

UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

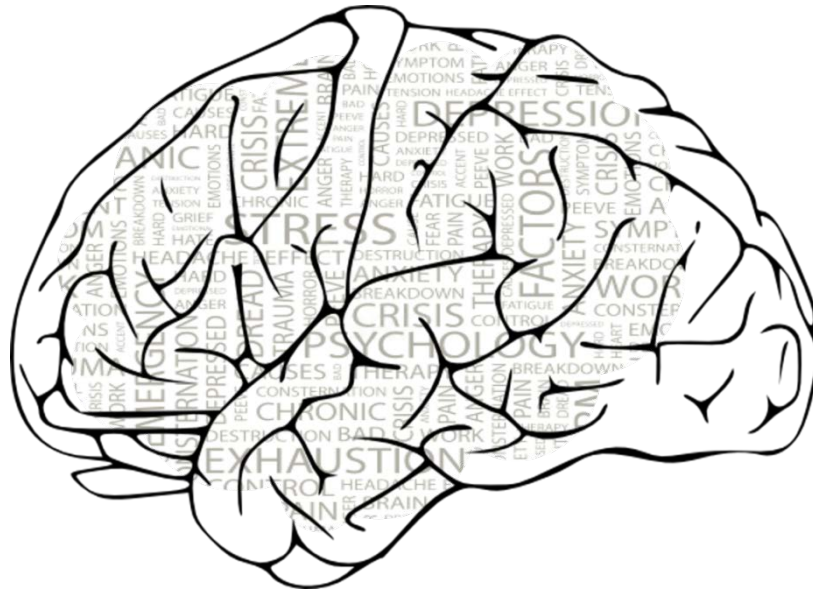
Practicumhandleiding

Celbiologie

Psychobiologie jaar1

5102CELB9Y

Coördinator: Dr. Marco Hoekman
Practicumcoördinator: Dr. Ilja Boor
2013-2014



Practicum Celbiologie

5102CELB9Y

Periode 4: februari- maart 2014

I hear and I forget

I see and I remember

I do and I understand

- *Chinees gezegde*

Contact informatie en belangrijke personen

Psychobiologiejaar1-science@uva.nl

Coördinator: Dr. Marco Hoekman
Practicumcoördinator: Dr. Ilja Boor

Assistenten: Dr. Linda Holtman (ABV docent)
Dr. Nico Romeijn (ABV docent)

Cindy Wagemans MSc (hoofdassistent)

Amber Bernedis van Berlekom

Bart de Vries

Bastijn van den Boom

Boris Berkhout

Elias Brandorff

Eva van Zelm

Garian Ohlsen

Janniek Wester

Joany Annegarn

Julia Sassi

Jurrien Fransen

Kas Houthuijs

Melanie Soeter

Milo de Baat

Steven Heshusius

Ynse Deinema

Inhoudsopgave

Leerdoelen	4
Practicumregels	5
Veiligheid	6
Algemeen	6
Gevaarlijke stoffen en apparatuur	6
Afvalverwerking	6
Tips en Tricks voor het practicum	8
Overzicht practicum voorbereidingen	9
Algemene introductie practica	10
Het labjournaal	11
Labjournaalfeedbackformulier	15
Beoordeling	16
Automatische pipet	18
Werken met vloeistoffen	19
Kiezen tussen glas of plastic	20
Introductie lichtmicroscopie	21
Het gebruik van een Fluorescentiemicroscoop	22
Tekeninstructies	23
Steriel werken met microbiologische culturen	24
Het gestresste brein	28
Dagdeel 1: Bootcamp	31
Dagdeel 2: PCR glucocorticoïde receptor	34
Dagdeel 3: Opzuiveren PCR product /Restrictie digestie /DNA extractie	43
Dagdeel 4: Ligatie / Transformatie	52
Dagdeel 5: Colony PCR	60
Dagdeel 6: Mini-prep DNA isolatie	64
Dagdeel 7: Cellen uitzetten	68
Dagdeel 8: Calciumfosfaat transfecties	73
Dagdeel 9: Translocatie assay	75
Dagdeel 10 en 11: Analyse resultaten	79

Leerdoelen

Het practicum Celbiologie heeft twee hoofddoelen. Het eerste is om aan de hand van verschillende veel gebruikte moleculair biologische technieken de translocatie van het glucocorticoïde receptor- green fluorescent protein-fusie eiwit te bestuderen. Het tweede is om het kritisch denken verder te ontwikkelen.

Wat je moet kennen en kunnen is in de volgende algemene leerdoelen beschreven:

- Je kunt de theoretische achtergronden van de volgende technieken beschrijven:
 - o DNA isolatie
 - o PCR
 - o (sub)Kloneren
 - o Transformeren
 - o Transfecteren
 - o Translocatie assay
- Je kunt bovenstaande technieken op een correcte manier uitvoeren.
- Je kunt een experiment reproduceerbaar en nauwkeurig uitvoeren.
- Je kunt de samenhang tussen de verschillende experimentele stappen beschrijven.
- Je kunt een labjournaal correct bijhouden.
- Je kunt de voortgang van je experiment evalueren.
- Je kunt professioneel samenwerken met je duo partner tijdens experimenten.

Practicumregels

Hieronder staan de practicumregels die we hanteren om de practica zo veilig, efficiënt en plezierig mogelijk te laten verlopen en om jullie de beste leeromgeving te bieden. We vragen je deze goed door te lezen en ter harte te nemen.

- PRACTICA ZIJN VERPLICHT. Er wordt een presentielijst bijgehouden. Mocht je door overmacht niet in staat zijn om op het practicum aanwezig te zijn, meld dit dan VOORAFGAAND aan het practicum per EMAIL bij de practicumcoördinator Ilja Boor (psychobiologiejaar1-science@uva.nl). Afwezigheid zonder geldige reden of zonder afmelding kan tot uitsluiting van het gehele verdere practicum leiden met alle mogelijke gevolgen van dien voor de eindbeoordeling.
 - o Toelichting: het niet-voldoen aan de practicumverplichting betekent: geen eindcijfer voor het vak en geen toelating tot het 2de jaar.
- KOM OP TIJD. Ook dit hoort bij een academische houding. Als je te laat komt voldoe je bovendien niet aan de aanwezigheidsverplichting.
- BEREID JE VOOR OP ELK PRACTICUM. Lees de beschrijving in de practicumhandleiding over het betreffende practicumdagdeel en de bijbehorende hoofdstukken in het boek. Maak daarnaast de thuisopdrachten en bekijk de filmpjes die op BlackBoard staan. Voor een overzicht van de voorbereidingen zie het schema op BlackBoard.
 - o Toelichting: Om zo veel mogelijk te kunnen leren tijdens het practicum is een goede voorbereiding essentieel. Dit is je kans op de theorie toe te passen in de praktijk. Hoe beter je bent voorbereid hoe meer je je kunt richten op het aanleren van vaardigheden. Daarnaast is het dan makkelijker om een koppeling te maken tussen theorie en praktijk.
- LEVER DE OPDRACHTEN in VOOR DE DEADLINE. Vaak wordt je gevraagd de opdrachten in je labjournaal te maken en dit in te leveren.
- MOBIELE TELEFOONS EN ANDERE STORENDE APPARATUUR UITSCHAKELEN tijdens het practicum.
- LAPTOP IS NIET TOEGESTAAN in de practicumzaal tenzij daar specifiek toestemming voor wordt gegeven.
- Breng LABJAS, LABJOURNAAL (met naam en collegenummer duidelijk vermeld op de buitenkant) en TEKENPOTLODEN ieder practicum mee.

Veiligheid

Tijdens het practicum Celbiologie wordt gewerkt met apparatuur en stoffen die risico's voor de gezondheid met zich mee kunnen brengen. Lees daarom de volgende punten zorgvuldig door.

Algemeen

- Vraag je altijd af of de stoffen en organismen waarmee je werkt schadelijk zijn voor de gezondheid en het milieu.
- GEEN ETEN EN DRINKEN OP DE PRACTICUMZAAL.
- TASSEN en JASSEN NIET TOEGESTAAN IN DE PRACTICUMZAAL.
- WAS JE HANDEN altijd bij het verlaten van de practicumzaal en als daartoe enige aanleiding is.
- HET DRAGEN VAN EEN LABJAS, deugdelijk schoeisel (geen naaldhakken en rollerskates), en eventueel een veiligheidsbril, ZIJN VERPLICHT.
- HET IS VERBODEN DE LABJAS BUITEN DE PRACTICUMZAAL TE DRAGEN om te voorkomen dat je organismen mee naar buiten neemt en/of voorwerpen met chemicaliën contamineert.
- HET IS VERBODEN AAN BEIDE HANDEN EEN HANDSCHOEN TE DRAGEN. Behalve als hier uitdrukkelijk toestemming voor gegeven wordt.
 - o Deze regel geldt gedurende al het praktische werk en is bedoeld om je voortdurend bewust te laten zijn wat wel en wat niet mogelijk gecontamineerd is.
- LOSHANGEND HAAR SAMENBINDEN.
- Zorg ervoor dat je weet waar zich vluchtwegen, brandblussers, oogdouches en branddouches bevinden.
- Zorg voor een opgeruimde werkomgeving. Laat geen jassen en tassen op de labzaal rondslingeren. Werk netjes! Ruim gemorste chemicaliën direct op en ruim aan het eind van iedere dag de labtafel op en maak deze schoon.

Gevaarlijke stoffen en apparatuur

- ETIDIUMBROMIDE: intercaleert in DNA (dus ook in DNA van studenten!) en is mogelijk carcinogeen.
- ULTRAVIOLET (UV) LICHT: brandwonden en schade aan ogen en DNA kunnen het gevolg zijn. Draag dus altijd een perspex gezichtsmasker bij het gebruik van de UV-lichtbak.
- MAGNETRON: wordt gebruikt om agarose op te koken. Door het verschijnsel "kookvertraging" kan de oplossing op onverwachte momenten heftig gaan koken. Pas dus op voor ogen en handen!
- CENTRIFUGES: bij verkeerd gebruik (b.v. geen tegenbuis of tegenbuis met verkeerd gewicht) kunnen ongelukken gebeuren. Tarreer dus altijd de buizen en centrifugeer nooit met open deksel.

Afvalverwerking

- Op zaal staat een speciale afvalbak voor BIOLOGISCH AFVAL. Het mag dus niet door de gootsteen worden weggespoeld of in andere afvalbakken worden weggegooid.
- Op zaal staat een speciale afvalbak voor CHEMISCH AFVAL. Het mag dus niet door de gootsteen worden weggespoeld of in andere afvalbakken worden weggegooid. Let op; er is een aparte container voor halogeenrijk afval.

RAADPLEEG BIJ TWIJFEL ALTIJD JE PRACTICUMASSISTENT!!!

Verdunde basen



Diluted base

Halogeen arme oplosmiddelen



Halogeen-poor solvents

Verdunde zuren, zware metalen in oplossing

Salpeter-, zwavel- en perchloorzuur elk gescheiden inleveren



Diluted acid heavy metals in solution
Nitric acid, sulfuric acid and perchloric acid should be delivered separately

Halogeen rijke oplosmiddelen



Halogeen-rich solvents

Ontwikkelaar



Developer

Fixeer



Fixative

Messen
Spuiten



Knives
Syringes

Vast chemisch afval, verontreinigd glaswerk en papier, lege chemicaliën verpakkingen, disposables, gesteriliseerd VMT-materiaal



Solid chemical waste, contaminated glass and paper, empty packages of chemicals, disposables, sterilised VMT material

Blauwe 50 liter vaten en zwarte of blauwe 200 liter vaten

Blue barrels of 50 liters and black or blue barrels of 200 liter

Dierlijk afval



Animal waste

Vaten van 25 of 50 liter

Barrels of 25 and 50 liter

Tips en Tricks voor het practicum

- LEES nogmaals RUSTIG door wat er die dag moet gebeuren.
- Gebruik je TIJD EFFICIENT. Er zullen hier en daar wachttijden tussen de experimenten zijn. Deze tijd kan goed worden gebruikt voor het maken van opdrachten en beantwoorden van vragen, het lezen van de handleiding of het doorspreken van het experiment met elkaar en de practicumassistent.
- Dit practicum is één doorlopend experiment, waarbij elke onderdeel even belangrijk is om na acht weken een goed eindresultaat te boeken. Hou je lopend labjournaal dus goed bij!
- Voor alle enzymatische reacties: enzymen moeten altijd koud gehouden worden om inactivatie te voorkomen (enzymen zijn duur); voeg het enzym als laatste toe.
- Maak altijd een pipetteer schema en merk je epjes, dit kan problemen voorkomen. Zeker in het geval dat we apparatuur delen en/of als je pas een volgend practicum verder gaat met je experiment.

-----Veel plezier-----

Overzicht practicum voorbereidingen

De experimenten worden uitgevoerd in groepjes van twee, maar jullie moeten je zelfstandig voorbereiden op de practica. Op BlackBoard staat in een tabel overzichtelijk per practicum dagdeel wat we gaan doen en wat je moet voorbereiden.

De voorbereiding

Lees voor aanvang van het experiment het betreffende hoofdstuk uit de handleiding zorgvuldig door. Hierin staat achtergrondinformatie over het experiment en een protocol met handelingen die je moet uitvoeren. Er staan soms verwijzingen naar boekhoofdstukken, webpagina's of YouTube filmpjes op BlackBoard. Lees dit allemaal nauwgezet door. Waarschijnlijk moet je de tekst meer dan één keer lezen om goed te kunnen begrijpen waar het experiment over gaat en hoe het is opgezet. Vragen die je hebt naar aanleiding van het lezen van het betreffende hoofdstuk mag je altijd stellen aan je practicumassistenten.

Algemene introductie practica

De belangrijkste doelen van practica in het eerste jaar zijn het leren van technieken en onderzoeksmethoden, het illustreren van theoretische concepten en de toepassing van technieken en het ontwikkelen van een academische houding. Tijdens het practicum Celbiologie ga je aan de hand van verschillende veel gebruikte moleculair biologische technieken de translocatie van het glucocorticoïde receptor- green fluorescent protein- fusie eiwit bestuderen in humane cellen. Dit practicum is één doorlopend experiment, dus jullie werken elk dagdeel verder met je eigen resultaten. Hierdoor is jullie verantwoordelijkheid voor het slagen van het experiment en het behalen van het eindresultaat ook groter dan bij het vorige blok Genetica en Evolutie. Over de eindresultaten schrijf je bij het vak Academische Basis Vaardigheden een onderzoeksverslag. Verder ga je kennis en vaardigheden die je bij Methoden van Onderzoek en Statistiek en bij Academische Basisvaardigheden hebt geleerd toepassen.

Wat wordt er van de student verwacht?

Aanwezigheid

Deelname aan de practica is verplicht. Let op: ook als je te laat komt voldoe je niet aan de aanwezigheidsplicht (zie ook hoofdstuk practicumregels).

Academische houding

Tijdens dit practicum gaan we jullie academische houding verder ontwikkelen en je wordt hierop ook beoordeeld (zie beoordelingsmodel). Onder een academische houding verstaan we dat je je actief inzet (interesse toon, vragen stelt) en goed voorbereid verschijnt (literatuur en handleiding gelezen, YouTube filmpjes bekeken, opdrachten gemaakt; voor samenvatting voorbereidingen zie voorbereidingsschema in handleiding en op BlackBoard). Onder een academische houding valt ook kritisch denken. We stimuleren het kritisch denken door het stellen van vragen aan elkaar en aan (of door) de practicumassistent over de experimenten die je hebt uitgevoerd. Verder ontwikkelen we het kritisch denken door het geven en ontvangen van feedback, door te discussiëren over wetenschappelijke experimenten en tijdens de post-lab reflecties. Tenslotte stimuleren we de academische houding doordat jullie werken in duo's. We verwachten dat jullie dit gebruiken om elkaar te helpen, feedback te geven en elkaar aan te vullen.

Voor meer informatie over de academische houding zie Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 1 paragraaf 1.1 en 1.2 Academische Houding; paragraaf 1.3 Kritisch denken; paragraaf 1.4 Feedback; paragraaf 1.5: Reflectie.

Bijhouden labjournaal

Je houdt van het hele practicum een labjournaal bij waarop je meerdere keren feedback ontvangt van de practicumassistent. Daarnaast beoordeel je zelf ook je labjournaal aan de hand van het labjournaalfeedback formulier. Dit helpt je om zelf kritisch naar je eigen labjournaal te kijken en te checken of alles erin staat.

Wat kan er van de practicumassistenten worden verwacht?

De practicumassistent is vooral de begeleider van je individuele leerproces en maakt door middel van feedback inzichtelijk hoe het met de ontwikkeling van de verschillende vaardigheden staat. De practicumassistent begeleidt je tijdens het uitvoeren van de experimenten, geeft feedback op de academische houding en labjournaal en adviseert de practicumcoördinator over je eindcijfer. Daarnaast stimuleert de practicumassistent een actieve werkhouding.

Het labjournaal

Er zijn verschillende soorten wetenschappelijke verslaglegging met elk zijn eigen kenmerken en voorwaarden. Het heeft bijna altijd een informatieve en/of communicatieve functie waarbij onderzoekers aan zichzelf, vakgenoten of de maatschappij laten zien welk onderzoek ze gedaan hebben en welke resultaten uit dit onderzoek zijn gekomen. Het verslag moet voldoende informatie geven om het onderzoek te kunnen beoordelen en eventueel te repliceren. Om dit te bereiken worden alle fasen van de empirische cyclus op zodanig wijze weergegeven dat de lezer alle denkstappen, observaties en gegevens (ook eerdere theorievorming en experimenten) kan volgen, nagaan en voor zichzelf kan verifiëren om tot een conclusie te komen. Binnen de levenswetenschappen begint een goede verslaglegging van praktische en theoretische experimenten met het nauwkeurig bijhouden van het labjournaal. Hoe je een labjournaal precies moet bijhouden wordt hieronder uitgelegd.

Labjournaal Principe 1: Schrijf ALLES op

Het is de bedoeling dat je meteen begint met het bijhouden van een labjournaal. Dit is het dagboek van je wetenschappelijke carrière die nu begint. Een labjournaal is een geschreven verslag van alles dat je hebt gedaan, zowel goed als slecht, met alle relevante waarnemingen, notaties, berekeningen, interpretaties, conclusies en plannen. Het is een databank met alle informatie die je nodig hebt om je experimentele resultaten te kunnen verantwoorden. Reken er niet op dat je morgen (laat staan over drie weken of maanden) nog weet welke van de experimenten je vandaag hebt gedaan, op welke wijze je het protocol hebt aangepast, waar je je potjes hebt neergezet, hoe je wat gelabeld hebt. Het is nog veel lastiger om je wetenschappelijke creatieve gedachten en ingevingen of suggesties van collega's te herinneren. Daarom is een nauwkeurig en correct bijgehouden labjournaal een MUST.

Vaste onderdelen in het labjournaal:

Elk experiment bestaat uit een aantal vaste onderdelen die je in je labjournaal noteert (zie tabel 2: Samenvatting vaste onderdelen labjournaal). Onderdelen 1.1 tot en met 1.3 moet je voor aanvang van het experiment thuis voorbereiden. Het lopend labjournaal, onderdeel 2, houdt je bij tijdens het lab. Onderdeel 3 en 4 moet je deels in het lab bijhouden en kun je tijdens het practicum en/of thuis verder uitwerken, behalve op de momenten dat je labjournaal wordt ingenomen ter beoordeling. Reserveer voor elk experiment voldoende bladzijden in je labjournaal, zodat je alles van één experiment op één plek hebt staan. Mocht dat niet lukken dan moet je duidelijk aangeven waar het vervolg van een experiment is terug te vinden in je labjournaal. Geef de vaste onderdelen duidelijk aan in je labjournaal. Dat is niet alleen voor jezelf maar maakt het beoordelen ook een stuk plezieriger.

Hieronder staat een korte toelichting per onderdeel:

Welk wetenschappelijke concepten worden onderzocht met dit experiment?

De meeste practica zijn bedoeld om je te helpen wetenschappelijke concepten (principes, theorie of wetten) te begrijpen en om technieken te leren en experimentele vaardigheden op te doen. Identificeer het wetenschappelijke concept en/of techniek dat je veronderstelt wordt te leren gebaseerd op de informatie van de practicumhandleiding en andere bronnen. Beschrijf het concept in een paar zinnen in je labjournaal eventueel aangevuld met schematische tekeningen. Het is de bedoeling dat je de concepten aan je studiegenoten en/of practicumassistenten kunt uitleggen. Als je moeite hebt om het wetenschappelijke concept van een experiment te achterhalen, lees dan de titel en inleiding nog een keer en zoek naar kernwoorden. Voorbeelden van wetenschappelijke concepten die we gebruiken tijdens dit practicum zijn: DNA isolatie, genexpressie, PCR en restrictie fragment analyse.

Wat is de onderzoeksvraag van dit experiment?

De onderzoeksvraag is het beoogde doel van het experiment en is meestal maar één zin lang en beschrijft waarom je het experiment doet (zie ook Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 2 paragraaf 2.2: De onderzoeksvraag).

Wat is de hypothese van dit experiment?

Probeer eerst de variabelen van dit experiment te identificeren (zie section 1.3 The analysis of Biological Data) en geef dan je hypothese (zie chapter 6 The analysis of Biological Data en Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 2 paragraaf 2.3: de onderzoekshypothese). Elke hypothese kan worden opgeschreven in een paar zinnen. Maak voor het formuleren van je hypothese gebruik van je kennis over de wetenschappelijke concepten van dit experiment. Leg kort uit hoe je tot deze hypothese bent gekomen

1. Mijn lopend labjournaal

Je lopend labjournaal is een beknopt en makkelijk te volgen beschrijving van de procedures die je in het lab hebt gevolgd. Het geeft voldoende detail over de materialen en procedure zodat het experiment kan worden herhaald op precies dezelfde wijze zoals je het gedaan heb.

Principe 2: Je labjournaal moet leesbaar, begrijpelijk en eerlijk zijn.

- WEES BONDIG!
- Noteer altijd datum en tijd van een activiteit.
- Noteer de tijd waarop je iets doet. Noteer wat je in werkelijk hebt gedaan. Dus niet – incubeer tussen de 2 en 12 uur. Dat is wat in het protocol staat, maar – incubatie 16.00 tot 17.00 – of - incubatie 60 min.
- Noteer de resultaten duidelijk in tabellen, figuren, schema's of tekeningen. Vergeet bijvoorbeeld niet om de lanen van gelfoto's duidelijk te labelen.
- Fouten zijn ook resultaten. Beschrijf en verklaar ze. Het is uitermate belangrijk dat je precies weet wat je gedaan hebt en niet net te doen alsof alles perfect volgens protocol is verlopen. Van je fouten leer je en kunnen prachtige nieuwe inzichten opleveren.
- Vergeet niet de recepten van oplossingen te geven. Voor dit practicum geldt dat je mag verwijzen naar de practicumhandleiding en dat je enkel de recepten moet geven als ze niet in de handleiding staan. Noteer altijd de concentratie, pH volumes, oorsprong van het materiaal, de naam van de persoon die de stock oplossing heeft gemaakt en wanneer de oplossing is gemaakt en elke afwijking van het protocol.
- Pipetteerschema. Je gaat straks zelf oplossingen maken en meestal is alleen de samenstelling voor een enkele reactie gegeven. Dus als je meerdere reacties tegelijk wilt uitvoeren moeten er aanpassingen worden gemaakt. Geef van te voren aan in een schema hoeveel van welke stof je nodig hebt.
- Gebruik je labjournaal voor de planning van een experiment (voorbereiding proefopzet).
- Als bladen in je labjournaal slordig of vies zijn, schrijf de informatie dan over. SCHEUR de betreffende bladen niet uit je labjournaal!
- Biedt weerstand aan de neiging om een super netjes labjournaal bij te houden. Het is bedoeld als een dagboek over werk in uitvoering. Als je een net labjournaal wilt, gebruik dan tweede labjournaal waar je na het labwerk het experiment in samenvat. Dit wil overigens niet zeggen dat je labjournaal onleesbaar mag zijn.

2. Resultaten

Hier beschrijf je je belangrijkste bevindingen objectief en in een logische volgorde, op het niveau van de voorspellingen. Geef de resultaten overzichtelijk weer in de vorm van 'visuals' (tabellen, foto's en grafieken). En label deze duidelijk (Tabel 1, figuur 2 etc). Schrijf bij elke visual een alinea met een korte samenvatting over de algemene trend en specifieke details die belangrijk zijn om de resultaten te begrijpen. De resultaten mogen niet worden geïnterpreteerd en er mogen geen conclusies worden getrokken (zie ook Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 9 paragraaf 9.4: resultaten).

3. Conclusie en Discussie

Elk experiment wordt afgesloten met een discussie (zie Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 9 paragraaf 9.5: discussie). De discussie bevat een aantal vaste onderdelen:

- Bespreekt resultaten op niveau hypothese. Kun je met deze resultaten de hypothese aannemen of verwerpen?
- Verwijs duidelijk naar specifieke resultaten die zijn gebruikt als bewijs voor de beslissing om de hypothese aan te nemen of te verwerpen
- Conclusie in een zin (uit de resultaten kan worden geconcludeerd dat....)
- Evaluatie en verklaringen van het onderzoek
 - o Waren er problemen of bronnen van onzekerheid in de procedure?
 - o Hoe verhouden je resultaten zich tot die van medestudenten en geeft verklaringen voor eventuele verschillen
- Terugkoppeling concepten
- Suggesties voor vervolgonderzoek

4. Post-lab reflecties

Schrijf na ieder practicum onderdeel de volgende post-lab reflectie in je labjournaal:

- Wat ging er goed en waarom?
- Wat kan er beter en waarom?
- Wat zou je als je het experiment kan herhalen anders doen?

5. Overige zaken labjournaal

- Gebruik de juiste opmaak voor tabellen, grafieken, figuren en tekeningen (zie ook Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 9 Onderzoeksverslag paragraaf 9.4 resultaten).
- Schrijf in wetenschappelijke taal in je labjournaal. Voor de juiste wetenschappelijke terminologie kun je gebruik maken van je concepten. Verder is wetenschappelijk taalgebruik objectief en zijn zinnen duidelijk en 'to the point' (zie ook Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 4 paragraaf 4.3: schrijfstijl en taalgebruik).

Labjournaalfeedbackformulier

Naam student: Student nummer: Naam practicumassistent:			+ / ± / -
Vorbereiding	Formele structuur	<ul style="list-style-type: none"> - Alle bladzijden en experimenten hebben nummer - Elk nieuw experiment staat op nieuwe bladzijde - Alle experimenten hebben een begin en eind datum - De titel van het experiment bevat alle sleutelwoorden 	
	Onderzoeksvraag	<ul style="list-style-type: none"> - De onderzoeksvraag is helder en correct geformuleerd - De onderzoeksvraag volgt logisch uit de concepten 	
	Hypothese	<ul style="list-style-type: none"> - De hypothese is helder en correct geformuleerd - De hypothese geeft antwoord op de onderzoeksvraag 	
	Proefopzet	<ul style="list-style-type: none"> - Het experiment geeft antwoord op de onderzoeksvraag - De proefopzet bevat een globaal overzicht door de belangrijkste stappen te noemen (eventueel weergeven in schema) 	
	Voorspellingen	<ul style="list-style-type: none"> - De voorspelling geeft de verwachtingen weer en is (statistisch) toetsbaar 	
Uitvoering	Materialen	<ul style="list-style-type: none"> - Van alle materialen is concentratie, zuurgraad en herkomst vermeld - Van alle gemaakte oplossingen is de berekening correct opgeschreven - Van alle gebruikte apparatuur zijn instellingen vermeld 	
	Methoden	<ul style="list-style-type: none"> - De beschreven methode geeft voldoende details om procedure in combinatie met het protocol te kunnen reconstrueren - Alle data, tijdstippen, hoeveelheden en concentraties zijn vermeld - Alle aanpassingen (en evt. fouten) op het protocol zijn vermeld - Wijze van labelen is vermeld 	
Uitwerking	Resultaten	<ul style="list-style-type: none"> - Alle onbewerkte resultaten en waarnemingen worden weergegeven - Figuren en tabellen zijn overzichtelijk, accuraat en volgens ABV normen weergegeven - Berekeningen zijn duidelijk en correct weergegeven 	
	Conclusie	<ul style="list-style-type: none"> - De interpretatie van de resultaten is logisch en 'to the point' 	

	Discussie	<ul style="list-style-type: none"> - De terugkoppeling van resultaten naar onderzoeksvraag en hypothese is helder en correct weergegeven - Deze terugkoppeling is logisch onderbouwd en verwijst naar relevante resultaten - Suggesties voor volgende experimenten, ideeën of andere wetenschappelijke ingevingen zijn vermeld 	
Vragen		<ul style="list-style-type: none"> - De voorbereidingsvragen en vragen gemaakt tijdens practicum zijn goed beantwoord 	
Post-lab reflecties		<ul style="list-style-type: none"> - De sterkte / zwakte analyse is argumentatief logisch onderbouwd - De student is in staat om logisch te beredeneren wat er bij herhaling van het experiment veranderd zou kunnen worden 	

Tip en Top:**Vragen in te vullen door student na ontvangen feedback op labjournaal:**

1. Waar zitten de verschillen tussen jouw beoordeling en die van de practicumassistent?

2. Waar komen die vandaan?

3. Wat zou je in de toekomst anders doen en waarom?

Beoordeling

Om het vak Celbiologie te halen moet je voor het practicum een voldoende halen. Het eindcijfer is het gewogen gemiddelde van het theorie tentamen (twee deeltentamen; samen 80%) en het practicumcijfer (20%). Het practicumcijfer wordt bepaald aan de hand van het onderstaande beoordelingsmodel.

Beoordelingsmodel Practicum Celbiologie

Vaardigheden			Punten	Gewicht
			1 2 3 4 5	
Natlab werk	Theorie	De student heeft zich de kennis eigen kunnen maken die nodig is voor het uitvoeren van het experiment.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	4
	Technische vaardigheden	Experimenten zijn correct uitgevoerd en leiden tot de verwachte resultaten.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Zelfstandigheid	Experimenten worden zelfstandig uitgevoerd.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Planning	De student is in staat om experimenten goed te plannen en zich hieraan te houden.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	Veiligheid	De student houdt zich aan milieu en veiligheidsvoorschriften.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Labjournaal	Labjournaal (beoordeling op basis van feedbackformulier labjournaal)	<ul style="list-style-type: none"> - Alle onderdelen labjournaal zijn overzichtelijk en compleet weergegeven. - Voorbereidings- en oefenvragen zijn goed beantwoord. - Post-lab reflecties: De student is in staat om te beredeneren wat er bij herhaling van het experiment veranderd zou kunnen worden. 	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	3
Academische houding	Samenwerking	De student werkt goed samen met duo-partner.	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	3
	Werkhouding	<ul style="list-style-type: none"> - De student is goed voorbereid (literatuur en handleiding gelezen; vragen gemaakt; YouTube filmpjes bekeken). - De student doet actief mee (stelt en beantwoordt vragen; denkt mee; verwerkt feedback). - De student is op tijd en houdt zich aan afspraken en deadlines. 	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	

Automatische pipet

ENGLISH

PIPETMAN® P

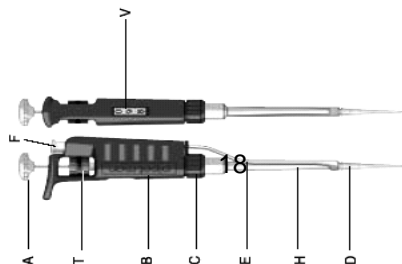
ENGLISH

PIPETMAN® P

PIPETMAN® P

3 - DESCRIPTION

- A) Color coded push-button for setting the volume, aspirating, and dispensing.
- B) Body or handle.
- C) Connecting nut to upper part (body or handle) of removable tip-holder.
- D) Diamond tip.
- E) Tip-ejector.
- F) Tip-ejector button.
- H) Tip-holder (removable for cleaning and decontaminating).
- T) Thumbwheel for setting the volume.
- V) Volumeter.



4 - OPERATING RANGES

Model	Range
P2	0.1 - 2 µL
P10	0.5 - 10 µL
P20	2 - 20 µL
P100	20 - 100 µL
P200	20 - 200 µL
P1000	200 - 1000 µL
P10ml	1 - 5 mL
P10ml	1 - 10 mL

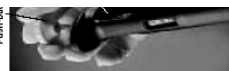
5 - SETTING THE VOLUME

The volume of liquid to be aspirated is set on the volumeter. The volumeter consists of number-disks, which are read from top to bottom (least significant digit) to bottom (most significant digit). A marker is used to set exact intermediate volumes using the scale on the bottom dial. The disks are colored either blue or red to indicate the position of the dial point, according to the model (see example).

The volume is set by turning the thumbwheel (1) or the push-button (A). The push-button makes it easier and quicker to set volumes, especially when wearing gloves. The thumbwheel may be turned to slowly reach the required setting.

To obtain maximum accuracy when setting the volume, proceed as follows:

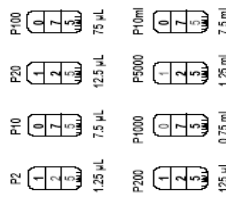
- when decreasing the volume setting, reach the required setting, making sure to overshoot the mark.



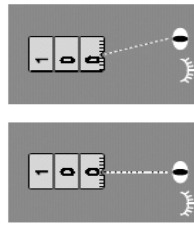
- when increasing the volume setting, pass the required value by 1/3 of a turn and then slowly decrease the volume to reach the volume, making sure not to overshoot the mark.

Model	Color of volumeter numbers	Blank	Red
P2 to P200	µL	0.1 µL and 0.01 µL	
P1000, P5000	0.1 mL and 0.01 mL		nL
P10ml	nL		0.1 mL

Example for each pipette:



To avoid parallax errors, make sure that the volume indicator and the selected volume marking are in your direct line of vision. A close range you may find it helps to close one eye.



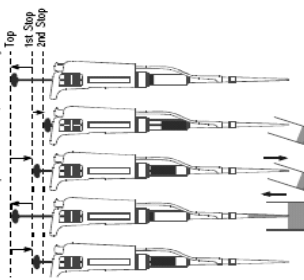
With the precise pipetting technique P2 models use to aspirate volumes down to 0.1 µL, P10 at 0.5 µL, and P200 at 30 µL.

Volatile Solvents

For volatile solvents you should saturate the air-cushion of your pipette by aspirating and dispensing the solvent repeatedly before aspirating the sample.

6 - PIPETTING

- 1) Fit a new Gilson Diamond Tip.
Plastic tips are for a single application - they must not be cleaned or reused. Push the tip-holder into the tip using a slight twisting motion to ensure a firm and airtight seal. (2) P5000 and P10ml: insert a filter into the tip holder before fitting a tip. If the filter gets dirty it should be replaced with a clean one.
- 3) P5000 and P10ml: these models are not equipped with tip-ejectors.
- 2) Pre-rinse the tip.
Some liquids (e.g. protein-containing solutions and organic solvents) can leave a film of liquid on the inside wall of the tip; pre-rinse the tip to minimize any errors that may be related to this phenomenon.
Pre-rinsing consists of aspirating the first volume of liquid and then dispensing it back into the same vessel (or to waste). Subsequent volumes that you pipette will have levels of accuracy and precision within specifications.
- 3) Aspirate.
Press the push-button to the first stop (this corresponds to the set volume of liquid). Hold the pipette vertically and immerse the tip



in the liquid (see immersion depth table). Release the push-button slowly and smoothly (to top position) to aspirate the set volume of liquid.

Wait one second (time depends on model, see table); then withdraw the pipette-tip from the liquid. You may wipe any droplets away from the outside of the tip using a medical wipe, however if you do so take care to avoid touching the tip's orifice.

4) Dispense.

Place the end of the tip against the inside wall of the recipient vessel (at an angle of 10° to 40°).

Press the push-button slowly and smoothly to the first stop.

Wait for at least a second; then press the push-button to the second stop to expel any residual liquid from the tip.

Keep the push-button pressed fully down and (while removing the pipette) draw the tip along the inside surface of the vessel. Release the push-button, smoothly.

- 5) Eject the tip by pressing firmly on the tip-ejector button.

General Guidelines for Good Pipetting

- 1) Make sure that you operate the push-button slowly and smoothly.
- 2) When aspirating, keep the tip at a constant depth below the surface of the liquid (refer to the table).

Table - Immersion Depth & Wait Time

Model	Immersion Depth (mm)	Wait Time (Seconds)
P2	1	1
P10	1	1
P20	2-3	1
P100	2-4	1
P200	2-4	1
P1000	3-4	2-3
P5000	3-6	4-5
P10ml	5-7	4-5

- 3) Change the tip before aspirating a different liquid, sample, or reagent.

- 4) Change the tip if a droplet remains at the end of the tip from the previous pipetting operation.

- 5) Each new tip should be pre-rinsed with the liquid to be pipetted.

- 6) Liquid should never enter the tip-holder; to prevent this:
 - press and release the push-button slowly and smoothly,
 - never turn the pipette upside down,
 - never lay the pipette on its side when there is liquid in the tip.

- 7) When pipetting liquids with temperatures different to the ambient temperature, pre-rinse the tip several times before use.

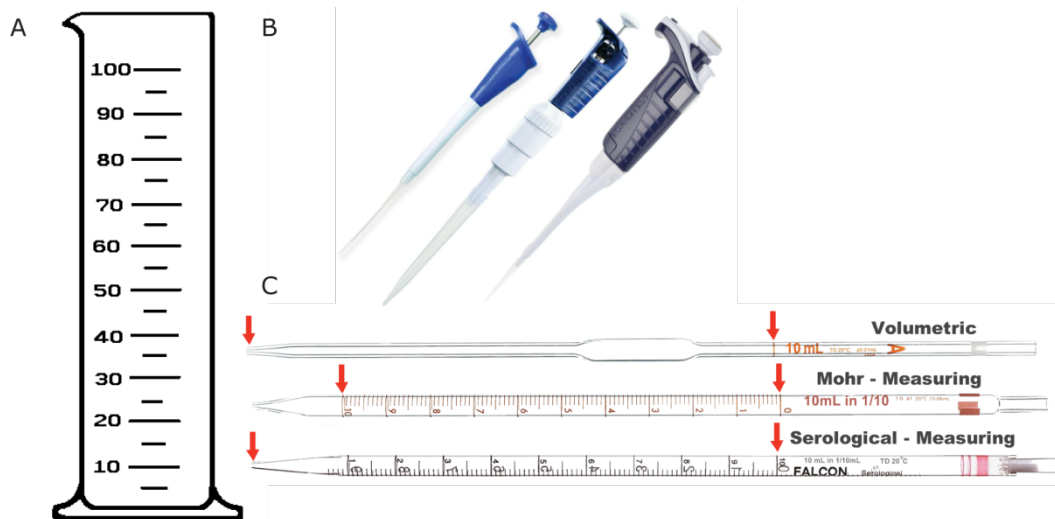
- 8) You may remove the tip-ejector (see "Maintenance") to aspirate from very narrow tubes.

Op het practicum heb je de beschikking over:

- P20 voor 2 – 20 µl (gele of witte tips)
- P200 voor 20 – 200 µl (gele of witte tips)
- P1000 voor 200 – 1000 µl (blauwe tips)

Werken met vloeistoffen

Voor het werken met vloeistoffen zijn verschillende hulpmiddelen beschikbaar (zie figuur 1). Afhankelijk van de mate van precisie waarmee men moet werken, wordt een bepaald hulpmiddel gekozen. Wanneer 10ml azijnzuur nodig is om een oplossing de juiste zuurgraad te geven, is het niet verstandig hier een kopje voor te nemen. Een maatcilinder, een glaspipet of een buret (in toenemende nauwkeurigheid) zullen beter geschikt zijn om te voorkomen dat de zuurgraad te hoog of te laag wordt.



Figuur 1. A: een maatcilinder. B: verschillende automatische pipetten. C: verschillende glazen pipetten voor het pipetteren van 10ml. De rode pijlen geven het begin en het eindpunt van de 10ml aan.

Automatische pipetten, zoals beschreven in de handleiding voor het gebruik van de Gilson pipetten, zijn ook zeer nauwkeurig. Wel moet een passende Gilson pipet bij het benodigde volume gezocht worden. Bijvoorbeeld 110 microliter zal nauwkeuriger door een P200 (maximaal 200 microliter) gepipetteerd worden dan door een P1000 (maximaal 1000 microliter). Wanneer zeer agressieve vloeistoffen gepipetteerd moeten worden, is het verstandig een Hamilton glas-injectiespuit te gebruiken. Deze glazen injectiespuiten zijn gekalibreerd en bestaan in vergelijkbare versies als de Gilson pipetten.

Wanneer een vloeistof zeer viskeus is, kan het soms onmogelijk zijn de vloeistof nauwkeurig te pipetteren. Dan kan de vloeistof afgewogen worden. Daarbij moet men wel de dichtheid van de vloeistof kennen en de temperatuur waarbij men de vloeistof weegt, omdat deze gegevens het volume bepalen. Het volume (V) kan uitgerekend worden door het gewicht (m) te delen door de dichtheid (ρ):

$$V = m/\rho$$

Waarbij V wordt uitgedrukt in m^3 , m in kilogram (kg) en ρ in kg/m^3 .

Kiezen tussen glas of plastic

- Nauwkeurigheid is in glas groter dan in plastic, omdat plastic eerder van vorm verandert. Plastic lost in sommige organische vloeistoffen op (bijvoorbeeld aceton).
- Glas kan allerlei ionen absorberen die aan je vloeistof kunnen worden afgegeven. Voor nauwkeurig werken is het van belang het glas zeer goed schoon te maken, bijvoorbeeld met zuur.
- Plastic kan eventueel eenmalig gebruikt worden. Glas is meestal te duur voor eenmalig gebruik.
- Glas en veel plastics (niet alle) kunnen gesteriliseerd worden door te autoclavieren (verhitting onder druk) voor minimaal 15 minuten bij 120 °C.
- Gebruik geen glas met barsten of stukjes eraf, omdat de kans dat het glas uit elkaar springt dan groter is.
- Draag (zware) flessen (met gevaarlijke stoffen) niet aan de hals maar ondersteun ze, zodat ze niet uit je handen kunnen glijpen of vallen, indien een zwakke hals afbreekt.

Introductie lichtmicroscopie

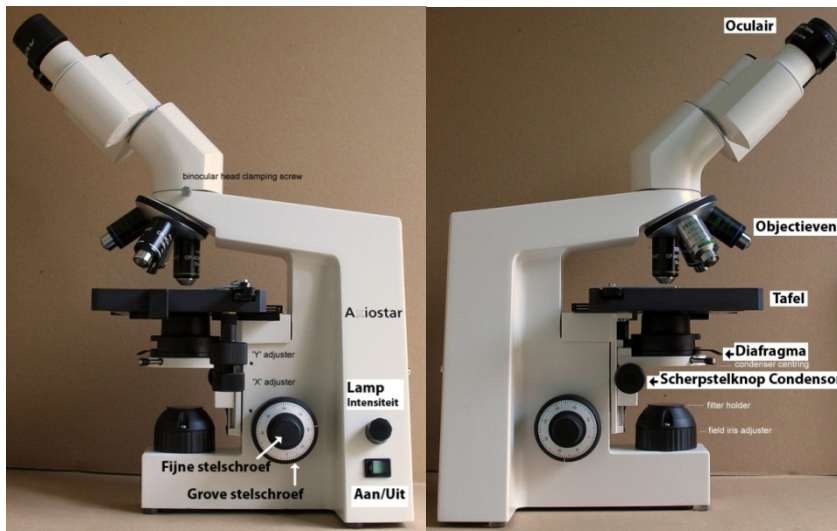
Veel interessante onderdelen van biologische systemen zijn te klein om met het blote oog te zien en kunnen alleen met een microscoop bekeken worden. Alle microscopen bestaan uit een gecoördineerd systeem van aaneengeschakelde lenzen, zodat de kijker een beeld van een organisme vergroot kan zien, vaak ook met verhoogde resolutie en contrast. Resolutie is de mogelijkheid om onderscheid te maken tussen twee punten in het specimen; hoe beter de resolutie, hoe 'scherper' het beeld. Contrast is het verschil in waargenomen intensiteit tussen verschillende delen van het beeld. Tijdens dit practicum zullen we kennis maken met binoculaire (samengestelde) lichtmicroscopie.

Het gebruik van een Lichtmicroscoop

Het correcte gebruik van een lichtmicroscoop is één van de meest elementaire en essentiële laboratoriumvaardigheden. Een standaard binoculaire lichtmicroscoop heeft drie belangrijke optische onderdelen: oculair, objectief en condensor. Deze zitten vast aan een staander op een platform (zie figuur 2). Voordat je gebruik gaat maken van een microscoop, moet je er eerst voor zorgen dat je de afzonderlijke onderdelen kent en weet wat hun functie is. Als je eenmaal zo ver bent, is de instelprocedure als volgt:

1. Plaats de microscoop op een ruime plek op je labtafel en stel je stoel zodanig af dat je de microscoop comfortabel kunt gebruiken en bedienen (met het oculair op ooghoogte, terwijl je met een rechte rug zit). Zet de microscoop aan en zorg ervoor dat de instelling van de lamp op 2/3 van het maximum staat.
2. Selecteer een objectieflens met een lage vergroting (5x of 10x).
3. Plaats de oculairen zodanig van elkaar dat je een cirkel ziet als je door beide oculairen tegelijk kijkt.
4. Leg een preparaat op de microscooptafel, zodanig dat er licht valt op het onderdeel van het preparaat dat je wilt bekijken.
5. Focusseer het beeld van je preparaat met eerst de grove en daarna de fijne scherpstelschroef. Het beeld dat je ziet is 180° gedraaid ten opzichte van wat je zou zien als je direct (met het blote oog) naar het preparaat gaat kijken. Als er maar één oculair instelbaar is (bv. het linker), sluit dan je linkeroog en stel het preparaat eerst scherp met je rechteroog. Sluit daarna je rechteroog en focusseer met je linkeroog op het preparaat door aan het instelbare linkeroculair te draaien.
6. Nu moet de lichtbundel optimaal worden ingesteld (= *belichting volgens Köhler*), zoals hieronder aangegeven.
 - Draai het velddiafragma (in de voet van de microscoop) dicht tot een lichte ring zichtbaar wordt met een donkere buitenring. De randen van het diafragma moeten scherp zijn afgebeeld; dit kun je doen door aan de scherpstelknop van de condensor te draaien (zie figuur 2). Verder moet het lichte deel 'concentrisch' in het beeld te zien zijn; dit doe je m.b.v. de twee fijne instelstaafjes ('condensor centering'). Als het diafragma scherp en gecentreerd te zien is, draai je vervolgens het velddiafragma open tot het hele veld verlicht is (de rand van het diafragma mag niet in beeld zijn).
 - Het diafragma in de condensortafel (irisdiafragma) moet zover geopend/gesloten worden dat er een rustig helder beeld met voldoende contrast ontstaat (zonder 'valse interferentieranden'). Vraag eventueel een assistent om advies betreffende deze instelling.
7. Voor hogere vergrotingen draai je het juiste objectief voor, waarbij je er goed op let dat er ruimte genoeg is tussen het objectief en het preparaat. Daarna weer focuseren op je preparaat met de fijnstelschroef.
 - *Indien het preparaat met de 100x lens bekeken wordt, moet het afgesloten worden met een dekglasje. Het dekglasje kan vastgezet worden op het objectglas met nagellak. Overtuig jezelf ervan dat de nagellak VOLLEDIG droog is voordat je het preparaat bekijkt. Stel vervolgens scherp met de 40x lens. Draai het objectief weg en doe een (klein) druppeltje olie op het preparaat. Draai vervolgens het 100x objectief voor en stel voorzichtig scherp met de fijnstelschroef.*

- Als je klaar bent met je microscoop, draai dan eerst terug naar een lage vergroting, haal je preparaat van de tafel en maak deze schoon, indien nodig. Draai de lamp lager en zet je microscoop uit. Maak indien nodig de oculairen schoon met lenspapier. Check ook de objectieven op vuil. Plaats de stofhoes over de microscoop.

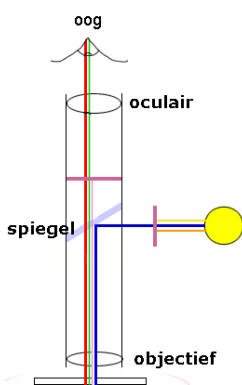


Figuur 2: Overzicht van een lichtmicroscoop. (Foto: Ian Walker, www.micscape.org)

Het gebruik van een Fluorescentiemicroscoop

Voor fluorescentie microscopie gebruiken we een microscoop die lijkt op de gewone lichtmicroscoop met een opzetstuk. Toch zijn er een paar belangrijke verschillen (zie onderstaand figuur). Allereerst de lamp (UV licht) en de lichtweg, want die valt nu op het preparaat en niet er doorheen. Verder het gebruik van een dichroïsche spiegel in combinatie met excitatie- en emissiefilters. Dit zorgt dat licht met een korte golflengte wordt gereflecteerd en boven een bepaalde golflengte wordt doorgelaten. Op deze manier kunnen verschillende fluorochromen met ieder hun eigen excitatie en emissie golflengte in de preparaten zichtbaar gemaakt worden.

Lees voordat je begint altijd goed de instructies op de tutorial naast de microscoop goed door en raadpleeg bij twijfel je practicumassistent.



Figuur 3: Schematische weergave lichtweg fluorescentie microscoop

Let op:

Je kwiklamp moet minimaal 15 minuten aanstaan voordat je hem uitzet. Te snel uitzetten gaat ten koste van de levensduur van de lamp. Bescherm altijd je preparaat voor licht (door gebruik te maken van de shutterslider).

Tekeninstructies

Tekenen heeft een belangrijke plaats in de biologie. Je moet namelijk heel goed observeren om het onderwerp te kunnen natekenen, terwijl het identificeren van de onderdelen je dwingt na te denken over wat je ziet. Strikt genomen is een tekening een precieze weergave van het onderwerp en vereist het geen biologische voorkennis. Biologische kennis is nodig om te besluiten naar welk deel je moet kijken, hoe je de onderdelen moet benoemen en welke details je kunt weglaten. Tekenen is een onderdeel van veel practica.

Het opzetten van een tekening

- Besluit wat je precies wilt tekenen en waarom.
- Besluit hoe groot de tekening moet worden.
- Besluit waar op de pagina je de tekening gaat maken.
- Schets een cirkel of rechthoek waarbinnen je het onderwerp wilt tekenen.
- Begin met tekenen.
- Teken met een potlood lichte hulplijnen om de basisverhoudingen vast te leggen. De hulplijnen worden weggegomd als de hoofdlijnen vastliggen.
- Teken met een potlood de hoofdlijnen van je onderwerp. Als je tevreden bent, kun je ze met een zachter potlood duidelijk overtrekken. Aarzel niet, kras niet en zorg ervoor dat verbindingen tussen lijnen goed aansluiten.
- Teken altijd wat je ziet en niet wat je denkt te zien!! Wat je denkt dat je ziet is de interpretatie van wat je ziet en *beschrijf* je in de resultaten of discussie.
- Als laatste moet je de onderdelen een naam geven door te 'labelen' in de tekening. Correct labelen is net zo belangrijk als het tekenen zelf. De labels moeten met horizontale (of schuine) lijnen eindigen in de structuur waarnaar ze refereren. Lijnen mogen elkaar niet kruisen! De labels moeten dezelfde oriëntatie hebben, zodat je de tekening niet hoeft te draaien als je ze wilt lezen. Annotaties (korte uitleg) tussen haakjes onder de labels wordt aangeraden – beschouw ze als een geheugensteuntje van wat je gezien hebt of als opmerkingen die de assistent heeft gemaakt over de betreffende structuur.
- Geef tot slot je tekening een titel, schaal of vergroting, en een legenda. In de legenda staat onder meer de naam van het organisme, onderwerp, kleuring, preparatie.

Veel voorkomende fouten

- Slechte positie op blad en verhoudingen
- Vergeten van titel, legenda en onvolledig labelen van getekende structuren
- Slordigheid en vaagheid
- Biologische onmogelijkheden

Het is belangrijk om je te realiseren dat je niet van jezelf kunt verwachten dat je binnen één dag je tekentalenten tot volle wasdom zullen komen. Net als andere vaardigheden moet je ook het (na)tekenen oefenen.

Steriel werken met microbiologische culturen

Steriel werken

Steriel werken (aseptische techniek) verwijst naar een procedure die wordt uitgevoerd onder steriele omstandigheden. Dit omvat technieken zoals vlamsterilisatie. Deze procedure wordt in principe gebruikt voor alle celtypes, ook al is het bekend dat het celtype waar je mee werkt niet gevaarlijk is. Steriel werken vormt een belangrijk deel van veiligheidsprocedures en moet altijd in acht worden genomen tijdens het werken met celculturen op een lab. Steriel werken heeft twee hoofddoelen:

1. Het voorkomen van contaminatie van je labculturen door microben van externe oorsprong, zoals die van je huid, kleren of de omgeving.

2. Het voorkomen van microbiologische contaminatie van mensen in het lab, in dit geval jij en je medestudenten.

Andere redenen om voorzichtig en zorgvuldig te werken tijdens experimenten met microbiologische culturen zijn: de kans om een gevaarlijke microbe in je normaliter ongevaarlijke cultuur krijgen of omdat sommige mensen bevattelijker voor infecties en ziektes zijn dan anderen. Labculturen zijn per definitie een steeds groter aantal cellen of organismes van de originele microbe; hoe meer cellen, hoe groter het risico. En een microbe kan andere eigenschappen krijgen, bijvoorbeeld door genuitwisseling of mutaties.

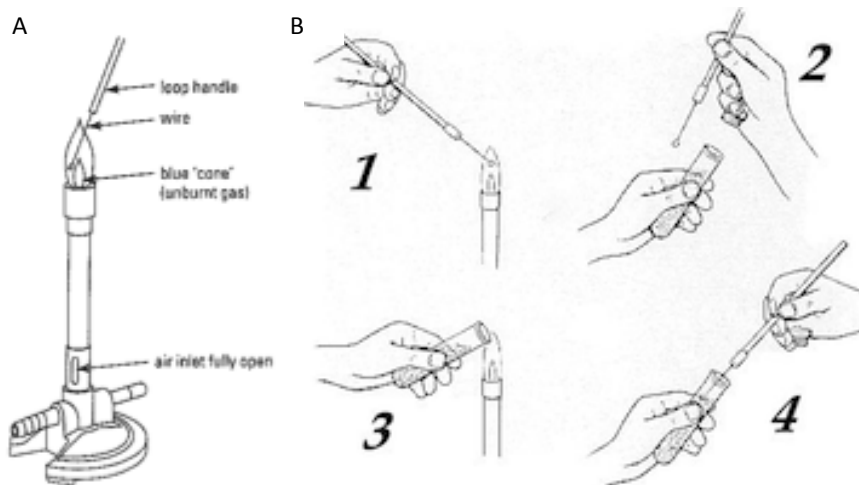
Sterilisatie Procedures

In onderstaande tekst behandelen we diverse methoden om microben te doden. De meest voorkomende vorm van steriliseren is warmtebehandeling en deze methode wordt gebruikt bij diverse basisprocedures in het lab. Tijdens dit practicum zullen we gebruik maken van de volgende methoden:

Vlamsterilisatie

Bij deze vorm van sterilisatie worden metalen voorwerpen, zoals öses (zie alinea hieronder), tot roodgloeïend verwarmd in de vlam van een Bunsenbrander (genoemd naar de Duitse natuurkundige C.K.J. Bunsen (1791-1860), zie figuur 4). Dit is een simpele en effectieve vorm, want geen van de microben die aanwezig is op het metalen voorwerp zal zelfs een korte blootstelling aan een vlam overleven.

Voor het isoleren en overbrengen van bacteriën maak je tijdens dit practicum gebruik van öses (öse = entoog/entnaald met oog). Deze zijn op onderstaande manier te steriliseren. Na verhitting van de öse totdat deze roodgloeïend is, dient deze nog ongeveer 8-10 sec. af te koelen (zonder een ander object te raken), voordat hij klaar is voor gebruik. Bij het ontsmetten van een gecontamineerde öse met een Bunsenbrander, dient de öse niet te snel verwarmd te worden, opdat er geen aerosolen ontstaan.



Figuur 4: Sterilistatietechniek. A: Overzichtstekening bunsenbrander B: Vlamsterilisatie

Vlamsterilisatie waarbij ethanol wordt gebruikt, is bijvoorbeeld weer geschikt voor Drigalski-spatels. Na het doppen van de spatel in 96% ethanol wordt deze afgevlamd in de vlam van de Bunsenbrander. Ook nu is het belangrijk nog even te wachten met gebruik, zonder andere objecten aan te raken. Na gebruik moet de spatel nogmaals gedoopt en gevlamd worden om contaminatie van je werkruimte te voorkomen. Ook de openingen van net geopende houders van culturen en/of media, zoals flessen en erlenmeyers, kunnen gesteriliseerd worden door de opening even door de vlam te halen. Bij de rand aanwezige microben worden zo vernietigd en de lucht die in de opening van de houder verhit wordt, zal een uitwaartse luchtstroom veroorzaken, waardoor microben geen kans krijgen de houder binnen te dringen. Na de handeling dient de houder nogmaals afgevlamd te worden, zodat contaminatie tijdens het sluiten van de houder voorkomen wordt. Doppen, deksels of watjes die de houders afsluiten, worden niet op tafel gelegd tijdens het afvlammen en de handeling. Houders worden geopend en dop/deksel/watje wordt vastgehouden met de pink. Op deze manier houd je ook vingers vrij voor andere handelingen.

Autoclaveren

Deze methode wordt voornamelijk gebruikt voor het steriliseren van vele laboratoriummaterialen, waaronder ook vloeistoffen (behalve natuurlijk warmtegevoelige stoffen). Autoclaveren kan ook gebruikt worden voor ontsmetten van vloeibare media en glaswerk na gebruik. Door verhitting van het water in de autoclaaf *onder druk* wordt de temperatuur hoger dan 100°C (121°C of hoger) waardoor bacteriën, virussen en schimmels sneller en met grotere zekerheid worden gedood. De meeste voorwerpen zijn steriel na 15 minuten blootstelling aan 121°C, hoewel grotere voorwerpen een langere periode nodig kunnen hebben.

Gebruik van Laboratorium Materialen

Werkruimte

Een van de meest belangrijke aspecten van steriel werken is het zo schoon en opgeruimd mogelijk houden van je werkruimte. Verwijder alle spullen uit je werkruimte en maak deze schoon met een desinfectans (ontsmettingsmiddel), bijvoorbeeld ethanol. Zorg er dan voor dat de spullen die je nodig hebt binnen handbereik zijn, maar dat je wel genoeg ruimte overhoudt om te kunnen werken. De aanwezigheid van een Bunsenbrander met harde vlam dicht bij je werkruimte vermindert de kans op contaminatie vanuit de lucht. De vlam veroorzaakt opstijgende lucht, zodat voorkomen wordt dat daar aanwezige deeltjes terechtkomen in openstaande houders, zoals petrischalen of flessen.

Media

Cellen kunnen gecultiveerd worden in een vloeibaar medium, bv. een rijk medium zoals het Luria-Bertani medium dat alle nutriënten (aminozuren, suikers, mineralen) voor bacteriegroei bevat, of op een gestold medium, zoals agar, waaraan LB is toegevoegd. Agar is een complexe polysaccharide van rode algen, die een stijve, transparante gel vormt en die relatief resistent is tegen degradatie door bacteriën. Aan deze media kunnen, naar gelang de noodzaak, nog andere desinfecterende of bacterie dodende stoffen worden toegevoegd, bv. antibiotica.

Besmettingsrisico's

De meest voor de hand liggende risico's tijdens werken met microbiële culturen zijn inslikken en besmetting via een open wond in de huid. Wonden moeten zoveel mogelijk bedekt worden met pleisters of plastic wegwerphandschoenen.

Een minder duidelijk gevaar is het ontstaan van aerosolen van druppels van microbiële suspensies, met het risico van inademen of besmetting van andere objecten. De volgende stappen verkleinen de kans op het ontstaan van aerosolen:

- Gebruik afgedichte buizen als je iets wilt schudden, centrifugeren of als je microbiële oplossingen wilt mixen.
- Giet oplossingen voorzichtig over, terwijl je het hoogteverschil zo minimaal mogelijk houdt.

- Pipetteer altijd via de wand van een houder.

Algemene regels voor laboratoria waar met microbiële culturen wordt gewerkt:

- Wees voorzichtig met scherpe instrumenten, zoals naalden en glazen Pasteur pipetten.
- Giet geen gebruikte culturen door de gootsteen; ze moeten geautoclaveerd worden.
- Stop andere besmette voorwerpen (bv. pipetten) na gebruik in een desinfecterend middel.
- Maak je werkruimte schoon met een desinfectans nadat je klaar bent met je werk.
- Was altijd je handen voordat je het lab verlaat.
- Laat je lab-jas achter in het lab.

Uitplaten

De meeste methoden voor het maken van culturen maken gebruik van gestolde media in een petrischaaltje. Er bestaan diverse technieken voor het overbrengen naar en verspreiden van organismen op de voedingsbodem in een petrischaal voorafgaand aan de incubatie. Hieronder beschrijven we twee van deze technieken.

Verdunningsuitstrijk

Enten om tot een reïncultuur te komen, is een van de meest belangrijke technieken van Microbiologie. Enten wordt gebruikt om celculturen te isoleren en voor het onderhoud van stamculturen, waarbij een verdunningsuitstrijk met losse kolonies van hetzelfde type puurheid van de cellijn waarborgt (de zogenaamde reïncultuur). Met een öse wordt de cultuur op zodanige wijze uitgestreken, dat de cultuur steeds verder wordt verdund (zie figuur 5). Het doel daarvan is om tot losse kolonies te komen op de voedingsbodem: idealiter zullen dergelijke kolonies ontstaan zijn uit één losse cel (bv. van eencellige bacteriën, dierlijke of plantaardige cellijnen) of uit groepen cellen van dezelfde soort. Reïnculturen, die cellen bevatten van één soort en die ontstaan zijn uit één oudercel, vormen de basis van de meest pure cultuur methodes.

Verspreidingsuitstrijk

Deze methode wordt gebruikt bij cellen in oplossing, zowel in een vloeibaar groeimedium als in een passende steriele oplossing. Het is een methode voor het kwantificeren van levensvatbare cellen (of kolonie vormende eenheden) in een monster, na verdunning. Een L-vormige spatel (bv. een Drigalski spatel) steriliseer je door deze eerst in 96% ethanol te dopen, uit te laten druppen en de resterende ethanol af te vlammen met behulp van een Bunsenbrander (let op: de spatel niet te lang in de vlam houden). Na afkoeling kun je de spatel gebruiken om een bekend volume aan oplossing uit te strijken over een voedingsbodem (zie figuur 5). Let bij deze techniek vooral op het brandrisico. Let bijvoorbeeld op dat je niet je bak met ethanol laat ontvlammen door een te hete spatel erin te dopen.



Figuur 5: Uitplaattechnieken A: uitplaten met öse entnaald B: uitplaten met Drigalski spatel

Labellen van platen en culturen

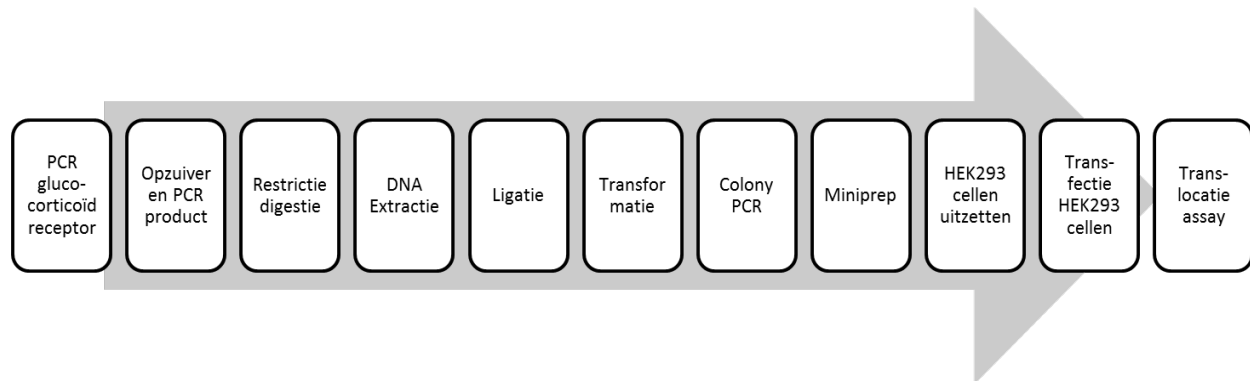
Het labellen van petrischaaltjes doe je altijd op de bodem met een permanente marker. Doe dat dan vooral aan de rand van je plaat, zodat je niet in de problemen komt bij het tellen van kolonies, het in de gaten houden van de

5102CELB9Y

groei van de cultuur, etc. Na het labellen worden petrischalen meestal ondersteboven geïncubeerd in een temperatuur gecontroleerde incubator (meestal 37°C). Ook tijdens het werk op het lab worden platen na de incubatie meestal ondersteboven bewaard.

Het gestresste brein

Tijdens het practicum Celbiologie gaan jullie zelf één van de moleculaire mechanismen achter stress bestuderen. Dit gaan jullie doen aan de hand van veel gebruikte moleculair biologische technieken. Het practicum is één doorlopend experiment (zie onderstaande flowchart met overzicht experimenten) dat begint met het (sub)kloneren van de humane glucocorticoïde receptor (GR) in-frame met het gen dat codeert voor het green-fluorescent protein (GFP). Dit glucocorticoïde receptor green-fluorescent protein (GR-GFP) fusie-eiwit gaan jullie tot expressie brengen in Human Embryonic Kidney 293 cellen (HEK293) en vervolgens onder verschillende omstandigheden onderzoeken. Voordat we verder ingaan op het praktisch werk eerst een korte algemene inleiding over stress.



Wat is de definitie van stress?

De term stress wordt in Nederland gebruikt sinds de jaren veertig van de vorige eeuw. De term is inmiddels zo ingeburgerd dat iedereen intuïtief weet wat we ermee bedoelen. Toch bestaan er meerdere verschillende definities. Tijdens dit practicum hanteren we de meest gangbare definitie die onderscheid maakt tussen een stressor (conditie die stress veroorzaakt) en de stressrespons (reactie op de stressor). Stress is dan het proces dat het gevolg is van een stressor en aanleiding voor de stressrespons.

Hoe kijken (psycho)biologen naar stress?

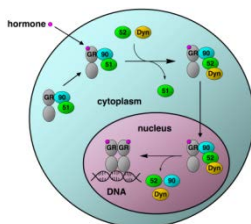
Vanuit biologisch oogpunt kun je stress zien als een reactie op een bedreigende situatie, die gepaard gaat met een verhoogde fysiologische activiteit. Deze activiteit stelt een organisme in staat om adequaat te reageren op een noodsituatie. De stressrespons komt tot stand via twee verschillende zenuwbanen. Allereerst de snelle 'vecht- of vluchtreactie' van het sympathisch (autonome) zenuwstelsel dat ervoor zorgt dat het bijniermerg adrenaline en noradrenaline afgeeft aan de bloedbaan. Hierdoor spannen spieren zich aan, gaat de bloeddruk en hartslag omhoog en verwijden pupillen zich. De spijsvertering gaat op een laag pitje en we beginnen te zweten. Het tweede en langzamere systeem wordt na enkele minuten aangeschakeld en komt via de hypothalamus-hypofyse-bijnierschors-as (HHB-as; in het Engels HPA-axis) tot stand. Het start als de stressprikkel de hypothalamus bereikt en deze het CRH peptide gaat produceren. Dit stimuleert de hypofyse voorkwab tot de productie van het hormoon ACTH dat vervolgens de bijnierschors aanzet tot de productie van corticosteroiden waaronder het stresshormoon cortisol. Cortisol zorgt ervoor dat de bloedsuikerspiegel stijgt en het metabolisme omhoog gaat zodat we voldoende energie hebben om met de stressvolle situatie om te gaan. Tenslotte remt cortisol via een feedback mechanisme de cellen in de hypothalamus die de stressrespons veroorzaken zodat de oorspronkelijke stressreactie niet te ver doorschiet en schade kan worden voorkomen.

Invloed van chronische stress op de hersenen

Onder normale stress condities reageert de hippocampus op verhoogde cortisolwaarden door de aanmaak van het hormoon te reduceren. In het geval van chronische stress raken de neuronen van de hippocampus beschadigd waardoor de cortisolwaarden hoog blijven en de hippocampus nog meer beschadigd raakt, waardoor het cortisolniveau hoog blijft. Op deze manier ontstaat een neerwaartse spiraal. Meer informatie over de neurobiologische effecten van stress kunnen jullie lezen in de review paper van Kloet (tijdschrift voor de psychiatrie 51 (2009) 8, 541-550). Deze paper wordt ook besproken tijdens de werkgroepen van Academische Basis Vaardigheden.

Stress en de rol van de glucocorticoïde receptor

Cortisol is een steroïdhormoon dat geproduceerd wordt in de bijnierschors uit cholesterol. Bij de synthese in de mitochondriën van de bijnierschors wordt eerst pregnenolon gevormd, een gemeenschappelijke voorganger van zowel de glucocorticoïden (bv. cortisol), de mineralocorticoïden (bv. aldosteron) en de androgenen (bv. testosteron). Cortisol heeft lipofiele eigenschappen waardoor het in staat is om door de celmembraan van de neuronen van de hippocampus te diffunderen waar het zich kan binden aan glucocorticoïde receptoren (GR). Naast de GR komt ook de mineralocorticoiden receptor (MR) tot expressie in neuronen. De affiniteit voor cortisol van de MR is tien keer hoger dan die van de GR. Door dit verschil in affiniteit is bij de basale concentratie cortisol voornamelijk de MR bezet, terwijl bij hogere concentraties gedurende een langere periode van stress de GR additioneel wordt bezet. Beide receptoren behoren tot de groep van de ligand geactiveerde transcriptiefactoren. Dat wil zeggen dat deze receptoren kunnen dienen als transcriptiefactor en hiervoor afhankelijk zijn van de aanwezigheid van ligand (in het geval van de GR zijn dit glucocorticoïden). In inactieve toestand bevinden de receptoren zich in het cytoplasma van de cel gebonden aan verschillende eiwitten zoals het heat shock protein-90 (HSP-90). Na ligandbinding vindt er dissociatie van de HSP-90s plaats en wordt vervolgens de GR gefosforyleerd. De GR kan nu homodimeren vormen en er vindt translocatie plaats naar de nucleus waar het kan binden aan de zogenaamde glucocorticoïde-responsieve elementen (GREs) die zich in de promotergebieden van targetgenen bevinden. Na binding aan een GRE gaat de receptor interactie aan met coactivatoren die op hun beurt chromatine structuur beïnvloeden en de basale transcriptiemachinerie rekruteren. Op deze manier kan genexpressie worden beïnvloed. Veel van de effecten die door glucocorticoïden worden bewerkstelligd, zijn dan ook het gevolg van veranderingen in genexpressie. Naast de directe functie als transcriptiefactor kan de GR ook genexpressie reguleren zonder aan DNA te binden, bijvoorbeeld via eiwit-eiwit interacties. Het proces van translocatie van cytoplasma naar nucleus door ligandbinding gaan jullie zelf bestuderen tijdens dit practicum. Per labtafel zijn er vier verschillende experimentele groepen. De eerste groep gaat de verschillen in affiniteit tussen het humaan specifieke cortisol en rat specifieke cortisterone op de translocatie bestuderen. Groep 2 kijkt naar het effect van een lage dosering ten opzichte van maximale dosering cortisol op de translocatie. De groepen 3 en 4 kijken naar het effect van het toevoegen van verschillende antagonisten op de translocatie. Over de deze resultaten schrijven jullie bij Academische Basis Vaardigheden een onderzoeksverslag.



Figuur 6: Schematisch overzicht van het activatiemechanisme van de humane glucocorticoïde receptor (Bron: Wikipedia).

Overzicht experimentele onderdelen practicum

Wat gaan we doen?	• Wat is ons doel?
PCR glucocorticoïd receptor	• Vermenigvuldigen insert (humane glucocorticoïd receptor (hGR))
Opzuiveren PCR product	• PCR product geschikt maken voor restrictie digestie
Restrictie digestie	• Compatibele 'stick ends' creëren insert (hGR) en plasmide (pEGFP-C1 dat green-fluorescent protein (GFP) gen bevat)
DNA Extractie	• Geknipte DNA fragmenten (insert en plasmide) zuiveren en isoleren uit agarose gel
Ligatie	• Kloneren fusiegen hGR-GFP van insert (hGR) met plasmide (pEGFP-C1)
Transformatie	• Vermenigvuldigen plasmide met hGR-GFP fusiegen in bacteriën
Colony PCR	• Selecteren koloniën met plasmide met hGR-GFP fusiegen
DNA isolatie (mini-prep)	• Isolatie en opzuiveren DNA van plasmide met hGR-GFP fusiegen
HEK293 cellen uitzetten	• Voorbereiden transfectie door cellen in juiste dichtheid uit te zetten
Transfectie HEK293 cellen	• Tot expressie brengen van humane glucocorticoïd receptor green-fluorescent protein (hGR-GFP) fusie-eiwit
Translocatie assay	• Functie hGR-GFP bestuderen door incubatie met steroïden en/of antagonisten

Dagdeel 1: Bootcamp

We beginnen dit practicum met een bootcamp om je labvaardigheden op te frissen die je in dit practicum nodig hebt. Het is bedoeling dat je zo snel en zo goed mogelijk alle opdrachten uitvoert samen met je practicumpartner. Je practicumassistent houdt de score bij en uiteindelijk hebben we per zaal een winnend duo.

Succes!

Leerdoelen

- Je kunt nauwkeurig een verdunningsreeks maken
- Je kunt een ijklijn maken en de r^2 hiervan berekenen
- Je kunt chemisch rekenen
- Je kunt steriel werken
- Je kunt omgaan met een lichtmicroscop en die op de juiste manier instellen
- Je kunt kleine volumes pipetteren
- Je bent op de hoogte van alle veiligheids- en milieuregels en kunt je hieraan houden

Bradford assay: eiwit concentraties bepalen

Jullie gaan later in dit practicum cellen genereren die het glucocorticoïde receptor green-fluorescent protein fusie-eiwit tot over-expressie brengen. Om de efficiëntie van eiwit over-expressie van de cellen te beoordelen of om te bepalen hoeveel eiwit je voor een vervolg experiment nodig hebt, moet je eerst de concentratie van je eiwit bepalen. Voor het bepalen van een monster met onbekende eiwitconcentratie kan je gebruik maken van een Bradford eiwit bepaling (Bradford protein assay). Deze eiwit bepaling is vernoemd naar Marion M. Bradford, die de methode voor het eerst publiceerde in 1976. De werking is gebaseerd op binding van de kleurstof Coomassie Brilliant Blue G250 aan eiwitten. Coomassie Brilliant Blue was oorspronkelijk ontwikkeld als wol verf en is vernoemd naar de stad Kumasi in Ghana. Deze kleurstof komt in drie vormen voor: cationisch (rood), neutraal (groen) en anionisch (blauw). In zure oplossing is de kleurstof voornamelijk in zijn dubbel geprotoneerde rode cationische vorm aanwezig ($A_{max} = 470\text{nm}$). Wanneer de kleurstof aan eiwitten bindt (voornamelijk aan basische (vooral arginine) en aromatische aminozuur residuen), wordt de kleurstof omgezet naar zijn stabiele ongeprotoneerde blauwe vorm ($A_{max} = 595\text{nm}$). Meting van de absorptie bij 595nm is dus een maat voor de hoeveelheid kleurstof die gebonden is aan eiwitten. Door de absorptie te vergelijken met de absorptiewaarden van een standaard reeks met bekende concentraties eiwit (een ijklijn) kan de eiwitconcentratie van een monster bepaald worden. Een standaard reeks wordt gemaakt door een stock oplossing met bekende concentratie een aantal keer te verdunnen. De absorptie van de standaard reeks wordt bepaald met behulp van een spectrofotometer. De waarden van de spectrofotometer worden in een grafiek uitgezet tegen de concentratie van de betreffende standaard. Voordat de ijklijn gebruikt mag worden moet eerst gecontroleerd worden of er een lineair verband is tussen de concentratie van de gemeten standaarden en de bij behorende waarden. Aangenomen mag worden dat een ijklijn lineair is als de correlatiecoëfficiënt (R^2) boven de 0,095 ligt. Vervolgens kan door interpolatie de eiwitconcentratie van het monster bepaald worden. Als de verkregen lijn geen lineair verloop heeft of er te grote uitschieters boven of onder de lijn liggen, is de standaard reeks niet betrouwbaar en heb je niet netjes genoeg gepipetteerd. Door de reeks in duplo te maken kan de betrouwbaarheid van je reeks vergroot worden. Van je monster maak je ook een aantal verdunningen, je monster moet na meten en plotten binnen (liefst in het midden van) je standaard reeks vallen.

Reagentia:	BSA stock 1mg/ml, Bradford reagens, H ₂ O
Benodigdheden:	pipetpunten, epjes, microtiterplaat
Apparatuur:	spectrofotometer, pipet, rekenmachine, liniaal, potlood, grafiekpapier

Jullie krijgen een BSA (Bovine Serum Albumine) oplossing met een concentratie van 2mg/ml en gaan hiermee een standaard reeks maken om de eiwit concentratie van een onbekend sample te bepalen.

Protocol

1. Maak met de tafelgenoten een pipetteer schema voor de microplaat, er moeten 8 standaard reeksen (zie tabel) en drie verdunningen van je monster met onbekende concentratie per duo op deze plaat.
2. Label de epjes die je nodig hebt zoals aangegeven in het pipetteerschema hieronder. LET OP je werkt in duo's maar iedereen voert deze pipetteer opdracht uit. Jullie zijn dus elkaars 'duplo 's'.
3. Maakt de standaard reeks volgens het onderstaande pipetteerschema.
4. Maak de verdunning van je onbekende monster zoals aangegeven in het pipetteerschema

Tabel 1: Pipetteerschema Bradford assay

Buis	Volume stock (µl)	Herkomst standaard	Volume oplosmiddel(µl)	Eind concentratie eiwit (µg/ml)
Standaard 1	20	1mg/ml stock	0	1,000
Standaard 2	30	1mg/ml stock	10	750
Standaard 3	20	1mg/ml stock	20	500
Standaard 4	20	Buis 2	20	375
Standaard 5	20	Buis 3	20	250
Standaard 6	20	Buis 5	20	125
blanco	-	-	20	0
Sample 1	20	Onbekend monster	0	?
Sample 2	10	Onbekend monster	10	?
Sample 3	5	Onbekend monster	15	?

5. Pipetteer 5µl van de standaarden en de verdunningen van het onbekende monster in een nieuw 1,5ml epjes.
6. Voeg 250µl 1x Dye (kleur) toe. Mix door een paar keer op en neer te pipetteren. Gebruik voor elk nieuw monster een nieuw pipetpuntje.
7. Als er vloeistof aan de rand van je epje zit, draai het dan kort af.
8. Incubeer de samples 5 min bij kamertemperatuur (niet langer dan 1h). Ruim intussen de spullen op die je niet meer nodig hebt.
9. Pipetteer je reeks in de microplaat volgens het schema dat jullie hebben gemaakt.
10. Als iedereen zijn monsters heeft gepipetteerd kan de plaat door de assistent gemeten worden.
11. Stel de spectrofotometer in op 595nm.
12. Stel de spectrofotometer in op 'nul' met de blanco.
13. Meet de absorptie van de standaarden en de samples.
14. Als de spectrofotometer niet op nul is gezet met een blanco, dan moet de (gemiddelde) waarde van de blanco van de waarden van de standaarden en de onbekende samples afgetrokken worden.
15. Maak in excell een standaard curve door de 595nm waarden (y-as) uit te zetten tegen hun concentratie in µg/ml (x-as). Zet het aantal µg eiwit van de ijklijn dmv een scatterplot uit tegen verkregen OD waarden (min de achtergrond). Zet de OD op de x-as, de hoeveelheid eiwit op de y-as. Voeg een trendline toe

(rechtermuisknop op de data, selecteer "Add Trendline") en laat Excel ook een formule uitrekenen (selecteer "Display Equation on chart").

16. Bereken de concentratie van het onbekende monster met behulp van je standaardreeks
17. Als alleen een verdund sample binnen de reeks valt, pas de eindconcentratie dan aan door te vermenigvuldigen met de gebruikte verdunningsfactor.
18. Gebruik de formule om het aantal μg eiwit in het onbekende monster te bepalen (vergeet niet bij je eigen monsters ook de gemiddelde achtergrond waarde af te trekken!). Corrigeer voor het genomen volume om het aantal μg eiwit per μl in je eigen monster te bepalen.
19. Hoeveel μl van je monster zou je nodig hebben als je 5mg, 750 μg of 5 μg nodig zou hebben?

Opdracht 1: Samenvatting vaste onderdelen labjournaal

Maak opdracht 1 (zie BlackBoard).

Opdracht 2: ijklijn maken

Voer het protocol voor het maken van een ijklijn uit. Dit experiment moet in duplo worden uitgevoerd en jullie pipetteren ieder een eigen reeks.

Maak een ijklijn en bereken de R^2 .

Gebruik deze ijklijn om de eiwit concentratie van het eerder gemeten onbekende monster te bepalen.

Opdracht 3: kleine hoeveelheden pipetteren

Voer de pipetteeropdracht die op het white board geschreven staat uit en laat aan je assistent zien dat je eindvolume correct is.

Opdracht 4: quiz

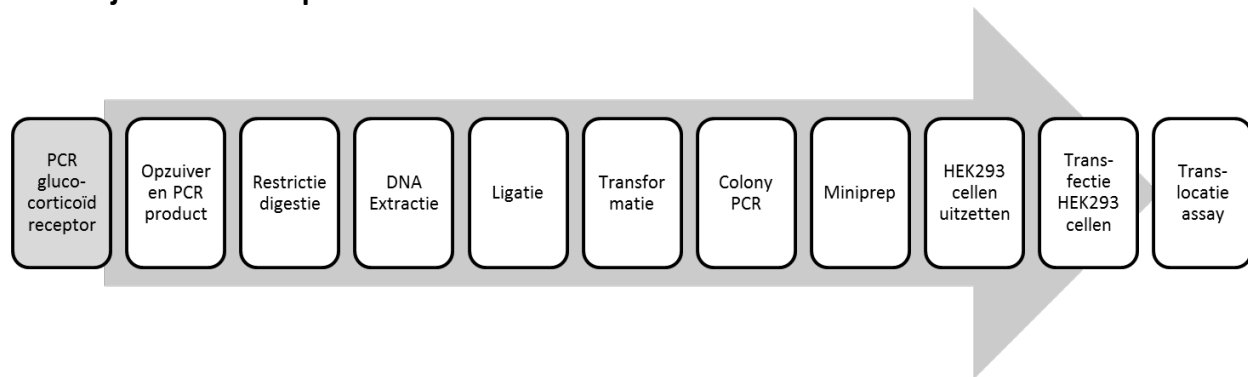
Beantwoord de vragen van de labvaardigheden quiz en geef de antwoorden door aan je assistent.

Dagdeel 2: PCR glucocorticoïde receptor

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van de PCR en (sub)kloneren beschrijven
- Je kunt de PCR correct uitvoeren
- Je kunt het juiste open reading frame van een gen bepalen
- Je kunt beschrijven waar een goede primer aan moet voldoen
- Je kunt de bepalen in welke mate een gen geconserveerd is tussen species en de betekenis hiervan uitleggen

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Jullie krijgen straks een plasmide waar het coderende gedeelte van de DNA sequentie van het *humane glucocorticoïde receptor* gen in zit en gaan dit subkloneren in een plasmide dat het *GFP* gen bevat. Binnen de moleculaire biologie spreken we van subkloneren als we een targetgen uit een ouderplasmide (plasmide met *humane glucocorticoïde receptor* gen) overzetten in een bestemmingsplasmide (plasmide met *GFP* gen). Dit bestemmingsplasmide is vaak een expressieplasmide dat kan worden gebruikt om de functie van een specifiek eiwit te bestuderen. Het subkloneren moet zodanig worden gedaan dat het coderende DNA van *het humane glucocorticoïde receptor* gen in frame wordt gezet met het *GFP* gen. Hiermee bedoelen we dat we een correct leesraam (open reading frame) krijgen van het *GFP* gen met het *humane glucocorticoïde receptor* gen om ons uiteindelijke doel, een glucocorticoïde receptor green-fluorescent protein (GR-GFP) fusie-eiwit te kunnen bereiken. Elke stuk DNA heeft zes leesramen, drie in elke richting (drie forward en drie reverse). Het leesraam dat wordt gebruikt bepaald voor welk aminozuur dat specifieke stukje gen codeert. Meestal wordt er voor ieder gen maar één leesraam gebruikt en dit is meestal de langste. Een leesraam begint altijd met een start codon (ATG dat codeert voor het aminozuur Methionine) en eindigt met een stop codon (TAA, TAG of TGA). Hieronder staat een voorbeeld van drie forward leesramen met corresponderende aminozuren. Frame 1 is in dit geval het correcte leesraam:

5'atgccaagctgaatagcgtagaggggtttcatcattgaggacgatgtaa3'

Frame 1:

atg	ccc	aag	ctg	aat	agc	gta	gag	ggg	ttt	tca	tca	ttt	gag	gac	gat	gta	taa
M	P	K	L	N	S	V	E	G	F	S	S	F	E	D	D	V	*

Frame 2:

tgc	cca	agc	tga	ata	gcg	tag	agg	ggt	ttt	cat	cat	ttg	agg	acg	atg	tat
C	P	S	*	I	A	*	R	G	F	H	H	L	R	T	M	Y

Frame 3:

gcc	caa	gct	gaa	tag	cgt	aga	ggg	gtt	ttc	atc	att	tga	gga	cga	tgt	ata
A	Q	A	E	*	R	R	G	V	F	I	I	*	G	R	C	I

Figuur 1: Voorbeeld van drie verschillende leesramen met corresponderende aminozuren.

De meest gebruikte methode om een gen te subcloneren is door gebruik te maken van restrictie enzymen. Je gebruikt dezelfde restrictie enzymen voor het uitknippen van het targetgen uit het ouderplasmide als voor het openknippen van het expressieplasmide. Op deze manier creëer je de zogenaamde complementaire sticky ends die worden gebruikt voor de ligatie. Hier komen we later nog uitgebreid op terug. Om voldoende DNA te hebben voor de restrictie digestie gaan jullie straks eerst het *glucocorticoïde receptor* gen amplificeren met de polymerase ketting reactie (Polymerase Chain Reaction kortweg PCR) door gebruik te maken van speciaal voor dit doeleinde ontworpen primers. De PCR heeft in de jaren tachtig van de vorige eeuw voor een wetenschappelijke revolutie gezorgd en de onderzoekers die deze methode hebben ontwikkelt hebben daarvoor een Nobelprijs gekregen (zie tekstbox).

The nobel Prize for the discovery of PCR

The Nobel Prize in Chemistry 1993 was awarded "for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry" jointly with one half to Kary B. Mullis "for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method" and with one half to Michael Smith "for his fundamental contributions to the establishment of oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis and its development for protein studies".

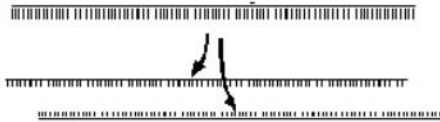


Kary B. Mullis

Michael Smith

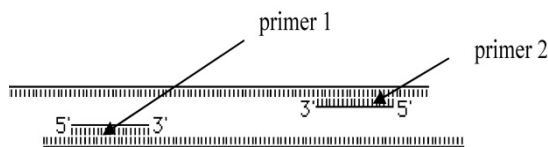
De PCR reactie bestaat uit drie fasen:

1. Denaturatie: tijdens deze fase wordt al het DNA dat als dimeer in de oplossing aanwezig is, gesplitst in twee matrijzen door te verhitten tot 94°C : de dubbele helix valt uit elkaar.



Figuur 2A: Denaturatie van DNA.

2. Hybridisatie (of annealing): bij een temperatuur tussen de 45°C en 65°C vindt er hybridisatie plaats van de primers. De timing en temperatuur van deze stap moet afgestemd zijn op de primer sequentie; hoog genoeg voor specifieke binding en kort genoeg om te voorkomen dat de denaturatie ongedaan wordt gemaakt.



Figuur 2B: Hybridisatie of anealing.

3. Extensie (of elongatie): bij 72°C zet het taq-polymerase de gehybridiseerde primers richting 3' om in het gewenste stuk dubbelstrengs DNA.



Figuur 2C: Extensie of elongatie.

Na de derde stap bevat de oplossing twee maal zoveel target DNA als ervoor. Vervolgens worden deze stukjes weer door verhitting gedeneureerd in enkelstrengs-DNA en begint het proces opnieuw. Omdat het polymerase alleen richting de targetsequentie kopieert, wordt dit stukje exponentieel gekopieerd, terwijl het oorspronkelijke DNA al bij de derde cyclus niet meer wordt gekopieerd. Na enkele cycli is er zoveel DNA aangemaakt dat dit aangetoond kan worden met gelelektroforese.

Het DNA polymerase dat oorspronkelijk werd gebruikt voor de PCR was geïsoleerd uit de *Escherichia coli* bacterie. Dit moest elke cyclus opnieuw worden toegevoegd, omdat het tijdens de eerste stap van de PCR het polymerase geïnactiveerd raakt. Pas bij de ontdekking van thermostabiel DNA polymerase (zie kader) was dit niet meer

noodzakelijk. Deze ontdekking was meer dan alleen gemak, want nu was het ook mogelijk om de elongatie te laten plaats vinden bij een hogere temperatuur. Hierdoor werden de specifieke producten die eerder de beperkende factor voor DNA amplificatie waren, gereduceerd en kon de PCR worden geoptimaliseerd tot de techniek zoals we hem nu kennen.

The taq behind PCR

Nobel Laureate Kary Mullis is generally credited with inventing the polymerase chain reaction, but his discovery owes a lot to a microbiologist who loved to travel, some refuted assumptions of what can live in hot springs, and a now-closed field station in Yellowstone National Park.

Here's the story:

In the 1960s, Thomas Brock was a biologist at Indiana University whose interest was shifting toward microbial ecology; he began studying microorganisms in intertidal pools, freshwater lakes, cold springs, and finally, geysers and hot springs.

Brock had a travel bug, and was increasingly interested in doing field ecology. He started a field research station in Yellowstone National Park, though he says at first he wasn't interested in geysers. At the time, scientists believed that bacteria optimally lived at about 55°C, and that nothing lived above 73°C. So, he assumed there was nothing to find.

But, he soon found pink bacterial filaments living in the Octopus Hot Spring at temperatures above 80°C. The bacteria: *Thermus aquaticus*, which contains the DNA polymerase that ultimately became the backbone of PCR.

The key to making PCR work is a heat-tolerant enzyme that can endure conditions in the chain reaction. Since *Thermus aquaticus* was the first organism known to exist (and reproduce) at these high temperatures, it naturally became the focus point of Mullis' later invention.

In a Journal of Bacteriology paper with an honors undergraduate Hudson Freeze, Brock introduced the new species in 1969. It was the first instance of an organism thriving at extremely high temperatures.

The bacteria are also in hot springs worldwide, including Japan, New Zealand, and Iceland. But Yellowstone was the easiest to study; being a national park, habitats were not destroyed or developed into spas and resorts, which made international research challenging.

Ironically, Brock at first had no interest in Yellowstone, because of the park's reputation in the 1950s and 60s as more of an amusement park than natural habitat. Brock continued his work on extreme thermophiles, but closed the Yellowstone research station in 1975. **Only several years later, when PCR technology** – which depends on the heat-tolerant DNA polymerase found in Taq – was announced did interest in his work rebound.

Bron: <http://bitesizebio.com/articles/the-taq-behind-pcr/>

Experiment

Elke PCR bevat in ieder geval de volgende vier componenten:

- dNTPs: term gebruikt voor de vier deoxyribonucleotides: dATP, dCTP, dGTP en dTTP ook wel oligonucleotiden genoemd. Dit zijn de bouwstenen voor het nieuw te synthetiseren DNA
- Template DNA: target DNA sequentie die je wilt amplificeren
- Primers: enkelstrengs korte DNA fragmenten (16-50 nucleotiden lang) die complementair zijn aan een gebied net voor en net na het target DNA
- DNA polymerase: thermostabiel enzym dat de synthese van nieuw DNA katalyseert

Reagentia:	PCR cocktail(10X PCR Dream Taq buffer (eind conc 1x), 2mM dNTP's (eind conc 0,04mM), 10µM forward primer (eind conc 0,2µM), 10µM reverse primer, H ₂ O, 5U/µl Dream Taq DNA polymerase (eind conc. 0,025U/µl)), Plasmide EGFP-C1 1µg/µl
Benodigheden:	PCR strip, ijs, ijsbak, pipet puntjes
Apparatuur:	PCR apparaat, mini tafelcentrifuge, pipet

PCR

1. Neem een schone PCR strip en label deze duidelijk met het nummer dat je van je practicumassistent hebt gekregen met watervaste stift en zet op ijs. Per tafel nemen jullie een negatieve controle mee (dus zonder DNA) Denk er ook weer aan dat je je buisjes kunt onderscheiden van alle andere.
2. Pipetteer 48µl PCR cocktail in een buisje van de PCR strip per PCR reactie. Zorg ervoor dat je alle reactiecomponenten en materialen, zoals pipetten (P200 en P20) en pipetpunten, bij je in de buurt hebt. Werk secuur, controleer voor gebruik altijd of je pipet op de juiste hoeveelheid staat ingesteld en gebruik voor elke stof een schone pipetpunt. Zet elke keer de reactiecomponenten terug op ijs, want het enzym is al toegevoegd aan de cocktail.
3. Voeg aan elk reactiemengsel 2µl DNA oplossing toe (met uitzondering van je negatieve controle) en meng voorzichtig door twee keer op en neer te pipetteren. Zet het buisje terug op ijs. Let erop dat het dopje goed op het buisje zit. Je moet een korte 'klik' horen, anders kan je product verdampen tijdens het PCR-en.
4. De assistent geeft aan wanneer jullie kort kunnen centrifugeren om alle vloeistoffen in de punt van het PCR buisje te krijgen en de PCR in het apparaat gezet kan worden.
5. De PCR kan beginnen en doorloopt het onderstaande programma:

Tabel 1: PCR programma Glucocorticoïde receptor

PCR programma		Temperatuur	Duur
Initiële denaturatie		95°C	2'
35 cycles	Denaturatie	95°C	30''
	Annealing	52°C	30''
	Extentie	72°C	3.30''
Eind extentie		72°C	10'
bewaren		8°C	∞

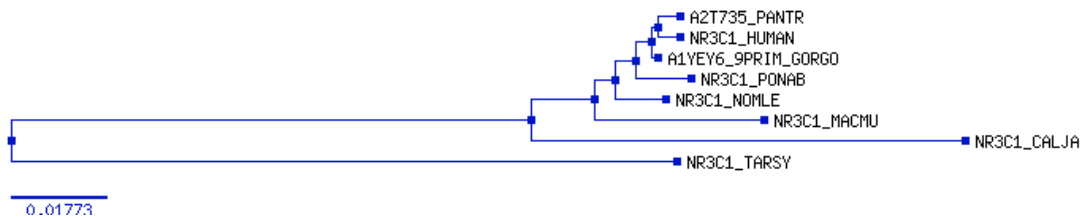
6. Je hoeft niet te wachten tot het programma is afgelopen; de PCR verloopt automatisch.

Opdracht 1:

Maak de opdracht over de empirische cyclus (zie BlackBoard). Vul het schema in, print het uit en plak in je labjournaal.

Opdracht 2:

Grote stukken sequentie van het *Glucocorticoïde receptor* gen zijn geconserveerd tussen species (men spreekt dan over orthologe sequenties) en hebben een identieke of een homologe sequentie. Als er meerdere orthologe genen zijn wil dat zeggen dat er evolutionaire druk is geweest op dit gen bij het ontstaan van nieuwe soorten. De evolutionaire relatie tussen soorten of genen kan worden weergegeven in een fylogenetische boom. In figuur 3 zie je als voorbeeld de fylogenetische boom van de *Glucocorticoïde receptor* tussen verschillende primaten. Als een gen op DNA niveau geconserveerd is, is dit uiteraard ook op eiwit niveau terug te vinden. De geconserveerde gebieden binnen een eiwit bevatten vaak functionele domeinen. De glucocorticoïde receptor heeft drie functionele domeinen: het transactivatiedomein (N-terminaal), het DNA bindend domein en het ligand bindend domein (C-terminaal). Het transactivatiedomein is direct betrokken bij de regulatie van promoteractiviteit en dus bij de transcriptie van targetgenen. Met het DNA-bindend domein bindt de receptor aan specifieke DNA sequenties (GREGs). Het ligand-bindend domein is verantwoordelijk voor het specifiek binden van liganden, in het geval van de glucocorticoïde receptor zijn dit glucocorticoïden. In deze opdracht gaan jullie zelf bepalen in welke mate het *Glucocorticoïde receptor* gen en het Glucocorticoïde receptor eiwit zijn geconserveerd. Daarnaast gaan jullie op eiwit niveau naar de verschillende functionele domeinen zoeken.



Figuur 3: Fylogenetische boom voor de *Glucocorticoïde receptor* voor verschillende primaten.

Om de geconserveerde gebieden in de glucocorticoïde receptor te vinden beginnen we met het vergelijken van de DNA en eiwit sequentie van deze receptor tussen de volgende species: de mens, de muis, de hond, het wilde zwijn en een vogel (de Witkeelgors). Hiervoor gebruiken we het programma MEGA. Op de internetdatabase GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) zijn van de verschillende species DNA sequenties te vinden. Zoek op GenBank eerst de DNA sequentie voor de glucocorticoïde receptor voor de mens (*Homo sapiens*), muis (*Mus musculus*), hond (*Canis lupus familiaris*), het wilde zwijn (*Sus scrofa*) en de Witkeelgors (*Zonotrichia albicollis*). Tip: op GenBank worden vaak afkortingen voor bepaalde genen gebruikt. De glucocorticoïde receptor wordt ook wel nuclear receptor subfamilie 3 groep C member 1 met als afkorting NR3C1. Je kunt de verschillende orthologe sequenties ook opzoeken met de volgende GenBank accession nummers:

- Mens: NM_001204264.1
- Muis: NM_008173.3
- Hond: XM_535225.4
- Zwijn: XM_005652957.1
- Witkeelgors: XM_005493096.1

Om sequenties te downloaden kan je ze opslaan op je clipboard. Klik rechtsboven op Send dan op Clipboard en dan Add to Clipboard. Als je nu op Clipboard drukt krijg je een lijst met de items die je hebt geselecteerd. Om de

sequenties te downloaden druk je op **Send**, dan selecteer je bij Choose Destination File selecteer bij Format FASTA en druk dan op **Create file**.

The screenshot shows the NCBI website interface. At the top, there are navigation links for 'Resources' and 'How To', and a 'Sign in to NCBI' link. The main content area displays the title 'Homo sapiens nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) (NR3C1), transcript variant 1, mRNA' along with its NCBI Reference Sequence (NM_001204264.1). A 'Send' menu is open, showing options for 'Complete Record', 'Coding Sequences', 'Gene Features', 'File', 'Clipboard', 'Collections', and 'Analysis Tool'. The 'Clipboard' option is selected, and the 'Add to Clipboard' button is highlighted. The background shows the 'FASTA' format selected for the download.


Het bestand dat je nu hebt gemaakt kan je openen in MEGA. Waarschijnlijk wordt er automatisch gevraagd of je het bestand wil openen in MEGA, zo niet dan moet je het bestand eerst opslaan en dan openen in MEGA. Wanneer je het bestand opend in MEGA wordt meteen de alignment explorer geopend waarin je al de basen van je sequenties in verschillende kleuren ziet. Druk nu op **alignment** en dan op **Custom**. Geconserveerde basen zijn aangegeven met een *.

Je kan MEGA de variatie in je DNA sequentie laten analyseren. Druk daarvoor eerst op **Data** en dan op **Phylogenetic Analysis**. Als je nu de alignment explorer minimaliseert zie je drie knoppen:



Druk op **TA**.

Je kan MEGA verschillende soorten basen laten selecteren. Als je op **C** drukt zie je alle geconserveerde basen geel gekleurd en als je op **V** drukt zie je alle variabele basen geel gekleurd. Je kijkt nu naar de DNA sequenties, dus naar de verschillende basenparen. Je kan in MEGA een DNA sequentie laten vertalen naar een aminozuur frequentie.

Druk daarvoor op deze knop: 

Opdracht 2a:

Is er verschil in het percentage totaal aantal geconserveerde baseparen en aminozuren? Leg uit.

Wat is het percentage homologe en wat is het percentage identieke sequenties? Leg uit.

Selecteer nu de geconserveerde aminozuren.

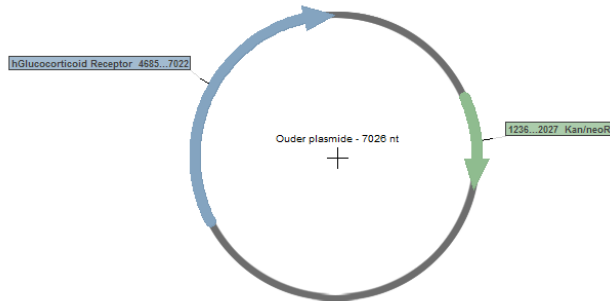
Opdracht 2b:

Kijk of je een verschil ziet in de hoeveelheid geconserveerde aminozuren op verschillende plekken in de sequentie. Kan je verschillende domeinen onderscheiden? Zo ja, welke en leg uit hoe deze domeinen gerelateerd zijn aan wat je al weet over de Glucocorticoïde receptor.

Opdracht 3: Primers

Zoals eerder aangegeven moet eerst het *glucocorticoïde receptor* gen geamplificeerd worden om voldoende DNA te hebben voor de restrictie digestie. Om dit te kunnen doen moeten eerst de juiste primers ontworpen worden.

De figuur hieronder is een schematische weergave van het humane glucocorticoide receptor DNA. Geef in deze figuur aan waar het start en waar het stop codon zich ongeveer zullen bevinden. Arceer vervolgens de gebieden die je zou gebruiken om de primer sequenties te ontwerpen. Waarom kies je voor deze gebieden?



Figuur 4: Plasmide kaartje van ouderplasmide met humane glucocorticoïd receptor gen.

Opdracht 3b:

Een primer is een klein stukje enkelstrengs DNA dat gebruikt wordt als startpunt van de PCR. Per reactie zijn er steeds twee primers nodig, één voor de 5'-streng en één voor de 3'-streng. Stel dat jullie zelf primers zouden moeten ontwerpen. Aan welke voorwaarden moet een goede primer voldoen? Leg uit.

Opdracht 3c:

Voordat we kunnen beginnen met de PCR moeten eerst de primers worden opgelost. Op de datasheet van de primers staat hoeveel mg peptiden we hebben ontvangen. Bereken in hoeveel Tris-EDTA je de primers moet oplossen om een 100µM stock oplossing te krijgen en vervolgens hoeveel je deze moet verdunnen om een 10mM werkoplossing te krijgen.

Biologio BV PO BOX 91, 6500 AB Nijmegen Tel: +31(0)24 3586885 FaxX: +31(0)243580259 E-mail: Info@biologio.com Website: www.biologio.com			
Researcher Name	Cindy Wagemans	Purification	Cartridge
Manufacture date	24.10.2013	5'-Label:	No
Batch-No	284501	3'-Label:	No
Oligo Name	EGFP-hGR 1 forward	Internal Label(s)	
Comment		Method	Economy
Scale	40 nmol	Dissolved	No
Chemistry	DNA	QC	Normal no extra

Sequence:

5'-AGA TCC GCC ACA ACA TCG AG-3'

Number of bases:

A	C	G	T	N	Total	%GC
7	7	4	2	0	20	55

Melting Temperature:	57,5 °C
Molecular Weight:	6080 gr/mol
Absorbance value (260 nm):	8,58
Total Nucleic Acid:	43,23 nmol
in sample:	262.84 ug
for 100 µM Solution dissolve in:	µl



Biolegio BV
 PO BOX 91, 6500 AB Nijmegen
 Tel: +31(0)24 3586885 FaxX: +31(0)243580259
 E-mail: Info@biolegio.com Website: www.biolegio.com

Researcher Name	Cindy Wagemans	Purification	Cartridge
Manufactory date	24.10.2013	5'-Label:	No
Batch-No	284502	3'-Label:	No
Oligo Name	EGFP-hGR 1 reverse	Internal Label(s)	
Comment		Method	Economy
Scale	40 nmol	Dissolved	No
Chemistry	DNA	QC	Normal no extra

Sequence:

5'-TGA TGG TTC ACG TAG TGG GC-3'

Number of bases:

A	C	G	T	N	Total	%GC
3	3	8	6	0	20	55

Melting Temperature:	55,3 °C
Molecular Weight:	6204 gr/mol
Absorbance value (260 nm):	8,11
Total Nucleic Acid:	42,08 nmol
in sample:	261,08 ug
for 100 µM Solution dissolve in:	µl

Figuur 5: Datasheet EGFP-hGR 1 primers.

Opdracht 3d:

- i. Aan welke streng annealt de forward primer?
- ii. Aan welke streng annealt de reverse primer?
- iii. Welke primer wordt van 5' naar 3' verlengd?

Opdracht 4:

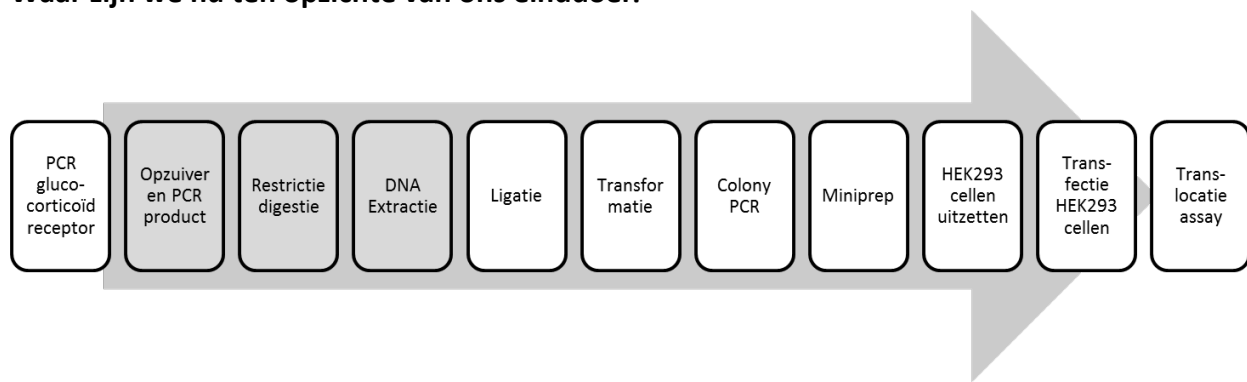
- a. Welke PCR product grootte verwacht je?
- b. Welke controles neem je mee bij het inzetten van je PCR en waarom?
- c. Waarvoor dient magnesiumchloride in de PCR mix?

Dagdeel 3: Opzuiveren PCR product /Restrictie digestie /DNA extractie

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van agarose gelelektroforese, PCR purificatie, restrictie digestie en DNA extractie beschrijven
- Je kunt de bovenstaande technieken correct uitvoeren
- Je kunt uitleggen hoe een 2-staps enzymreactie met een substraat werkt.
- Je kunt uitleggen hoe een Michaelis-Menten vergelijking tot stand komt en deze toepassen voor een gegeven enzymreactie
- Je kunt een Lineweaver-Burk plot om de K_m en de V_{max} van een enzymreactie te berekenen

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

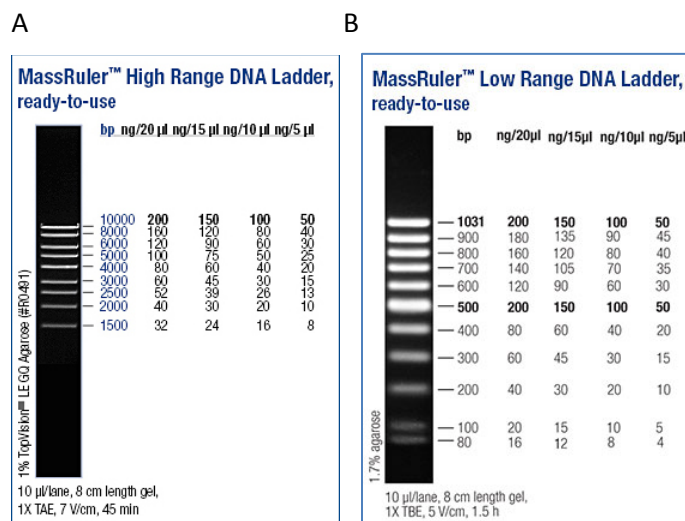
Vorig practicum dagdeel heb je het *glucocorticoïde receptor* gen geamplificeerd door middel van de PCR techniek. Vandaag gaan we verder met de subkloning door zowel het insert (*glucocorticoïde receptor* gen) als het expressiesplasmide pEGFP-C1 (dat het *GFP* gen bevat) met behulp van dezelfde restrictie enzymen te knippen. Hiermee creëren we de zogenaamde complementaire sticky ends die we gebruiken voor de ligatie van volgende week.

Restrictie enzymen zijn nucleases die de suiker-fosfaat backbone van DNA kunnen knippen en worden geïsoleerd uit bacteriën. Deze enzymen herkennen specifieke palindromische nucleotiden sequenties (herkenningssequentie) van vier, zes, acht tien of twaalf nucleotiden lang, de zogenaamde restrictiesite. De meeste restrictie enzymen knippen het DNA ongelijk en veroorzaken complementaire enkelstrengs klevende uiteinden (sticky ends), maar sommige enzymen knippen recht en veroorzaken stompe einden (blunt ends). Meer achtergrond over restrictie enzymen en hoe ze de ontwikkeling van de moleculaire biologie hebben gestimuleerd kun je lezen in het artikel van Roberts (PNAS 2005 102;17:5905-5908).

Tabel 1: Voorbeelden van veel gebruikte restrictie-enzymen

Enzym	Bron	Herkenningsplaats	Knipplaats	Resultaat restrictie
Not I	<i>Nocardia otitidis</i>	5'GCGGCCGC 3'CGCCGGCG	5'---GC GGCCGC---3' 3'---CGCCGG CG---5'	5'-sticky
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	5'CCCGGG 3'GGGCCC	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'	blunt

Er zijn veel verschillende restrictie enzymen beschikbaar, dus bijna altijd is er wel een restrictie enzym te vinden dat knipt in jouw target sequentie. Elk restrictie enzym heeft unieke eigenschappen dat bepaalt hoe efficiënt en onder welke condities (samenstelling restrictiebuffer, temperatuur, tijd, aantal base paren tussen restrictiesite en uiteinde DNA) het knipt. De meeste commercieel verkrijgbare expressieplasmiden bevatten naast een gen dat codeert voor antibiotica resistentie en een origin of replication (dat bacteriën gebruiken om kopieën van plasmide te maken) een polylinker, ook wel multiple cloning site genoemd. Dit bevat een aantal restrictiesites op een korte afstand die kunnen worden gebruikt voor (sub)klonering. Na de restrictie digestie kunnen de resultaten worden geanalyseerd met agarose gelelektroforese. Dit is een scheidingstechniek die de negatief geladen DNA moleculen in een elektrisch veld laat bewegen naar de positieve pool. Hoe groter de moleculen, hoe trager ze bewegen. Als referentie voor de grootte van DNA fragmenten gebruiken jullie de Massruler high- and low range DNA ladder (Fermentas), ook wel molecular-weight size marker genoemd. Van deze standaard is de grootte van de DNA fragmenten bekend. Door jouw bandjes te vergelijken met die van de ladder is de grootte van een DNA fragment redelijk nauwkeurig te bepalen. Bij het practicum Genetica en Evolutie hebben jullie dit al preciezer berekend door gebruik te maken van semi-logaritmisch papier. We beginnen dit practicum met het opzuiveren van het PCR product.



Figuur 1: Massruler High (A) en Low (B) range DNA ladder


Experiment

PCR opzuiveren:

Voordat we verder kunnen moeten we eerst het PCR product opzuiveren. We willen alleen het PCR product overhouden en eventuele overgebleven componenten kwijtraken.

Reagentia:	Roche High Pure PCR Product Purification Kit (binding buffer, wash buffer, elution buffer), PCR product
Benodigdheden:	1,5ml epjes, pipet punten
Apparatuur:	tafelcentrifuge, pipet

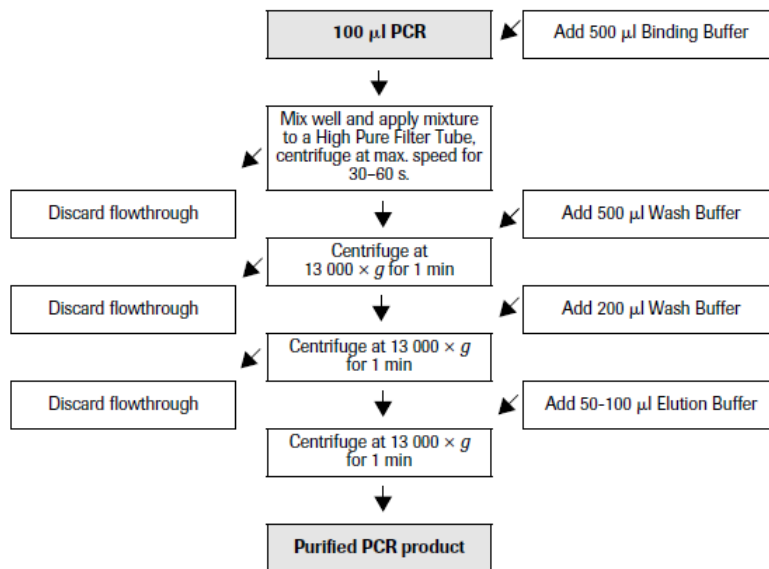
Bindingsbuffer: Guanidine hydrochloride

	Xi irriterend
R-zinnen:	R22, R37/38, R41
S-zinnen:	S22

Principle

The sample is mixed with a chaotropic salt and applied to the glass fiber fleece in a High Pure Spin Filter Tube. Under the buffer conditions used in the procedure, all nucleic acids in the sample bind to the glass fleece in the High Pure tube, while contaminating substances (salts, proteins, nucleotides, mineral oil and other contaminants) do not. Brief wash-and-spin steps readily remove these contaminants. Once purified, the nucleic acids can be easily eluted in a small volume of low salt buffer

Bron: <http://www.roche-applied-science.com/shop/products/high-pure-pcr-product-purification-kit>



Figuur 2: Overzicht PCR opzuivering.

Protocol:

1. Vul het volume van elke PCR reactie tube aan tot 100µl
2. Voeg 500µl binding buffer toe aan elke PCR reactie
3. Plaats een spinkolom (High pure filter tube) op een opvangepje voor elke PCR reactie.
4. Pipetteer de gehele inhoud van je PCR reactie in het bovenste reservoir van de spinkolom
5. Centrifugeer 60 sec bij 13000 rpm.
6. Leeg het opvangepje en plaats de spinkolom weer in het lege opvangepje.
7. Voeg 500µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.

8. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom weer op het opvangepje
9. Voeg 200µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
10. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom op een schoon 1,5ml epje.
11. Voeg 25µl elutiebuffer toe aan de spinkolom en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
12. Pipetteer het eluaat nogmaals op de kolom en plaats de kolom terug in het 1,5ml epje en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
13. Het gezuiverde DNA bevindt zich nu in oplossing in het 1,5ml epje.

Restrictie digestie:

Reagentia:	restrictie enzymen Fast digest XhoI en BamHI, 10x Fast digest buffer, H ₂ O, gezuiverd PCR product, EGFP-C1 vector :
Benodigdheden:	ijs, ijsbak (of -20 bakjes voor enzym) pipet punten, 1,5 ml epjes
Apparatuur:	pipet, tafelcentrifuge, waterbad 37°C

Protocol:

1. Het insert (de PCR reactie) en expressieplasmide pEGFP-C1 worden geknipt met de restrictie enzymen *BamHI* en *XhoI*. Pipetteer aan de hand van je pipeteerschema je restrictiedigestie reactie voor ieder monster in een 0,5ml epje. Per practicumduo doen jullie een dubbeldigestie van het expressieplasmide en het insert en per tafel nemen jullie de volgende controles mee: ongeknipte plasmide, ongeknipte PCR product, plasmide geknipt met BamHI of met XhoI. Laat voordat je begint je pipeteerschema controleren door je practicumassistenten.

Tabel 2: samenstelling mastermix restrictie enzym.

	Per duo		Per tafel			
	Dubbele digestie		Enkele digestie		Ongeknipt	
	hGR insert	pEGFP-C1	pEGFP-C1	pEGFP-C1	hGR insert	pEGFP-C1
10x Restrictiebuffer G	?	?	?	?	-	-
BamHI	3µl	2µl	2µl	-	-	-
XhoI	3µl	2µl	-	2µl	-	-
Insert hGR	20µl	-	-	-	5µl	-
Expressieplasmide pEGFP-C1 (1ug/ul)	-	2µl	2µl	2µl	-	1µl
water	?	?	?	?	?	?
Totaal volume	60µl	40µl	40µl	40µl	10µl	10µl

2. Sluit het buisje goed af en centrifugeer kort, zodat alle vloeistof onder in het epje zit.
3. Incubeer 5 minuten bij 37°C in een waterbad

DNA extractie uit agarose gel:

Voordat we verder kunnen moeten we eerst de restrictie enzymen en zouten uit de restrictie digestie mengsels worden verwijderd. Daarnaast willen we ongewenste DNA moleculen verwijderen (aspecifieke PCR producten en fragmenten DNA die we uit het insert en expressieplasmide hebben geknipt). Dit doen we door de DNA monsters met behulp van agarose gelelektroforese te scheiden en vervolgens uit gel te zuiveren.

Principle

A solubilization buffer containing a chaotropic salt (sodium perchlorate) dissolves an agarose gel slice that contains a DNA fragment. In the presence of the chaotropic salt, the DNA fragment binds selectively to silica matrix. The DNA remains bound while a series of rapid wash-and-spin steps remove contaminating small molecules. Finally, low-salt elution removes the DNA from the silica matrix. The process does not require DNA precipitation, organic solvent extractions, or extensive handling of the DNA.

Bron: <http://www.roche-applied-science.com/shop/products/agarose-gel-dna-extraction-kit>

Reagentia:	agarose, 1x TAE, midori green, high range DNA ladder, Low range DNA ladder, Orange loading dye, DNA sample
Benodigdheden:	gel tray, kammen 2x, 250/500ml erlenmyer, 250 ml maatcilinder weegbakje, spatel, eppenrek, 2,0ml eppen
Apparatuur:	electroforese apparaat, weegschaal, pipet magnetron



Midori Green DNA Stain kleurt nucleine zuren. Voor het kleuren van DNA in agarose gellen is het een veilig alternatief voor Ethidium bromide. Het is niet-mutageen, maar kan mogelijk wel de huid en ogen irriteren. Het wordt daarom aangeraden om handschoenen te dragen.

Protocol:


1. Per practicumgroep zal één agarose gel gegoten worden. Je assistent zal de taken verdelen:
2. Maak een 200ml 0,7% agarose oplossing in 1X TAE (pH 8.1) in een erlenmeyer. Agarose is een droge stof die moet worden afgewogen. TAE is een buffer en wordt 10X zo geconcentreerd gemaakt en moet dus voor gebruik 10x verdund worden met demi-water.
3. Kook de agarose oplossing om de agarose op te lossen in de magnetron (duurt ongeveer 3.5 min). Pas op dat de oplossing niet overkookt en zwenk tot dat er geen agarose bolletjes meer zichtbaar zijn. Door het verschijnsel kookvertraging kan de oplossing op onverwachte momenten heftig gaan koken. **Pas dus op voor ogen en handen!**
4. Laat de geloplossing afkoelen tot ongeveer 40-50°C en voeg met een 300µl midori green toe (10mg/ml) toe aan de nog vloeibare agarose gel. Plak de open zijde van de gelbak dicht met tape, zodanig dat de zijanten goed zijn afgesloten en er geen lekkage kan optreden.
5. Laat de oplossing afkoelen tot handwarm en giet deze dan pas in de afgeplakte gelbak. Plaats de kam in de gelbak zodat je slotjes kunt maken waar je straks de DNA monsters in kunt pipetteren. Laat de gel 20 minuten stollen.

6. Voeg 2µl orange loading dye per 10µl monster. Meng de oplossing door twee keer rustig op en neer te pipetteren. Dit geeft de oplossing een oranje kleur waardoor deze makkelijker op gel te brengen is en zorgt er tevens voor dat je DNA in de welletjes zakt
7. Als de gel na 30-45 min bij kamertemperatuur gestold is kan deze in de gelbak worden gelegd. Trek de kam rustig uit de gel. Vul de gelbak met de overgebleven 1X TAE buffer totdat de gel 1 à 2 mm onder de vloeistof staat.
8. Pipetteer het volledige monster in een leeg slotje van de gel. Nadat alle studenten geladen hebben moet als laatste 10µl van beide DNA ladders (high range en low range) in een leeg slotje worden gepipetteerd.
9. Sluit de spanningsbron aan en start het runnen of lopen van de gel. Vraag je assistent welke spanning je tussen de elektroden moet hebben - dit is meestal 150 V.
10. Na ongeveer 45 minuten bij 150 V heeft de gel lang genoeg gelopen.
11. Handschoenen aan: haal de gel rustig uit de gelbak door de geldrager iets scheef te houden en de vloeistof weg kan lopen. Houdt de gel met je vingers tegen, want hij wil nog wel eens uit de geldrager glibberen. Leg de geldrager met gel rustig in een witte dienblad en loop naar het gel doc systeem om de resultaten te bekijken
12. Maak een foto en start met de interpretatie van de resultaten. Foto's worden op BlackBoard gezet.



Fragmenten uitsnijden en DNA extractie

Reagentia:	Roche DNA extraction kit (binding buffer, was buffer, elution buffer), isopropanol, DNA monster in agarose
Benodigheden:	scalpel, 1.5 ml epje, pipet punten, eppen rek
Apparatuur:	UV bak/Blue light illuminator, bescherm kap, pipet, hitteblok 56°C, vortex, tabletop centrifuge

Bindingsbuffer bevat Guanidine hydrochloride:

 Xi irritierend	
R-zinnen:	R22, R36/38
S-zinnen:	S22

Isopropanol

 Xi irritierend  F licht ontvlambaar	
R-zinnen:	R11, R36/37, R67
S-zinnen:	S7, S16, S24/25, S26

Protocol:

1. Bekijk de gel op de Blue-light transilluminator en snijd vervolgens met behulp van een schoon scalpelmessje de gewenste DNA fragmenten uit de gel. Probeer hierbij zo weinig mogelijk gel mee uit te snijden. Doe de uitgesneden gel blokjes die de DNA fragmenten bevatten in een 1,5ml epje. Label het epje zodat je weet welk bandje in welk epje zit. Maak de plaat eerst schoon met water en daarna met ethanol.

2. Weeg de hoeveelheid uitgesneden gel in de 1,5ml epjes. Leg hiervoor eerst een leeg 1,5ml epje op een weegschaal en tarreer. Leg vervolgens het epje met de gel op de weegschaal en lees het gewicht af.
3. Voeg 300µl bindingsbuffer per 100mg agarosegel toe.
4. Vortex de suspensie 30 seconden
5. Incubeer 10 minuten bij 56°C om de agarose gel op te lossen. Vortex tijdens deze incubatie de inhoud van het epje elke 2-3 minuten kort. Als na 10 minuten de gel nog niet geheel opgelost is, incubeer dan nog enkele minuten bij 56°C en vortex nogmaals. Herhaal dit eventueel totdat alle gel opgelost is.
6. Voeg 1,5µl isopropanol per mg agarose gel aan de oplossing toe en vortex goed.
7. Plaats een spinkolom in een opvangepje.
8. Pipetteer de gehele inhoud van je epje (max. 700µl) in het bovenste reservoir van de spinkolom en centrifugeer 30-60 sec bij 13000 rpm.
9. Leeg het opvangepje en plaats de spinkolom weer in het lege opvangepje.
10. Voeg 500µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
11. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom weer op het opvangepje. Voeg 200µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
12. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom op een schoon 1,5ml epje.
13. Voeg 25µl elutiebuffer toe aan de spinkolom, incubeer 1 minuut bij kamertemperatuur en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
14. Pipetteer het eluaat nogmaals op de kolom en plaats de kolom terug in op het epje en centrifugeer 1 min bij 13000rpm.
15. Het gezuiverde DNA bevindt zich nu in oplossing in het 1,5ml epje.

Concentratiebepaling gezuiverde insert en expressie vector

Reagentia:	DNA monster, oplossing om blanco in te stellen, demiwater
Benodigheden:	P2 puntjes, tissue
Apparatuur:	Nanodrop, pipet (P2)

De nanodrop is een apparaat om de concentratie van nucleïne zuren en eiwitten in een oplossing te bepalen. Het maakt gebruik van het principe dat nucleïne zuren en eiwitten licht absorberen met een golflengte van 260 en 280 nm respectievelijk. Voor dubbelstrengs DNA correleert een optical density (OD) van 1 bij 260nm met een DNA concentratie van 50ng/µl. De hoeveelheid licht die door gelaten wordt is afhankelijk van de concentratie van het monster en aan de hand van OD metingen kan dus de concentratie nucleïne zuren in een monster worden bepaald. De ratio van de absorptie (260/280) geeft de zuiverheid van een monster aan. DNA wordt als zuiver gezien bij een ratio van ~1.8, voor RNA bedraagt deze waarde ~2.0. Een ratio die veel lager is kan duiden op vervuiling met eiwitten, phenol of andere stoffen die sterk absorberen (vlak)bij 280nm. Alle nucleïne zuren (nucleotides, RNA, ssDNA, dsDNA) dragen bij aan de totale absorptie bij 260nm. Absorptie bij 230nm wordt veroorzaakt door andere vervuiling, bijvoorbeeld van chemicaliën gebruikt voor de extractie van nucleïne zuren. De A260/230 waarde ligt normaliter tussen 2.0-2.2 voor zuivere nucleïne zuren.

Protocol:

1. Zet de computer aan die met de nanodrop is verbonden.
2. Maak de lens (onder en boven kant) in de arm van de nanodrop voorzichtig schoon met demiwater en maak het droog met een schone tissue.

Instellen van de nanodrop

3. Open de nanodrop software op de computer door op het 'ND-1000' icon te klikken.
4. Stel de nanodrop in op 'Nucleic acid'. Dit opent een dialoog venster. NIET op 'okay' klikken tot je water hebt aangebracht.
5. Pipetteer 1 μ l MilliQ op de onderste lens en sluit de arm, doe dit heel voorzichtig.
6. Klik op 'okay' en wacht tot de nanodrop klaar is met initialiseren.
7. Maak beide lenzen schoon en droog.

Blanco

1. Pipetteer 1 μ l van de buffer waar je DNA monster in is opgelost. Zorg dat er geen belletjes in komen, pipetteer anders opnieuw.
2. Doe de arm naar beneden en klik op 'Blank'.
3. Wacht tot de analyse klaar is.
4. Droog de lens met een tissue.

Monster

5. Pipetteer 1 μ l sample op de onderste lens.
6. Noteer de naam van het monster in de 'sample ID' box.
7. Klik op 'measure' om de concentratie te meten.
8. Wacht tot de analyse is uitgevoerd.
9. Maakt de lens schoon met demi water en een tissue en droog de lens
10. Herhaal dit voor alle monsters.

Data

11. Noteer de de concentratie van je monster
12. Noteer de 260/280 en 260/230 waarde
13. Als alle metingen en analyses gedaan sluit je het nanodrop programma en sluit de computer af.

Opdracht 1:

- a) Vul het pipeteerschema voor je restrictiedigestie verder in (zie protocol stap 1).
- b) Welke controles neem je mee bij het inzetten van je restrictie digestie en waarom?

Opdracht 2:

Maak een schematische tekening van de essentiële stappen die nodig zijn om DNA fragmenten uit de agarose gel te isoleren en op te zuiveren.

Opdracht 3:

Waarom moet het PCR product gezuiverd worden voor de restrictie digestie? En welke problemen kunnen er mogelijk ontstaan als je dit niet doet?

Opdracht 4:

- a. Hoe wordt de activiteit van een restrictie enzym gedefinieerd en wat betekent dat?
- b. Wat is het verschil tussen endo- en exonucleases?
- c. Wat is een palindromische sequentie?
- d. Noem een aantal verschillen tussen restrictieenzymen
- e. Wat zijn isoschizomeren en neoschizomeren?

Opdracht 5:

Stel je ziet te veel bandjes op gel na restrictie digestie. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door ster-activiteit of door partiële digestie.

1. Wat is "ster-activiteit". Wanneer kan dat optreden? Wat kan je doen om dit op te lossen?
2. Wat is partiële digestie? Wat kan je doen om dit probleem op te lossen?
3. Hoe kun je bepalen of er sprake is van ster-activiteit of van partiële digestie?

Opdracht 6:

Aan welke voorwaarde moet een restrictie enzym in ieder geval voldoen om geschikt te zijn voor het subkloneren van een bepaald gen? Leg uit.

Opdracht 7:

Maak een schematische tekening van jullie insert- en expressieplasmide en geef aan waar de restrictie sites zitten. Maak vervolgens een restrictie kaartje waarin je aangeeft hoeveel bandjes en welke grootte bandjes je verwacht te zien op gel.

Opdracht 8:

Maak een schematische tekening van de herkenningsequentie van geef hierin ook weer hoe deze restrictie enzymen knippen. Resulteert dit in een blunt end of stick end? Wat zijn de voordelen en wat de nadelen van blunt ends en van sticky ends?

Opdracht 9:

- a) Waarom wordt het PCR product na digestie gezuiverd uit een agarose gel? Welke problemen kunnen er mogelijk optreden als je dit niet doet?
- b) Waarom is het belangrijk om de agarose volledige op te lossen?

Opdracht 10:

Maak de opdracht over enzymkinetiek die te downloaden is van Blackboard. In deze opdracht leer je dat een enzymreactie volgens een bepaalde wetmatigheid verloopt en dat er verschillende factoren zijn die de snelheid van een enzymreactie beïnvloeden.

Opdracht 11:

Beantwoord de onderstaande vragen die horen bij het artikel van Roberts (PNAS 2005 102;17:5905-5908):

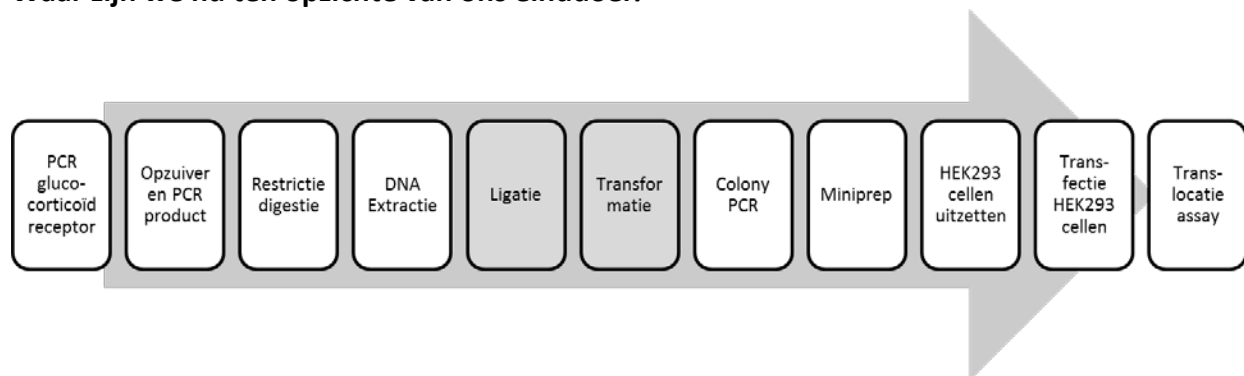
- a) Door wie is het eerste restrictie enzym ontdekt en wie publiceerden het eerste artikel waarin de mogelijkheden met deze restrictie enzymen werden omschreven?
- b) Welke twee methodes konden vroeger, na het runnen van de gel, gebruikt worden om de locatie van het DNA in de gel aan te tonen?
- c) Hoe doen we dat tegenwoordig?
- d) Er werd verwacht dat met behulp van endonuclease R, DNA in stukken van ongeveer 1000 basenparen zou worden geknipt. Bij gebruik van het enzym kwamen de onderzoekers er echter achter dat de 4500 basenparen van het SV40 DNA in 11 fragmenten werd geknipt. Wat was hiervoor de verklaring?

Dagdeel 4: Ligatie / Transformatie

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van ligatie en transformatie
- Je kunt de bovenstaande technieken correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vorig practicum dagdeel heb je met behulp van restrictie digestie en DNA extractie het insert (*glucocorticoïde receptor* gen) en de expressieplasmide pEGFP-C1 (dat het *GFP* gen bevat) klaar gemaakt voor ligatie. Vandaag gaan jullie het insert kloneren in het opengeknijpte expressieplasmide pEGFP-C1 door gebruik te maken van het enzym T4 DNA ligase. Vervolgens gaan jullie dit transformeren in bacteriën.

Onder ligatie verstaan we binnen de moleculaire biologie het verbinden van twee DNA fragmenten door de activiteit van het enzym ligase, waarbij een recombinant DNA molecuul ontstaat. Tijdens de ligatie reactie worden hydrogene verbindingen gevormd tussen de overhangende 3' en 5' uiteinden van DNA fragmenten. Ligase repareert vervolgens de fosfaat backbone, zodat er een stabiel circulair plasmide ontstaat. Voor dit proces functioneert ATP meestal als cofactor. Verschillende factoren beïnvloeden ligatie:

1. DNA concentratie; de DNA concentratie heeft invloed op de snelheid van ligatie en of de ligatie een inter- of intra-moleculaire reactie is. Als een plasmide is opengeknijpt en beide uiteinden zijn compatibel (bijvoorbeeld als de vector is opengeknijpt met één restrictie enzym of is opengeknijpt door een blunt-end knippend enzym) dan kan het gebeuren dat de twee uiteinden van het plasmide weer aan elkaar gaat zitten en een 'zelfsluiter' vormen, dus zonder insert. De kans op deze intermoleculaire ligatie is groter bij hoge concentraties plasmide DNA. Bij lage concentraties plasmide en grote concentraties insert is de kans op intra-moleculaire verbindingen groter. De relatieve concentratie van de verschillende DNA fragmenten (lengte van insert ten opzichte van grootte plasmide) speelt ook een rol op het ontstaan van inter- versus intra-moleculaire verbindingen. De standaard ratio vector versus insert is 1:3, maar is afhankelijk van de grootte van het insert. Een hogere ratio kan de interligatie van meerder insert veroorzaken. De standaard totale concentratie DNA is minder dan 10µg/ml.
2. Ligase concentratie; hoe hoger de concentratie ligase hoe sneller de reactie. Blunt-end ligaties zijn ongeveer 100 keer minder efficiënt dan sticky end ligaties. Dit komt doordat de stompe uiteinden afhankelijk zijn van toevallige botsingen tussen beide uiteinden. Om de kans op een ligatie reactie toe te laten nemen wordt voor blunt-end ligaties 10 keer meer ligase gebruikt, is de concentratie DNA groter en de incubatie tijd langer.
3. Temperatuur; er zijn twee factoren die de temperatuur van de ligatie reactie beïnvloeden. Allereerst de optimale temperatuur van het ligase enzym (37°C) en ten tweede de smelttemperatuur van de DNA uiteinden die moeten worden geligeerd. De smelttemperatuur kan flink variëren en is afhankelijk van de samenstelling

en lengte van de uiteinden. Aangezien er vaak verschillende restrictie enzymen worden gebruikt voor het creëren van de uiteinden en er dus uiteinde ontstaan met verschillende smelttemperaturen wordt er om praktische redenen vaak gekozen voor een ligatie reactie temperatuur van tussen de 14-16°C of overnacht bij 4°C.

Jullie vervolgen het experiment door het ligatie product te transformeren in *Escherichia coli* bacteriën. Transformatie is een van de drie processen die bacteriën gebruiken om vreemd exogeen DNA op te nemen. De andere processen zijn conjugatie (overdracht van genetisch materiaal tussen twee bacterie cellen door direct contact; dit hebben jullie zelf bestudeerd bij Genetica en Evolutie practicum) en transductie (injectie van vreemd DNA door een bacteriofaag). Tijdens transformatie nemen bacteriën vreemd DNA op door de celmembraan. Dit proces komt van nature voor, maar bacteriën moeten zich hiervoor wel (tijdelijk) in een competente toestand bevinden bijvoorbeeld als reactie op voedselgebrek of celdichtheid. In een laboratorium gebruiken we bacteriën die door een specifieke procedure (gebruik van snel delende cellen in de logfase; calciumfosfaat en heatshock) al competent zijn gemaakt. Om jullie ligatieproduct in de competente cellen te krijgen gaan jullie de cellen heatshocken voor 90 seconden. Waarschijnlijk veroorzaakt de korte hitte shock een thermale onbalans tussen beide zijden van de celmembraan waardoor het DNA door poriën of de beschadigde celwand kan heen dringen. Na de transformatie moeten de cellen eerst herstellen voordat ze worden uitgeplaat. Om onderscheid te kunnen maken tussen getransformeerde en niet getransformeerde cellen maken we gebruik van de selectiemaker Kanamycine. Het expressieplasmide pEGFP-C1 bevat een *Kanamycine* gen dat ervoor zorgt dat alleen bacteriën die het plasmide hebben opgenomen kunnen groeien. De efficiëntie van de transformatie kan sterk variëren, maar onder gunstige omstandigheden 10^9 kolonie vormende eenheden per microgram DNA bereiken. Realiseer je wel dat zelfs bij hoge efficiëntie maar ongeveer 1 DNA molecuul per 10.000 cellen succesvol wordt getransformeerd.

Experiment

Platen gieten:

Reagentia:	LB medium(25g LB broth (Miller's 10g/L Tryptone, 10g/L NaCl, 5g/L Yeast extract), 15g Agar, 1000ml water), Kanamycine 50mg/ml(1000x stock)
Benodigdheden:	steriele bacterieplaten
Apparatuur:	Bunsen brander

1. Zorg voor een opgeruimde en steriele werkomgeving
2. Bepaal de hoeveelheid platen je nodig hebt voor de transformatie. Houdt rekening met de controles en overleg met je assistent.
3. De warme gesteriliseerde LB met agar staat in de incubator. Voor 1 petrischaal heb je ~20ml medium nodig. Voeg kanamycine toe tot een eindconcentratie van 50µg/ml (stock is 50 mg/ml) toe wanneer het medium nog net te heet is om lang vast te kunnen houden (~50°C).
4. Giet de agar in de petrischalen en laat de platen een half uurtje tot 3 kwartier stollen en drogen.

Ligatie van het hGR gen in pEGFP-C1:

We gaan verder met het ligeren van het gezuiverde insert in de pEGFP-C1 expressieplasmide. .

Reagentia:	Quick T4 ligase; 5x rapid ligation buffer; gezuiverd DNA, H ₂ O
Benodigdheden:	ijs, ijsbak, epjes, eppenrek, pipet punten
Apparatuur:	pipet

Waarschuwing:

Enzymen op ijs houden!!

Tip: pipetteer eerst water, dan DNA en buffer en als laatste het enzym.

Protocol:

1. Pipetteer voor de ligatie volgens het onderstaande pipetteschema in 1,5ml epjes:

Tabel 7: pipetteschema voor de ligatie van het hGR gen in pEGFP-C1

	1:2	Controle 1	Controle 2	Controle 3
pEGFP-C1 XhoI-BamHI	50ng = xµl	50ng = xµl	-	-
pEGFP-C1 XhoI	-	-	50ng = xµl	-
pEGFP-C1 BamHI	-	-	-	50ng = xµl
Insert hGR XhoI - BamHI	50ng = xµl	-	-	-
5x rapid ligatie buffer	?	?	?	?
Quick T4 ligase	1µl	1µl	1µl	1µl
water	?	?	?	?
Totaal volume	20µl	20µl	50µl	50µl

2. Meng goed door op en neer te pipetteren.
3. Incubeer 5 minuten bij kamertemperatuur.
4. Zet de ligatiereacties op ijs.

Transformatie:

We gaan verder.

Reagentia:	Ligatie reacties: competente cellen, ongeknijpte vector, 1x LB Medium, LB agar platen met Kanamycine
Benodigheden:	ijs, ijsbak, pipetpunten, spatel (uitplaten), epjes
Apparatuur:	waterbad 37°C, waterbad 42°C, tabletop centrifuge, pipet, schudstoof 37°C 250rpm, brander

Waarschuwing:

Competente cellen zijn extreem fragiel, dus op ijs houden en niet vortexen.

Protocol:

1. Ontdooi per conditie 50µl competente cellen 20 minuten op ijs.
2. Verwarm LB (zonder kanamycine) in het waterbad van 37°C
3. Pipetteer 5µl van de ligatiereacties in een 1,5ml epje en zet dit op ijs.
4. Voeg 50µl competente cellen toe, meng door zachtjes tegen het epje te tikken (voorzichtig!)

5. Incubeer 30 minuten op ijs.
6. Heatshock de cellen 90 seconden in een waterbad van 42°C en zet daarna direct op ijs voor 2min.
7. Voeg 950µl LB medium (van 37°C en **zonder** kanamicine) toe en incubeer de cellen in een schudstoof bij 37°C voor 45 minuten.
8. Plaat 100µl celsuspensie uit op een gelabelde LB agar plaat met kanamicine (kijk of de plaat goed droog is).
9. Centrifugeer de cellen 3 minuten in een microcentrifuge bij 4000 rpm
10. Verwijder 700µl van het supernatant en resuspendeer het pellet voorzichtig in de resterende 100µl LB.
11. Plaat de 100µl suspensie uit op een gelabelde LB agar plaat met kanamycine.
12. Incubeer de platen (met de agar kant naar boven) overnacht bij 37°C in de stoof; de practicumassistenten zetten jullie platen de volgende dag in de koelkast.

Opdracht 1:

- a) Vul het pipeteerschema voor je ligatie verder in (zie protocol stap 1).
- b) Waarvoor zijn de controles 1 tot en met 3?
- c)

Opdracht 2:

De concentratie kanamycine in de stockoplossing is 50mg/ml. Welk volume kanamycine voeg je per plaat (20ml) toe?

Opdracht 3:

Waarom is het zo belangrijk om het enzym op ijs te houden?

Opdracht 4:

In de ligatie moet er een molaire verhouding van het pEGFP-C1 plasmide en het PCR product zijn van 1:2. Omdat de DNA moleculen niet even lang zijn, is de verhouding in ng niet hetzelfde als de molaire verhouding en daar hebben we al rekening mee gehouden in je pipeteerschema.

Stel dat de molaire verhouding 1:3 is. Hoeveel ng van het insert moet je nu toevoegen aan je ligatie mix? Gebruik hiervoor de onderstaande formule:

De lengte van het insert hGR is: xx kb

De grootte van de expressievector pEGFP-C1 is: xx kb

Gebruik voor de ligatie 50 ng expressieplasmide (de concentratie van het plasmide is 50 ng/µl).

$$ng\ insert = \frac{ng\ vector * insert\ lengte\ in\ kb}{vector\ lengte\ in\ kb} * \frac{2}{1}$$

Vul nu de onderstaande tabel in: .

Tabel 8: Verhoudingen ligatie mix

	1:3
pEGFP-C1 XhoI-BamHI (50ng/ μ l)	1 μ l
Insert hGR XhoI - BamHI	?
10x ligatie buffer	?
T4 ligase	1 μ l
water	?
Totaal volume	20 μ l

Opdracht 5:

- Stel je hebt super competente cellen die een transformatie efficiëntie kunnen halen van 109 kolonies vormende eenheden per μ g DNA. Voor de transformatie gebruik je 1ng plasmide DNA en plaat 1/1000ste uit. Hoeveel kolonies verwacht je?
- Vervolgens transformeer 2 μ l plasmide (efficiëntie van 109 kolonies vormende eenheden per μ g DNA) en plaat je 1/100ste uit. Er groeien 50 kolonies op je plaat na 24 uur incuberen bij 37°C. Wat is de concentratie plasmide die je hebt gebruikt?

Opdracht 6:

- Stel, op de LB plaat + kanamycine waar je je transformatie hebt uitgeplaat groeien geen kolonies. Bij welke stappen zou er iets fout kunnen zijn gegaan? Welke experimenten zou je kunnen doen om er achter te komen wat er fout is gegaan?
- Stel, op alle LB platen + kanamycine groeien duizenden kolonies. Bij welke stappen zou er iets fout kunnen zijn gegaan? Welke experimenten zou je kunnen doen om er achter te komen wat er fout is gegaan?

Opdracht 7:

- Waarom mag je de cellen niet te lang in medium zonder kanamycine laten zitten?
- Waarom moet je doorgaan met uitplaten tot alle vloeistof is opgenomen door de plaat?
- Wat gebeurt er als je vergeet kanamycine in de platen te doen?

Opdracht 8:

Noem twee voordelen van het openknippen van je expressieplasmide met verschillende restrictie enzymen?

Opdracht 9:

Om de (sub)kloning van de glucocorticoïde receptor virtueel uit te testen kun je gebruik maken van het programma Serial cloner (te downloaden via link op BlackBoard.)

Importeren insert en expressieplasmide

- Maak een nieuwe file en importeer de sequentie van de pEYFP-hGR ouderplasmide die te vinden is op Blackboard. De eerste 10 basen van zijn 5'-CACCGGATCT-3', de laatste 10 basen zijn 5'-AGTGAGGATC-3'. De sequentie wordt in een 'sequence window' geopend. Sla de sequentie op in het programma met behulp van de knop in het sequence window en geef het de naam 'ouderplasmide hGR'.
 - Uit hoeveel basen bestaat de sequentie?
 - Is het DNA lineair of circulair?

PCR

Een van de eerste stappen van kloneren is het verkrijgen en amplificeren van kan je insert (het *hGR* gen) met behulp van PCR.

- b) Voer een PCR uit in serial cloner. Selecteer 'function' en vervolgens 'Run a PCR'. De sequenties van de primers staan in een file op Blackboard. Selecteer voor primer 1 de **Forward hGR primer** (5'-AGATCCGCCACAACATCGAG-3') en voor primer2 de **Reverse hGR primer** (5'-TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3'). Gebruik het opgeslagen 'ouderplasmide **hGR**' bestand als 'matrix DNA sequentie'. Run de PCR en sla het resultaat op als '**PCR hGR insert**'.
- i. Hoe groot is het verkregen PCR product?

Restrictie digestie

- c) Dit PCR product is niet geschikt om direct in het expressieplasmide te kloneren. Om het wel geschikt te maken moeten de uiteinden eerst worden geknipt om uiteinden te creëren die compatibel zijn met het expressieplasmide. Selecteer 'restriction' en vervolgens 'virtual cutter'. Gebruik je PCR product (PCR hGR insert) als sequentie om te knippen, knip de sequentie met XhoI en BamHI. Sla het 'graphic report' op.
- i. Op welke plek (basepaar) knippen deze enzymen?
 - ii. Hoe groot zijn de producten?
 - iii. Welke van de producten ga je straks gebruiken om in het expressieplasmide te kloneren?
- d) Selecteer 'Graphic map' onderaan het sequence venster, in het graphic map venster dat nu wordt geopend selecteer je boven aan 'particular sites'. Selecteer bij 'choose sites' BamHI en XhoI en klik op het plaatje.
- e) Doe hetzelfde met de file '**pEGFP-C1**', dit is de vector waar de glucocorticoidereceptor in gekloneerd gaat worden. De eerste 10 basen hiervan zijn -tagtattaa- en de laatste 10 basen zijn -cgccatgcat-.
- i. Zitten de restrictie sites XhoI en BamHI in de polylinker van pEGFP-C1?
 - ii. Geef de sequentie van de site waar BamHI en XhoI knippen, geef ook aan op welke manier de enzymen de sequentie knippen.
- f) Ga naar het sequence venster van '**PCR hGR insert**' en selecteer de graphic map. Vink 'particular sites' aan en selecteer BamHI en XhoI als restrictie sites. De geselecteerde sites worden gekleurd weergegeven in het venster. Selecteer XhoI door er 1x op te klikken (hiermee geef je aan dat dit het begin van de sequentie is) en dubbel klik op BamHI (hiermee geef je aan dat dit het eind van de sequentie is). Klik met je rechter muis in het venster en selecteer 'extract fragment', er wordt een nieuw venster geopend met daarin het virtueel geknipte fragment. Sla dit fragment op als '**insert hGR restrictie BamHI-XhoI**'.
- i. Hoeveel baseparen groot is het hGR insert?
 - ii. Hoe zien de 5'- en 3'- uiteinden van het insert eruit?
- g) Voer de virtuele restrictie met de virtual cutter ook uit met het pEGFP-C1 expressieplasmide. Sla ook hiervan het 'graphic report' op.
- i. Op welke plek (basepaar) knippen BamHI en XhoI
 - ii. Hoe groot zijn de restrictie producten?
 - iii. Welk van de producten is je expressie vector?
- h) Maak ook een nieuwe sequentie file van pEGFP-C1 welke geknipt is met BamHI en XhoI en sla de sequentie op als '**pEGFP-C1 restrictie BamHI-XhoI**'.
- i. Welke restrictie site is in dit geval het begin van je gezuiverde fragment?
 - ii. Hoe gaat de vector er straks uitzien als hij geligeerd is? Maak een overzicht tekening waarin je het hGR insert, de eGFP-C1 vector, het eGFP gen. Geef ook aan op welke manier de 3'- en 5'- uiteinden van het insert en de vector aan elkaar gekoppeld zijn.

Ligatie

Je hebt nu 2 files, een met de eGFP-C1 expressie vector en een met het hGR insert. Beide sequenties hebben nu compatible uiteinden welke aan elkaar geligeerd kunnen worden zoals je later ook tijdens het practicum gaat doen.

- i) Selecteer 'construct' in de werkbalk. Fragment #1 is het pEGFP-C1 expressieplasmide, selecteer de 'pEGFP-C1 restrictie BamHI-XhoI' file en vervolgens 'select all'. Fragment #2 is de hGR insert, selecteer de 'insert hGR restrictie BamHI-XhoI' file en vervolgens 'select all'. Als de sequenties zijn ingevoerd kan je ze ligeren door op de 'ligate' knop te drukken, in een nieuw venster wordt de sequentie weergegeven. Sla de sequentie op als 'EGFP-C1 -hGR'. Sla ook de graphic map van je vector op met daarin alleen de sites van BamHI en XhoI aangegeven, scan eerst je sequentie door in de taakbalk op de 'scan' knop te drukken.
 - i. Klopt de vector map die je eerder getekend het met het kaartje dat je nu hebt?
- j) Voer een virtuele restrictie uit op je geligeerde product en sla de graphic map van de restrictie met BamHI en XhoI op.
 - i. Klopt je restrictiekaart?

Vertalen van DNA naar proteïne sequentie

- k) Ga naar de website <http://web.expasy.org/translate/> en voer de sequentie van de vector in en 'translate sequence'. Er worden nu verschillende reading frames weergegeven. Klik op de juiste reading frame. Let op, het volledige humane glucocorticoïde receptor green-fluorescent proteïne fusie-eiwit wordt nu weergegeven.
 - i. Welk reading frame kies je en waarom?
 - ii. Zit het green-fluorescent proteïne voor of achter de humane glucocorticoïde receptor ?
 - iii. Hoe groot is het fusie-eiwit (in Dalton)?

Is sequentie terug te vinden in de database?

- l) Je krijgt nu een venster waar het reading frame wordt weergegeven, selecteer de 'Met' (Methionine is het startcodon) waar het fusie-eiwit begint. En selecteer in het volgende venster 'BLAST submission on Expasy/SIB'. In het volgende scherm selecteer je 'Run BLAST'. De aminozuur sequentie wordt nu vergeleken met een database.
 - i. Kies je voor het start codon van het green-fluorescent proteïne of van de humane glucocorticoïde receptor? Leg uit
 - ii. Wordt de humane Glucocorticoïde receptor in de database gevonden? Is je fusie eiwit in-frame? Leg uit.
 - iii. Waarom is het belangrijk om te weten en van te voren te testen of je eiwit in-frame is?
 - iv. Kan je nog andere eiwitten vinden als je een ander start codon kiest?
 - v. Kan je het eiwit vinden als je een andere reading frame kiest?

Het fusie eiwit bekijken

Om je eiwit later onder de microscoop te kunnen bekijken kloneren we het in frame met het Green Fluorescent Proteïne. Een eiwit waar door een klonering een stuk aan wordt gezet wordt een fusie eiwit genoemd. .

Ga naar **Find Open Reading Frames** onder **Nucleotide Analyses** in de toolbox en maak de ORFs zichtbaar. Wat is de positie van het startcodon van het gen dat codeert voor je fusie eiwit? Wat is de lengte van het fusiegen?

Vertaal het fusiegen naar een aminozuur sequentie (**Toolbox, Nucleotide Analysis, Translate to Protein, Reading frame +1**). Hoe groot is het fusie-eiwit? Wat is de aminozuurpositie van het GFP gen? Bewaar de aminozuur sequentie als hGR_GFP.

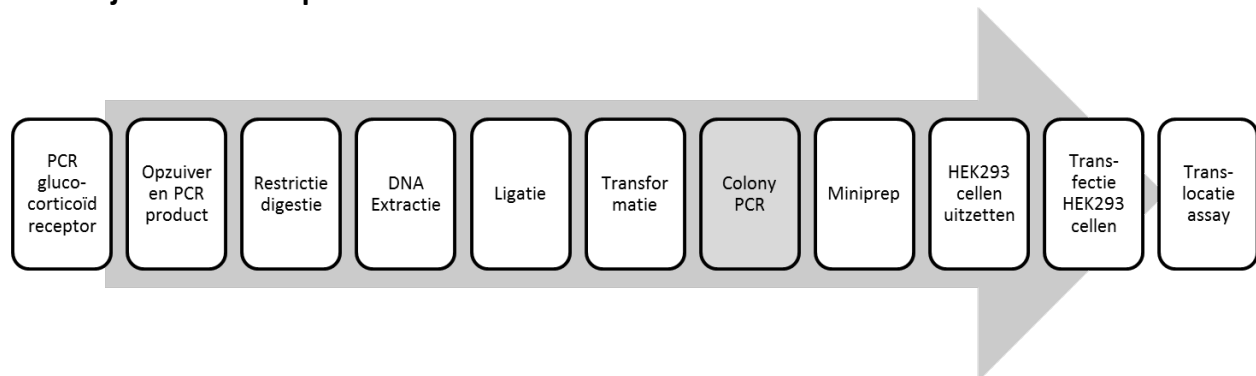
Stel dat er ergens midden in het *hGR* gen per ongeluk aantal baseparen gewijzigd zijn. Simuleer zo'n gebeurtenis en maak varianten waar in het ene geval 1 basen en in het andere geval 2 basen zijn gedeleteerd. Doe dit als volgt: open de file hGR_GFP, selecteer xx bp vanaf positie xx, en druk op delete. Bewaar het resultaat vervolgens door **SAVE AS** te kiezen onder file en sla de sequentie op als hGR_GFP_deletie 1bp. Open vervolgens opnieuw de file hGR_GFP en deleteer nu xx bp vanaf positie xx en sla het resultaat op als hGR_GFP_deletie 2bp. Vertaal nu de naar een aminozuur sequentie zoals je al eerder hebt gedaan en bewaar de aminozuur sequenties als prot_hGR_GFP_del_1bp en prot_hGR_GFP_del_2bp. Wat is het effect op je open reading frame?

Dagdeel 5: Colony PCR

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van colony PCR
- Je kunt de bovenstaande techniek correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vorig practicum dagdeel hebben jullie het insert (*glucocorticoïde receptor* gen) in de expressieplasmide pEGFP-C1 (dat het *GFP* gen bevat) geligeerd en naar *E.coli* getransformeerd. Vandaag gaan jullie transformanten identificeren en selecteren waarbij de klonering gelukt is, dus waarbij de pEGFP-C1 vector een insert van de verwachte grootte bevat. Een snelle en efficiënte manier om te bepalen of een kolonie het insert bevat is de colony PCR. Hierbij wordt het DNA van de bacteriën niet eerst gezuiverd, maar worden de bacteriën vanaf de plaat direct gebruikt voor de PCR reactie. De specifieke primers kunnen alleen hechten op DNA van de glucocorticoïde receptor en dus zullen alleen kolonies met het insert een PCR product opleveren.

Experiment

Colony PCR:

Reagentia:	PCR cocktail (10X PCR Dream Taq buffer (eind conc. 1x), 2mM dNTP's (eind conc 0,04mM), 10µM forward primer (eind conc 0,2µM), 10 µM reverse primer (eind conc 0,2µM), H ₂ O, 5U/µl Dream Taq DNA polymerase (eind conc. 0,025U/µl), plasmide 1µg/µl EGFP-C1-hGR (1µl)
Benodigdheden:	PCR strip, ijs, ijsbak, pipet puntjes
Apparatuur	mini tafelcentrifuge, pipet

primers voor de kolonie-PCR:

Forward hGR primer: 5'-AGATCCGCCACAACATCGAG-3'

Reverse hGR primer: 5'-TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3'

Protocol PCR:

1. Zorg voor een opgeruimde en steriele werkomgeving. Zorg ervoor dat je alle reactiecomponenten en materialen, zoals pipetten (P200 en P20) en pipetpunten, bij je in de buurt hebt. Werk secuur, controleer

voor gebruik altijd of je pipet op de juiste hoeveelheid staat ingesteld en gebruik voor elke stof een schone pipetpunt. Zet elke keer de reactiecomponenten terug op ijs.

2. Maak opdracht 1
3. Vanwege de kosten mogen jullie per practicumduo maximaal 2 kolonies testen. Als dit niet overeenkomt het antwoord op opdracht 1 overleg dan met je practicumassistent.
4. Neem 2 steriele 0,2ml PCR epjes. Label de epjes duidelijk met het nummer dat je van je practicumassistent hebt gekregen met watervaste stift en zet op ijs. Denk er ook weer aan dat je je epjes kunt onderscheiden van alle andere EN dat je straks terug moet kunnen terug vinden welke kolonie in welk epje zit! Naast de 2 kolonies per ligatie mogen jullie per tafel één kolonie van de transformatie controle met het lege pEGFP-C1 plasmide en een negatieve controle met water als template meenemen.
5. Voeg 20µl steriel water toe aan de epjes.
6. Prik met een gele tip een **losliggende** kolonie aan en meng dit met het water in het epje. Geeft eventueel voor je de kolonie aanent met een pen met een circel op de petrischaal aan welke kolonie je gaat aanenten en geef deze een naam.
7. Pipetteer enkele malen heen en weer, zodat een homogene celsuspensie ontstaat.
8. Neem 1 nieuw steriel epje per kolonie en label ze op dezelfde manier als bij stap 4.
9. Gebruik 2µl van de celsuspensie voor de PCR reactie en meng voorzichtig door twee keer op en neer te pipetteren. Zet het buisje terug op ijs. *Let erop dat het dopje goed op het buisje zit. Je moet een korte 'klik' horen, anders kan je product verdampen tijdens het PCR-en.*
10. Voeg aan ieder epje 48µl PCR cocktail toe.
11. De assistent geeft aan wanneer jullie je monsters kort kunnen centrifugeren om alle vloeistoffen in de punt van het PCR buisje te krijgen en de PCR in het apparaat gezet kan worden.
12. De PCR kan beginnen en doorloopt het onderstaande programma:

Tabel 1: PCR programma voor de colony PCR met hGR primers.

PCR programma		Temperatuur	Duur
Initiële denaturatie		95°C	2'
35 cycles	Denaturatie	95°C	30''
	Annealing	52°C	30''
	Extentie	72°C	3,30''
Eind extentie		72°C	10'
bewaren		8°C	∞

13. Je hoeft niet te wachten tot het programma is afgelopen; bereid als de PCR loopt alvast de gelelektroforese voor.

Agarose Gelelektroforese

Reagentia:	agarose, 1x TAE, midori green, high range DNA ladder, Low range DNA ladder, Orange loading dye, DNA sample
Benodigheden:	gel tray, kammen 2x, 250/500ml erlenmyer, 250 ml maatcilinder weegbakje, spatel, eppenrek 0.2 ml eppen,

Apparatuur:	electroforese apparaat, weegschaal, pipet magnetron, UV bak/blue light illuminator, beschermkap
-------------	---

Protocol:

1. Per practicumtafel worden twee agarose gellen gegoten worden. Je assistent zal de taken verdelen:
2. Maak een 200 ml 0,7% agarose oplossing in 1X TAE (pH 8.1) in een erlenmeyer. Agarose is een droge stof die moet worden afgewogen. TAE is een buffer en wordt 50X zo geconcentreerd gemaakt en moet dus voor gebruik 50x verdund worden met demi-water.
3. Kook de agarose oplossing om de agarose op te lossen in de magnetron (duurt ongeveer 3.5 min). Pas op dat de oplossing niet overkookt en zwenk tot dat er geen agarose bolletjes meer zichtbaar zijn. Door het verschijnsel kookvertraging kan de oplossing op onverwachte momenten heftig gaan koken. **Pas dus op voor ogen en handen!**
4. Laat de geloplossing even wat afkoelen en voeg met een 300µl midori green toe (10mg/ml) toe aan de nog vloeibare agarose gel.
5. Plak de open zijde van de gelbak dicht met tape, zodanig dat de zijkanten goed zijn afgesloten en er geen lekkage kan optreden.
6. Laat de oplossing afkoelen tot handwarm en giet deze dan pas in de afgeplakte gelbak. Plaats de kam in de gelbak zodat je slotjes kunt maken waar je straks de DNA monsters in kunt pipetteren. Laat de gel 20 minuten stollen.
7. Neem 25µl van je PCR monster en pipetteer het in een nieuw epje
8. Voeg 10µl loading dye toe aan je monster. Meng de oplossing door twee keer rustig op en neer te pipetteren. Dit geeft de oplossing een oranje kleur waardoor deze makkelijker op gel te brengen is en zorgt er tevens voor dat je DNA in de wellletjes zakt
9. Als de gel na 30-45 min bij kamertemperatuur gestold is verwijder dan eerst de tape en leg de tray in de gelbak. Trek de kam rustig uit de gel. Vul de gelbak met de overgebleven 1X TAE buffer totdat de gel 1 à 2 mm onder de vloeistof staat.
10. Pipetteer 30µl van je monster in een leeg slotje van de gel. Nadat alle studenten geladen hebben moet als laatste 5µl High Range DNA ladder in een leeg slotje worden gepipetteerd.
11. Sluit de spanningsbron aan en start het runnen of lopen van de gel. Vraag je assistent welke spanning je tussen de elektroden moet hebben - dit is meestal 150 V.
12. Na ongeveer 30 minuten bij 150 V heeft de gel lang genoeg gelopen.
13. Handschoenen aan: haal de gel rustig uit de gelbak door de geldrager iets scheef te houden en de vloeistof weg kan lopen. Houdt de gel met je vingers tegen, want hij wil nog wel eens uit de geldrager glibberen. Leg de geldrager met gel rustig in een witte dienblad en loop naar het gel doc systeem om de resultaten te bekijken
14. Maak een foto en start met de interpretatie van de resultaten. Foto's worden op BlackBoard gezet.

Aanenten geselecteerde transformanten voor DNA-isolatie

Reagentia:	koloniesuspensie, LB medium met kanamycine
Benodigheden:	bacteriebuizen, pipetpunten, entnaalden
Apparatuur:	pipet, schudstoof 37°C / 250 rpm, brander

Protocol:

1. Zorg voor een steriele en schone werkomgeving.
2. Selecteer twee pEGFP-C1_hGR transformanten op basis van de PCR analyse en daarnaast per tafel ook een controle kolonie met het lege pEGFP-C1 plasmide.
3. Label 4 steriele bacteriebuizen (dit is inclusief de buis voor je negatieve controle).
4. Ent de drie transformanten aan in 4ml LB medium met kanamycine (50µg/ml) door de originele 18µl bacterie-suspensie in water toe te voegen aan het medium.
5. Voeg voor de negatieve controle alleen een steriel geel puntje toe aan 5ml LB medium met kanamycine (50µg/ml)
6. Zet de bacteriebuizen in de schudstoof en incubeer overnacht bij 37°C en 250 rpm. De assistenten zetten de volgende dag jullie cultures in de koelkast.

Opdracht 1

Tel het aantal kolonies op de verschillende platen en maak een inschatting van de kans dat een willekeurige kolonie het pEGFP-C1_hGR plasmide bevat. Bepaal aan de hand hiervan het aantal kolonies dat getest moet worden om met enige zekerheid de gewenste kolonie aan te prikken.

Opdracht 2

Bepaal de transformatie efficiency en druk deze waarde uit in kolonies/µg plasmide DNA.

Opdracht 3

Waarom kan de PCR reactie direct op bacteriën worden uitgevoerd, ookal bevindt het plasmide DNA zich intracellulair?

Opdracht 4

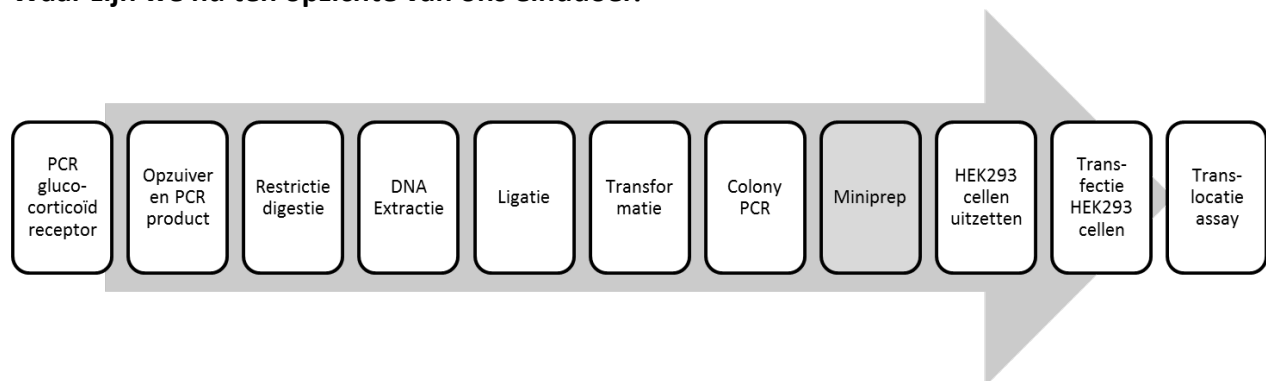
- a) Verwacht je wel of geen bacterie groei in je controles?
- b) Waaraan herken je bacterie groei?
- c) Als je wel bacterie groei ziet, is er dan iets mis gegaan? En zo ja bij welke stap?

Dagdeel 6: Mini-prep DNA isolatie

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van miniprep beschrijven
- Je kunt de bovenstaande techniek correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Het vorige practicum dagdeel hebben jullie gemerkt dat het relatief simpel is om een plasmide in een bacteriecel te brengen. De bacteriën zijn gegroeid en als het goed is, is jullie plasmide DNA vermenigvuldigd. Vandaag gaan jullie dit plasmide DNA weer uit de bacteriën isoleren. Ook deze techniek is één van de moleculair biologische klassiekers en ontwikkelt in de jaren 70 van de vorige eeuw. Oorspronkelijk was deze techniek ontworpen om het relatief kleine plasmide DNA te scheiden van het grote chromosomale bacterie DNA op basis van grootte. Dit werd gedaan door te centrifugeren in een cesium chloride (CsCl) gradiënt. Jullie gaan het plasmide DNA isoleren op basis van alkaline lysis bedacht door Birnboim en Doly (1979), ook wel de miniprep genoemd. De bacteriën worden gelyseerd in een basische buffer (pH 12.0-12.5) waarin chromosomaal DNA en eiwitten denatureren, maar het plasmide DNA stabiel blijft. De zuur bevattende neutralisatie buffer precipiteert het chromosomaal DNA en eiwitten terwijl het plasmide DNA in oplossing blijft. Uiteindelijk resulteert dit snel en efficiënt in zuiver plasmide DNA.

Principle

The QIAprep miniprep procedure is based on alkaline lysis of bacterial cells followed by absorption of DNA onto silica in the presence of high salt. The unique silica membrane used in the QIAprep Miniprep Kits completely replaces glass or silica slurries for plasmid minipreps. The procedure consists of three basic steps:

1. Preparation and clearing of bacterial lysate
2. Adsorption of DNA onto the QIAprep membrane
3. Washing and elution of plasmid DNA

Bron: *Qiaprep miniprep handbook*



Figuur 1: schematische weergave van de verschillende stappen van de miniprep.

Experiment

Mini-prep DNA isolatie

Benodigdheden: 4ml overnachtcultuur, QIAprep® Spin Miniprep Kit (resuspensie buffer (met RNase A en lyseBlue), cel lysis buffer, neutralisatie buffer, anti-endonuclease buffer, ontzoutingsbuffer (met ethanol), elutie buffer).

Benodigdheden: pipetpunten 1,5ml epje, eppenrek

Apparatuur: vortex, pipet, mini tafelcentrifuge, nanodrop

Resuspensiebuffer: RNase A (Ribonuclease)

R-zinnen: 40-42

S-zinnen: 23-24-26-36/37


Cellysisbuffer: Natriumhydroxide





Xi irritierend

R-zinnen:	36/38
S-zinnen:	13-26-36-46

Neutralisatiebuffer: Guanidine hydrochloride en azijnzuur

 Xn schadelijk	
R-zinnen:	22-36/38
S-zinnen:	13-26-36/37/39-46

Ontzoutingsbuffer: Guanidine hydrochloride en isopropanol

 Xn schadelijk	 F licht ontvlambaar
R-zinnen:	10-22-36/38
S-zinnen:	13-26-36/37/39-46

Protocol:

1. Vortex de overnacht culturen voor gebruik.
2. Pipetteer 1,5ml van de cultuur in een 2ml epje en draai dit 3 minuten af bij meer dan 8000 rpm.
3. Pipetteer het supernatant af en voeg opnieuw 1,5ml van de overnacht cultuur toe. Centrifugeer dit weer 3 minuten op maximale snelheid en pipetteer het supernatant er weer af.
4. Herhaal stap 3 een 3e keer en pipetteer al het supernatant af (draai eventueel nog een keer af na de laatste keer afpipetteren om het laatste restje medium te verwijderen).
5. Resuspendeer het celpellet in 250µl resuspensie bufferbuffer. Zorg dat de cellen volledig geresuspendeerd zijn door te vortexen of op en neer te pipetteren zodat er geen klompjes cellen meer te zien zijn.
6. Voeg 250µl cel lysisbuffer toe en mix goed door het epje 4-6 keer om te draaien tot de oplossing visceus wordt en iets opheldert. Incubeer 5 minuten bij kamertemperatuur. Niet vortexen en niet langer dan 5 minuten incuberen om fragmentatie van plasmid DNA te voorkomen.
7. Voeg 350µl neutralisatie buffer toe en mix goed door het epje 4-6 keer om te draaien. Niet vortexen om fragmentatie van het precipitaat te voorkomen. Het lysaat moet troebel worden en witte vlokken vormen.
8. Centrifugeer 10 min op maximale snelheid om de celwand, de eiwitten en het chromosomaal DNA kwijt te raken.
9. Pipetteer het supernatant op een kolom. Neem niets van het witte pellet mee en zorg dat je het membraan van de kolom niet raakt met je pipetpunt.
10. Centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid, leeg het opvangbuisje en plaats de kolom terug in het buisje.
11. Voeg 500µl anti-endonuclease buffer toe.
12. Centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid, leeg het opvangbuisje en plaats de kolom terug in het buisje.
13. Voeg 750µl ontzoutings buffer toe.
14. Centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid, leeg het opvangbuisje en plaats de kolom terug in het buisje.
15. Centrifugeer nog een extra minuut zonder iets op de kolom te brengen. Deze stap is essentieel om de resten van de wasbuffers te verwijderen en voorkomt daardoor ethanol vervuiling van je eindproduct.
16. Breng de kolom over naar een nieuw 1,5ml epje.
17. Pipetteer 30µl elutiebuffer op het midden van het membraan van de kolom. Let op: prik niet met de punt van de pipet in het membraan.
18. Incubeer 2 minuten en draai vervolgens 2 minuten af.
19. Verwijder de kolom en bepaal de concentratie van de opbrengst met behulp van de NanoDrop

Opdracht 1:

- a. Beschrijf de functies van de verschillende buffers die je gebruikt.
- b. Wat zou er gebeuren als er geen RNase A aan de resuspensie buffer is toegevoegd?
- c. Wat zou er gebeuren als je een veel hoger of lager volume van elutiebuffer zou gebruiken?

Opdracht 2:

Bedenk 3 mogelijke verklaringen voor een lage DNA opbrengst. Welke stappen in het protocol kunnen fout zijn gegaan?

Opdracht 3:

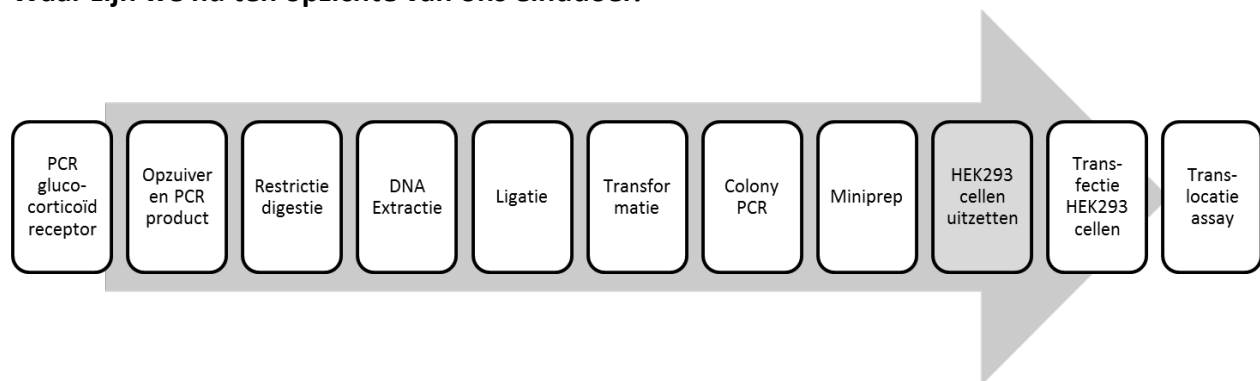
In verband met tijdsgebrek gaan we geen controle digestie uitvoeren. Stel dat we dat wel zouden doen. Welke restrictie enzymen zou je hiervoor gebruiken? Teken het verwachte bandenpatroon in je labjournaal.

Dagdeel 7: Cellen uitzetten

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van cellen doorzetten beschrijven
- Je kunt de bovenstaande techniek correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vandaag gaan jullie alle voorbereiden stappen zetten om het volgend dagdeel onder optimale condities te kunnen transfecteren. Onder transfecteren verstaan we het introduceren van vreemd DNA (expressieplasmide) in eukaryoten cellen (humane HEK293 cellen). De HEK293 cellen moeten straks groeien op glaasjes die we na afloop van de experimenten eruit kunnen halen en fixeren om vervolgens onder de microscoop te analyseren. Hoe we de glaasjes het beste steriel in de 12-wells plaat kunnen krijgen is te zien op de kennisclip (zie BlackBoard). De hoogste transfectie efficiëntie wordt behaald als cellen in de logaritmische fase van hun groei zitten. Om hechtende cellen in de juiste dichtheid te kunnen uitzetten moeten ze worden eerst worden getrypsiniseerd (zie kennisclip) met het enzym trypsine. Trypsine (afkomstig van Griekse woord thrupsis dat verbrokkeling betekent) is een eiwit afbrekend enzym dat in de dunne darm voedingseiwitten afbreekt. Een inactief voorstadium van het enzym, trypsinogeen, wordt gemaakt in de alveesklier. Activering van trypsinogeen tot trypsine in de dunne darm wordt veroorzaakt door trypsine zelf (autokatalytisch) of door het enzym enteropeptidase of enterokinase. Trypsine splitst alleen peptidebindingen waarvan de carboxylgroep afkomstig is van een van de basische aminozuren lysine en arginine. Het wordt daarom ook gebruikt voor knippen van de eiwitten die ervoor zorgen dat cellen kunnen hechten aan de kweekfles.

De oorsprong van de Humane Embryonic Kidney cellijn

Laboratoria wereldwijd maken gebruik van de Human Embryonic Kidney cellijn, kortweg HEK of HEK293. Deze cellijn is in de jaren 70 van de vorige eeuw gemaakt in het laboratorium van Alex van der Eb in Leiden. De gekweekte normale humane embryonale niercellen verkregen uit abortus materiaal zijn getransformeerd met 'adenovirus 5 DNA' door Frank Graham (ook de uitvinder van de calciumfosfaat transfectie methode waar we het volgende dagdeel nog uitgebreid op terug komen). Deze transformatie resulteerde in experiment 293 (Graham nummerde al zijn experimenten) in de integratie van circa 4,5 kilobase viraal DNA op chromosoom 19 van de HEK cellen, vandaar dat de originele cel kloon de naam HEK293 heeft gekregen. Zeer waarschijnlijk heeft het adenovirus de celmorfologie en het expressiepatroon beïnvloedt, maar dat is niet meer te achterhalen aangezien embryonale niercellen bestaan uit een mix van celtypen. Sterker nog, recentelijk is gebleken dat deze cellen mogelijk een neuronale oorsprong hebben, aangezien ze mRNA tot expressie brengen dat karakteristiek is voor neuronen (voor meer informatie zie Shaw G et al. "Preferential transformation of human neuronal cells by human

adenoviruses and the origin of HEK 293 cells". FASEB J. 2002 16 (8): 869–71). Deze cellen kunnen dus niet gebruikt worden als *in vitro* model voor functioneel onderzoek naar niercellen.

Bron: http://en.wikipedia.org/wiki/HEK_293_cells

Experiment

Cellen uitzetten voor transfectie

Reagentia:	90% confluenta HEK293 cellen, DMEM medium (met antibiotica gentamicine, glutamine en 10% foetaal kalf serum, HEPES buffered Saline), trypsine, PBS, 70% Ethanol
Benodigheden:	tissue, markeer stift
Benodigheden steriel:	pipet 5ml en 10ml, 15ml buis, dekglasjes, 12 well kweek plaat
Apparatuur:	pipet boy, omkeer microscoop, 37 °C incubator

Protocol:

We gaan de cellen 1 op 4 doorzetten van een T75 naar een 12-wells plaat

Vorbereiding:

1. Zorg voor een opgeruimde en steriele werkomgeving. Zorg ervoor dat je alle reactiecomponenten en materialen, zoals pipetten (P200 en P20) en pipetpunten, bij je in de buurt hebt. Werk secuur, controleer voor gebruik altijd of je pipet op de juiste hoeveelheid staat ingesteld en gebruik voor elke stof een schone pipetpunt.
2. Doe sieraden af.
3. Trek handschoenen aan en maak ze steriel door met 70% ethanol kort op je handschoen te spuiten.
4. Verwarm alle vloeistoffen die je gaat gebruiken voor op 37°C
5. Neem je werkplek in de kweekkast af met 70% ethanol en een papieren doek.
6. Neem alles dat van buiten af de kweekkast ingaat af met ethanol
7. Controleer de volgende punten als je de cellen onder de microscoop bekijkt:
 - a) Zien ze er gezond uit?
 - b) Hoe confluent zijn je cellen?
 - c) Is er mogelijk sprake van een infectie?
 - d) Drijven er veel dode dode cellen in het medium?
 - e) In welke fase zitten de cellen? (logfase of differentiatie fase)
 - f) Zijn de cellen goed gehecht?

Dekglasjes in welltjes plaatsen

8. Aangezien er beperkt tijd is per duo in de kweekkast willen we jullie eerst laten oefenen met het plaatsen van dekglasjes in de 12-wells platen. Oefen met steriel werken, ook al zit je nu niet in een steriele omgeving. Als je straks in de kweekkast zit gebruik je hetzelfde protocol.
 - a) Pak een dekglasje met je pincet
 - b) Dip het glaasje voorzichtig in 70% Ethanol.
 - c) Vlam het glaasje even af in de blauwe vlam
 - d) Laat het glaasje afkoelen om te voorkomen dat het vast smelt aan het plastic.
 - e) Leg het dekglasje voorzichtig in een lege well.
 - f) Herhaal dit totdat alle welltjes die je nodig hebt een dekglasje bevatten.

Trypsiniseren:

9. Zuig het medium van de celkweek af met een steriele wegwerppipet
Houd de kweekfles schuin zodat je gemakkelijk kan afzuigen en de cellaag zo min mogelijk verstoort

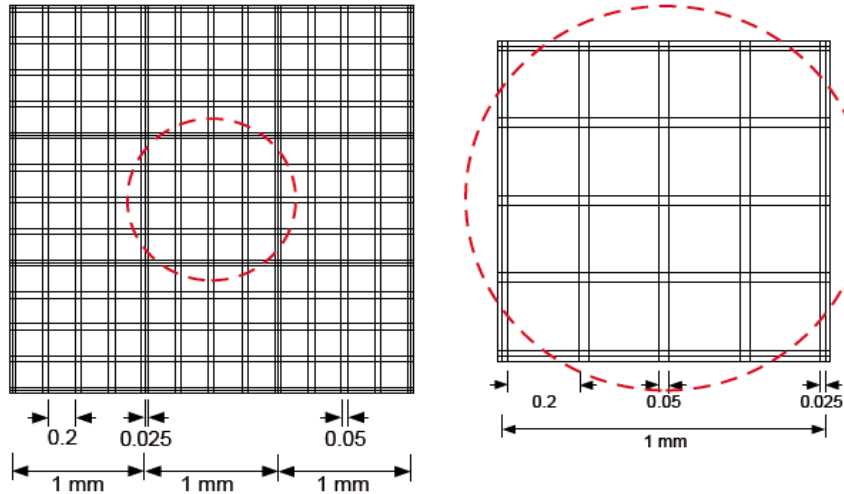
10. Zorg ervoor dat de cellen zo kort mogelijk droog staan en ga zo snel mogelijk door met de volgende stap
 11. Voeg 5ml steriele PBS toe aan de cellen met een steriele wegwerppipet om de cellen te wassen.
Houd de kweekfles scheef en pipetteer niet direct op de cellen maar op de rand van de kweekfles. Het wassen is nodig om FBS te verwijderen dat de activiteit van trypsine remt en om cel debris te verwijderen.
 12. Zuig de PBS van de celkweek af met een steriele wegwerppipet.
 13. Herhaal de stappen 11 en 12.
 14. Voeg voorzichtig 1,5ml 1x trypsine toe met een steriele wegwerppipet.
Zorg ervoor dat de trypsine goed verdeeld is over de hele bodem van de kweekfles.
 15. Plaats de cellen 2–3 minuten terug in de stoof bij 37°C.
*Dit verhoogt de enzym activiteit.
Laat de reactie niet langer duren dan strikt noodzakelijk is, want het enzym blijft doorwerken en kan de celwand beschadigen. Als je daarentegen te kort trypsiniseert komen niet alle cellen los van de kweekbodem en kunnen er grote klompen met cellen ontstaan en dit kan de transfectie efficiëntie negatief beïnvloeden.
Open de stoof regelmatig om te bekijken of de cellen al loslaten. Dit kun je doen door de fles schuin te houden of onder de microscoop te kijken of alle cellen los zijn gekomen of 'rond' zijn. Als de meeste cellen helemaal rond zijn tik dan voorzichtig tegen de fles om ze los te maken.*
 16. Voeg 7ml DMEM met FBS toe met een steriele 10ml wegwerppipet om de reactie te stoppen.
 17. Pipetteer een aantal keer (ongeveer 5 keer) op en neer
*Zet bij het terugpipetteren van de celsuspensie je pipet in een hoek van 90 graden tegen de wand van de fles en pipetteer voorzichtig zo snel mogelijk uit. Dit zorgt ervoor dat je de cellen die eventuele nog aan elkaar vastzaten loslaten en je een mooie 'single cell suspension' krijgt.
Let op het aantal op en neer pipetteren is een fragiele balans: te weinig pipetteren kan resulteren in celklompjes, te veel in celdood.*
 18. Controleer onder de microscoop of je cellen 'single cell' zijn
 19. Breng de celsuspensie over naar een 15ml buis en centrifugeer 3 min bij 500rpm
- Cellen uitzetten**
20. Zuig het supernatant af met een steriele wegwerppipet
 21. Resuspendeer de cellen in 12ml medium met 10% FBS + gentamycine.
 22. Neem 3 nieuwe 15ml buizen en pipetteer in elke buis 3ml van de celsuspensie.
*Zorg dat de cellen nog niet uitgezakt zijn voor je dit doet anders krijgt de ene plaat meer cellen dan de ander.
De buis met 3ml celsuspensie wordt later gebruikt om cellen te tellen.*
 23. Vul alle buizen aan tot 12ml en meng voorzichtig.
 24. Pipetteer hiervan 1ml celsuspensie per well in je 12 well platen totdat je cellen hebt uitgezet in alle wellletjes die je nodig hebt.
Zorg ervoor dat de cellen niet uitgezakt zijn als je dit doet, pipetteer desnoods nog 1 a 2 keer voorzichtig en rustig op en neer.

Experiment

Cellen tellen

Reagentia:	0,2% trypaanblauw in PBS/10mM NaN ₃ , cellen in suspensie, 70% ethanol
Benodigdheden:	pipetpunten, 15ml buis, 1,5ml epje, tissue
Apparatuur:	telkamer van Burker, microscoop, pipet, centrifuge

Voor het tellen van levende cellen worden cellen in een isotone kleurstofoplossing (trypaanblauw) in fysiologisch zout gebracht. Bij levende cellen is de celmembraan nog intact en is de kleurstof niet in staat om binnen te dringen. Dit is niet het geval bij dode cellen, de celmembraan is dan permeabel waardoor de kleurstof de cel kan binnen dringen en kan reageren met eiwitten. Dit proces geeft dode cellen een blauwe kleur.



Figuur XX:Telkamer (www.science services.eu)

Protocol:

- 1) Gebruik voor dit experiment 1ml van je geresuspendeerde celsuspensie (na de trypsinisatie).
- 2) Pipetteer 1ml celsuspensie in een 15ml buis.
Let op dat je celsuspensie niet uitzakt.
- 3) Centrifugeer 3 minuten bij 1000 RPM.
- 4) Resuspendeer de cellen in 3ml medium (DMEM zonder toevoeging)
- 5) Pipetteer hiervan 150 μ l in een 1,5ml epje.
- 6) Voeg 150 μ l 0,2% trypaanblauw toe.
- 7) Meng door voorzichtig een paar keer op en neer te pipetteren
- 8) Incubeer 5-15 minuten op kamertemperatuur.
- 9) Maak telkamer van Burker schoon met 70% ethanol en droog met een papieren doekje.
- 10) Doe hetzelfde met het dekglasje
Dit dekglasje moet worden hergebruikt, dus wees voorzichtig
- 11) Plaats het dekglasje op de telkamer van Burker (over het telgebied) en zet het voorzichtig vast met de bijbehorende klemmen zodat je 'Newtonse refractie ringen' ziet.
Newtonse refractie ringen zijn regenboogachtige ringen onder het dekglasje en geeft aan dat het dekglasje is gehecht aan de telkamer via zuigkracht.
- 12) Pipetteer 10 μ l van de celsuspensie met trypaanblauw aan beide kanten (tel gebieden) van de telkamer.
 - a) Zet de pipet voorzichtig in de hoek waar de hemocytometer en het dekglasje samenkomen.
 - b) Pipetteer de suspensie voorzichtig, door zuigkracht wordt deze opgenomen door de kamer.
 - c) De kamer moet helemaal gevuld zijn, maar niet over-loaded.
 - d) Zorg dat er geen luchtbelllen ontstaan.
- 13) Plaats de telkamer van Burker onder de microscoop en visualiseer het grid bij 10x vergroting.
- 14) De grid ziet er onder de microscoop uit als het bovenstaande figuur en tel het aantal cellen.
 - a) Tel de 25 hokjes van 0,2mm. Bijvoorbeeld twee rijen plus 1 hokje of een 1mm vierkant plus 9 hokjes.
 - b) Als er cellen op de gridlijnen liggen tel dan alleen de cellen die de linker- of bovenlijn raken. De cellen die

- op de rechter- en onderlijn liggen tel je niet mee.
- c) Tel de kleine vierkanten zoals aangegeven met de blauwe pijl, op deze manier weet je makkelijker waar je gebleven bent met tellen en hoef je zo min mogelijk heen en weer te scrollen.
 - d) Noteer het aantal levende (doorzichtig) cellen.
 - e) Noteer het aantal dode (blauwe) cellen.
 - f) Als je een 1mm hokje telt, tel dan van links naar rechts, ga een 0,2mm hokje naar beneden en tel dan van rechts naar links, enz tot je het hele 1mm hokje geteld hebt.
- 15) Maak de telkamer en het dekglasje schoon met 70% ethanol, droog af en leg hem terug.

Opdracht 1

Laat je proefopzet controleren door je practicum assistent. Laat aan je assistent overzichtelijk zien:

- a) Hoeveel wellletjes van een 12-wells plaat je nodig hebt.
- b) Welke wellletjes met welk(e) plasmide(n) worden getransfecteerd
- c) Welke steroïden worden geïncubeerd en welke concentraties steroïden gebruikt worden (afhankelijk van welke groep je zit).
- d) Denk aan de controles

Opdracht 2

Cellen tellen

- 1) Bereken het aantal cellen per ml: (Totale aantal cellen/ getelde aantal 0,2mm vierkanten) * $(2,5 \cdot 10^6)$ * verdunningsfactor
- 2) Hoeveel levende cellen zaten er in de fles die je door hebt gezet?
- 3) Hoeveel levende cellen heb je per well uitgeplaat?
- 4) Stel dat je cellen in 5ml medium met een celdichtheid van $2,4 \cdot 10^4$ cellen /ml wilt doorzetten, hoe zou je dit doen? Denk aan de formule $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$, waarbij V het volume is en C de concentratie.
- 5) Bereken het percentage levende cellen: (aantal levende cellen / totale aantal cellen (levend en dood))* 100%

Opdracht 3

Beantwoord de volgende vragen bij de YouTube filmpjes:

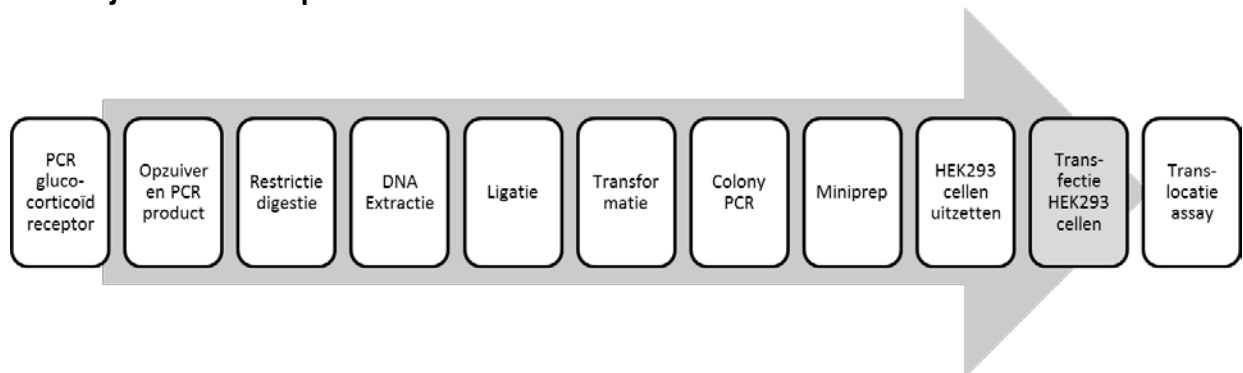
- 1) Filmpje Cell Culture Basics from Gibco®:
 - a) Welke drie variabelen moet je instellen, en op welke waarden moet de deze meestal instellen, als je cellen wilt groeien in een incubator?
 - b) Als je een celcultuur onder de microscoop controleert, op welke 3 punten let je dan?
- 2) Filmpje Aseptic Technique: Gibco® Cell Culture Basics:
 - a) Waarom hebben alle voorwerpen in de zuurkast een vaste/ideale plek waar ze moeten staan?
- 3) Filmpje Cell Counting Using the Trypan Blue Exclusion Method
 - a) Hoe zijn dode cellen te herkennen wanneer cellen worden geteld met behulp van de Trypan Blue Exclusion Method?
 - b) Waarvoor zijn de drie lijntjes aan de buitenste zijde van het telveld van de hemocytometer bedoeld?

Dagdeel 8: Calciumfosfaat transfecties

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van de calciumfosfaat transfectie methode
- Je kunt de bovenstaande techniek correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vandaag gaan jullie je construct transfecteren in de HEK293 cellen die jullie het vorig dagdeel hebben uitgezet. Als het expressieplasmide in de cellen zit, zal eerst transcriptie van het mRNA plaats vinden en vervolgens door middel van translatie het glucocorticoïde receptor green-fluorescent proteïn (GR-GFP) fusie-eiwit gesynthetiseerd worden dat jullie het volgend dagdeel gaan bestuderen. Een veel gebruikte efficiënte en goedkope methode is de calciumfosfaat transfectie. Deze methode is ontwikkeld door Frank Graham in het laboratorium van Alex van der Eb in Leiden in 1973. De procedure wordt gebruikt voor zowel transiente als voor stabiele transfecties. Het is gebaseerd op de vorming van calcium-fosfaat-DNA precipitaten die de binding van het DNA aan de celmembraan faciliteren. Het DNA dringt vervolgens de cellen binnen door endocytose of fagocytose. Allereerst wordt het DNA gemengd met een geconcentreerde oplossing van CaCl_2 . Vervolgens wordt dit mengsel druppelsgewijs toegevoegd aan een gebufferde zout-fosfaat buffer om fijne precipitaten te krijgen.

Transfectie

Reagentia:	60-70% confluente HEK293 cellen, DMEM medium (met antibiotica gentamicine, glutamine en 10% foetaal kalf serum, HEPES buffered Saline), MilliQ, 0,1x TE , 2,5M CaCl_2 , 2X HBS pH 7.05, DNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Benodigdheden steriel:	pipetpunten, epjes, eppenrek
Apparatuur:	pipet, vortex, incubator 37°C, omkeer microscoop

Protocol:

1. Vervang het medium van de cellen voor vers medium. Voeg 1ml vers medium per welletje van een 12-wells plaat toe.
 - a. Voorkom dat cellen droog komen te staan, dus verwijder niet het medium van teveel wellettes tegelijk.
 - b. Houd tijdens het pipetteren de punt van de pipet tegen de wand van het welletje, zodat het medium niet direct op de cellen terecht komt.
2. Maak de transfectiemix in een steriel 1,5ml epje aan de hand van het onderstaande transfectieschema deel 1. Pipetteer de verschillende componenten van boven naar beneden bij elkaar. Maak gebruik van een mastermix en maak voor 1 well meer dan je nodig hebt. Laat je assistenten van je voren je tabel controleren.

Tabel 1: Transfectieschema deel 1 voor een 12-wells plaat

	1 well (μ l)	x- welletjes
Water	12,4	
0,1x TE	17,3	
DNA 1 μ g/ μ l	1,4	
2,5M CaCl ₂	3,5	
totaal	34,6	

3. Zet de vortex op constant en op 3/4 van zijn vermogen. houd het epje bovenaan vast met de lid open en zet het op de vortex, en voeg nu met 2 druppels per seconde de 2x HBS van Deel 2 toe.
 - a. *Door de 2x HBS langzaam bij de CaCl₂/DNA oplossing te pipetteren ontstaat een fijner precipitaat dat zorgt voor een hogere transfectie efficiëntie.*

Tabel 2: Transfectieschema deel 2 voor een 12-wells plaat

	1 well (μ l)	x- welletjes
2x HBS pH 7,05	34,6	
Totaal deel 1 en 2	69.1	

1. Druppel 69,1 μ l transfectiemix per well snel (maar niet spuitend) op de cellen (niet zwenken)
 - a) *Het precipitaat, dat uit calciumfosfaat en plasmide DNA bestaat, kan nu door de cellen worden opgenomen.*
2. Zet de cellen terug in de CO₂ stoof bij 37°C tot het volgende dagdeel.

Opdracht 1

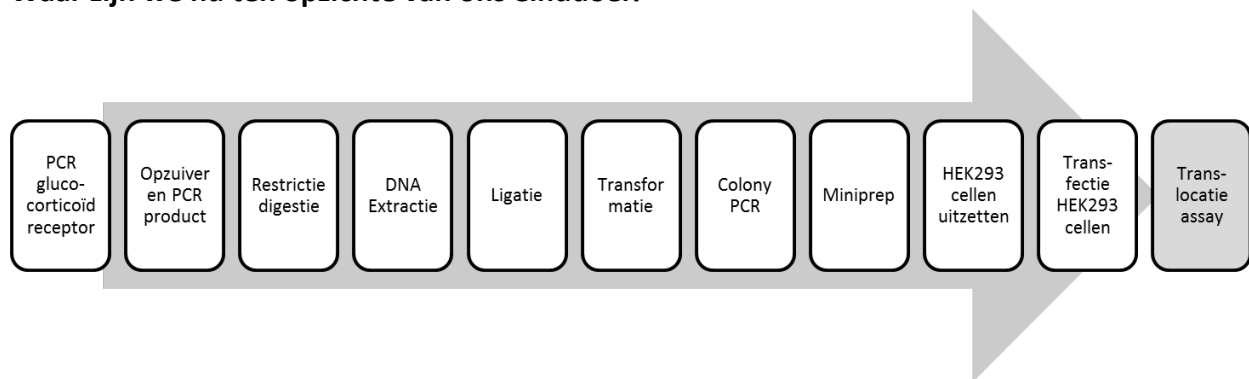
Laat je transfectieschema (zie stap 1 protocol) controleren door je practicumassistent.

Dagdeel 9: Translocatie assay

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van het translocatie assay
- Je kunt de bovenstaande techniek correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



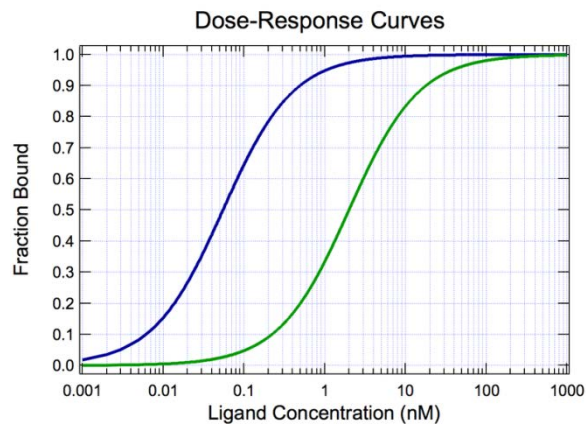
Inleiding

Vandaag gaan jullie met behulp van de fluorescentie microscoop controleren of het glucocorticoïde receptor green-fluorescent protein (GR-GFP) fusie-eiwit wel tot expressie wordt gebracht in het juiste celcompartiment in HEK293 cellen. Vervolgens gaan jullie bestuderen of na activatie van de glucocorticoïde receptor translocatie plaats vindt van het cytoplasma naar de nucleus en of jullie deze translocatie experimenteel kunnen beïnvloeden. De conditie die je gaat testen is afhankelijk van de groep waarin je zit. Om dit te kunnen doen moeten jullie de getransfecteerde cellen incuberen met steroïden. Om de resultaten te kunnen analyseren is het van belang dat de celmorfologie, de intracellulaire locatie van het fusie-eiwit en het fusie-eiwit zelf in tact blijft. Daarom gaan jullie aan het einde van het practicum de cellen fixeren en inbedden in VECTAshield (zie kennisclip op BlackBoard).

Allereerst een korte toelichting over ligand binding. Een ligand is een molecuul of een ion dat een specifieke binding aan kan gaan met een biomolecuul, vaak een eiwit met als doel om biologische processen te beïnvloeden. Een ligand bindt op een specifieke bindingsplaats (ligand bindend domein, zie ook opdracht 2 dagdeel 2) op het betreffende targetmolecuul en vormt hierbij een complex. Deze binding wordt bewerkstelligd door intermoleculaire krachten zoals ion- of hormoonbindingen, waterstofbruggen en van der Waalsbindingen. Hoe groter de inter-moleculaire kracht tussen ligand en bindingsplaats, hoe groter de bindingsaffiniteit. Sommige targetmoleculen veranderen van vorm nadat het ligand heeft gebonden en dit kan tot gevolg hebben dat een binding tijdelijk of voorgoed aan een ligand bindt. De binding zorgt ervoor dat een signaal wordt doorgegeven, vaak houdt dit in dat het biomolecuul zonder het ligand niet actief is. Dit is ook het geval voor de humane glucocorticoïde receptor die behoort tot de ligand geactiveerde transcriptie factoren. De receptor bevindt zich in ongebonden en inactieve toestand in het cytoplasma en pas na binding van het ligand cortisol vindt er translocatie naar de nucleus plaats waar regulatie van genexpressie kan plaats vinden.

Vaak hangt de activiteit van een eiwit af van de concentratie van het ligand. Een ligand die activeert of activiteit verhoogd noem je een agonist. Het tegenovergestelde van agonisten zijn antagonist, deze binden wel maar activeren niet. Verschillende agonisten of antagonist kunnen competitief werken. Welk molecuul of ion bindt heeft te maken met de affiniteit van de bindingsplek voor de ligand. De fractie van gebonden ligand hangt af van de concentratie van het ligand. Als er weinig ligand in oplossing is is er weinig kans dat ligand bindt. Naarmate er meer ligand in oplossing komt zal er meer ligand gaan binden totdat er zoveel ligand gebonden is dat er weinig

bindingsplaatsen over zijn, steeds minder ligand zal binden totdat alle bindingsplaatsten bezet zijn. Als je dit uitzet in een grafiek krijg je een dosis-response curve (zie figuur 1).



Figuur 1: Een voorbeeldgrafiek van een dosis-respons curve (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DoseResponse.png>)

De evenwichtsconstante (ook wel associatie constante of affiniteitconstante genoemd) voor de binding van een ligand aan een eiwit kan berekend worden met de volgende formule:

$$K_{eq} = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Hierbij is K_{eq} de evenwichtsconstante, $[ML]$ is de concentratie van het eiwit-ligand complex, $[M]$ is de concentratie van het eiwit en $[L]$ is de concentratie van vrij aanwezig ligand (dus niet de totale hoeveelheid aanwezig ligand in oplossing).

Een ligand bindings assay is een methode die berust op de binding van een ligand aan een receptor. Na het toevoegen van het ligand kan er gekeken worden of, en in welke mate, ligand-eiwit complexen zijn gevormd. Vaak wordt dit elektrochemisch of met behulp van een fluorescentie methode bepaald.

Vandaag gaan jullie zelf ligandbinding en de verschillende componenten die hierop invloedt hebben onderzoeken met behulp van een zogenaamd translocatie assay. Tijdens deze assay gaan jullie de translocatie het glucocorticóide receptor green-fluorescent protein fusie-eiwit van cytoplasma naar nucleus bestuderen in HEK293 cellen na het toevoegen van het ligand cortisol. Daarnaast gaan jullie per groep het effect op de translocatie bekijken van de onderstaande component:

- Groep 1 de verschillen in affiniteit tussen species (humaan (cortisol) versus rat (corticosterone))
- Groep 2 de dosis-effect relatie
- Groep 3 effect van de antagonist Mifepreston
- Groep 4 effect van de antagonist Geldanamycine (17-AAG)





Translocatie assay

Reagentia:	EGFP-hGR getransfecteerde cellen, DMEM, cortisol, corticosteron, mifepreston, 17-AAG, VECTAshield hard set, 4% Paraformaldehyde (PFA)in PBS
Benodigdheden	voorwerpglasjes, aluminiumfolie
Apparatuur:	pipet, omkeer en fluorescentiemicroscop


Hydrocortisone (Cortisol)

R-zinnen:	63-62-40
S-zinnen:	36/37-45-36-22



Corticosteroneacetate (Corticosterone)

 Xn schadelijk	 T toxisch	 N gevaarlijk voor milieu	 Xi irriterend
R-zinnen:	43-40		
S-zinnen:	36-22		


Mifepreston

 T toxisch	
Risk codes:	53-22-36/37/39-45
Safety statements:	60-61

Geldanamycine (17-AAG)

 T toxisch	 Xi irriterend
Risk codes:	36/37/38
Safety statements:	22-24/25-36-26

Paraformaldehyde

 Xn schadelijk	
R-zinnen:	31-43-40-36/37/38-20/22-41-37/38-42/43-20/21/22
S-zinnen:	36-45-36/37/39-26-24-22

Tip: Vergeet niet bij het maken van je experimentele opzet aan te geven wanneer je wat in welke concentratie in welke well wilt pipeteren en wanneer je welke reacties moet stop zetten.

Protocol:

1. Translocatie assay
 - a) De standaarden van de steroïden en remmers hebben een concentratie van $1,0 \cdot 10^6$, $1,0 \cdot 10^4$ en $1,0 \cdot 10^2$ nM in DMEM
 - b) Zoek in het pipetteerschema (de assistent zal de groepen verdelen) de steroïden en de concentraties die je gaat pipetteren.
 - c) Bereken aan de hand van de concentraties van de boven genoemde standaarden en het volume in je well hoeveel μ l steroïden je moet toevoegen om aan de gegeven einconcentratie te komen. Bedenk zelf welke standaard concentratie je gaat gebruiken.
2. Ververs het medium (1ml) van de cellen minimaal 1 uur voor de behandeling.
 - a) De groepen die antagonisten (mifeprestone of 17AAG) toevoegen moeten een uur voor het toevoegen van cortisol de antagonist toevoegen.
 - b) Incubeer minimaal een uur in de stoof bij 37°C
 - c) voeg de steroïden (cortisol of corticosteron)
 - d) incubeer 30-60min in de stoof bij 37°C , noteer goed hoelang je precies hebt geincubeerd dit kan van belang zijn.
3. Fixeren en inbedden.
4. Verwijder het medium met steroïden van de cellen.

5. Was de cellen een keer 5 minuten met 1000µl PBS.
6. Fixeer de cellen gedurende 10-15 min. in 300µl 4% PFA. Bescherm de cellen tegen licht.
7. Verwijder de PFA oplossing en doe dit in de speciale afvalcontainer.
8. Was de cellen 2X met 500 ul PBS.
9. Druppel een 25µl VectaSHIELD op een gelabeld voorwerpglas
10. Haal de objectglaasjes voorzichtig uit de 12-welletjes en leg ze op zijn kop (cellen naar beneden) op het voorwerpglas met VectaSHIELD.
11. De celpreparaten kunnen enkele weken bewaard worden in een doos in het donker bij 4°C.

Opdracht 1:

Waarom worden cellen, voordat ze bekeken worden met de fluorescentie microscoop, gefixeerd?

Dagdeel 10 en 11: Analyse resultaten

Leerdoelen

- Je kent de theoretische achtergronden van het translocatie assay
- Je kunt de resultaten analyseren met behulp van het programma ImageJ

Inleiding

De laatste twee dagdelen gaan jullie de data van de translocatie assay bekijken onder de fluorescentie microscoop en maken hier foto's van. Deze foto's gaan jullie analyseren door gebruik te maken van het programma ImageJ (zie BlackBoard). De verkregen resultaten worden per zaal in een Excelsheet ingevoerd en op BlackBoard gezet zodat jullie dat kunnen gebruiken voor het schrijven van het onderzoeksverslag.

The nobel Prize for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP

Glowing proteins – a guiding star for biochemistry

The remarkable brightly glowing green fluorescent protein, GFP, was first observed in the beautiful jellyfish, *Aequorea victoria* in 1962. Since then, this protein has become one of the most important tools used in contemporary bioscience. With the aid of GFP, researchers have developed ways to watch processes that were previously invisible, such as the development of nerve cells in the brain or how cancer cells spread.

Tens of thousands of different proteins reside in a living organism, controlling important chemical processes in minute detail. If this protein machinery malfunctions, illness and disease often follow. That is why it has been imperative for bioscience to map the role of different proteins in the body.

This year's Nobel Prize in Chemistry rewards the initial discovery of GFP and a series of important developments which have led to its use as a tagging tool in bioscience. By using DNA technology, researchers can now connect GFP to other interesting, but otherwise invisible, proteins. This glowing marker allows them to watch the movements, positions and interactions of the tagged proteins.

Researchers can also follow the fate of various cells with the help of GFP: nerve cell damage during Alzheimer's disease or how insulin-producing beta cells are created in the pancreas of a growing embryo. In one spectacular experiment, researchers succeeded in tagging different nerve cells in the brain of a mouse with a kaleidoscope of colours.

The story behind the discovery of GFP is one with the three Nobel Prize Laureates in the leading roles:

Osamu Shimomura first isolated GFP from the jellyfish *Aequorea victoria*, which drifts with the currents off the west coast of North America. He discovered that this protein glowed bright green under ultraviolet light.

Martin Chalfie demonstrated the value of GFP as a luminous genetic tag for various biological phenomena. In one of his first experiments, he coloured six individual cells in the transparent roundworm *Caenorhabditis elegans* with the aid of GFP.

Roger Y. Tsien contributed to our general understanding of how GFP fluoresces. He also extended the colour palette beyond green allowing researchers to give various proteins and cells different colours. This enables scientists to follow several different biological processes at the same time.

Bron: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html

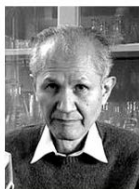


Photo: J. Henriksson/SCANPIX
Osamu Shimomura



Photo: J. Henriksson/SCANPIX
Martin Chalfie



Photo: UCSD
Roger Y. Tsien



Jellyfish, *Aequorea victoria*

Protocol:

1. Lees voordat je begint altijd goed de instructies op de tutorial naast de microscoop goed door en raadpleeg bij twijfel je practicumassistent.
2. Zoek je preparaten op.
3. Stel je fluorescentiemicroscoop goed af
4. Bekijk je preparaten goed en maak foto's.
5. Hoe je deze foto's kunt analyseren in ImageJ is te vinden op BlackBoard.

