

---

# Biotechnology Explorer™

## Genes in a Bottle Kit DNA-Extractiemodule

Catalogus Nummer  
166-2000EDU

DNA necklace module (166-2200EDU)  
wordt afzonderlijk verkocht.

[explorer.bio-rad.com](http://explorer.bio-rad.com)

Zie de losse bestanddelen voor de bewaartemperaturen.

Kopiëren van (delen van) deze handleiding is alleen toegestaan voor gebruik in  
de klas.





## Je eigen DNA gevangen!

Of het nu over klonen, sequencen, vingerafdrukken maken of genetisch modificeren gaat, DNA kom je dagelijks tegen in de media en in de klas. Laat uw leerlingen kennis maken met de moleculaire kant van de biologie. Zij gaan met de *Genes in a Bottle Kit* hun eigen DNA verzamelen en bewaren.

Hoe krijgen wetenschappers het zuivere DNA uit cellen die voornamelijk bestaan uit lipiden, eiwitten, koolhydraten en zouten? De membranen worden eerst opengescheurd met een wasmiddel om het DNA in oplossing te krijgen. Vervolgens worden de eiwitten en andere organische moleculen afgebroken en gescheiden, terwijl het DNA intact blijft. Tenslotte wordt het DNA met behulp van precipitatie verzameld in een vorm die naar wens kan worden bewerkt.

Deze simpele laboratoriumactiviteit geeft leerlingen praktische ervaring met een echte laboratoriumprocedure, die gebruikt wordt om DNA uit verschillende organismen te isoleren voor allerlei toepassingen. Leerlingen isoleren genomisch DNA uit hun eigen wangslimvliescellen en zien het DNA neerslaan als drijvende witte slierten. Met behulp van de DNA-extractiemodule (166-2200EDU) wordt het DNA vervolgens eenvoudig verzameld en in een glazen flesje overgebracht. Dit glazen flesje wordt verwerkt tot een halskettinkje.

De kit is geschikt voor alle klassen van het voortgezet onderwijs. Er is maar weinig achtergrondkennis nodig. De activiteit kan worden uitgevoerd bij alle lessen die iets te maken hebben met DNA, cellen, celstructuur, mitose en meiose, genetica en DNA technologie.

Wanneer leerlingen voor het eerst in aanraking komen met de moleculaire kant van de biologie, blijkt DNA een erg abstract onderwerp. Met deze kit wordt het onzichtbare zichtbaar gemaakt - je eigen DNA zien, maakt het tastbaar. Afbeeldingen van DNA en de extra activiteiten zijn een hulpmiddel om de functie van het DNA te verduidelijken. Zo hopen wij leerlingen begrip bij te brengen van de onzichtbare essentie van het leven.

De activiteit kan in alle soorten klaslokalen uitgevoerd worden. Er zijn geen speciale apparaten of kleuringen nodig. De kit kan in de Tweede Fase (maar ook voor hogescholen en universiteiten) bijvoorbeeld gebruikt worden als introductie bij de lessen over DNA-structuur en -functie, celstructuur en enzymfunctie. Voor de onderbouw is het een mooie introductie op de spannende wereld van het DNA onderzoek.

Heel veel plezier!

Nebbie Idris, PhD  
Biotechnology Explorer  
Product Manager



# Inhoudsopgave

## Docenten- en TOA-handleiding

<b>Benodigde materialen</b> .....	1
<b>Algemene informatie voor de docent</b> .....	2
Waarom lesgeven over DNA-isolatie? .....	2
Doelgroep.....	2
Waar in het curriculum? .....	3
Vereiste achtergrondkennis .....	3
Hoe lang duurt het? .....	3
Veiligheid.....	3
Belangrijke tip.....	3
<b>Achtergrondinformatie</b>	
Basisuitleg.....	4
Gevorderdenuitleg.....	6
<b>Antwoorden op vragen</b>	
Basisuitleg .....	8
Gevorderdenuitleg....	9
<b>Vorbereiding voor TOA en docent</b>	
Hoe lang duurt het?.....	11
Praktische voorbereiding voor les 2.....	11
DNA-isolatie en precipitatie: proefopstelling checklist .....	13
Kort protocol voor DNA-isolatie.....	14
<b>Uitbreidingsactiviteiten</b>	
Demonstratiepracticum voor onderbouw .....	17
Cellen bekijken met de microscoop en kernen kleuren .....	17

## Leerlingenhandleidingen

<b>Basis</b> .....	18
Inleiding.....	19
Protocol.....	22
<b>Uitgebreid</b> .....	27
Inleiding.....	28
Protocol.....	33



## Docenten- en TOA-handleiding

DNA Extraction Module: benodigde materialen

De materialen in de kit zijn voldoende voor 36 leerlingen.

<b>Kit inhoud</b>	<b>Hoeveelheid in kit</b>
Lysis buffer	40 ml
Protease	1,3 ml
5 M natrium chloride (salt)	5 ml
Steriel water	2,5 ml
5 ml rondbodem reageerbuisjes	50
Doorzichtige microreageerbuisjes	60
Verschillende kleuren microreageerbuisjes	60
Doorzichtige schroefdopbuisjes	40
Verschillende kleuren schroefdoppen	40
Wegwerp plastic pipetten	50
Schuimrubber microreageerbuishouders	10
Cytology borstels	80
Parafilm	1 strook

<b>Andere benodigde materialen (niet in kit)</b>	<b>Hoeveelheid</b>
91% isopropanol of 95% ethanol (verkrijgbaar bij drogisterijen)	ongeveer 250 ml
Waterbad met thermometer, van 50°C*	1
Watervaste stiften	1–9
Bak met ijs	1
Plastic bekertje als afvalbakjes	9

### **Optioneel: DNA Necklace Module\*\* (niet in kit)**

**166-2200EDU** bevat:

Glazen flesjes	18
Zilver dopjes	18
Plastic stopjes	18
Draad	18
Superlijm	1 flesje

\* Als er geen waterbad met instelbare temperatuur aanwezig is, gebruik dan een of meer geïsoleerde bakken (piepschuim is erg geschikt) waar de schuimrubber reageerbuishouders in passen. Vul deze bakken met water van 50°C.

\*\*Elke DNA Necklace Module bevat genoeg materiaal om 18 kettingen te maken. Voor een klas van 36 leerlingen zijn twee kits nodig. Bij bestelling van artikelnummer 166-2300EDU ontvangt u: 1x 166-2000EDU (DNA Extraction Module) en 2x 166-2200EDU (DNA Necklace Module).

## DNA-isolatie uit wangslimvliescellen

Je eigen DNA gevangen!

### Algemene informatie voor de docent

Met deze kit gaan uw leerlingen DNA isoleren uit hun wangslimvliescellen. Uit onze ervaring blijkt dat dit eenvoudig uit te voeren practicum tot de verbeelding van leerlingen (en anderen) spreekt. In deze handleiding vindt u onder andere algemene informatie over het practicum, praktische informatie voor uitvoering van de proef en de kant-en-klare leerlinghandleidingen. Veel plezier!

Waarom lesgeven over DNA-isolatie?

**1) DNA-isolatie helpt leerlingen de eigenschappen van DNA beter te begrijpen.**

De DNA-moleculen in de celkern zijn onvoorstelbaar lang en dun. Laat uw leerlingen bedenken hoe het mogelijk is dat zulke lange moleculen in microscopisch kleine cellen passen. De dunne witte slierten die de leerlingen zullen zien, zijn vele duizenden DNA-moleculen om elkaar heen gedraaid als gesponnen garen.

**2) DNA-isolatie is de eerste stap in DNA-technologie.**

Het isoleren van DNA is een routinestap in veel biotechnologische procedures. Om te klonen, DNA-sequencen en DNA-fingerprints moet eerst DNA geëxtraheerd en geïsoleerd worden uit cellen. Deze kit laat leerlingen zien hoe eenvoudig DNA geïsoleerd kan worden voor gebruik in baanbrekend onderzoek.

**3) DNA-isolatie geeft leerlingen de mogelijkheid om hun eigen genetische essentie te zien.**

Het is voor leerlingen altijd weer verrassend en spannend om hun eigen DNA te zien verschijnen. Het neergeslagen DNA kan lange tijd worden bewaard in een mooi glazen flesje.

### Doelgroep

Dit practicum is geschikt voor alle klassen in het voortgezet onderwijs en kan ook in het hoger onderwijs gebruikt worden. In de onderbouw kan het practicum uitgevoerd worden bij biologie of andere vakken of projecten (bv. Science) in het leergebied Mens en Natuur. In de bovenbouw kan het practicum uitgevoerd worden bij bijvoorbeeld biologie of ANW.

Deze kit is vooral erg goed inzetbaar als een inleiding op DNA of de cel. Ook als leerlingen al eerder DNA hebben geïsoleerd uit uien of lever, zullen ze dit practicum interessant vinden. Je eigen DNA isoleren is toch bijzonder!

De leerlinghandleiding bevat twee **complete** uitvoeringen van het practicum: een basisversie en een gevorderdenversie. Afhankelijk van het niveau van uw leerlingen kunt u een van de twee handleidingen gebruiken.



## Waar in het curriculum?

Deze kit kan onder andere bij de volgende onderwerpen uitgevoerd worden:

- DNA
- Cellen en celstructuur
- Mitose en meiose
- Genetica/erfelijkheid
- DNA-technologie/biotechnologie/genomics

## Vereiste achtergrondkennis

Leerlingen moeten een algemeen idee hebben van de structuur en functie van DNA, voordat begonnen wordt.

## Hoe lang duurt het?

Dit practicum kan in één lesuur van 50 minuten uitgevoerd worden, maar kan ook uitgebreid worden met aanvullende activiteiten.

Les 1 Inleiding en achtergrondmateriaal

Les 2 Isoleren wangslimvliescellen, isoleren DNA en precipiteren

Les 3 DNA-halsketting maken (optioneel)

## Veiligheid

Eten, drinken en roken zijn niet toegestaan tijdens het practicum. Het wordt aangeraden om veiligheidsbrillen en handschoenen te dragen. Voorafgaand en na afloop van het practicum moeten leerlingen hun handen wassen. Als een leerling een oplossing in zijn of haar oog krijgt, spoel dan gedurende 15 minuten met water.

## Belangrijke tip

Voor een succesvolle proef is het belangrijk dat er genoeg cellen worden verzameld. De beste resultaten worden verkregen als de leerlingen zich houden aan de aangegeven tijden in de leerlingenhandleiding en de cellen voorzichtig overbrengen.

## Achtergrondinformatie voor basisuitleg

### Wat is DNA en wat doet het?

Deoxyribonucleïnezuur (DNA) is een molecuul dat je vindt in alle levende wezens, zoals bacteriën, planten en dieren. DNA bevat de erfelijke informatie die organismen van hun ouders hebben geërfd. Soms wordt het DNA aangeduid als de biologische “bouwtekening”, omdat het voor een groot deel het uiterlijk van een organisme bepaalt. Denk hierbij aan haar-, oog- en huidskleur, lengte, bloedgroep en vele andere eigenschappen. Jouw DNA-bouwtekening is tijdens de bevruchting samengesteld uit het DNA van je moeder (uit haar eicel) en dat van je vader (uit zijn spermacel).

DNA bestaat uit vier chemische bouwstenen. Deze worden aangeduid met de eerste letter van hun naam: **A** (adenine), **G** (guanine), **T** (thymine) en **C** (cytosine). Deze letters vormen een genetische code. De letters in deze DNA-code werken net als de letters van ons alfabet. Met de 26 letters van ons alfabet kunnen we woorden maken. En met deze woorden kunnen we een vrijwel oneindige hoeveelheid boodschappen en informatie creëren. Op een vergelijkbare manier zijn de vier letters van het DNA gerangschikt in begrijpelijke boodschappen voor cellen. Deze boodschappen worden **genen** genoemd. Deze genen bevatten de informatie om **eiwitten** te maken. Eiwitten zijn de basis voor bijna alle functies en structuren in het lichaam en de cellen.

Jouw DNA-volgorde is de complete volgorde van chemische letters in je **genoom**, oftewel al je DNA bijelkaar. Wetenschappers hebben ontdekt dat DNA-volgorde van alle mensen voor 99,9% identiek zijn. Die 0,1% variatie in DNA-volgorde tussen individuen maakt elk mens dus uniek.

### Waar vind je DNA?

Op een paar uitzonderingen na, vind je DNA in alle cellen van een organisme. In menselijke cellen zit het DNA in de **kern**. Als een cel deelt (voor groei, reparatie of voortplanting), wordt het DNA in de kern gekopieerd en daarna sterk gespiraliseerd, zodat de afzonderlijke DNA-moleculen, de **chromosomen**, zichtbaar worden. Het DNA in de kern van een menselijke cel is verdeeld over 46 chromosomen, die ongeveer 40.000 genen bevatten met de informatie om het menselijk lichaam te bouwen.

### Hoe ziet DNA eruit?

Op moleculair niveau lijkt DNA op een gedraaide ladder of een wenteltrap. Deze ladder bevat eigenlijk twee strengen DNA, waarbij paren van de chemische letters A, C, T en G de treden vormen. Deze structuur wordt een **dubbele helix** van DNA genoemd - helix betekent spiraal. De DNA-ladder is heel lang en dun. Om in een cel te passen is hij heel strak in elkaar gedraaid. Als alle 46 chromosomen van een menselijke cel uit elkaar gedraaid en achter elkaar neergelegd zouden worden, dan is het DNA 2 meter lang, maar slechts 2 nanometer (2 miljardste meter) breed.

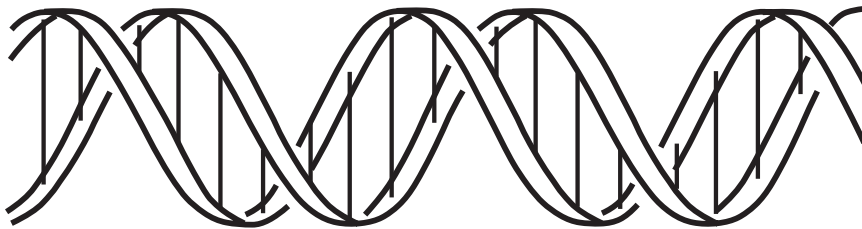


Fig. 1. Schematische weergave van DNA.

### Hoe maken we DNA zichtbaar?

We kunnen ons DNA zichtbaar maken door cellen te verzamelen, ze kapot te maken en het DNA uit alle cellen op te stapelen. Een enkel, lang DNA-molecuul is niet zichtbaar, maar als je alle DNA-moleculen uit alle cellen op elkaar legt, dan zou je ze wel zien. In dit practicum worden wasmiddelen en enzymen gebruikt om de wangslimvliescellen van leerlingen open te breken. Het DNA komt vervolgens vrij in de oplossing, waarna zouten en koude alcohol het DNA doen neerslaan, of laten **precipiteren**, in een kluwen van DNA moleculen. En deze witte kluwen kun je zien.

## **Achtergrondinformatie voor gevorderdenuitleg**

### **Isolatie en precipitatie van DNA: hoe werkt dat?**

Leerlingen beginnen deze activiteit met het schrapen van cellen aan de binnenkant van hun wang. De verzamelde cellen worden in een buisje met lysisbuffer gedaan. De lysisbuffer bevat een zeep die de fosfolipide celmembraan en kernmembraan afbreekt. Hierdoor komt het DNA vrij. De lysisbuffer bevat ook een buffer om de pH gelijk te houden. Hierdoor blijft het DNA stabiel.

Protease, een enzym dat eiwitten afbreekt, wordt toegevoegd aan de oplossing. Hierdoor worden de eiwitten waaraan het DNA gebonden is vernietigd, evenals aanwezige enzymen die het DNA kunnen afbreken. Zijn de eiwitten uit de weg, dan kan veel meer intact DNA uit de oplossing worden gehaald. De buisjes met cellen en protease worden opgewarmd tot 50°C. Dit is de optimumtemperatuur van protease.

DNA, suikers, vetten en eiwitten afkomstig uit de cel lossen op in de lysisbuffer. Het DNA is onder de proefomstandigheden negatief geladen, dankzij de fosfaatgroepen die het bevat. De elektrische lading maakt het DNA oplosbaar in water. Wanneer zout (natriumchloride) wordt toegevoegd aan de oplossing, worden de positieve natriumionen aangetrokken door de negatieve ladingen op het DNA. De DNA-moleculen kunnen hierdoor naar elkaar toe komen in plaats van elkaar afstoten. Wanneer dan ook nog koude alcohol wordt toegevoegd, precipiteert het DNA. DNA is namelijk onoplosbaar in een oplossing met hoge concentraties zout en alcohol. Het DNA-precipitaat wordt langzaam zichtbaar als dunne, witte draden op het grensvlak van de alcohol. De andere cellulaire componenten blijven in oplossing.

### **Toepassingen van DNA-technologie**

Dit practicum kan gebruikt worden wanneer DNA-structuur en -functie behandeld worden. Het is een simpele, praktische manier om leerlingen zelf in aanraking te laten komen met DNA. Deze activiteit krijgt meer betekenis als leerlingen begrijpen dat DNA-isolatie de eerste stap is in verschillende toepassingen van DNA-technologie. Hieronder wordt een aantal kort toegelicht.

#### **Klonen**

Klonen betekent veel kopieën maken van (een stukje) DNA. Een kapot gen dat een aandoening veroorzaakt, kan gekloond worden om de DNA-volgorde te onderzoeken. Met deze informatie kan wellicht in de toekomst een medicijn worden ontwikkeld. Een gen dat codeert voor een gunstig eiwit of een belangrijke eigenschap, kan worden gekloond en geplaatst in een ander organisme (zie volgende paragraaf). Ook kan een volledig genoom worden gekloond, door het in cellen te plaatsen die zich tot volledige organismen kunnen ontwikkelen.

### **Genetische modificatie**

Om bruikbare hoeveelheden van een waardevol eiwit te produceren, bijvoorbeeld een bloedstollings-eiwit, wordt het gen dat codeert voor dit eiwit geïsoleerd en geplaatst in cellen die snel kunnen groeien en delen. Deze cellulaire “fabrieken” kunnen bacteriën, gist, schimmel, planten of dierlijke cellen zijn.

In sommige gevallen wordt een zoogdier gebruikt om het gewenste eiwit te produceren. Het betreffende gen wordt dan in een bevruchte eicel van bijvoorbeeld een koe geplaatst. De genetisch gemodificeerde koe die hieruit ontstaat, kan dan het gewenste eiwit produceren in haar melk. Hieruit kan dan het eiwit geïsoleerd worden.

Landbouwgewassen bevatten ook genen van andere organismen. Zo bevatten sommige planten een gen dat codeert voor een eiwit dat rupsen doodt. Andere planten bevatten genen die ervoor zorgen dat ze bestand zijn tegen verdelgingsmiddelen.

### **DNA-profielen**

Wetenschappers bestuderen specifieke stukken van chromosomen, waar DNA-volgordes tussen individuen verschillen. Dit doen ze met de Polymerase Chain Reaction (PCR), een techniek waarmee ze deze specifieke stukken DNA in grote hoeveelheden kunnen kopiëren (zodat er genoeg materiaal is om deze volgordes te analyseren en manipuleren). Door middel van DNA-gelelektroforese kunnen de verschillen tussen individuen zichtbaar worden gemaakt in een bandenpatroon, dat iets wegheeft van een streepjescode. Deze techniek kan worden gebruikt om misdrijven op te lossen, om ouderschapstesten uit te voeren, en ook om evolutionaire verwantschappen tussen organismen te onderzoeken.

## **Antwoorden op vragen (Basisuitleg)**

- 1. Hoe kun je controleren of je echt wangslijmvliescellen aan het verzamelen bent? Welk apparaat kun je hiervoor gebruiken?**

Je kunt, nadat je wangslijmvliescellen hebt verzameld, een objectglas kort met de borstel in aanraking brengen. Daarna kun je onder de microscoop kijken of er werkelijk cellen aanwezig zijn.

- 2. Gaat afwassen van de vuile vaat beter met koud of warm water? Helpt warm of koud water beter bij het openbreken van de cel met een zeep? Leg je antwoord uit.**

Warm water werkt beter, omdat vetten en eiwitten dan beter oplossen in het afwasmiddel. Een hogere temperatuur helpt het wasmiddel in de lysisbuffer bij het openbreken van de cel.

- 3. Is je DNA zichtbaar met het blote oog na het openbreken van de cellen? Leg je antwoord uit.**

Je DNA is dan niet zichtbaar. Het is namelijk opgelost in de lysisbuffer.

- 4. Waar vind je proteases in je lichaam?**

Proteases vind je in de maag. In de maag worden de eiwitten die je tijdens het eten binnenkrijgt verteerd.

- 5. Gaat oplossen van suiker beter in ijssthee of in hete thee?**

Suiker lost veel sneller op in hete thee dan in ijssthee. De lagere temperatuur van de ijssthee zorgt ervoor dat suiker minder goed kan oplossen. In het algemeen geldt dat stoffen beter oplossen bij hogere temperaturen.

## Antwoorden op vragen (Gevorderdenuitleg)

1. **Leg het verschil uit tussen DNA, chromosomen en genen. Leg het zo uit dat een twee jaar jongere leerling het antwoord kan begrijpen.**

DNA is een chemische stof die in alle levende wezens zit. Kinderen krijgen hun DNA van hun ouders.

Chromosomen zijn lange draden van in elkaar gedraaid DNA. Al je DNA is verzameld in 46 chromosomen. Tijdens het delen van de cel worden de chromosomen gekopieerd.

Genen zijn stukjes DNA. Deze stukjes DNA bevatten informatie om eiwitten te maken en eiwitten vervullen allerlei belangrijke functies in cellen en organismen.

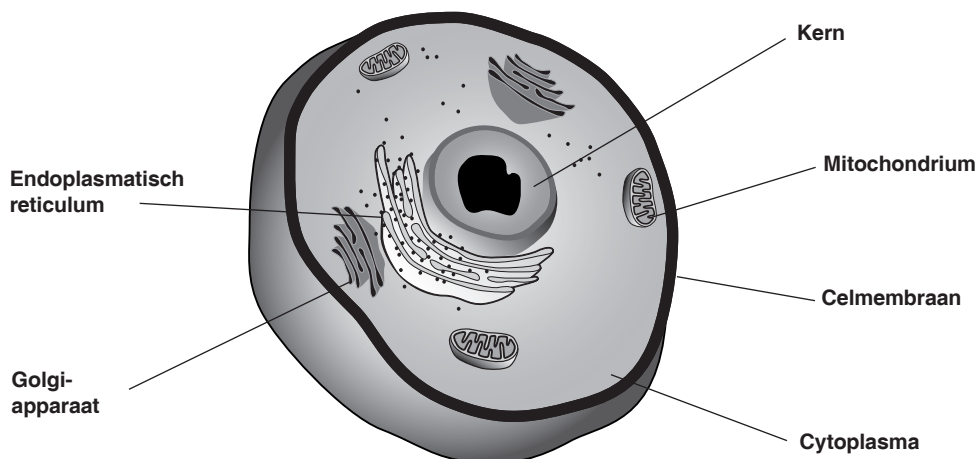
2. **Bevat een levercel net zoveel chromosomen als een wangslimvliescel?**

Ja; elke lichaamscel, op de geslachtscellen na, bevat hetzelfde DNA. Het maakt geen verschil uit welk weefsel de cel komt.

3. **Stel, je wilt het gen voor een eiwit in de maag kopiëren en isoleren. Kun je dit gen vinden in en isoleren uit een wangslimvliescel? Leg uit.**

Ja, dat kan. Het gen dat codeert voor een maageiwit vind je in het DNA van alle cellen. In een wangslimvliescel wordt echter het maageiwit niet geproduceerd: dat gebeurt normaal gesproken alleen in de maag.

Hieronder zie je een schematische tekening van een dierlijke cel.



4. **Geef in de tekening de verschillende onderdelen van de cel aan.**

5. **Waar in de cel vind je het genomisch DNA?**

Genomisch DNA vind je in de kern.

**6. Wat is de functie van het kopiëren van de informatie op het DNA naar mRNA, voordat het vertaald kan worden naar eiwitten?**

Het DNA in de kern is niet mobiel. Eiwitten worden echter buiten de kern in de ribosomen gemaakt. Er is dus een mobiele boodschapper nodig die de informatie van de kern naar de ribosomen in het cytoplasma brengt.

**7. Nadat de membranen kapot gemaakt zijn, komt het DNA in de oplossing. Het DNA is niet het enige molecuul in de cel. Noem zoveel mogelijk andere moleculen die veel in de cel voorkomen.**

Eiwitten (proteïnen), vetten (lipiden), suikers en zouten.

**8. Hoe kun je de andere cellulaire moleculen afbreken, zodat je schoon DNA overhoudt?**

Met behulp van enzymen en andere chemicaliën. Proteases zijn enzymen die eiwitten afbreken. Wasmiddelen lossen lipiden op. Enzymen als beta-galactosidase breken suikers af. Verwarming en schudden kunnen deze processen versnellen.

**9. De protease die hierbij gebruikt wordt, heeft zijn optimumtemperatuur bij 50°C. Denk je dat dit enzym geïsoleerd is uit *E. coli*-bacteriën? Leg je antwoord uit. (Tip: Waar leeft *E. coli*?)**

Nee, *E. coli* komt voor in onze darmen en daar is het rond de 37°C. Als een enzym een optimumtemperatuur heeft rond de 50°C, komt het waarschijnlijk uit een organisme dat rond die temperatuur leeft.

**10. Vleesvermalser wordt vaak gebruikt om taai vlees, zoals biefstuk, malser te maken. Biefstuk is niets anders dan eiwitrijke spieren. Hoe denk je dat vleesvermalser werkt?**

Vleesvermalser maakt gebruik van een protease-enzym (papaïne) dat de eiwitten in de spieren afbreekt. Hierdoor wordt het vlees malser.

**11. Zet de juiste activiteiten rechts bij de uitkomsten van de activiteiten links.**

   A Oogsten cellen

   C Oplossen celmembranen

   E Neerslaan van DNA

   B Afbreken van eiwitten

   D DNA minder oplosbaar maken in water

A. Met een borstel de binnenkant van je wang schrapen

B. Protease toevoegen en bij 50°C incuberen

C. Toevoegen aan oplossing met zeep

D. IJskoude alcohol toevoegen

E. Zout toevoegen



## Vorbereitung voor TOA en docent

In dit gedeelte van de docenten- en TOA-handleiding vindt u de praktische voorbereiding voor het practicum. U vindt hier ook een stapsgewijs protocol en enkele uitbreidingsactiviteiten.

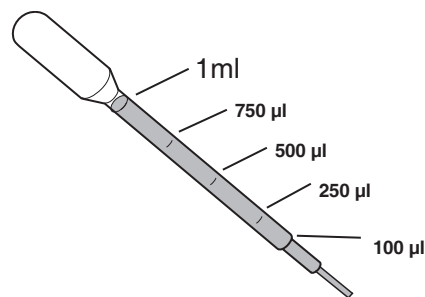
### Hoe lang duurt het?

20-50 minuten	Les 1	Inleiding en achtergrondmateriaal <b>Optioneel</b> Demonstratiepracticum van de DNA-isolatie. Geschikt voor de lagere klassen. Zie de uitbreidingsactiviteiten.
50 minuten	Les 2	Isoleren wangslijmvliescellen, isoleren DNA en precipiteren
30-50 minuten	Les 3	<b>Optioneel</b> DNA-ketting maken

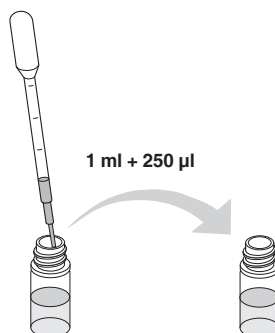
### Praktische voorbereiding voor les 2

- Afmeten vloeistoffen

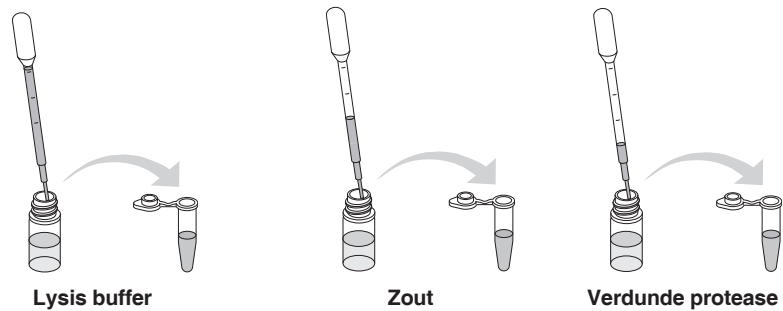
Deze kit bevat plastic pipetten waarmee alle hoeveelheden vloeistof tijdens de proef worden afgemeten. De figuur hieronder laat zien hoe de volumes op de pipet verdeeld zijn. Andere pipetten kunnen uiteraard ook gebruikt worden.



- Zet de alcohol (isopropanol of ethanol) tenminste 1 uur voor het begin van les 2 in de vriezer.
- Voeg 1,25 ml water toe aan het flesje met protease. Meng protease en water voorzichtig, door het flesje 5 keer om te draaien. Na deze verdunning kan de oplossing tot twee maanden bij 4°C bewaard worden.



- Verdeel de lysisbuffer, verdunde protease en natriumchloride (zout) over de juiste buisjes. Zie beneden voor uitgebreider uitleg.



- Knip de strook Parafilm in 36 of meer kleine vierkantjes. Voor elke leerling één vierkantje.

#### **Verdelen van oplossingen voor elke proefopstelling (4 leerlingen per opstelling)**

1. Voor elke leerling: verdeel de **lysisbuffer** over de doorzichtige microreageerbuisjes. 1 ml per buisje (max. 4 buisjes per proefopstelling).
2. Pipetteer 500  $\mu$ l (0,5 ml) natriumchloride in 8 roze microreageerbuisjes. Schrijf op elk buisje "**zout**".
3. Pipetteer 250  $\mu$ l verdunde protease (zie vorige bladzijde voor verdunning) in 8 blauwe microreageerbuisjes. Schrijf op elk buisje "**prot**".
4. Elke proefopstelling krijgt 4 doorzichtige microreageerbuisjes **lysisbuffer**, 1 roze microreageerbuisje "**zout**" en 1 blauw microreageerbuisje "**prot**". Zet de buisjes in een schuimrubber houder.

## DNA isolatie en precipitatie

### Proefopstelling checklist

De materialen in de kit zijn voldoende voor 36 leerlingen.

### Gemeenschappelijke proefopstelling (bij leraar)

Waterbad op 50°C

Fles ijskoude isopropanol (91%) of ethanol (95%) in bak met ijs

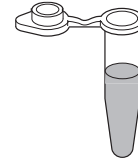
<b>Proefopstelling voor leerlingen (4 lln per opstelling)</b>	<b>Hoeveelheid</b>
Doorzichtige microreageerbuisjes met 1 ml lysisbuffer	4
Blaauwe microreageerbuisjes " <b>prot</b> " met 250 µl protease	1
Roze microreageerbuisjes " <b>zout</b> " met 500 µl zout	1
Doorzichtige schroefdopbuisjes	4
Verschillende kleuren schroefdoppen	4
Cytology borstels	8
5 ml rondbodem reageerbuisjes	4
Parafilm (kleine vierkantjes)	4
Wegwerp plastic pipetten	4
Schuimrubber microreageerbuishouder	1
Watervaste stiften	1
Plastic bekertje als afvalbakje	1

### Belangrijke tip!

Voor een succesvolle proef is het belangrijk dat er genoeg cellen worden verzameld. De beste resultaten worden verkregen als de leerlingen zich houden aan de aangegeven tijden in de leerlingenhandleiding en de cellen voorzichtig overbrengen.

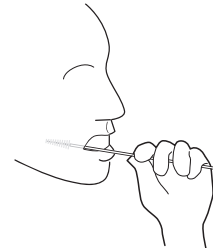
## Kort protocol voor DNA-isolatie

1. Pak één doorzichtige microreageerbuis met 1 ml lysisbuffer uit de schuimrubber houder. Zet met de watervaste stift je naam op het buisje.

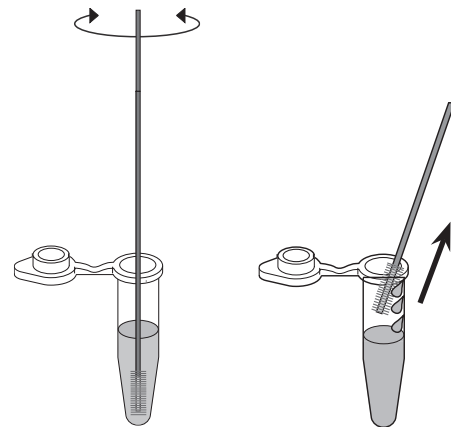


1 ml lysis buffer

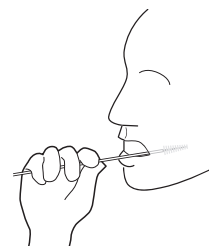
2. Schraap met de borstel voorzichtig langs de binnenkant van je rechterwang en in de ruimte tussen je tandvlees en wang. Doe dit 1 minuut. Probeer zoveel mogelijk materiaal te verzamelen.



3. Plaats de borstel met wangslimvliescellen in de microreageerbuis met lysisbuffer. Draai de borstel rond (tussen je vingers) om de cellen van de borstel in de oplossing te krijgen. Schraap de borstel ook nog af aan de bovenrand van het reageerbuisje om zoveel mogelijk cellen te verzamelen.

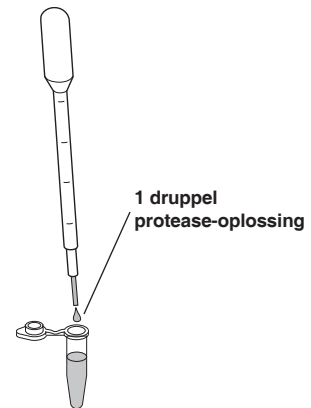


4. Schraap met een tweede borstel voorzichtig langs de binnenkant van je linkerwang, in de ruimte tussen je tandvlees en wang, langs je gehemelte en onder je tong. Doe dit weer 1 minuut. Probeer weer zoveel mogelijk cellen te verzamelen. Plaats de borstel weer in dezelfde microreageerbuis en breng de cellen over in de lysisbuffer zoals in punt 3.

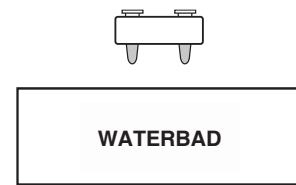


5. Doe het dopje op de microreageerbuis en draai het buisje 5 keer **voorzichtig** ondersteboven en terug.

6. Voeg met de plastic pipet 1 druppel uit het buisje "prot" toe aan je cellen. Doe het dopje op het buisje en draai het buisje 5 keer ondersteboven en terug, om te schudden.

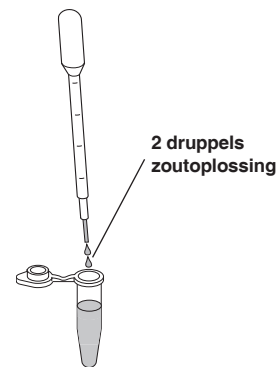


7. Zet de microreageerbuisjes met cellen en protease van je groepje in de schuimrubber reageerbuisshouder en plaats deze in een waterbad van 50°C. Haal de buisjes na 10 minuten uit het waterbad.

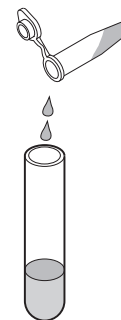


50°C, 10 min

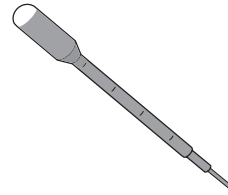
8. Voeg met de plastic pipet 2 druppels uit het buisje "zout" toe aan je celextract. Doe het dopje op het buisje en draai het buisje weer 5 keer om te schudden.



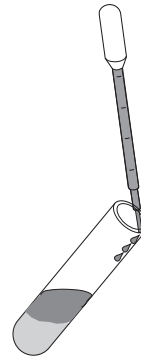
9. Zet je initialen op een schone 5 ml rondbodem reageerbuis en breng de inhoud van je microreageerbuisje over in de rondbodem reageerbuis.



10. Vul een schone plastic pipet met ijskoude alcohol.



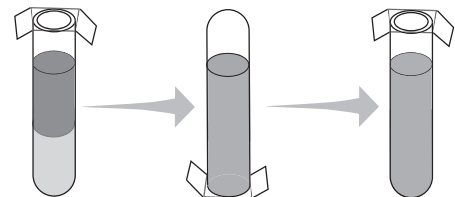
11. Houd de rondbodembuis in een hoek van 45° en voeg langzaam de alcohol toe. De alcohol moet voorzichtig langs de binnenkant van het buisje naar beneden stromen.



12. Laat de reageerbuis 5 minuten rechtop staan.

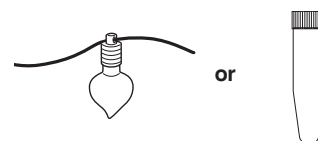


13. Sluit na 5 minuten de bovenkant van de reageerbuis af met Parafilm. Draai de buis langzaam 5 keer ondersteboven en terug om het DNA samen te laten klonteren tot een zichtbare kluwen.



14. Breng het geprecipiteerde DNA met een plastic pipet voorzichtig over in het smalle glazen flesje uit de DNA necklace kit (166-2200EDU). Voeg daarna nog 750 µl tot 1 ml alcohol toe.

Of, als je geen DNA-ketting gaat maken, bewaar het DNA in een schroefdobuisje.



## **Uitbreidingsactiviteiten**

### **Demonstratiepracticum voor onderbouw**

Voor de onderbouw is het isoleren van DNA een nogal abstracte activiteit. Een demonstratiepracticum kan gebruikt worden om het proces visueel te illustreren. Om het isoleren van DNA uit wangslijmvliescellen te demonstreren kan gebruik gemaakt worden van een doorzichtige ballon, als model van de cel, gevuld met allerlei voorwerpen. De voorwerpen stellen de celorganellen voor. Neem bv. draad voor het DNA (het DNA kan nog in een 'kern', een extra kleinere ballon, worden gedaan). Beeld uit dat een wasmiddel membranen oplost (ballon laten knallen); dat protease eiwitten kapot maakt (voorwerpen kapot maken) en dat zout en alcohol het DNA doen precipiteren en aggregeren (draad bij elkaar brengen).

### **Cellen bekijken met de microscoop en kernen kleuren**

Laat leerlingen, voordat ze hun wangslijmvliescellen overbrengen van de borstel in het reageerbuisje, de cellen onder de microscoop bekijken. Laat ze daarvoor een druppel water op een objectglas doen en de druppel voorzichtig aanraken met hun borstel met cellen. Voeg vervolgens 1 druppel kernkleuring, bv. Bio-Rad's Bio-Safe Stain (166-0400EDU), toe op het objectglas. Bekijk de cellen onder de microscoop. Tijdens de proef is hier tijd voor tijdens de 10 minuten incubatie met protease. Dezelfde procedure kan ook op andere momenten tijdens de proef worden uitgevoerd. Zijn er verschillen?

## **Leerlingenhandleiding: basis**

**DNA-isolatie uit wangslimvliescellen  
Je eigen DNA gevangen!**

### **Inhoud**

- Les 1**      Inleiding en achtergrondmateriaal
- Les 2**      Isoleren wangslimvliescellen, isoleren DNA en precipiteren
- Les 3**      DNA-ketting maken (optioneel)



# Leerlingenhandleiding: Basis

## DNA-isolatie uit wangslimvliescellen - Vang je genetische essentie in een fles

### Inleiding

In dit practicum ga je uit je eigen wangslimvliescellen DNA isoleren. Aan het eind van de proef heb je je eigen DNA in een flesje, dat je als een ketting om je hals kunt hangen. Heel veel plezier!

### Wat is DNA en wat doet het?

Deoxyribonucleïnezuur (afgekort DNA, de “A” staat voor “acid”) is een molecuul dat aanwezig is in alle levende wezens, zoals bacteriën, planten en dieren. Je DNA bevat alle informatie die je van je ouders hebt geërfd. Soms wordt het DNA een biologische “bouwtekening” genoemd. Het bepaalt namelijk voor een belangrijk deel het uiterlijk van een individu. Hierbij kun je denken aan: haar-, oog- en huidskleur, lengte, bloedgroep en vele andere eigenschappen. Maar het bevat ook alle informatie over eigenschappen die bij iedereen gelijk zijn: bijvoorbeeld over de bouw van organen en ledematen. Je DNA is voor de helft afkomstig van je moeder en voor de helft van je vader. Daarom lijken we in bepaalde eigenschappen ook op onze ouders.

DNA bestaat uit vier chemische bouwstenen. Deze worden aangeduid met de eerste letter van hun naam: **A** (adenine), **G** (guanine), **T** (thymine) en **C** (cytosine). Deze letters vormen een genetische code. De letters in deze DNA-code werken net als de letters van ons alfabet. Met de 26 letters van ons alfabet kunnen we woorden maken. En met deze woorden kunnen we een vrijwel oneindige hoeveelheid boodschappen en informatie creëren. Op een vergelijkbare manier zijn de vier letters van het DNA gerangschikt in begrijpelijke boodschappen voor cellen. Deze boodschappen worden **genen** genoemd. Deze genen bevatten de informatie om **eiwitten** te maken. Eiwitten zijn de basis voor bijna alle functies en structuren in het lichaam en de cellen.

Jouw DNA-volgorde is de complete volgorde van chemische letters in je **genoom**, oftewel al je DNA bijelkaar. Wetenschappers hebben ontdekt dat DNA-volgorden van alle mensen voor 99,9% identiek zijn. Die 0,1% variatie in DNA-volgorde tussen individuen maakt elk mens dus uniek.

### Waar vind je DNA?

Alle organismen zijn opgebouwd uit cellen. Zij zijn de bouwstenen waaruit een organisme is opgebouwd, Organen en weefsels (spieren, hersenen, darmen, lever, huid, enz.) bestaan helemaal uit cellen. Een cel wordt afgesloten van de buitenwereld door de celmembraan. Dit is een dun vliesje, gemaakt van eiwitten en lipiden, dat om de hele cel in ligt. In de cel liggen weer allemaal afgesloten compartimenten die verschillende functies hebben. Een van deze compartimenten wordt de celkern genoemd. Hierin ligt het DNA. Het DNA bevat alle informatie om de cel te laten functioneren. In de kern van een menselijke cel bestaat uit DNA uit 46 in elkaar gedraaide moleculen, **de chromosomen**.

## Hoe ziet DNA eruit?

Op moleculair niveau lijkt DNA op een gedraaide ladder of een wenteltrap. Deze ladder bevat eigenlijk twee strengen DNA, waarbij paren van de chemische letters A, C, T en G de treden vormen. Deze structuur wordt een **dubbele helix** van DNA genoemd - helix betekent spiraal. De DNA-ladder is heel lang en dun. Om in een cel te passen is hij heel strak in elkaar gedraaid. Als alle 46 chromosomen van een menselijke cel uit elkaar gedraaid en achter elkaar neergelegd zouden worden, dan is het DNA 2 meter lang, maar slechts 2 nanometer (2 miljardste meter) breed.

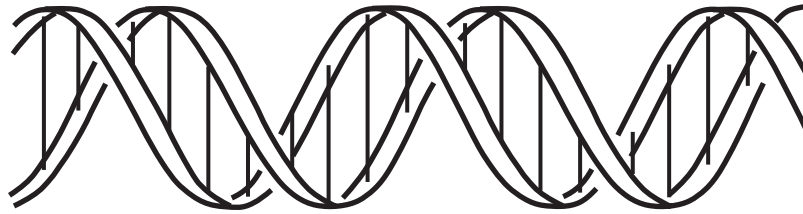


Fig. 2. Schematische weergave van DNA.

## Hoe maken we DNA zichtbaar?

### Stap 1: Cellen verzamelen

Om je eigen DNA zichtbaar te maken, ga je in deze proef cellen verzamelen, de cellen openbreken, en een kluwen DNA maken. Je kunt duizenden cellen verzamelen door met een borstel voorzichtig langs de binnenkant van je mond te schrapen. De cellen aan de binnenkant van je mond delen heel vaak en worden heel snel vervangen. Ze laten daardoor makkelijk los. Bij elke hap eten die je kauwt, komen er cellen los en worden ze weer vervangen.

### **Vraag:**

1. Hoe kun je controleren of je echt wangslimvliescellen aan het verzamelen bent? Welk apparaat kun je hiervoor gebruiken?

### Stap 2: Openbreken van de cellen

Na het verzamelen van de cellen worden ze opengebroken om het DNA vrij te laten komen. Hiervoor wordt een wasmiddel gebruikt. Een wasmiddel lost vetten op. Omdat ook een celmembraan vooral uit vetten bestaat, kan een detergent een cel openbreken. Wanneer de membranen opgelost zijn, komt het DNA vrij. Het openbreken van cellen wordt **lysis** genoemd en de oplossing met het wasmiddel erin wordt **lysisbuffer** genoemd.

### **Vraag:**

2. Gaat afwassen van de vuile vaat beter met koud of warm water? Helpt warm of koud water beter bij het openbreken van de cel met een wasmiddel? Leg je antwoord uit.

3. Is je DNA met het blote oog zichtbaar na het openbreken van de cellen? Leg je antwoord uit.

### **Stap 3: Eiwitten verwijderen**

DNA ligt in de kern strak om eiwitten heengedraaid. Net zoals een klosje garen, houden de eiwitten het DNA bij elkaar en raakt het niet hopeloos in de war. Om het DNA te kunnen zien, moeten eerst de eiwitten verwijderd worden, waardoor het DNA loslaat. Daarna wordt al het DNA van alle cellen in een grote klont verzameld. Om dit te kunnen doen ga je de kapotte wangslimvliescellen incuberen met **protease**. Protease is een enzym en breekt eiwitten af. Bij een temperatuur van 50°C werkt protease het best. Het protease helpt het DNA los te komen, door de eiwitten waar het DNA aan vast zit af te breken.

#### **Vraag:**

4. Waar vind je proteases in je lichaam?

### **Stap 4 en 5: Zichtbaar maken van DNA**

DNA-strengen zijn veel te dun om met het blote oog te zien. Vergelijk het met een dun wit draadje: als je één zo'n draadje in een klaslokaal legt, kun je het bijna niet zien; maar als je duizenden van die draadjes op elkaar legt, zie je ze wel. Dit principe gebruiken we ook om DNA zichtbaar te maken. Eerst ga je het DNA uit de oplossing halen met zout en koude alcohol. Dit noemen we 'neerslaan' of **precipiteren**. Het zout en alcohol veranderen de omstandigheden zodat het DNA precipiteert en aan elkaar gaat plakken. Hierdoor wordt het DNA een kluwen van strengen en kun je het zien. Eerst zie je het DNA als hele dunne witte draden drijvend in de oplossing. Wanneer je het DNA uit de vloeistof haalt, plakt het allemaal aan elkaar.

#### **Vraag:**

5. Gaat oplossen van suiker beter in ijsstee of in hete thee?

## DNA isolatie uit wangslimvliescellen: protocol

### Vang je genetische essentie in een flesje

#### Gemeenschappelijke proefopstelling (bij leraar)

Waterbad op 50°C

Fles ijskoude isopropanol (91%) of ethanol (95%) in bak met ijs

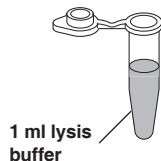
#### Proefopstelling voor leerlingen (4 lln per opstelling)

	Hoeveelheid
Doorzichtige microreageerbuisjes met 1 ml lysisbuffer	4
Blaauwe microreageerbuisjes “ <b>prot</b> ” met 250 µl protease	1
Roze microreageerbuisjes “ <b>zout</b> ” met 500 µl zout	1
Doorzichtige schroefdopbuisjes	4
Verskillende kleuren schroefdoppen	4
Cytology borstels	8
5 ml rondbodemp reageerbuisjes	4
Parafilm (kleine vierkantjes)	4
Wegwerp plastic pipetten	4
Schuimrubber microreageerbuishouder	1
Watervaste stiften	1
Plastic bekertje als afvalbakje	1

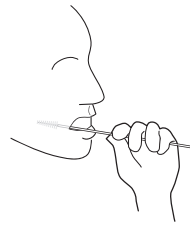
#### Stap 1 en 2: Verzamelen en openbreken cellen

Je gaat eerst cellen verzamelen uit je mond. Hiervoor gebruik je twee borstels, die je voorzichtig door je mond gaat halen. De cellen op beide borstels voeg je daarna samen in een buisje met lysisbuffer. Voor een succesvolle proef is het belangrijk dat je genoeg cellen verzamelt. Houd je daarom aan de aangegeven tijden en breng de cellen voorzichtig over in het buisje.

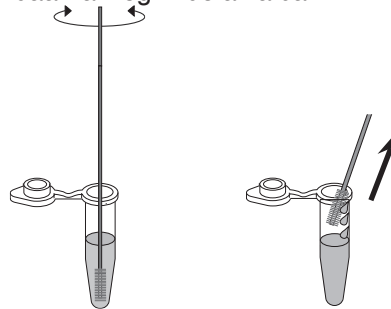
1. Pak één doorzichtig microreageerbuisje met 1 ml lysisbuffer en zet je naam erop met een watervaste stift.



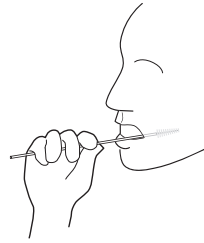
2. Neem de eerste borstel en schraap voorzichtig langs de binnenkant van je rechterwang en in de ruimte tussen je tandvlees en wang. Doe dit precies 1 minuut. Borstel redelijk stevig, maar doe jezelf geen pijn.



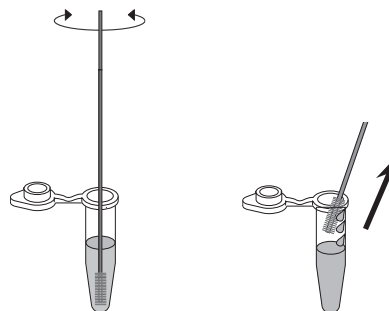
3. Plaats de borstel met wangslimvliescellen in de micoreageerbuis met lysisbuffer. Draai de borstel rond (tussen je vingers) om de cellen van de borstel in de oplossing te krijgen. Schraap de borstel ook nog af aan de bovenrand van het reageerbuisje om zoveel mogelijk cellen te verzamelen. Gooi de borstel daarna weg in de afvalbak.



4. Neem een tweede, schone borstel. Schraap voorzichtig langs de binnenkant van je linkerwang, in de ruimte tussen je tandvlees en wang, langs je gehemelte en onder je tong. Probeer weer zoveel mogelijk cellen te verzamelen.



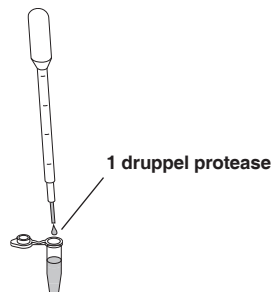
5. Plaats de borstel met wangslimvliescellen in dezelfde micoreageerbuis met lysis buffer. Draai de borstel weer rond om de cellen van de borstel in de oplossing te krijgen. Schraap de borstel ook nog af aan de bovenrand van het reageerbuisje. Gooi de borstel daarna weg in de afvalbak.



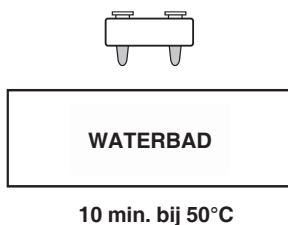
6. Doe het dopje op de micoreageerbuis en draai het buisje 5 keer **voorzichtig** ondersteboven en terug.

### Stap 3: eiwitten verwijderen

1. Pak het reageerbuisje met “**prot**”. Voeg met de plastic pipet 1 druppel uit het buisje “**prot**” toe aan je cellen. Doe het dopje op het buisje en draai het buisje 5 keer ondersteboven en terug, om te schudden..

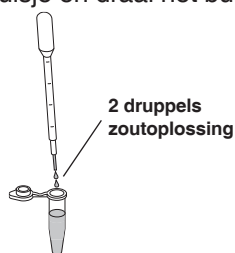


2. Zet je microreageerbuisje met cellen in de schuimrubber reageerbuisshouder en plaats deze 10 minuten in het waterbad van 50°C.



### Stap 4 en 5: DNA zichtbaar maken

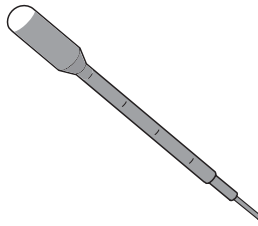
1. Voeg met de plastic pipet 2 druppels uit het buisje “**zout**” toe aan je celextract. Doe het dopje op het buisje en draai het buisje weer 5 keer om te schudden.



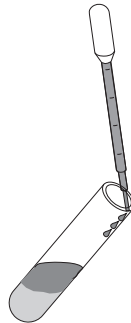
2. Zet je naam op een 5 ml rondbodem reageerbuis en giet je oplossing met cellen erin.



3. Vul een schone, plastic pipet met ijskoude alcohol (vraag de docent of TOA om de alcohol).



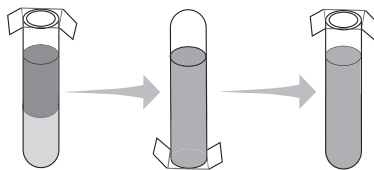
4. Houd de rondbodembuis in een hoek van  $45^\circ$  en voeg langzaam de alcohol toe. Laat de alcohol voorzichtig langs de binnenkant van het buisje naar beneden lopen. Als het goed is zie je twee lagen (boven en onder) ontstaan. Wat gebeurt er op de plek waar de twee lagen elkaar ontmoeten? Schrijf op wat je ziet.



5. Zet de reageerbuis in de schuimrubber houder en laat de reageerbuis 5 minuten **rustig** staan bij kamertemperatuur.

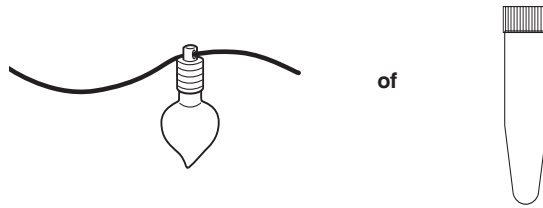


6. Wat zie je na 5 minuten op de plek waar beide lagen, de celoplossing en alcohol, elkaar ontmoeten? Schrijf weer op wat je ziet. Zien de buisjes van klasgenoten er hetzelfde uit?
7. Sluit de bovenkant van je buisje af met een stukje Parafilm. Zet je duim op de Parafilm en meng de inhoud door het buisje 5 keer rustig ondersteboven te draaien. Zie je witte of doorzichtige draadjes ontstaan? **Dit is je DNA!**



8. Als je een DNA-ketting gaat maken, krijg je van je docent of TOA een glazen flesje. Breng het geprecipiteerde DNA met een plastic pipet voorzichtig over in het glazen flesje. Voeg daarna nog 750  $\mu$ l tot 1 ml alcohol toe (uit je eigen reageerbuisje). De docent of TOA helpt je daarna met het sluiten van het flesje.

Als je geen DNA-ketting maakt, kun je het DNA bewaren in een schroefdopbuisje. Breng het geprecipiteerde DNA samen met ongeveer 500  $\mu$ l uit je reageerbuisje en pipeteer het in het schroefdopbuisje. Sluit het schroefdopbuisje tenslotte af en je hebt je eigen DNA in je handen!





## **Leerlingenhandleiding: uitgebreid**

**DNA-isolatie uit wangslimvliescellen  
Je eigen DNA gevangen!**

### **Inhoud**

- Les 1** Inleiding en achtergrondmateriaal
- Les 2** Isoleren wangslimvliescellen, isoleren DNA en precipiteren
- Les 3** DNA-ketting maken (optioneel)

# Leerlingenhandleiding

## DNA-isolatie uit wangslijmvliescellen - Vang je genetische essentie in een fles

### Inleiding

In dit practicum ga je uit je eigen wangslijmvliescellen DNA isoleren. Hiervoor gebruik je simpele technieken, maar deze technieken worden ook veelvuldig op laboratoria gebruikt. Aan het eind heb je je eigen DNA in een flesje dat je als een ketting om je nek kunt hangen. Heel veel plezier!

### Wat is DNA en wat doet het?

Deoxyribonucleïnezuur (afgekort DNA, de “A” staat voor “acid”) is een molecuul dat aanwezig is in alle levende wezens, zoals bacteriën, planten en dieren. Je DNA bevat alle informatie die je van je ouders hebt geërfd. Soms wordt het DNA een biologische “bouwtekening” genoemd. Het bepaalt namelijk voor een belangrijk deel het uiterlijk van een individu. Hierbij kun je denken aan: haar-, oog- en huidskleur, lengte, bloedgroep en vele andere eigenschappen. Maar het bevat ook alle informatie over eigenschappen die bij iedereen gelijk zijn: bijvoorbeeld over de bouw van organen en ledematen. Je DNA is voor de helft afkomstig van je moeder en voor de helft van je vader. Daarom lijken we in bepaalde eigenschappen ook op onze ouders.

### DNA-structuur

Op moleculair niveau lijkt DNA op een gedraaide ladder of een wenteltrap. Deze ladder bevat twee strengen DNA, waarbij steeds paren van chemische bouwstenen de treden vormen. Deze chemische bouwstenen worden **stikstofbasen** genoemd en de structuur een dubbele helix. De stikstofbasen vormen de genetische code. Ze worden aangeduid met de letters **A, G, T** en **C** (afkortingen voor respectievelijk adenine, guanine, thymine en cytosine). Elke stikstofbase vormt samen met een suiker en een fosfaatgroep een **nucleotide**. De stikstofbases paren altijd op dezelfde wijze: A met T en G met C.



Fig. 3. Een schematische weergave van DNA.

De letters in deze DNA-code werken net als de letters van ons alfabet. Met de 26 letters van ons alfabet kunnen we woorden maken. En met deze woorden kunnen we een vrijwel oneindige hoeveelheid boodschappen en informatie creëren. Op een vergelijkbare manier zijn de vier letters van het DNA gerangschikt in begrijpelijke boodschappen voor cellen. Deze boodschappen worden **genen** genoemd. Deze genen bevatten de informatie om **eiwitten** te maken. Eiwitten zijn de basis voor bijna alle functies en structuren in het lichaam en de cellen.

Jouw DNA-volgorde is de complete volgorde van chemische letters in je **genoom**, oftewel al je DNA bijelkaar. Wetenschappers hebben ontdekt dat DNA-volgorde van alle mensen voor 99,9% identiek zijn. Die 0,1% variatie in DNA-volgorde tussen individuen maakt elk mens dus uniek.

### **Genoom, chromosomen, genen, DNA, RNA en eiwitten**

Op een paar uitzonderingen na, vind je DNA in alle cellen van een organisme. In menselijke cellen zit het DNA in de **kern**. Als een cel deelt (voor groei, reparatie of voortplanting), wordt het DNA in de kern gekopieerd en daarna sterk gespiraliseerd, zodat de afzonderlijke DNA-moleculen, de **chromosomen**, zichtbaar worden. Het DNA in de kern van een menselijke cel is verdeeld over 46 chromosomen, die ongeveer 40.000 genen bevatten met de informatie om het menselijk lichaam te bouwen.

Vergelijk het genoom met een enorme verzameling kookboeken: om een maaltijd te bereiden heb je niet alle recepten nodig uit die verzameling. Je hebt ook niet alle genen nodig om een cel te laten functioneren. In elke cel staan alleen de genen aan die nodig zijn voor dat specifieke celtype (bv. levercellen of spiercellen). Elke cel bevat dus alle informatie (het gehele genoom), maar cellen gebruiken verschillende genen.

Alhoewel genen de informatie bevatten voor eiwitten, wordt deze informatie niet direct afgelezen voor de eiwitsynthese. Er is een tussenstap. Eerst wordt van een gen een kopie gemaakt. Deze kopie noemen we mRNA (messenger ribonucleic acid). Het mRNA beweegt van het DNA in de kern naar het cytoplasma waar de ribosomen liggen. De ribosomen zijn de eiwitfabrieken van de cel. Daar wordt de genetische informatie vertaald in een aaneenschakeling van aminozuren die samen een werkend eiwit zullen vormen. Het zijn de eiwitten in een cel die de cel zijn eigenschappen geven.

Vragen:

1. **Leg het verschil uit tussen DNA, chromosomen en genen. Leg het zo uit dat een twee jaar jongere leerling het antwoord kan begrijpen..**
2. Bevat een levercel net zoveel chromosomen als een wangslimvliescel?
3. Stel, je wilt het gen voor een eiwit in de maag kopiëren en isoleren. Kun je dit gen vinden in en isoleren uit een wangslimvliescel? Leg uit.

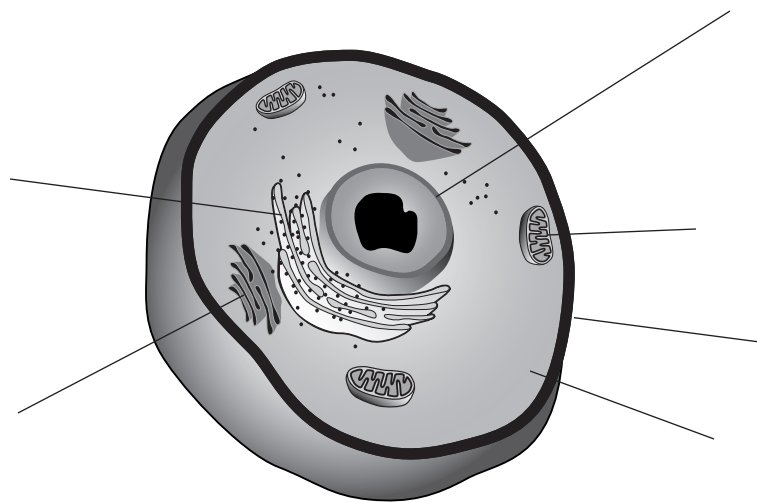
### Hoe wordt DNA uit cellen geïsoleerd?

#### Stap 1: Cellen verzamelen

De eerste stap bij het isoleren van DNA is het verzamelen van genoeg cellen. De binnenkant van de mond is een uitstekende bron voor cellen. De cellen in de mond delen regelmatig en liggen relatief los. Door met een speciale borstel langs de binnenkant van je mond te schrapen, verzamel je voldoende cellen om DNA uit te isoleren.

Vragen:

Hieronder zie je een schematische tekening van een dierlijke cel.



4. Geef in de tekening de verschillende onderdelen van de cel aan.

5. Waar in de cel vind je het genomische DNA?
6. Wat is de functie van het kopiëren van de informatie op het DNA naar mRNA voordat het vertaald kan worden naar eiwitten?

### **Stap 2: Openbreken cellen (lysis)**

De eerste stap om het DNA vrij in oplossing te krijgen, is het openbreken van de cellen. Dit ga je doen met behulp van een wasmiddel. Membranen in de cel zijn opgebouwd uit fosfolipiden en deze lossen op in de aanwezigheid van een wasmiddel. De cellen die je losschraapt uit je mond, voeg je toe aan een oplossing met wasmiddel.

#### **Vragen:**

7. Nadat de membranen kapot gemaakt zijn, komt het DNA in de oplossing. Het DNA is niet het enige molecuul in de cel. Noem zoveel mogelijk andere moleculen die veel in de cel voorkomen.
8. Hoe kun je de andere cellulaire moleculen afbreken, zodat je schoon DNA overhoudt?

### **Stap 3: Protease breekt eiwitten af**

Een van de andere moleculen in een cel die dwars kunnen zitten bij het isoleren van zuiver DNA is eiwit. Het eiwit ga je verwijderen door een enzym te gebruiken dat specifiek eiwitten afbreekt. Dit enzym, protease, breekt de peptidebindingen tussen de aminozuren van eiwitten. Op deze wijze breek je ook de DNAses af, enzymen die DNA afbreken.

#### **Vragen:**

9. De protease die gebruikt wordt, heeft zijn optimumtemperatuur bij 50°C. Denk je dat dit enzym geïsoleerd is uit *E. coli*- bacteriën? Leg je antwoord uit. (Tip: waar leeft *E. coli*?)
10. Vleesvermalser wordt vaak gebruikt om taai vlees, zoals biefstuk, malser te maken. Biefstuk is niets anders dan eiwitrijke spieren. Hoe denk je dat vleesvermalser werkt?

### Stap 5: DNA onoplosbaar maken

Je gaat het DNA uit de oplossing halen door zout toe te voegen. DNA is onder de proefomstandigheden negatief geladen. Dit komt door de fosfaatgroepen in het DNA. De elektrische lading maakt het DNA oplosbaar in water. Wanneer zout (natriumchloride) wordt toegevoegd aan de oplossing, worden de positieve natriumionen aangetrokken door de negatieve ladingen op het DNA. De DNA-moleculen kunnen hierdoor bij elkaar in buurt komen in plaats van elkaar afstoten.

### Step 5. Precipiteren van DNA met alcohol

Om het DNA van de andere moleculen in het celextract te scheiden ga je ijskoude alcohol toevoegen. Na toevoeging van ijskoude alcohol precipiteert het DNA, omdat het minder goed oplost in alcohol dan in water. Hoe kouder de alcohol, hoe onoplosbaarder het DNA. Vergelijk het met de oplosbaarheid van suiker in thee; In warme thee lost suiker makkelijker op dan in ijsthee.

Door het zout en de alcohol precipiteert en aggregeert het DNA, totdat je het met het blote oog kunt zien. De andere moleculen in de oplossing, zoals aminozuren en koolhydraten, blijven opgelost in het water en de alcohol. De witte draden die je ziet zijn duizenden DNA-strengen aan elkaar geplakt. Je ziet het DNA van duizenden van je eigen cellen!

#### Vragen:

11. Zet de juiste activiteiten rechts bij de uitkomsten van de activiteiten links.

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| ___ Oogsten cellen                 | A. Met een borstel de binnenkant van je wang schrappen |
| ___ Oplossen celmembranen          | B. Protease toevoegen en bij 50°C incuberen            |
| ___ Neerslaan van DNA              | C. toevoegen aan oplossing met zeep                    |
| ___ Afbreken van eiwitten          | D. Ijskoude alcohol toevoegen                          |
| ___ DNA onoplosbaar maken in water | E. Zout toevoegen                                      |

## DNA isolatie uit wangslimvliescellen: protocol

### Vang je genetische essentie in een flesje

#### Gemeenschappelijke proefopstelling (bij leraar)

Waterbad op 50°C

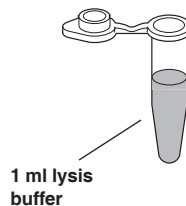
Fles ijskoude isopropanol (91%) of ethanol (95%) in bak met ijs

<b>Proefopstelling voor leerlingen (4 lln per opstelling)</b>	<b>Hoeveelheid</b>
Doorzichtige microreageerbuisjes met 1 ml lysisbuffer	4
Blauwe microreageerbuisjes “ <b>prot</b> ” met 250 µl protease	1
Roze microreageerbuisjes “ <b>zout</b> ” met 500 µl zout	1
Doorzichtige schroefdopbuisjes	4
Verschillende kleuren schroefdoppen	4
Cytology borstels	8
5 ml rondbodemp reageerbuisjes	4
Parafilm (kleine vierkantjes)	4
Wegwerp plastic pipetten	4
Schuimrubber microreageerbuishouder	1
Watervaste stiften	1
Plastic bekertje als afvalbakje	1

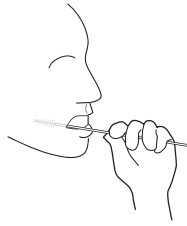
#### Stap 1 en 2: Verzamelen en openbreken cellen

Je gaat eerst cellen verzamelen uit je mond. Hiervoor gebruik je twee borstels, die je voorzichtig door je mond gaat halen. De cellen op beide borstels voeg je daarna samen in een buisje met lysisbuffer. Voor een succesvolle proef is het belangrijk dat je genoeg cellen verzamelt. Houd je daarom aan de aangegeven tijden en breng de cellen voorzichtig over in het buisje.

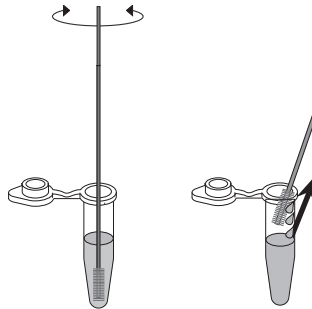
1. Pak één doorzichtig microreageerbuisje met 1 ml lysisbuffer en zet je naam erop met een watervaste stift.



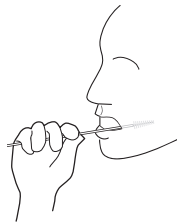
2. Neem de eerste borstel en schraap voorzichtig langs de binnenkant van je rechterwang en in de ruimte tussen je tandvlees en wang. Doe dit precies 1 minuut. Borstel redelijk stevig, maar doe jezelf geen pijn.



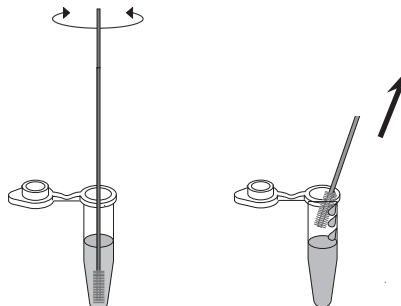
3. Plaats de borstel met wangslimvliescellen in de micoreageerbuis met lysisbuffer. Draai de borstel rond (tussen je vingers) om de cellen van de borstel in de oplossing te krijgen. Schraap de borstel ook nog af aan de bovenrand van het reageerbuisje om zoveel mogelijk cellen te verzamelen. Gooi de borstel daarna weg in de afvalbak.



4. Neem een tweede, schone borstel. Schraap voorzichtig langs de binnenkant van je linkerwang, in de ruimte tussen je tandvlees en wang, langs je gehemelte en onder je tong. Probeer weer zoveel mogelijk cellen te verzamelen.



5. Plaats de borstel met wangslimvliescellen in dezelfde micoreageerbuis met lysis buffer. Draai de borstel weer rond om de cellen van de borstel in de oplossing te krijgen. Schraap de borstel weer af aan de bovenrand van het reageerbuisje. Gooi de borstel daarna weg in de afvalbak.



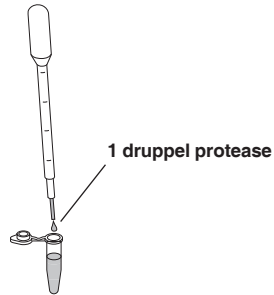
Leerlingenhandleiding: uitgebreid



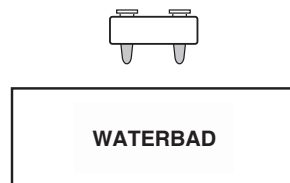
6. Doe het dopje op de microreageerbuis en draai deze 5 keer ondersteboven.

### Stap 3: eiwitten verwijderen

1. Pak het reageerbuisje met “prot”. Voeg uit dit buisje met een plastic pipet 1 druppel protease bij jouw microreageerbuisje met cellen. Doe het dopje op je microreageerbuisje en draai deze 5 keer voorzichtig om.



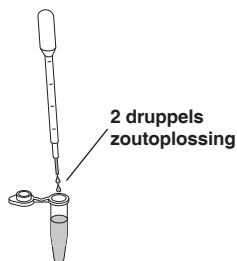
2. Zet je microreageerbuisje met cellen in de schuimrubber reageerbuisshouder en plaats deze 10 minuten in het waterbad van 50°C.



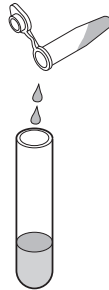
10 min. 50°C

### Stap 4 en 5: DNA zichtbaar maken

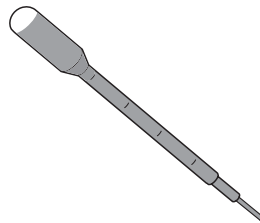
1. Haal je microreageerbuis uit het waterbad en voeg 2 druppels “zout” toe. Doe het dopje op je microreageerbuisje en draai deze 5 keer voorzichtig om.



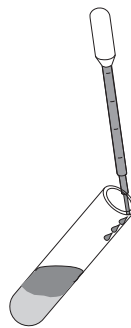
2. Zet je naam op een 5 ml rondbodemp reageerbuisje en giet je oplossing met cellen erin.



3. Vul een schone, plastic pipet met ijskoude alcohol (vraag de docent of TOA om de alcohol).



4. Houd de rondbodemp reageerbuis in een hoek van  $45^\circ$  en voeg langzaam de alcohol toe. Laat de alcohol voorzichtig langsde binnenkant van het buisje naar beneden lopen. Als het goed is zie je twee lagen (boven en onder) ontstaan. Wat gebeurt er op de plek waar de twee lagen elkaar ontmoeten? Schrijf op wat je ziet.

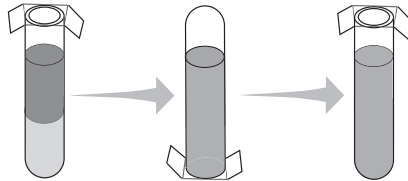


5. Zet de reageerbuis in de schuimrubber houder en laat de reageerbuis 5 minuten **rustig** staan bij kamertemperatuur.



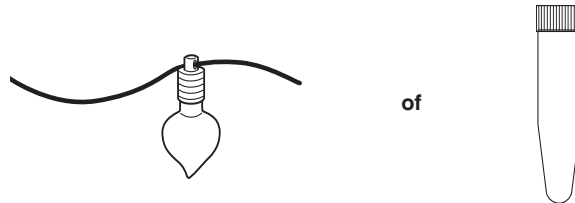
6. Wat zie je na 5 minuten op de plek waar beide lagen, de celoplossing en alcohol, elkaar ontmoeten? Schrijf weer op wat je ziet. Zien de buisjes van klasgenoten er hetzelfde uit?

7. Sluit de bovenkant van je buisje af met een stukje Parafilm. Zet je duim op de Parafilm en meng de inhoud door het buisje 5 keer rustig ondersteboven te draaien. Zie je witte of doorzichtige draadjes ontstaan? **Dat is je DNA!**



8. Als je een DNA-ketting gaat maken, krijg je van je docent of TOA een glazen flesje. Breng het geprecipiteerde DNA met een plastic pipet voorzichtig over in het glazen flesje. Voeg daarna nog 750  $\mu$ l tot 1 ml alcohol toe (uit je eigen reageerbuisje). De docent of TOA helpt je daarna met het sluiten van het flesje.

Als je geen DNA-ketting maakt, kun je het DNA bewaren in een schroefdobuisje. Breng het geprecipiteerde DNA samen met ongeveer 500  $\mu$ l uit je reageerbuisje en pipetteer het in het schroefdobuisje. Sluit het schroefdobuisje tenslotte af en je hebt je eigen DNA in je handen!



Parafilm is a trademark of American National Can Co. Styrofoam is a trademark of Dow Chemical Co.



Bio-Rad  
Laboratories, Inc.

---

Life Science  
Group

Web site [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com) Bio-Rad Laboratories Main Office 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, Ph. (510) 741-1000, Fx. (510) 741-5800  
Also in: Australia Ph. 02 9914 2800, Fx. 02 9914 2889 Austria Ph. (01) 877 89 01, Fx. (01) 876 56 29 Belgium Ph. 09-385 55 11, Fx. 09-385 65 54  
Brazil Ph. 55 21 507 6191 Canada Ph. (905) 712-2771, Fx. (905) 712-2990 China Ph. (86-21) 63052255, Fx. (86-21) 53964775  
Czech Republic Ph. (420) 2-4141 0532 Fx. (420) 2-4143 1642 Denmark Ph. 45 44 52-1000, Fx. 45 4452 1001  
Finland Ph. 358 (0)9 804 2200, Fx. 358 (0)9 804 1100 France Ph. 01 47 95 69 65, Fx. 01 47 41 9133 Germany Ph. 089 318 84-177, Fx. 089 318 84-123  
Hong Kong Ph. 852-2789-3300, Fx. 852-2789-1257 India Ph. (91-124)-6398112/113/114, 6450092/93, Fx. (91-124)-6398115/6450095  
Israel Ph. 03 951 4127, Fx. 03 951 4129 Italy Ph. 39 02 216091, Fx. 39 02 21609399 Japan Ph. 03-5811-6270, Fx. 03-5811-6272  
Korea Ph. 82-2-3473-4460, Fx. 82-2-3472-7003 Latin America Ph. 305-894-5950, Fx. 305-894-5960 Mexico Ph. 52 5 534 2552 to 54, Fx. 52 5 524 5971  
The Netherlands Ph. 0318-540666, Fx. 0318-542216 New Zealand Ph. 64-9-4152280, Fx. 64-9-443 3097 Norway Ph. 47-23-38-41-30, Fx. 47-23-38-41-39  
Poland Ph. (48) 22-8126 672, Fx. (48) 22-8126 682 Portugal Ph. 351-21-472-7700, Fx. 351-21-472-7777 Russia Ph. 7 095 721 1404, Fx. 7 095 721 1412  
Singapore Ph. 65-2729877, Fx. 65-2734835 South Africa 00 27 11 4428508, Fx. 00 27 11 4428525 Spain Ph. 34 91 590 5200, Fx. 34 91 590 5211  
Sweden Ph. 46 (0)8-55 51 27 00, Fx. 46 (0)8-55 51 27 80 Switzerland Ph. 061 717-9555, Fx. 061 717-9550 United Kingdom Ph. 0800-181134, Fx. 01442-259118