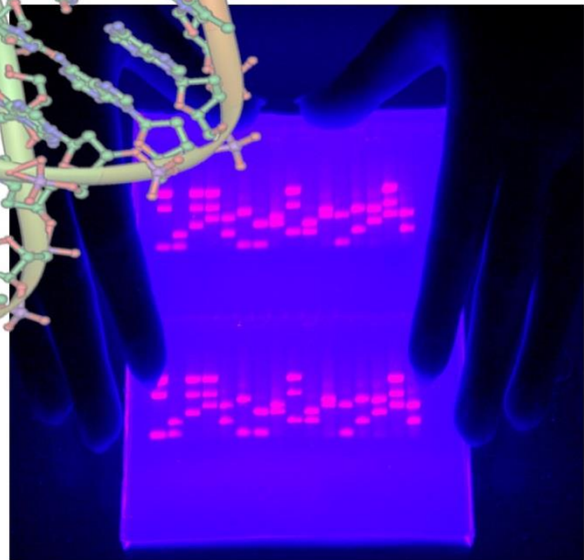
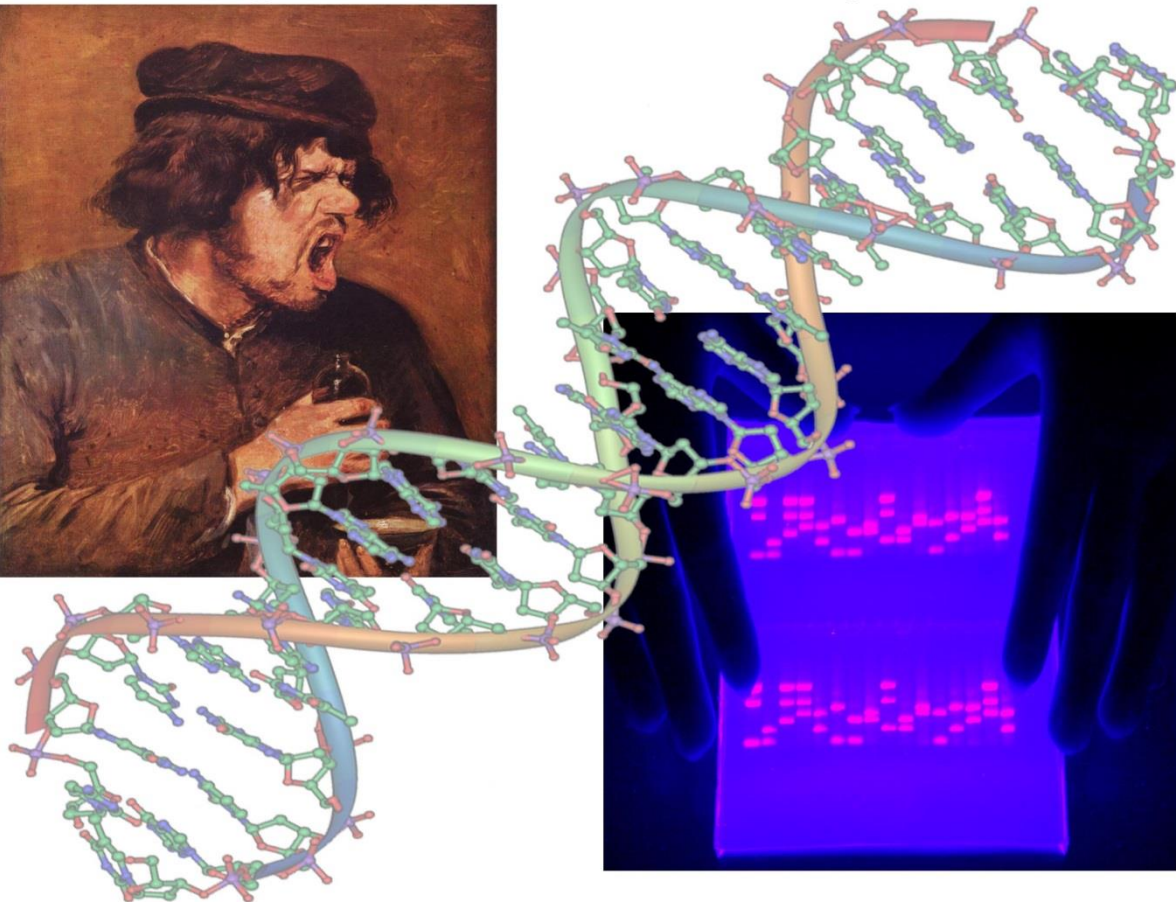
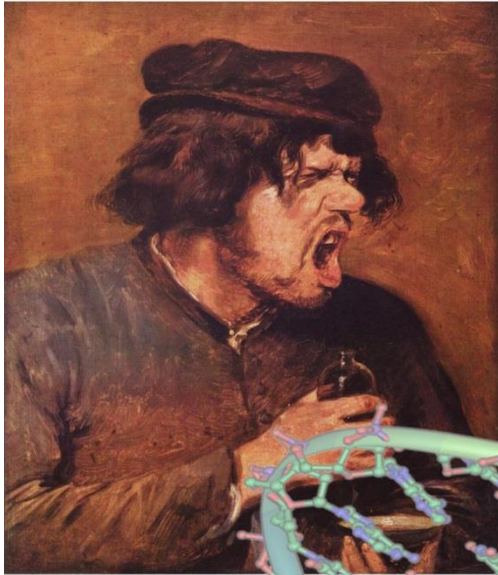


Leerlingenhandleiding

PCR kit

De genetica achter bitter proeven



VOS instrumenten

Sylphium
molecular biology

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 plaatsvinden tijdens het volgende les uur.

Uitvoering van de proef: eerste les uur.

1. Spoel je mond een aantal keer met leidingwater om storende stoffen in het speeksel te verwijderen.

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 openen breken 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 analyse.

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:

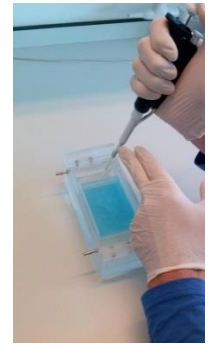
5 min	@	94 °C	} 50 cycli
30 s	@	94 °C	
30 s	@	59 °C	
30 s	@	72 °C	
5 min.	@	72 °C	
∞	@	4 °C	

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.

Uitvoering van de proef: tweede les uur.

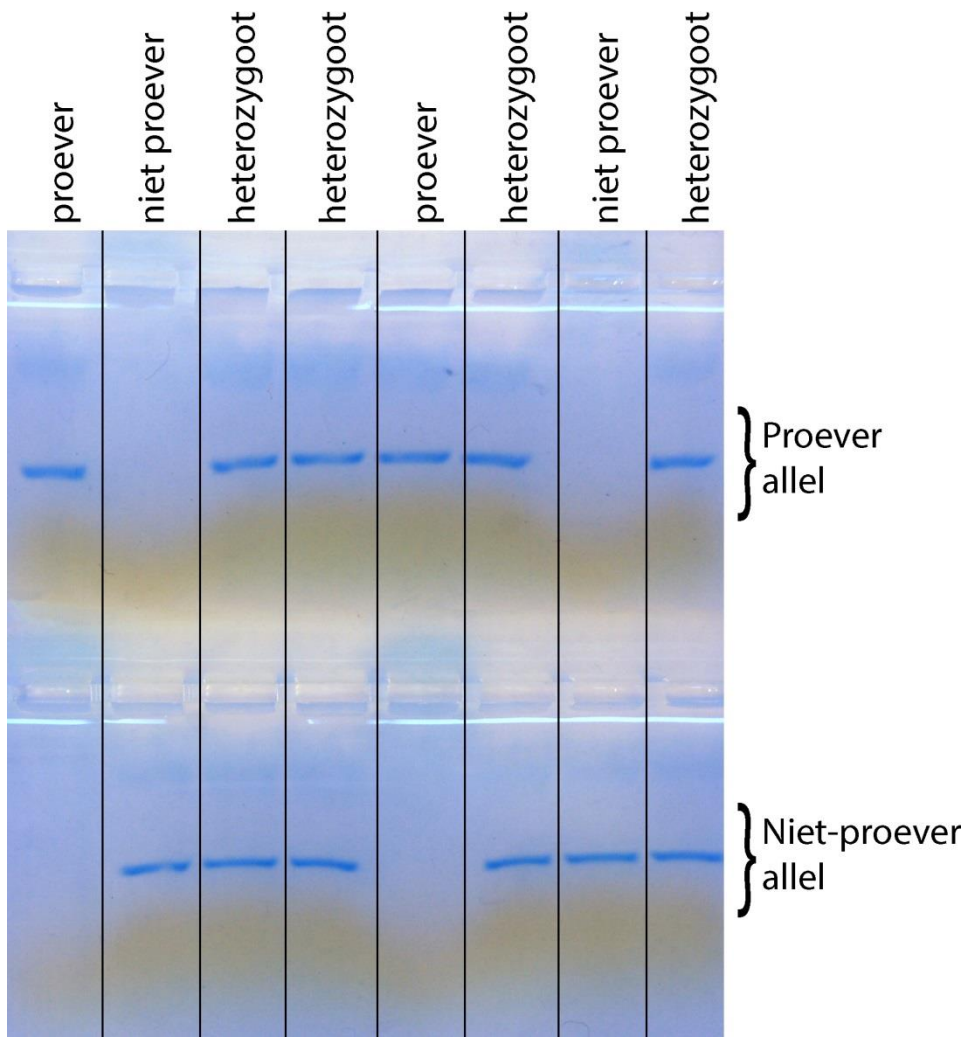
1. Pipetteer 20 μ l van het PCR product (proever allel) in een leeg slotje van de gel. Herhaal deze handeling voor het tweede (niet proever allel) monster. Noteer de volgorde van de monsters op de gel, zodat je, je eigen monsters terug kunt vinden op de gel.



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.



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