

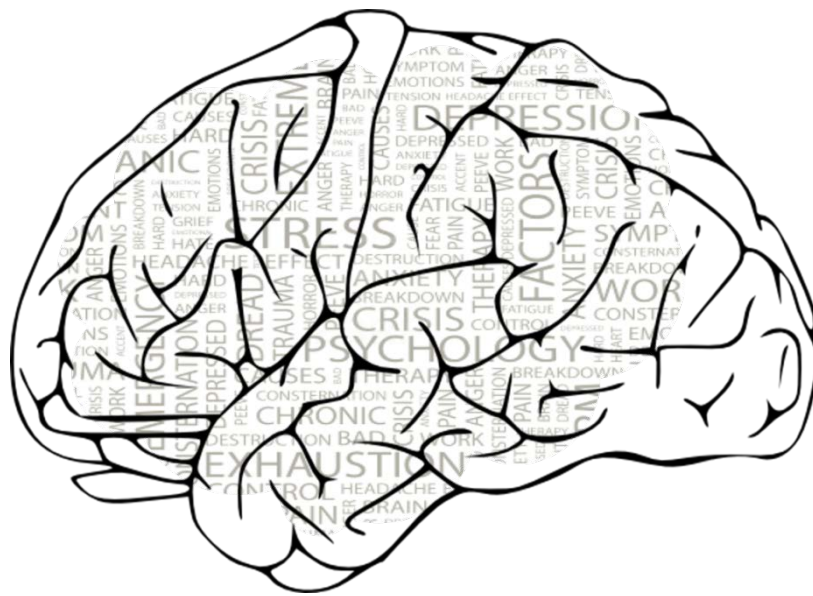
Practicumhandleiding

Celbiologie Psychobiologie

jaar1

5102CELB9Y

Coördinator: Dr. Ilja Boor
2015-2016



Practicumhandleiding Celbiologie

5102CELB9Y

Periode 4: februari- maart 2016

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. Ilja Boor
Practicumdocent: Cindy Wagemans MSc
Danielle van Veersendaal MSc
Dr. Linda Holtman
Julia Sassi MSc
Simone Mesman MSc
Veerle Eggens MSc
Onderwijsmedewerker: Rianne Strik BSc
Chris Darley
Assistenten: Dieuwertje Reinders BSc
Jerom van Gemert MSc
Milou van Helvert BSc
Nils Nieuwenkamp BSc
Tessa Supèr BSc

Inhoudsopgave

CONTACT INFORMATIE EN BELANGRIJKE PERSONEN	3
INHOUDSOPGAVE	4
LEERDOELEN	7
PRACTICUMREGELS	8
VEILIGHEID	9
INSTRUCTIES IN HET GEVAL VAN EEN CALAMITEIT.....	14
TIPS EN TRICKS VOOR HET PRACTICUM.....	16
ALGEMENE INTRODUCTIE PRACTICA	17
VERWACHTINGEN	17
<i>Wat wordt er van de student verwacht?</i>	<i>17</i>
<i>Wat mag je van de practicumassistenten verwachten?</i>	<i>18</i>
HET LABJOURNAAL.....	19
<i>Vaste onderdelen in het labjournaal:.....</i>	<i>20</i>
<i>Labjournaalbeoordelingsformulier en -feedbackformulier</i>	<i>26</i>
WERKEN MET EEN GILSON PIPETMAN® MICROPIPET	28
WERKEN MET DE ZUURKAST	32
WERKEN MET VLOEISTOFFEN.....	33
WERKEN MET EEN LICHTMICROSCOOP	35
HET GEBRUIK VAN EEN FLUORESCENTIEMICROSCOOP.....	37
WERKEN MET MICROBIOLOGISCHE CULTUREN	38
<i>Steriel werken.....</i>	<i>38</i>
<i>Sterilisatie Procedures.....</i>	<i>39</i>
<i>Kweekmedia.....</i>	<i>40</i>
<i>Uitplaten</i>	<i>41</i>
TEKENINSTRUCTIES	42
OVERZICHT PRACTICA	43
HET GESTRESSTE BREIN	44
DAGDEEL 1: INTRODUCTIE, BOOTCAMP EN PCR HUMANE GLUCOCORTICOÏD RECEPTOR	47
<i>Leerdoelen.....</i>	<i>47</i>
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	<i>47</i>
<i>Inleiding.....</i>	<i>47</i>
<i>Wat gaan we vandaag doen?</i>	<i>51</i>
<i>Experiment</i>	<i>51</i>
<i>Bootcamp opdracht 1: chemisch rekenen.....</i>	<i>52</i>
<i>Bootcamp opdracht 2: kleine hoeveelheden pipetteren</i>	<i>52</i>
<i>Bootcamp opdracht 3: quiz.....</i>	<i>52</i>
<i>Bootcamp opdracht 4: instellen microscoop.....</i>	<i>52</i>
<i>Opdrachten</i>	<i>53</i>

DAGDEEL 2: OPZUIVEREN PCR PRODUCT EN RESTRICTIEDIGESTIE.....	58
<i>Leerdoelen</i>	58
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	58
<i>Inleiding</i>	58
<i>Experiment</i>	60
<i>Opdrachten</i>	62
DAGDEEL 3: AGAROSE GELELEKTROFORESE EN DNA EXTRACTIE	67
<i>Leerdoelen</i>	67
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	67
<i>Inleiding</i>	67
<i>Experiment</i>	68
<i>Opdrachten</i>	72
DAGDEEL 4: LIGATIE / TRANSFORMATIE	73
<i>Leerdoelen</i>	73
<i>Inleiding</i>	73
<i>Experiment</i>	76
<i>Opdrachten</i>	79
DAGDEEL 5: COLONY PCR	81
<i>Leerdoelen</i>	81
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	81
<i>Inleiding</i>	81
<i>Experiment</i>	83
<i>Opdrachten</i>	85
DAGDEEL 6: MINI-PREP DNA ISOLATIE	87
<i>Leerdoelen</i>	87
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	87
<i>Inleiding</i>	87
<i>Experiment</i>	90
<i>Opdrachten</i>	92
DAGDEEL 7: CELLEN UITZETTEN	93
<i>Leerdoelen</i>	93
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	93
<i>Inleiding</i>	93
<i>Experiment</i>	95
<i>Opdrachten</i>	99
DAGDEEL 8: CALCIUMFOSFAAT TRANSFECTIES.....	100
<i>Leerdoelen</i>	100
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	100
<i>Inleiding</i>	100
<i>Experiment</i>	101
<i>Opdrachten</i>	102
DAGDEEL 9: TRANSLOCATIE ASSAY	103
<i>Leerdoelen</i>	103
<i>Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?</i>	103
<i>Inleiding</i>	103

<i>Experiment</i>	105
<i>Opdrachten</i>	106
DAGDEEL 10: FLUORESCENTIE MICROSCOPIE	107
<i>Leerdoelen</i>	107
<i>Inleiding</i>	107
<i>Opdrachten</i>	111
DAGDEEL 11: ANALYSE RESULTATEN	112
<i>Leerdoelen</i>	112
<i>Inleiding</i>	112
<i>Opdrachten</i>	115

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden (concepten) van de volgende experimenten en technieken uitleggen en toepassen op experimenteel onderzoek:
 - o Basale aseptische en microbiologische technieken
 - o DNA isolatie (mini-prep), extractie en zuivering
 - o (kolonie)PCR
 - o restrictiedigestie
 - o (in frame) subkloneren
 - o Transformeren
 - o Ligeren
 - o Calciumfosfaat transfecties
 - o Celweek van HEK293 cellen
 - o Translocatie assay
 - o Cel preparaten maken
 - o Fluorescentie microscopie
- Je kunt een protocol correct interpreteren en uitvoeren.
- Je kunt de verschillende experimentele stappen toelichten en de samenhang hiertussen uitleggen.
- Je kunt zelfstandig de empirische cyclus doorlopen en toepassen op experimenteel onderzoek volgens de richtlijnen van Academische Basis Vaardigheden:
 - o selecteren en uitleggen concepten
 - o opstellen onderzoeksvraag en onderzoekshypothese
 - o maken van proefopzet (inclusief opstellen nul- en alternatieve hypothese(s) en voorspellingen)
 - o (statistisch) analyseren, interpreteren en bediscussiëren van verkregen resultaten
- Je kunt een labjournaal bijhouden.
- Je kunt reflecteren op je eigen handelen.
- Je kunt professioneel samenwerken.
- Je kunt deelnemen aan een wetenschappelijke discussies (je mening naar voren brengen, verantwoorden en overeind houden).
- Je kunt uitleggen wat er onder een professionele werk- (academische-) houding wordt verstaan en je hier naar gedragen.
- Je kunt de algemene veiligheidsregels (voor mens en milieu) correct toepassen.

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 Ilya Boor (psychobiologiejaar1-science@uva.nl). Afwezigheid zonder geldige reden of zonder afmelding kan tot uitsluiting van het gehele practicum leiden. Het niet-voldoen aan de practicumverplichting betekent: geen practicumcijfer en dus kun je het vak Celbiologie niet meer halen.
- **Kom op tijd.** Dit hoort bij een academische houding. Wanneer je te laat komt voldoe je bovendien niet aan de aanwezigheidsplicht.
- **Houd je aan de veiligheidsregels.** Experimenten doen in een laboratorium brengt risico's met zich mee. Om deze tot het minimum te beperken gelden er strikte veiligheidsregels. De veiligheidsmaatregelen zijn niet alleen bedoeld voor jullie eigen veiligheid en om je experimenten goed te laten verlopen, maar ook om te voorkomen dat schadelijke (biologische) agentia in het milieu terecht komen (zie ook Veiligheid).
- **Bereid je voor op elk practicum.** Lees vóór 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. Daarnaast zijn er thuisopdrachten die je vooraf moet maken, boekhoofdstukken of artikelen die je moet lezen en/of filmpjes / internetpagina's om te bekijken. Voor een overzicht van de voorbereidingen per dagdeel zie het schema op BlackBoard. Een vast onderdeel van de voorbereiding is het uitwerken van de onderdelen van de empirische cyclus tot en met de proefopzet in je labjournaal.
 - *Toelichting: Om zo veel mogelijk te kunnen leren tijdens het practicum is een goede voorbereiding essentieel. Dit is je kans om 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 opdrachten in voor de deadline.** Vaak word je gevraagd de opdrachten in je labjournaal te maken en dit in te leveren.
- Het is **niet toegestaan** om **Mobiele telefoons, tablets, rekenmachines** en **laptops** te gebruiken in de practicumzaal vanwege het risico op **contaminatie van gevaarlijke stoffen en/of biologische agentia**, tenzij daar specifiek toestemming voor wordt gegeven.
- Zonder **handleiding en labjournaal** heb je **geen toegang** tot de practicumzaal. Neem daarnaast ieder practicum tekenpotloden en een markeerstift mee.
 - *Tip: Label al je spullen met je naam en collegenummer op de buitenkant.*

Veiligheid

Algemeen

- Stel je op de hoogte van vluchtwegen, brandblussers, oogdouches en branddouches.
- Stel je op de hoogte van de eigenschappen van te gebruiken chemicaliën (zie Gevaarlijke stoffen).
- Stel je op de hoogte van de micro-organismen of cellen waarmee je werkt en volg de veiligheidsvoorschriften (zie Bioveiligheid).
- Stel je op de hoogte van voorschriften van te gebruiken apparatuur.
- Het dragen van een labjas, deugdelijk schoeisel (schoenen van een gesloten type en geen naaldhakken) en indien vermeld 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.
- Geen eten en drinken op de practicumzaal. Leg dit in je kluisje.
- Tassen en jassen zijn niet toegestaan in de practicumzaal. Leg deze in je kluisje.
- Vermijd zoveel mogelijk contact tussen hand en gezicht. Breng tijdens het practicum bijvoorbeeld geen make-up aan en breng geen contactlenzen in.
- Draag zo min mogelijk sieraden aan je handen.
- Zorg voor schone handen en kortgeknipte nagels.
- Was je handen altijd bij het verlaten van de practicumzaal en als daartoe enige aanleiding is
 - o *Gebruik water en zeep en zo nodig handdesinfectants (zie tekst box handen wassen).*
- Het is verboden aan beide handen een handschoen te dragen. Behalve als hier uitdrukkelijk toestemming voor gegeven wordt.
 - o *Deze regel is bedoeld om je voortdurend bewust te laten zijn wat wel en wat niet mogelijk gecontamineerd is.*
- Pipetteer nooit met de mond.
- Loshangend haar opbinden.
 - o *Let op!: samenbinden is niet voldoende, want ook een staart kan vlamvatten*
- Houd de werkruimte schoon en opgeruimd.
- Ruim gemorste chemicaliën direct op met een tissue en gemorste biologische agentia met desinfectant en deponeer deze tissue in het juiste vast afvalvat.
- Zorg voor duidelijke etikettering.
- Ontdoe je op de juiste manier van (chemisch en biologisch) afval (zie Afvalverwerking).
- Ruim aan het eind van iedere dag de labtafel op en maak deze schoon met desinfectant.

Handen wassen en het ontsmetten van de huid

De belangrijkste antiseptische handeling in een laboratorium is het wassen van de handen. Dit dient vooral ter verwijdering van transiënte flora en om versleping van een besmetting te voorkomen. Om de handen goed te kunnen reinigen wordt aanbevolen ringen en andere sieraden voor aanvang van het werk te verwijderen. Voor het wassen van de handen is een goede zeep voldoende. Een goede handwastechniek bestaat uit:

- Het bevochtigen van de handen met warm water
- Het verdelen van de zeep over de hand vanaf de pols naar de vingers
- Handen stevig inwrijven gedurende 20 seconden vanaf de pols naar de vingers. Tussen de vingers rond en onder de vingernagels niet vergeten.
- Ruim afspoelen vanaf de pols naar de vingers
- Goed afdrogen met papieren handdoek
- Als laatste handeling met de zojuist gebruikte handdoek de kraan dichtdraaien (met een elleboogkraan kan dit eerder gedaan worden)
- Papieren handdoek weggoeien in reguliere vuilnisbak, NIET bij chemisch of biologisch afval

Bron: Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten. Onder redactie van H. Schellekens. Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie

**Bioveiligheid**

Iedereen die in een laboratorium werkt met biologisch materiaal (micro-organismen en cellen) moet zich houden aan strikte veiligheidsmaatregelen om:

- de onderzoeker te beschermen
- het experiment te beschermen
- mens en milieu te beschermen

Het niveau van de verschillende veiligheidsmaatregelen is onder andere afhankelijk van de eigenschappen van het organisme waarmee gewerkt wordt (pathogeniteit, toxiciteit, etc). Voor de organismen waar wij in de practicumzaal mee werken hanteren we tien basale werkvoorschriften die samen de principes van Veilige Microbiologische Technieken (VMT) vormen. Jullie worden geacht deze voorschriften te kennen EN volgens deze voorschriften te handelen. Alleen op deze manier kan een werksituatie worden gecreëerd die veilig is voor jullie zelf, jullie medestudent en voor het milieu.

De Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie heeft het boekje Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten onder redactie van H. Schellekens uitgegeven (ISBN 978-90-8559-549-6). Belangstellenden kunnen dit bestellen bij de vereniging (www.knvm.org/knvm/publications/knvm_biosafety_booklet/).

Tien basis Veilige Microbiologische Technieken-regels:

1. Deuren en ramen zijn gesloten tijdens de werkzaamheden
2. Op de practicumzaal wordt een laboratoriumjas gedragen
3. Eten, drinken, roken en de opslag van eet- en drinkwaren in de practicumzaal zijn verboden.
4. Draag geen sieraden of horloges en houdt de handen schoon en de nagels kort
5. Na het morsen van biologisch wordt direct ontsmet.
 - a. Ontsmet met 70% alcohol het oppervlak waarop gemorst is. Gebruik hiervoor een tissue of papier en gooi dit in de biologisch afvalbak.
 - b. Was handen na afloop.
6. Het ontstaan en verspreiden van aerosolen (microscopisch kleine vloeistofdruppeltjes die zich door de lucht kunnen verspreiden) wordt geminimaliseerd. Dit bereik je door:
 - a. Alleen te centrifugeren met dichte buizen.
 - b. Te voorkomen dat doppen van buizen nat zijn.
 - c. Natte entnaalden op de juiste manier uit te gloeien; d.w.z. eerst de steel en dan pas het entoog.
 - d. Entnaalden eerst te laten afkoelen voor ze weer in cultuurvloeistof te steken.
 - e. Pipetten niet kracht leeg te drukken, maar ze leeg te laten lopen.
 - f. Vloeistoffen geleidelijk (en nooit van grote hoogte) uit te gieten.
7. Met de mond pipetteren is verboden.
 - a. Gebruik altijd een pipetteerballon of een mechanische pipet.
 - b. Voor kleine hoeveelheden wordt een mechanische micropipet gebruikt.
8. Gebruikte materialen worden ontsmet voordat ze worden gewassen of hergebruikt.
 - a. Dit kan door ze te autoclaveren of door ze in gevalideerde ontsmettende vloeistof te dompelen.
9. Biologisch afval wordt geïnactiveerd.
 - a. Deponeer hiertoe het afval in de verzamelbak voor biologisch afval. Dit moet worden afgevoerd naar de autoclaaf of naar een verbrandingsoven die geschikt is voor de verbranding van ziekenhuisafval.
10. De handen worden gewassen voordat de practicumzaal wordt verlaten (zie handen wassen en het ontsmetten van de huid).

Zie ook de instructiefilm over "Veilige microbiologische techniek (VMT) en GGO-regelgeving" met als titel 'Precies zoals het hoort' (<http://www.youtube.com/watch?v=xbdi95lxUw8>) gemaakt in opdracht van het Ministerie van Infrastructuur en Milieu (voorheen ministerie van VROM).

Gevaarlijke stoffen

Het is in ieders belang dat er veilig wordt omgegaan met chemicaliën. Denk daarbij aan de juiste opslag, het dragen van persoonlijke beschermingsmiddelen, weten welke stoffen je beslist niet bij elkaar mag voegen en wat te doen bij een calamiteit.

Belangrijke gegevens over chemicaliën zijn te vinden in de zogenaamde 'Material Safety Data Sheet' (MSDS). Je kunt de MSDS vinden op de website van de leverancier of fabrikant aan de hand van het CAS-nummer (en in jullie geval op BlackBoard). Alle chemicaliën zijn voorzien van een uniek CAS-nummer dat is weergegeven op het etiket van iedere pot of fles. Op de MSDS worden, naast waarschuwingspictogrammen, ook Risico- en Veiligheidszinnen (R- en S-zinnen) weergegeven. De Risicozinnen duiden de risico's van de stof aan en de Veiligheidszinnen geven de maatregelen aan die men moet treffen als men met de stof werkt. Als gevolg van het nieuw ingevoerde Globally Harmonised System zijn de waarschuwingspictogrammen en de R- en S-zinnen gewijzigd in H(azard) en P(recaution)

zinnen. Tot 2016 is er een overgangsfase. Daarom kun je zowel oude als nieuwe waarschuwingspictogrammen tegenkomen en vaak worden er zowel R- en S-zinnen als H- en Z-zinnen beschreven. Bekijk voorafgaand aan ieder practicum het MSDS van de chemicaliën waar je dat dagdeel mee gaat werken. Noteer vervolgens het waarschuwingspictogram en H- en P-zinnen in je labjournaal (zie ook opdracht veiligheid en milieu die je elk experiment moet maken).

Gevaarlijke apparatuur

- Gasbrander: wordt gebruik bij experimenten waarbij een vlam vereist is (bijvoorbeeld steriel werken). Let goed op als de brander aanstaat om brandwonden te voorkomen. Lang haar opbinden en nooit weglopen bij je tafel als de gasbrander aan staat.
- Mes / Scalpel: wordt gebruikt voor het uitsnijden van agar blokjes. Nooit lopen met een mes en/of scalpel om snij- en steekwonden te voorkomen.
- PCR apparaat: Het hitteblok van het PCR apparaat kan heet zijn en brandwonden veroorzaken
- Thermoblokken en waterbaden: deze kunnen heet zijn en brandwonden veroorzaken. Vloeistoffen, vaste stoffen en gassen zetten uit bij verhitting, hierdoor kunnen doppen openspringen. Pas dus op voor ogen en gezicht.
- 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 (dragen van een veiligheidsbril is verplicht) en handen!
- Centrifuges: bij verkeerd gebruik (b.v. geen tegenbuis of tegenbuis met verkeerd gewicht) kunnen ongelukken gebeuren. Zorg dus altijd voor een tegenbuis met het gelijk gewicht en centrifugeer nooit met open deksel.

Afvalverwerking

- Biologisch en chemisch afval mag NIET door de gootsteen worden weggespoeld of in reguliere afvalbakken worden weggegooid. Gebruik voor:
 - o Biologisch afval de vierkante blauwe bak met gele deksel voorzien van het biologisch afvalteken (50 liter) (Figuur 1I).
 - o Chemisch afval het vat voor vast of voor vloeibaar afval:
 - Vast chemisch afval in de blauwe ton met zwarte deksel (60 liter) (Figuur 1H).
 - Vloeibaar chemisch afval gieten in de juiste jerrycan die in de zuurkasten staan:
 - Halogeenrijk (concentratie hoger dan 4% aan halogenide) vloeibaar chemisch afval in de **blauwe** jerrycan (10 liter) (Figuur 1D).
 - Halogeenarm vloeibaar chemisch afval in de **witte** doorzichtige jerrycan (10 liter) (Figuur 1B).
- Scherpe voorwerpen (scalpels en naalden) moeten in de gele container met witte deksel (Figuur 1G).








Aanvullende maatregelen voor het werken met genetisch gemodificeerde organismen

Organismen waarvan het genetisch materiaal is veranderd op een wijze die van nature niet mogelijk is door voortplanting of natuurlijke recombinatie, zijn volgens de wet genetisch gemodificeerde organismen (GGO). Om met dergelijke organismen veilig te kunnen werken heeft de overheid

het *Besluit genetisch gemodificeerde organismen* en de *Regeling genetisch gemodificeerde organismen vast gesteld*. In deze regeling is bepaald hoe men met deze organismen moet werken en hoe de laboratoria moeten zijn ingericht om het werken met GGO's mogelijk te maken. Voor het werken in een practicumzaal door studenten met GGO's gelden naast de standaard VMT regels een aantal aanvullende maatregelen om de veiligheid van mens en milieu te waarborgen:

- Opgeslagen GGO materiaal (koelkast, stoof, vriezer, etc.) altijd voorzien van naam, datum en GGO naam (in jullie geval pEGFP-C1_hGR).
- Glaswerk, disposables en instrumentarium dat in aanraking is geweest met biologische GGO materiaal moet worden gesteriliseerd, anderszins worden gedesinfecteerd of worden afgevoerd in de vierkante blauwe bak met gele deksel voorzien van het biologisch afvalteken (Figuur 1I).
- Vervoer van besmet materiaal buiten de werkruimte moet plaatsvinden in lekdichte, gesloten containers.
- Gebruik elk practicum dezelfde laboratoriumjas die in de practicumzaal blijft. Je hoeft dus geen eigen jas mee te nemen.

RAADPLEEG BIJ TWIJFEL ALTIJD JE PRACTICUMASSISTENT!!!

A	Verdunde basen		Diluted base	B	Halogeen arme oplosmiddelen		Halogeen-poor solvents
C	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	D	Halogeen rijke oplosmiddelen		Halogeen-rijke solvents
E	Ontwikkelaar		Developer	F	Fixeer		Fixative
G	Messen Spuiten		Knives Syringes	H	Vast chemisch afval, verontreinigd glaswerk en papier, lege chemicaliën verpakkingen, disposables, gesteriliseerd VMT-materiaal Blauwe 50 liter vaten en zwarte of blauwe 200 liter vaten		Solid chemical waste, contaminated glass and paper, empty packages of chemicals, disposables, sterilised VMT material Blue barrels of 50 liters and black or blue barrels of 200 liter
				I	Dierlijk afval Vaten van 25 of 50 liter		Animal waste Barrels of 25 and 50 liter

Figuur 1: Soorten afvalvaten op de practicumzaal.

Instructies in het geval van een calamiteit

Bij elke calamiteit (groot of klein) de practicumleiding waarschuwen

UvA-alarmlijn: 2222

Bedrijfshulpverleners bouwdeel-F:

- Iwan Stricevic, kamer F2.31, telefoon 7612
- Gert Advokaat, kamer F2.30, telefoon 7649

 UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

WAT TE DOEN BIJ	WHAT TO DO IN CASE OF
	BRAND
	020 - 525 2222
	<p>GEEF INFORMATIE OVER DE BRAND</p> <ul style="list-style-type: none"> - WAAR - WAT - OMVANG
	<p>GIVE INFORMATION ABOUT THE FIRE</p> <ul style="list-style-type: none"> - LOCATION - OBJECTS INVOLVED - EXTENT OF THE FIRE
	<p>WAARSCHUW MENSEN IN DE DIRECTE OMGEVING</p>
	<p>WARN PEOPLE IN THE IMMEDIATE AREA</p>
	<p>SLUIT DEUREN EN RAMEN VERLAAT KALM DE GEVARENZONE</p>
	<p>CLOSE DOORS AND WINDOWS LEAVE THE DANGER AREA CALMLY</p>
	<p>GEBRUIK GEEN LIFTEN</p>
	<p>DO NOT USE ELEVATORS</p>
	<p>GA NAAR DE VERZAMELPLAATS</p>
	<p>GO TO THE ASSEMBLY POINT</p>

	ONGEVALLLEN	INJURY
	020 - 525 2222	
	<p>GEEF INFORMATIE OVER</p> <ul style="list-style-type: none"> - LOCATIE - TOESTAND SLACHTOFFER - UW NAAM - EHBO EN/OF AMBULANCE GEWENST 	<p>GIVE INFORMATION ABOUT</p> <ul style="list-style-type: none"> - LOCATION - CONDITION VICTIM - YOUR NAME - FIRST AID AND/OR AMBULANCE NECESSARY

Laat calamiteiten zoveel mogelijk afhandelen door de EHBO-/BHV-ers. Als er direct hulp nodig is, dan zijn dit de vuistregels:

Brandwonden:

- Indien nodig bel UvA-alarmlijn: 2222
- Minimaal 10 minuten koelen met lauw water. Verbrande kleding niet verwijderen.
- Brandende kleding:
 - o Slachtoffer onder de branddouche (in de gang te vinden), daarna het slachtoffer warm houden om een shock te voorkomen.
- Of:
 - o Branddeken omslaan (van hoofd naar voeten) en gaan liggen of over de grond rollen. Niet gaan lopen, de deken werkt dan als een schoorsteen.

Bijtende stoffen:

- Indien nodig bel UvA-alarmlijn: 2222
- In het oog:
 - o Minstens 10 minuten spoelen met oogdouche (bij kranen te vinden).
- Op de huid:
 - o Loog of zuur: Verontreinigde kleding uittrekken. Spoelen met veel water. Bij pijn of blaren advies UvA-alarmlijn volgen.

Verwonding door glas:

- Indien nodig bel UvA-alarmlijn: 2222
- Wond goed spoelen met water .
- Glas laten zitten.

ONTRUIMING GEBOUW F

JE WORDT GEWAARSCHUWD DOOR SLOW--WHOOOP en/of ONTRUIMINGSTEKST

- Gebruik géén telefoon.
- Verlaat de ruimte.
- Waarschuw anderen in uw omgeving (ook in de toiletten, bijruimten etc.).
- Verlaat de verdieping zo snel mogelijk via de dichtstbijzijnde brandtrap.
- Gebruik géén lift.
- Help anderen die moeilijk ter been zijn.
- Volg de aanwijzingen op van BHV-ers en/of ontruimers.
- Ga naar de aangegeven verzamelplaats.
 - o Verzamelplaats is bij bord 'verzamelplaats' voor het gebouw van het universitair sportcentrum (USC).
- Meld je aanwezigheid bij de je practicumassistent.
- Wacht met naar huis of terug naar de afdeling gaan totdat je hiervoor toestemming wordt gegeven.

Tips en Tricks voor het practicum

- Dit practicum is één doorlopend experiment, waarbij elk onderdeel even belangrijk is om na acht weken een goed eindresultaat te boeken. Hou je lopend labjournaal dus goed bij!
- Lees nogmaals de handleiding door, zodat je weet waar het experiment over gaat en wat er die dag moet gebeuren. Denk goed na over de verschillende stappen in het protocol. Stel jezelf vragen als: Waarvoor dient deze stap of deze stof? Of waarom incuberen we bij een bepaalde temperatuur? Dit helpt je om het experiment beter te begrijpen en de handleiding niet als 'kookboek' te gebruiken.
- Gebruik je tijd efficiënt. Er zullen hier en daar wachttijden tussen de experimenten zijn. Deze tijd kan goed worden gebruikt voor het bijhouden van je labjournaal, het maken van opdrachten en beantwoorden van vragen, het nogmaals lezen van de handleiding of het doorspreken van het experiment met elkaar en de practicumassistent.
- Houd enzymen **altijd** koud om inactivatie te voorkomen (enzymen zijn duur) en voeg het enzym als laatste toe.
- Maak altijd een pipetteerschema en merk je epjes en platen goed en noteer het in je labjournaal. 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.

-----Have Fun-----

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. Veder ga je kennis en vaardigheden die je bij Methoden van Onderzoek en Statistiek en bij Academische Basisvaardigheden hebt geleerd toepassen.

Verwachtingen

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 practicumregels).

Academische houding

Tijdens dit practicum ga je je academische houding verder ontwikkelen en je wordt hierop ook beoordeeld (zie beoordelingsmodel). Onder een academische houding wordt verstaan dat je je actief inzet (interesse toont, vragen stelt) en je je goed voorbereidt (op BlackBoard staat een hoe je je voorbereidt).



Onder een academische houding valt ook kritisch denken. De assistenten en docenten stimuleren het kritisch denken door je vragen te stellen over experimenten en concepten en door jullie zelf vragen te laten stellen. Verder wordt het kritisch denken bevordert door het geven van feedback, door met je te discussiëren over wetenschappelijke experimenten, waarin we verwachten dat je standpunten kunt innemen en deze met overtuigende argumenten kunt onderbouwen en kritiek kunt weerleggen. Daarnaast werk je aan de belangrijke academische vaardigheid reflecteren doordat je ieder dagdeel een post-lab reflectie schrijft (zie het labjournaal). Tot slot stimuleren we de academische houding door jullie te laten werken in duo's. We verwachten dat je het werken in duo's gebruikt om van elkaar te leren en feedback te geven. Voor meer informatie over de academische houding zie Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basis Vaardigheden (HWV ABV).

Bijhouden labjournaal

Je houdt van het hele practicum een labjournaal bij waarop je op meerdere keren feedback ontvangt van de practicumassistent. Daarnaast beoordeel je zelf ook je labjournaal aan de hand van het labjournaalfeedback formulier (zie formulier verderop in de handleiding). Dit helpt je om kritisch naar je eigen labjournaal te kijken en te controleren of alles erin staat. Daarnaast kun je aan de hand van je

labjournaal aan je assistent laten zien hoe het met de verschillende vaardigheden (zie beoordelingsmodel) staat en hoe je je ontwikkelt. Dit wordt meegenomen in je beoordeling, dus hoe beter je labjournaal, hoe beter de assistent in staat is om inzicht te krijgen in je vaardigheden en vooruitgang.

Wat mag je van de practicumassistenten verwachten?

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. Verder stimuleert de practicumassistent een actieve werkhouding.

Het labjournaal

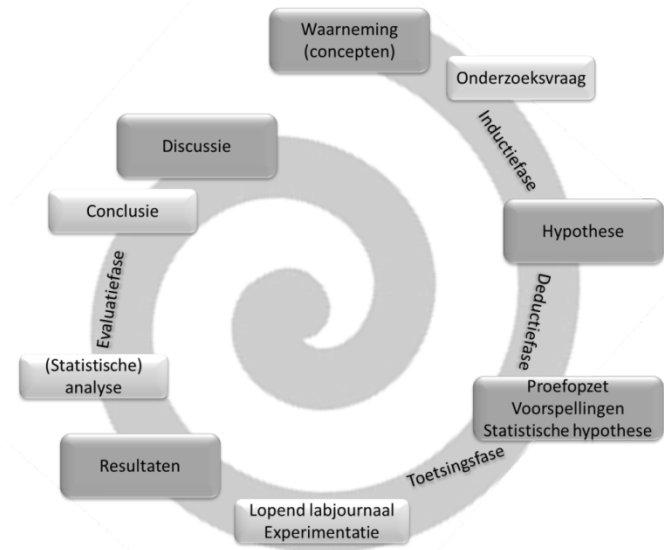
Er zijn verschillende soorten wetenschappelijke verslaglegging met eigen kenmerken en voorwaarden waaronder het labjournaal. De verslaglegging heeft bijna altijd een informatieve en/of communicatieve functie waarbij onderzoekers aan zichzelf, vakgenoten of de maatschappij laten zien welk onderzoek ze 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. Voor jullie begint een goede verslaglegging met het nauwkeurig bijhouden van het labjournaal. Hoe je een labjournaal precies moet bijhouden wordt hieronder uitgelegd.

Labjournaal Principe 1: Schrijf ALLES op dat relevant is

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 bijhouden van het labjournaal een must.

Opbouw en uitwerken empirische cyclus in het labjournaal:

In het tweede semester sturen we nog meer aan op het student gestuurd. Dit betekent dat we van jullie steeds meer eigen verantwoordelijkheid en zelfstandigheid verwachten en dit gaan jullie ook toepassen gebruiken op het bijhouden van je labjournaal. Dus elk experiment moeten jullie de empirische cyclus vrijwel volledig uitwerken en we stellen geen sturende vragen meer over het uitwerken van de resultaten en discussie. We gaan ervan uit dat jullie dit standaard doen! Om jullie geheugen op te frissen staan hieronder de vaste onderdelen van het labjournaal uitgewerkt.



Figuur 2: Empirische cyclus. Dit is de volledige empirische cyclus aangepast voor het labjournaal. Alle onderdelen op dit plaatje moeten per experiment in je labjournaal terug te vinden zijn. Zoals je ziet lijkt dit figuur meer op een spiraal dan een cirkel om aan te geven dat de empirische cyclus geen gesloten cirkel is, maar een continue proces dat altijd verder gaat.

Vaste onderdelen in het labjournaal:

Elk experiment bestaat uit een aantal vaste onderdelen die je in je labjournaal noteert (Figuur 2). De concepten, vraagstelling, hypothese en proefopzet moet je **vóór aanvang** van het experiment thuis voorbereiden. Het lopend labjournaal houdt je bij tijdens het practicum. De resultaten, conclusie en discussie 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. De post-lab reflecties schrijf je altijd thuis na afloop van ieder dagdeel. 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. Start iedere voorbereiding met het identificeren van de wetenschappelijke concepten en/of technieken die dit practicum onderdeel worden behandeld. 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.

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 HWV ABV).

Wat is de hypothese van dit experiment?

Kennis verwerven gaat door middel van het onderzoeken van hypothesen. De meeste hypothesen staan niet op zichzelf, maar horen thuis in een bepaalde theorie en worden geformuleerd op een algemeen niveau. Deze algemene hypothesen zijn meestal niet direct toetsbaar. Voor het practicum is het daarom van belang om een onderzoekshypothese te formuleren die specifiek is en onderzoekbare consequenties bevat. Maak bij het formuleren van de onderzoekshypothese ook gebruik van je kennis over de wetenschappelijke concepten van het experiment en leg kort uit hoe je tot deze hypothese bent gekomen. Elke hypothese kan worden opgeschreven in een paar zinnen en geeft antwoord op de onderzoeksvraag (zie ook HWV ABV).

Deductiefase

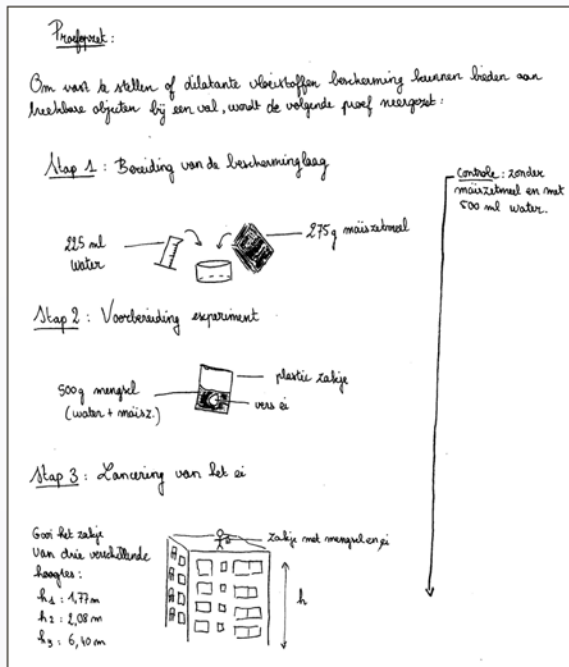
Tijdens de deductiefase maak je concreet wat onderzocht gaat worden in meetbare grootheden en welke resultaten uit het onderzoek worden verwacht (voorspellingen). Je maakt duidelijk wat je wilt en hoe je dat gaat bereiken. Dit doe je door een proefopzet te maken. Een onderdeel van een goede proefopzet is het selecteren van de juiste statistische toetsen waarmee je kunt bepalen of je resultaten significant zijn. De voorspellingen geven weer wat geobserveerd gaat worden als de theorie juist is. Op deze manier wordt de theorie getoetst op overeenkomsten met de werkelijkheid. (zie ook Handleiding Wetenschappelijke Verslaglegging Academische Basisvaardigheden Hoofdstuk 2 paragraaf 2.4: De deductiefase).

Proefopzet

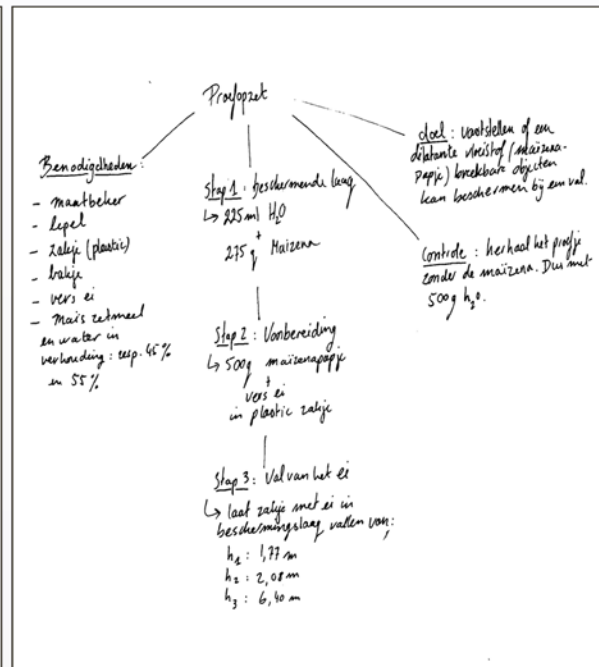
De proefopzet beschrijft kort waarom het experiment wordt gedaan (het doel van het experiment in één zin) en bevat een globaal overzicht van de benodigdheden en de belangrijkste stappen van het experiment inclusief de controles. Een proefopzet kan beeldend in een schema of tekstueel in een stroomdiagram worden weergegeven (zie onderstaande tekst box). Het één is niet beter dan het ander. Bepaal zelf wat jij het prettigste vindt werken en dit kan per experiment verschillen.

Proefopzet

a. Schema



b. Stroomdiagram



Opmerking: Dit zijn voorbeelden van een proefopzet uit een ander vakgebied, de focus ligt niet op de inhoud maar op de weergave van een proefopzet. Zowel in het schema als in het stroomdiagram zijn de verschillende onderdelen van een proefopzet terug te vinden: het doel van het experiment, de benodigheden, de stappen van het experiment en de controles.

Statistische hypothesen:

Zoals eerder beschreven is het selecteren van de juiste statistische toets onderdeel van een goede proefopzet. Je moet voordat je een experiment gaat uitvoeren al bedenken welke statistische toets je nodig hebt om te kunnen aantonen of je resultaten significant zijn. Als je de juiste toets hebt gekozen ga je verder met formuleren van statistische hypothesen (nul- en alternatieve hypothesen), waarbij de nulhypothese (H₀) voorlopig veronderstelt dat er geen effect is. Met de resultaten van je experiment ga je vervolgens na of deze veronderstelling blijft bestaan.

Op basis van het gevonden resultaat kun je de nulhypothese aannemen of verwerpen en in het geval dat je de hypothese verworpt bepalen met welke alternatieve hypothese de gevonden resultaten het meest overeen komen.

Voorspellingen:

Daarnaast ga je voorspellingen formuleren die na afloop van het experiment wel of niet zijn uitgekomen. De voorspellingen zijn de mogelijke uitkomsten van het experiment en helpen bij de evaluatie van de resultaten en de terugkoppeling naar de onderzoekshypothese. Formuleer voorspellingen zo dat ze direct antwoord geven op de onderzoeksvraag en dat ze als

vergelijkingsmateriaal gebruikt kunnen worden in de toetsingsfase. Uiteindelijk is het de bedoeling dat er kan worden nagegaan of de resultaten van het experiment overeenkomen met de voorspellingen. Voorspellingen moeten daarom concreet en toetsbaar zijn.

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 gebruikte materialen en procedures zodat het experiment kan worden herhaald op precies dezelfde wijze als je het uitgevoerd hebt.

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

- **WEES BONDIG!**
- Noteer altijd datum en tijd van een activiteit. Noteer wat je in werkelijk hebt gedaan. Dus niet – incubeer tussen de 2 en 12 uur. Dat is wat in het protocol staat, maar – incubatietijd 16.00 tot 17.00 – of - incubatietijd 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 of tabel 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

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 tabellen, foto's en/of grafieken). Label deze duidelijk (Tabel 1, Figuur 2 etc.) en geef 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 HWV ABV).

Conclusie en Discussie

Elk experiment wordt afgesloten met een discussie (zie HWV ABV). 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 één 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

Post-lab reflecties

Voor academici is reflecteren een belangrijke vaardigheid. Reflecteren betekent dat je op een systematische wijze de manier waarop je functioneert bekijkt. Voor jou als aankomend academicus is dit belangrijk omdat jouw handelen van invloed is op de kwaliteit van je werk, en daardoor op het eindproduct van wetenschap: 'wetenschappelijke kennis'. Om wetenschappelijke kennis zo hoogwaardig mogelijk te



maken is het dus zinvol aandacht te besteden aan alles wat hierin van invloed is: van de kwaliteit van apparatuur in het lab tot jouw persoonlijke bijdrage eraan. Door te reflecteren leer je ook jezelf te ontwikkelen en je gedrag en prestaties te optimaliseren. Het zorgt ervoor dat je de verantwoordelijkheid voor je groei zelf in handen neemt. Reflecteren leer je vooral door het te doen. Daarom willen we dat je na iedere practicumdagdeel een post-lab reflectie in je labjournaal schrijft waarbij je voornamelijk kijkt naar de manier waarop je beroepsmatig functioneert (wat is het effect van je handelen,). Probeer eerlijk naar jezelf te kijken en niet te oordelen. Het doel is groeien, niet om al perfect te zijn. Vertrek steeds vanuit een concrete situatie en concreet gedrag. Om je post-lab reflectie te schrijven mag je gebruik maken van de volgende vragen:

- Wat ging er goed en waarom?
- Wat kan er beter en waarom?
- Wat ga je doen om het goede te behouden?
- Wat ga je doen om de verbeterpunten aan te pakken?

Tip: Neem in je reflectie ook feedback van andere mee. Het maakt je reflectie rijker en completer.

Let op!: Fouten die je hebt gemaakt tijdens het natlab werk die je resultaten beïnvloeden schrijf je in je discussie en NIET in de post-lab reflecties.

Overige zaken labjournaal

- Schrijf in je labjournaal altijd met pen, met uitzondering van tekeningen (met potlood).
- Gebruik de juiste opmaak voor tabellen, grafieken, figuren en tekeningen (zie ook HWV ABV)..

- 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 HWV ABV).
- Uitleg of vragen en antwoorden van jezelf en collega's schrijf je ook op in je labjournaal. Dit doe je door het zogenaamde inkaderen. Trek een horizontale streep, noteer de extra informatie en sluit weer af met een horizontale streep. Zo is dit duidelijk te onderscheiden van je lopende logboek.

Labjournaalbeoordelingsformulier en -feedbackformulier

Ge-wicht	Onderdeel	Beginnend	In ontwikkeling	Voldoende	Uitmuntend
Vorbereiding					
3x	Formele structuur	- De inhoudsopgave komt niet overeen met de experimenten. - Experimenten beginnen niet op een nieuwe pagina en staan door elkaar beschreven. - Het labjournaal ziet er slordig uit. - Kopjes met onderdelen empirische cyclus ontbreken. - Datum en titel van experimenten ontbreken.	- De inhoudsopgave komt matig overeen met de experimenten. - Sommige experimenten beginnen op een nieuwe pagina. - Het labjournaal ziet er verzorgd uit. - Kopjes met onderdelen empirische cyclus zijn soms aanwezig. - Datum is aanwezig, maar de titel sluit niet aan bij inhoud.	- De inhoudsopgave komt overeen met de experimenten. - Elk experiment begint op een nieuwe bladzijde, maar de dagdelen van een experiment staan niet aansluitend achter elkaar. - Kopjes met onderdelen empirische cyclus zijn altijd aanwezig. - Datum is aanwezig en titel sluit aan bij inhoud.	... en de dagdelen van een experiment staan aansluitend achter elkaar in het labjournaal. ... en de titel bevat alle sleutelwoorden.
1x	Onderzoeksvraag	- De onderzoeksvraag ontbreekt of volgt niet uit de wetenschappelijke context (concepten). - De onderzoeksvraag is slecht geformuleerd.	- De onderzoeksvraag volgt uit de wetenschappelijke context (concepten). - De onderzoeksvraag is wollig geformuleerd en/of bevat te veel detail.	... en het onderzochte organisme en de bijbehorende condities worden genoemd. - De onderzoeksvraag is bondig geformuleerd.	... en de onderzoeksvraag is helder en formeel geformuleerd (optioneel: uitdagend en origineel).
2x	Onderzoekshypothese	- De onderzoekshypothese ontbreekt of geeft geen antwoord op de onderzoeksvraag.	- De onderzoekshypothese beantwoordt de onderzoeksvraag, maar kan niet met het experiment getoetst worden. - De onderzoekshypothese is wollig geformuleerd en/of bevatten te veel detail.	- De onderzoekshypothese geeft antwoord op de onderzoeksvraag en kan met het experiment getoetst worden. - De onderzoekshypothese is kort en bondig geformuleerd.	... en is helder en formeel geformuleerd.
4x	Proefopzet	- De proefopzet ontbreekt.	- De proefopzet bevat een overzicht van het experiment door verschillende stappen te noemen, maar gaat te veel in op details van het protocol.	- De proefopzet bevat een globaal overzicht met belangrijkste stappen en beschrijft het doel van het experiment.	- ... en geeft een kort overzicht van de belangrijkste benodigdheden en beschrijft de controles.
3x	Statistische analyse	- De H_0 en H_a ontbreken en statistische berekeningen zijn niet terug te vinden.	- De H_0 en H_a sluiten aan op andere variabelen dan die van het uitgevoerde experiment.	- De H_0 en H_a sluiten aan op de juiste variabelen. De H_0 verondersteld dat er geen effect is.	... en er worden meerdere H_a 's geformuleerd.
2x	Voorspellingen	- De voorspellingen ontbreken.	- De voorspellingen sluiten niet aan bij de hypothese.	- De voorspellingen sluiten aan bij de hypothese.	... en zijn (statistisch) toetsbaar.

Uitvoering lopend labjournaal					
3x	Materialen en Methode Lijst onderdelen (markeer):	-Geen onderdelen	-1-4 onderdelen zijn gemarkeerd op de lijst.	-5-7 onderdelen zijn gemarkeerd op de lijst.	-Alle onderdelen zijn gemarkeerd op de lijst.
		- labels - duur/tijd/datum activiteit - pipetteerschema's - recepten van oplossingen die je zelf maakt		- correcte berekeningen - aanpassingen op het protocol - hoeveelheden/concentraties/pH/volumes - fouten die zijn opgetreden	
3x	Lopend logboek	-Het logboek ontbreekt of is overgeschreven of gekopieerd van het protocol uit de handleiding.	-Het logboek is wollig geformuleerd of bevat te veel detail.	-Het logboek is kort en bondig geformuleerd.	-Het logboek is kort en bondig geformuleerd én de beschreven methode geeft voldoende details om het experiment in combinatie met het protocol te kunnen herhalen.
Uitwerking					
4x	Resultaten	-Waarnemingen of data ontbreken.	-De data zijn in figuren, tabellen, foto's of tekeningen weergegeven volgens ABV richtlijnen, maar er worden interpretaties gegeven en conclusies getrokken.	De data zijn in figuren, tabellen, foto's of tekeningen weergegeven volgens ABV richtlijnen en de bevindingen worden beschreven.	--en de resultaten worden in logische volgorde, duidelijk en bondig beschreven.
1x	Conclusie	-De conclusie ontbreekt of beantwoordt onderzoeksvraag niet.	-De conclusie beantwoordt de onderzoeksvraag.	... en herhaalt de belangrijkste bevindingen.	... en is bondig, helder en formeel geformuleerd.
4x	Discussie	-De discussie ontbreekt of is ongestructureerde opsomming van ideeën.	-De discussie begint met terugkoppeling van resultaten naar het doel van het experiment.	... en geeft interpretaties voor de (onverwachte) resultaten.	... en bevat oplossingen voor problemen en suggesties voor vervolgonderzoek.

Werken met een Gilson Pipetman® Micropipet

De micropipet is een precisie-instrument ontworpen om kleine hoeveelheden vloeistof te kunnen meten en verplaatsen. Tijdens het practicum maken we gebruik van een zogenaamde air displacement micropipet (Figuur 3). Deze pipetten zijn ontworpen door Warren Gilson en Henry Lardy op de universiteit van Wisconsin (Madison, Verenigde Staten) in 1972. De meeste micropipetten zijn vervaardigd uit verschillende soorten kunststof en moeten worden voorzien van een afneembare wegwerp pipetpunt. Deze punten zijn gemaakt van materiaal dat waterafstotend is, zodat de pipet de juiste volumina blijft opnemen en er geen vloeistof in de punt blijft zitten. Micropipetten zijn in te stellen op verschillende volumes op microliterschaal. Een microliter is een duizendste milliliter ($1\mu\text{l} = 0.001\text{ml}$). Veel voorkomende pipetten zijn de P10, P20, P200 en P1000 met verschillende minimum- en maximum volumewaardes van 1-10 μl ; 20-50 μl ; 50-200 μl en 100-1000 μl respectievelijk (zie tabel 2). Voor de verschillende micropipetten zijn verschillende maten pipetpunten. De werking van de air displacement micropipet is gebaseerd op de luchtdicht afsluitende cilindrische zuiger die zich in de pipet bevindt. Deze zuiger kan worden ingesteld op een bepaalde hoeveelheid vloeistof die dan moet worden opgezogen. Vervolgens wordt er een hoeveelheid lucht die exact zo groot is als de gewenste hoeveelheid op te zuigen vloeistof, uit de pipet geblazen. Door de knop langzaam los te laten, gaat de pipet weer naar zijn originele positie. Hierdoor ontstaat een gedeeltelijk vacuüm, waardoor exact dezelfde hoeveelheid vloeistof de pipet binnengezogen wordt. Door de knop vervolgens weer volledig in te drukken, leegt de air displacement micropipet zich weer.



Figuur 3:
Gilson
Pipetman®
Micropipet.

Tabel 2: Verschillende micropipetten met volumebereik en kleur bijbehorend pipetpunt

Micropipet	Volumebereik	Kleur van pipetpunt
P10	1 - 10 μl	Wit
P20	2 - 20 μl	Geel
P200	20 - 200 μl of 50 - 200 μl	Geel
P1000	200 - 1000 μl	Blauw

Pipette maker is piqued*Founding company accuses partner of bending the rules***By Ryan J. Foley****May 24th 2005**

MADISON, Wis. – A federal trial is scheduled next week involving major makers of scientific equipment, the University of Wisconsin and an entrepreneur, all over who can profit from a device most people know from high school chemistry.

At stake is millions of dollars in U.S. sales of the adjustable pipette, the syringe-like instrument that researchers worldwide use to measure and transfer liquids from one container to another. Inventor Warren Gilson created the instrument in 1972, and since then his company, Gilson Inc., has had an agreement allowing Rainin Instrument of Woburn, Mass., to exclusively buy and sell it in the United States. For 30 years, the two companies have teamed up to supply laboratories worldwide with the devices, which allow researchers to take in and discharge precise amounts of liquids into a tube at the push of a button. But Gilson claims that Rainin has waged a campaign to disparage Gilson's Pipetman products and route customers to its own line of competing products introduced after Gilson's 1974 patent expired in 1991. Gilson blames Rainin for a significant drop in sales of pipettes to U.S. customers. Gilson seeks to break the sales contract with Rainin and recoup more than \$8 million in lost profits and royalties. The lawsuit also names Rainin's parent company, Mettler-Toledo of Ohio, alleging that the lab instrument company warned investors, in a February filing with the Securities and Exchange Commission, that losing the agreement would cost it \$19.9 million. The downturn in sales also means less money for research at the University of Wisconsin, which gets \$4.25 in royalties on every Gilson pipette sold, thanks to a gift from Warren Gilson, who died in 2002. Even in a year with slow sales, that can bring the university more than \$200,000. Trial is scheduled for May 31 at the U.S. District Court for the Western District of Wisconsin in Madison.

Gilson's 1972 invention made the pipettes adjustable, allowing one tool to be used for many different sizes of measurements, instead of having to use dozens of them. "It made the researchers' life easier because it took a task that had been drudgery and it made it fast and easy and reliable," said Robert Gilson, chairman and president of Gilson and son of the inventor. The younger Gilson himself had a role in the invention, designing the instrument so it could be hand-held. The invention cut three-quarters of the time that scientists spent measuring and transferring liquids, said Henry Lardy, professor emeritus of biochemistry at UW-Madison. "With the Gilson pipette, you could just hit that button and you got the right amount, clicked the button again and it discharged the volume that you had," said Lardy, who was among the first users of the invention. "It was much, much faster." Warren Gilson was a University of Wisconsin professor before he started Gilson Inc. in suburban Madison in the early 1950s. In an unpublished article included in court records he wrote that he signed a contract in 1972 allowing business partner Ken Rainin to exclusively distribute his pipettes because "his sales and business ability are remarkable." Gilson wrote that he conceived the idea of the Pipetman "in about ten milliseconds" by combining a technological device his company used to measure air and the device scientists used at the time to measure liquid. The instrument is one of the icons of molecular biology, said Tom Zinnen, an outreach specialist at the University of Wisconsin Biotechnology Center. "There's very few instruments that you can find that are more ubiquitous," he said. "They are like the Swiss Army knife (is) for campers."

Bron: aangepast versie van http://www.utsandiego.com/uniontrib/20050524/news_1b24inventio.html

Gebruiksaanwijzingen:

1. Kies de micropipet die correspondeert met het vereiste meetbereik (zie tabel 1).
2. Gebruik de gekartelde moer (instelknop) in het handvat om het gewenste volume in te stellen. Draai de knop naar rechts om het volume te verhogen of naar links om het volume te verlagen.

Let op!: gebruik een micropipet niet voor volumes onder of boven zijn bereik, want dit heeft een negatief effect op de nauwkeurigheid. Bovendien kan een pipet kapot gaan als je de instelknop boven het maximale bereik draait.

3. In het handvat van de micropipet is een leesvenster waarin het ingestelde volume wordt weergegeven door drie verticale nummers (zie tabel 3). Stel de micropipet in door aan de instelknop te draaien totdat het leesvenster de correcte nummers weergeeft. Voorbeelden voor elk van de vier typen micropipetten (P10, P20, P200 en P1000) worden weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: Voorbeelden van leesvensters van de P10, -20, -200 en -1000 micropipetten.

P10 (1-10 μ l)	P20 (2-20 μ l)	P200 (50-200 μ l)	P1000 (100-1000 μ l)																								
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>0</td><td>10's</td></tr> <tr><td>1</td><td>1's</td></tr> <tr style="border-top: 1px solid red;"><td>5</td><td>0,1's</td></tr> </table> <p style="text-align: center;">1.5 μl</p>	0	10's	1	1's	5	0,1's	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>1</td><td>10's</td></tr> <tr><td>5</td><td>1's</td></tr> <tr style="border-top: 1px solid red;"><td>0</td><td>0,1's</td></tr> </table> <p style="text-align: center;">15 μl</p>	1	10's	5	1's	0	0,1's	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>1</td><td>100's</td></tr> <tr><td>5</td><td>10's</td></tr> <tr><td>0</td><td>1's</td></tr> </table> <p style="text-align: center;">150 μl</p>	1	100's	5	10's	0	1's	<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr><td>0</td><td>1000's</td></tr> <tr><td>2</td><td>100's</td></tr> <tr><td>0</td><td>10's</td></tr> </table> <p style="text-align: center;">200 μl</p>	0	1000's	2	100's	0	10's
0	10's																										
1	1's																										
5	0,1's																										
1	10's																										
5	1's																										
0	0,1's																										
1	100's																										
5	10's																										
0	1's																										
0	1000's																										
2	100's																										
0	10's																										

4. Selecteer de juiste pipetpunt (zie tabel1) en plaats deze stevig op de neus van de micropipet door deze lichtjes aan te schroeven.

Let op!: Gebruik de micropipet nooit zonder pipetpunt. Als je steriel werkt, zorg je dat de pipetpunt geen contact maakt met objecten, handen en dergelijke.

5. De zuiger van de micropipet kan, wanneer ingedrukt, bij twee verschillende posities stoppen. De eerste stop (het punt van de eerste weerstand) is het niveau dat resulteert in de gewenste hoeveelheid vloeistof dat wordt overgebracht. De tweede stop wordt gebruikt om de pipetpunt helemaal leeg te maken van overgebleven vloeistof. Deze stop wordt niet ingedrukt bij het laden van het vloeistof in de micropipet. Oefen, voor je verder gaat, het indrukken van de zuiger om beide stops van elkaar te kunnen onderscheiden.
6. Druk de zuiger in tot aan de eerste stop.
7. Houd de micropipet verticaal en dompel de pipetpunt tot een diepte van 3-5 mm in de vloeistof.
8. Laat voorzichtig en langzaam de zuiger op een gecontroleerde wijze het geselecteerde volume vloeistof opzuigen. Zorg bij het pipetteren van een viskeuze oplossing dat het eindvolume is

opgezogen voor de punt uit de oplossing gehaald wordt. Dit voorkomt luchtballen in de pipetpunt die het te pipetteren volume negatief beïnvloeden.

Let op!: Houd tijdens gebruik de micropipet constant in de verticale positie en leg een geladen micropipet nooit op tafel neer.

9. Steek de gevulde pipetpunt vervolgens in het gewenste reactievaatje en druk vervolgens de zuiger in tot de tweede weerstand stop. Houd de zuiger ingedrukt en haal de micropipet eruit. Dit voorkomt dat vloeistof terug de punt in wordt gezogen.
10. Verwijder de gebruikte pipetpunt in een afval bakje door de pipetpunt-ejector in te drukken.

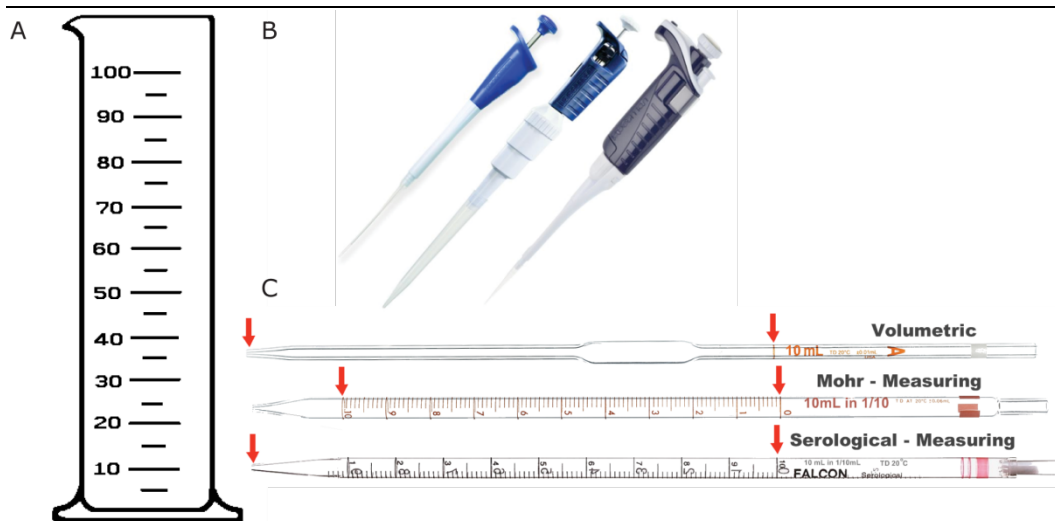
Werken met de zuurkast

Een zuurkast is een speciale werkruimte en is voorzien van een constante zuiging om blootstelling aan gevaarlijke stoffen tot een minimum te beperken. Voor veilig gebruik van de zuurkast hanteren we de volgende regels:

- Controleer visueel de werking van de zuurkast d.m.v. een strookje papier aan het raam aan de achterzijde van de zuurkast.
- Houd het raam zoveel mogelijk gesloten. De veilige werkopening staat op de zijkant van de kast aangegeven met een groene pijl
- Zet de zuurkast niet te vol. Een goede luchtstroom over het werkblad is essentieel voor de afvoer van gassen en dampen
- Gebruik de zuurkast niet als opslagplaats voor gevaarlijke stoffen. Gebruik hiervoor de veiligheidskasten
- Laat bij werkzaamheden in de zuurkast altijd de eerste 15-20 cm van het werkblad vrij
- Houd je hoofd buiten de kast!
- Maak geen heftige bewegingen voor en in de kast
- Houd de kast schoon, ruim gemorste stoffen direct op
- Gebruik extra persoonlijke beschermingsmiddelen zoals veiligheidsbril, handschoenen

Werken met vloeistoffen

Voor het werken met vloeistoffen zijn verschillende hulpmiddelen beschikbaar (zie figuur 4). Welk hulpmiddel het beste geschikt is hangt af van de mate van precisie en de stof waarmee gewerkt moet worden. 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 4: Verschillende hulpmiddelen voor het werken met vloeistoffen. 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. Je moet dan wel een Gilson pipet kiezen die het beste past bij het benodigde volume. 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 je wel rekening houden met de dichtheid van de vloeistof en de temperatuur waarbij de vloeistof wordt afgewogen, 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 .

Ook bij het werken met vloeistoffen is veiligheid van belang. Werk in de zuurkast met geconcentreerde zuren en vluchtige vloeistoffen (blootstelling bij inademen). Zeer verdunde waterige oplossingen kunnen daarentegen op de labtafel worden gebruikt (geen blootstelling bij inademen).

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 glippen of vallen, indien een zwakke hals afbreekt

Werken met een lichtmicroscop

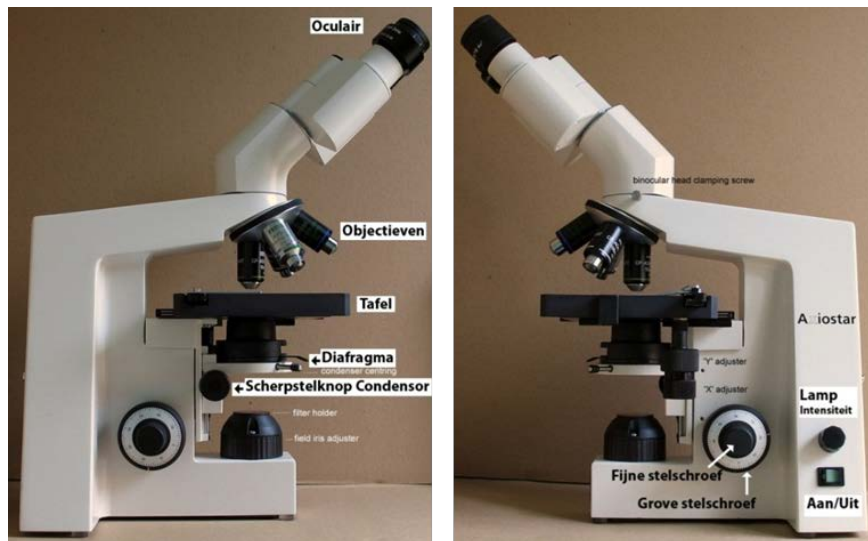
Veel interessante onderdelen van biologische systemen zijn te klein om met het blote oog te zien en kunnen alleen met een microscoop bekeken worden. Alle microscopen bestaan uit een gecoördineerd systeem van aaneengeschakelde lenzen, zodat de kijker een beeld van een organisme vergroot kan zien, vaak 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 Lichtmicroscop

Het correcte gebruik van een lichtmicroscop is één van de meest elementaire en essentiële laboratorium-vaardigheden. Een standaard binoculaire lichtmicroscop heeft drie belangrijke optische onderdelen: oculair, objectief en condensor. Deze zitten vast aan een staander op een platform (zie figuur 5). 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 zover 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 microscop tafel, zodanig dat er licht valt op het onderdeel van het preparaat dat je wilt bekijken
5. Focuseer 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 focuseer 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 4). 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 over 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 focussen 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*
8. 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

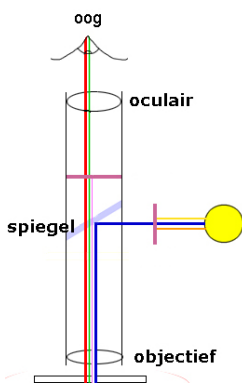


Figuur 5: Overzicht van een lichtmicroscoop (Foto: Ian Walker, www.micscape.org).

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).

Werken met microbiologische culturen

Een micro-organisme of microbe is een organisme dat uitsluitend waar te nemen is met een microscoop, want het is te klein om met het blote oog te zien. Hieronder vallen alle eencelligen zoals bacteriën, protozoa, eencellige algen en schimmels (waaronder de gisten). Het 'kweekje' van een micro-organisme wordt ook cultuur genoemd.

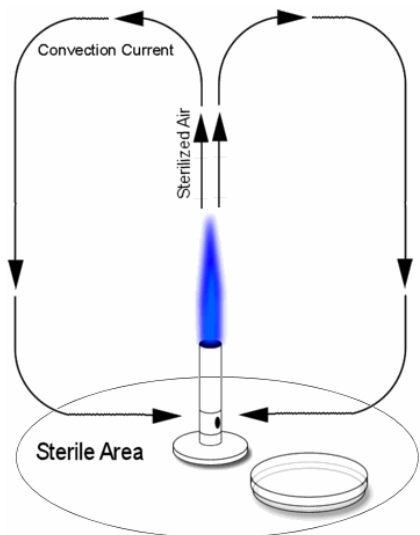
Steriel werken

Steriel werken (aseptische techniek) verwijst naar een procedure die wordt uitgevoerd onder steriele omstandigheden. Deze procedure wordt in principe gebruikt voor alle micro-organismen, ook al is het bekend dat het organisme waar je mee werkt niet gevaarlijk is. Steriel werken vormt een belangrijk onderdeel van veiligheidsprocedures die altijd in acht moeten worden genomen tijdens het werken met micro-organismen op de practicumzaal (zie bioveiligheid en de principes van Veilige Microbiologische Technieken). Steriel werken heeft twee hoofddoelen:

Het beschermen van de onderzoeker (en je medestudent).

Het beschermen van het experiment door het voorkomen van contaminatie van je labculturen door micro-organismen van buitenaf, zoals die van je huid, kleren of de omgeving.

Andere redenen om voorzichtig en zorgvuldig te werken tijdens experimenten met microbiologische culturen zijn bijvoorbeeld: de mogelijkheid dat gevaarlijke micro-organismen in je normaliter ongevaarlijke cultuur terecht komen; verschillen tussen individuen voor de kans op infecties en ernst van ziektes. Hierbij speelt ook mee dat het aantal cellen in je labculturen vaak veel groter is dan onder natuurlijke omstandigheden. Hoe meer cellen, hoe groter het risico. Tenslotte kan een micro-organisme andere eigenschappen krijgen, bijvoorbeeld door genuitwisseling of mutaties.



Figuur 6: Steriele werkrimte: met de bunsenbrander kun je een steriele werkrimte creëren waarbij in een straal van 30cm rond de brander convectiestroom omhoog is en het risico op airborne contaminatie van steriel materiaal gering is.

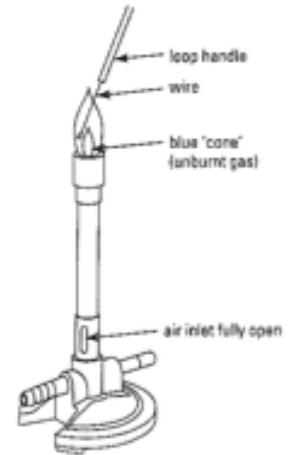
Sterilisatie Procedures

Er zijn diverse methoden om micro-organismen te doden. Tijdens het practicum maak je gebruik van de meest gangbare waaronder vlamsterilisatie en autoclaveren.

Vlamsterilisatie

Vlamsterilisatie van metalen voorwerpen

Bij deze vorm van sterilisatie worden metalen voorwerpen, zoals öses (öse = entoog/entnaald met oog), tot roodgloeiend verwarmd in de vlam van een Bunsenbrander (genoemd naar de Duitse natuurkundige C.K.J. Bunsen (1791-1860), zie figuur 7). Dit is een simpele en effectieve vorm, want geen van de micro-organismen die aanwezig zijn op het metalen voorwerp zal zelfs een korte blootstelling aan een vlam overleven. Na verhitting moet de öse ongeveer 8-10 seconden afkoelen (zonder een ander object te raken), voordat hij klaar is voor gebruik (Figuur 8). Bij het ontsmetten van een gecontamineerde öse met een Bunsenbrander moet de öse niet te snel verwarmd worden om het ontstaan van aerosolen te voorkomen.



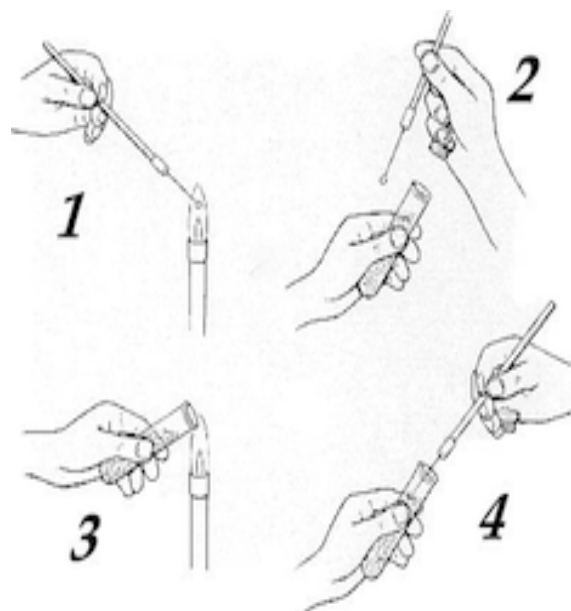
Figuur 7: Overzicht Bunsenbrander

Vlamsterilisatie met ethanol

Vlamsterilisatie waarbij ethanol wordt gebruikt is meer geschikt voor Drigalski-spatels (L-vormige spatel die wordt gebruikt om bacteriën uit te platen). Je steriliseert door de spatel eerst in 96% ethanol te dopen, uit te laten druppen en de resterende ethanol af te vlammen met behulp van een Bunsenbrander. Ook nu is het belangrijk nog even te wachten met gebruik, zonder andere objecten aan te raken. Na gebruik moet de spatel weer gedoopt en gevlamd worden om contaminatie van je werkruimte te voorkomen. Let bij deze techniek op het brandrisico. Laat de ethanol niet ontvlammen door er een hete spatel in te dopen.

Vlamsterilisatie van flessen en erlenmeyers

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 micro-organismen worden zo vernietigd en de lucht die in de opening van de houder verhit wordt, zal een uitwaartse luchtstroom veroorzaken, waardoor micro-organismen geen kans krijgen de houder binnen te dringen. Na deze handeling moet de houder nog een keer afgevlamd 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



Figuur 8: Vlamsterilisatie technieken

geopend en dop/deksel/watje wordt vastgehouden met de pink (Figuur 8). Op deze manier houd je ook vingers vrij voor andere handelingen.

Autoclaveren

Deze methode wordt voornamelijk gebruikt voor het steriliseren van 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.

Kweekmedia

Er zijn verschillende soorten cultuurmedium/voedingsmedium (ook 'substraat' of 'voedingsbodem' genoemd) die afhankelijk van het doel van de kweek en het soort micro-organismen worden gebruikt. De basisbestanddelen zijn altijd: water, aminozuren, suikers en mineralen. Soms worden er groeifactoren (bijvoorbeeld gistextract of serum), selectieve inhibitoren (bijvoorbeeld antibiotica), indicatoren (bijvoorbeeld pH-, redox-) en/of een stollingsagens toegevoegd. Het stollingsagens is meestal agar, een complexe polysacharide afkomstig van rode algen. Agar smelt boven de 95°C en blijft bij afkoeling vloeibaar tot 50°C. Onder de 50°C vormt het een stijve, transparante gel die relatief resistent is tegen degradatie door bacteriën. Op deze manier kunnen media onderscheiden worden naar toepassing (van universele naar selectieve media) en naar vorm (van vloeibare bouillons (in het Engels 'broth' genoemd) naar vaste agarbodems). Het meest gebruikte vloeibare medium voor het kweken van bacteriën is Lysogene Broth (ook Luria Both of Luria-Bertani genoemd (LB)). Het is een rijk medium waarin de bacteriën snel en robuust groeien.

Protocol voor het maken van Lysogene Broth (LB):

- Los op in 1 liter demi H₂O:
 - o 10 gram bacto-tryptone
 - o 5 gram bacto-yeast extract
 - o 10 gram NaCl (in sommige protocollen 5 gram)
- Breng de pH naar 7.0 met 1M NaOH
- Autoclaveer 15-20 minuten op 121°C
- Bewaar bij kamertemperatuur

De Reincultuur

Het kweken van zuivere gist

Het onderzoek naar de rol van gist bij het brouwproces kreeg in 1877, mede door de publicaties van Pasteur, een belangrijke stimulans. De Deense brouwer Jacob Jacobsen, eigenaar van de Carlsbergbrouwerij, stelde toen een grote som geld beschikbaar om aan zijn bedrijf een goed geoutilleerd laboratorium te verbinden. Hoofd van de afdeling onderzoek van het Carlsberglaboratorium, dat zich zou ontwikkelen tot een belangrijk centrum van research op het terrein van de microbiologie, werd twee jaar na de oprichting de botanicus en fysioloog dr. Emil Hansen. Tot zijn dood in 1909 zou hij zich bezig houden met microscopisch onderzoek naar biergist. In navolging van onderzoekers als Pasteur, de Duitser Robert Koch en de Deen C.J. Salomonsen ging Hansen zich nu bezig houden met het kweken van een zuivere gistsoort uit één cel. Hij slaagde er al spoedig in verschillende van deze 'pure', dat wil zeggen niet-verontreinigde soorten, te kweken in daarvoor speciaal vervaardigde glazen kolven.

Hansens grote kans kwam in november 1883. Toen bleek namelijk dat de gist die Jacobsen in 1845 had meegebracht uit München en waarmee sindsdien was voort gekweekt, verontreinigd was geraakt door 'wilde' gistsoorten. Dit leverde troebel bier op met de beruchte bittere smaak. Bij wijze van experiment mocht Hansen nu eenmaal bierbrouwen met de gist die hij in zijn laboratorium had gekweekt. Het resultaat was uitstekend en vanaf dat moment was Jacobsen, die eerst sterk twijfelde of de in het laboratorium gekweekte gist geschikt was voor de nagisting op fust of in de fles, gewonnen voor de 'reincultuur'. Hij was er nu van overtuigd, schreef hij in mei 1884 aan zijn vriend Gabriel Sedlmayer in München, die hij ook een monster 'zuivere gist' zond, 'dass die Hefen in allen Brauereien mehr oder weniger von wilden Hefearten inficiert sind, weil man jetzt fast überall in den gefährlichen Sommermonaten siedete und dass das unendliche Hefewechsels deshalb nichts nutzt.'

Bron: aangepast versie van http://www.techniekinnederland.nl/nl/index.php?title=De_reincultuur

Uitplaten

Je kunt een micro-organisme in vloeibaar LB-medium kweken, maar ze ook uitplaten op een vaste voedingsbodem. Voor het uitplaten kun je gebruik maken van een öse of een Drigalski spatel. Probeer tijdens het uitplaten altijd besmetting te voorkomen door zo dicht mogelijk bij de vlam te werken (zie figuur 6), door geen handelingen te verrichten met voorwerpen of media die niet steriel zijn en door de culturen zo weinig mogelijk bloot te stellen aan de omgeving.

Uitplaten met een öse

Een öse wordt vaak gebruikt om een reincultuur te maken. Een reincultuur is een verzameling van micro-organismen die afstammen van één enkele cel. Reinkweken worden gebruikt om micro-organismen te isoleren en voor het onderhoud van stamculturen. Dit kan worden bereikt door een zogenaamde verdunningsuitstrijk; met een öse wordt de cultuur op zodanige wijze uitgestreken, dat de cultuur steeds verder wordt verdund (zie figuur 8A) met als einddoel het verkrijgen van losse kolonies op de voedingsbodem.

Uitplaten met een Drigalski spatel

Bij deze methode wordt een steriele en afgekoelde Drigalski spatel gebruikt om een vloeibare bacterie houdende cultuur egaal uit te platen over de volledige voedingsbodem (zie figuur 9B).

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.

Overzicht practica

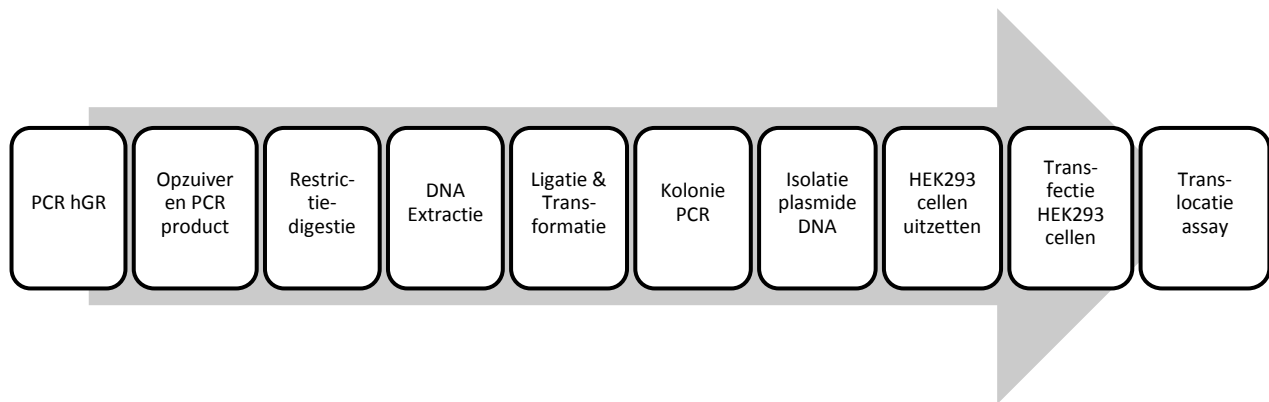
Het practicum bestaat uit tien dagdelen. Elke week heb je minimaal één keer practicum in de practicumzaal met maximaal 125 studenten tegelijk. Jullie werken in duo's en worden ingedeeld in practicumtafels van maximaal 16 studenten onder begeleiding van twee practicumassistenten. Gedurende het hele practicum werk je samen met dezelfde duopartner aan dezelfde tafel met dezelfde assistenten. De practica duren drie-en-een-half uur van 9.00 – 12.30 uur of van 13.30-17.00 uur. Naast de tijd op zaal moet je rekenen op gemiddeld twee uur voorbereiding (zie overzichtsschema voorbereidingen op BlackBoard) en twee uur uitwerken per dagdeel (resultaten analyseren, interpreteren en bediscussiëren en post-lab reflecties schrijven). Alle dagdelen met experimenten staan weergegeven in het onderstaande overzicht. Wanneer je welk experiment doet kun je opzoeken in het rooster op Datanose.

Tabel 1: Overzicht experimentele onderdelen practica per dagdeel

Dagdeel	Wat gaan we doen?	Wat is ons doel?
1	PCR glucocorticoïd receptor	Vermenigvuldigen insert (humane glucocorticoïd receptor (hGR))
2	Opzuiveren PCR product	PCR product geschikt maken voor restrictie-digestie
2	Restrictie-digestie	Compatibele 'stick ends' creëren insert (hGR) en expressieplasmide (pEGFP-C1 dat <i>green-fluorescent protein (GFP)</i> gen bevat)
3	Gelelektroforese en DNA Extractie	Geknipte DNA fragmenten (insert en expressieplasmide) isoleren en opzuiveren uit agarosegel
4	Ligatie	Creëren van fusiegen <i>hGR-GFP</i>
4	Transformatie	Vermenigvuldigen expressieplasmide met <i>hGR-GFP</i> in bacteriën
5	Kolonie PCR	Selecteren koloniën die expressieplasmide met <i>hGR-GFP</i> bevatten
6	Isolatie plasmide DNA (mini-prep)	Isolatie en opzuiveren plasmide DNA
7	HEK293 cellen uitzetten	Voorbereiden transfectie door cellen in juiste dichtheid uit te zetten
8	Transfectie HEK293 cellen	Tot expressie brengen van humane glucocorticoïd receptor green-fluorescent protein (hGR-GFP) fusie-eiwit
9	Translocatie assay	Functie hGR-GFP bestuderen door incubatie met corticosteroiden en/of antagonisten
10	Fluorescentie microscopie	Resultaten bekijken onder fluorescentie microscoop en foto's maken
11	Analyse	Cellen tellen, data analyseren en interpreteren

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 (hGR) 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

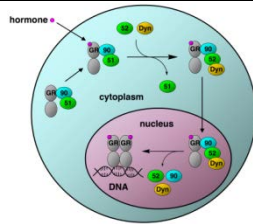
situatie om te gaan. Tenslotte remt cortisol via een feedback mechanisme de cellen in de hypothalamus die de stressrespons veroorzaken zodat de oorspronkelijke stressreactie niet te ver doorschiet en schade kan worden voorkomen.

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 mineralocorticoïden 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 drie verschillende experimentele groepen. De eerst groep gaat de verschillen in affiniteit tussen het humaan specifieke cortisol en rat specifieke cortisterone op de translocatie bestuderen. De groepen 2 en 3 kijken naar het effect van het toevoegen van verschillende antagonistten op de translocatie. Over de resultaten schrijven jullie bij Academische Basis Vaardigheden een onderzoeksverslag.



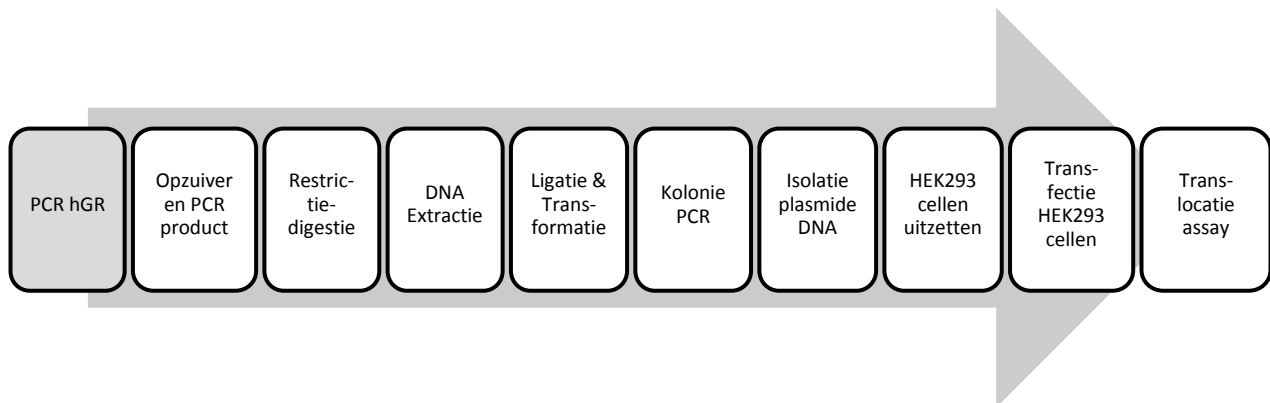
Figuur 6: Schematisch overzicht van het activatiemechanisme van de humane glucocorticoïde receptor (Bron: Wikipedia).

Dagdeel 1: Introductie, Bootcamp en PCR humane glucocorticoïd receptor

Leerdoelen

- Je kunt basale chemisch rekensommen maken.
- Je kunt standaard aseptische technieken correct uitvoeren.
- Je kunt verschillende onderdelen van een lichtmicroscopie benoemen en deze op de juiste manier instellen.
- Je kunt kleine volumes correct pipetteren.
- Je kunt algemene veiligheids- en milieuregels benoemen en je hieraan houden.
- Je kunt de specifieke veiligheids- en milieuregels voor het werken met Genetisch Gemodificeerde Organismen beschrijven en je hieraan houden.
- Je kunt de theoretische achtergronden van de PCR en (sub)kloneren beschrijven.
- Je kunt de PCR correct uitvoeren.
- Je kunt het juiste open leesraam van een gen bepalen.
- Je kunt uitleggen waar een goede primer aan moet voldoen.

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vandaag ga je de eerst stap van het grote Celbiologie experiment inzetten. Het doel van dit experiment is om een plasmide waarin het coderende gedeelte van de DNA sequentie van het *humane glucocorticoïd receptor* gen zit te 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 glucocorticoïd 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 glucocorticoïd receptor* gen in frame wordt gezet met het *GFP* gen. Hiermee bedoelen we dat we een correct leesraam (open leesraam) krijgen van het *GFP* gen met het *humane glucocorticoïd receptor* gen om ons uiteindelijke doel, een humaan glucocorticoïd receptor green-fluorescent protein (hGR-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 startcodon (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:



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

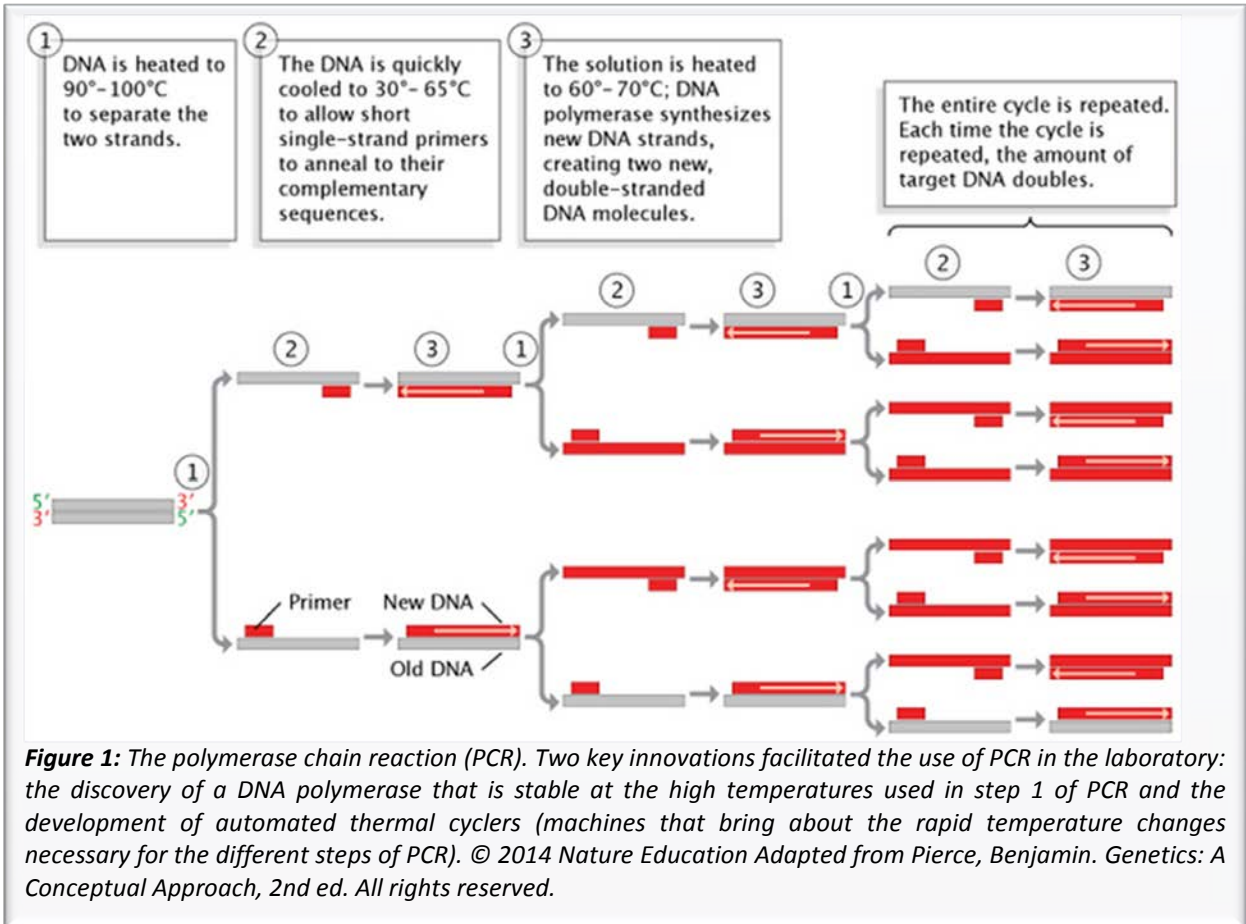
De meest gebruikte methode om een gen te subcloneren is door gebruik te maken van restrictie-enzymen. Je gebruikt dezelfde restrictie-enzymen voor het uitknippen van het targetgen uit het ouderplasmide als voor het openknippen van het expressieplasmide. Op deze manier creëer je de zogenaamde complementaire sticky ends die worden gebruikt voor de ligatie. Hier komen we later nog uitgebreid op terug. Om voldoende DNA te hebben voor de restrictiedigestie gaan jullie straks eerst het *glucocorticoïd 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 tekst box).

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



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/>

Wat gaan we vandaag doen?

Om je labvaardigheden op te frissen begin je met bootcamp dat bestaat uit vier onderdelen:

1. Chemisch rekenen sommen maken
2. Labquizz
3. Pipetteer opdracht maken
4. Het correct instellen van een licht microscoop

Het is bedoeling dat je zo snel en zo goed mogelijk alle opdrachten uitvoert samen met je practicumpartner. De practicumassistenten houden de score bij. Als iedereen klaar is volgt een inleiding over het practicum van de practicumassistenten en ga je een PCR inzetten. Ondertussen berekent de jury welk duo het Bootcamp heeft gewonnen. Aan het eind van het practicum worden de winnaars bekend gemaakt.

Succes!

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 welke 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

Let op!: Bewaar de PCR cocktail (paarse epje) op ijs, deze bevat namelijk enzymen die anders hun werking verliezen.

PCR

- Reagentia: PCR cocktail (10X PCR Dream Taq buffer (eind conc 1x), 2mM dNTP's (eind conc 0,04mM), 10 μ M forward primer (eind conc 0,2 μ M), 10 μ M reverse primer, H₂O, 5U/ μ l Dream Taq DNA polymerase (eind conc. 0,025U/ μ l) en ouderplasmide pBluescript SK+ met *hGR* gen (pBS-SK+_hGR) 1 μ g/ μ l
- Benodigheden: PCR epje, ijs, ijsbak, pipetpuntjes
- Apparatuur: PCR apparaat, mini tafelcentrifuge, pipet

Protocol

1. Pak een nieuw PCR epje en label deze duidelijk met het nummer dat je van je practicumassistent hebt gekregen met watervaste stift en zet op ijs (het koelhouden van je eigen reactie mengsel is van belang om de enzym activiteit te behouden). Per tafel nemen jullie een negatieve controle (NTC, no template control) mee (dus zonder DNA). Denk ook nu weer om het labellen van de epjes en zorg dat je het kunt onderscheiden van alle andere tafels.
2. Pipetteer 48 μ l PCR cocktail in een buisje van de PCR epje 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 stap een nieuwe 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 pBS-SK+_hGR toe (met uitzondering van je negatieve controle; voeg hieraan 2µl water toe) 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 epje 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 Glucocorticoïd receptor

PCR programma		Temperatuur	Duur
Initiële denaturatie		95°C	2'
35 cycli	Denaturatie	95°C	30''
	Annealing	52°C	30''
	Extensie	72°C	3'.30''
Eind extensie		72°C	10'
bewaren		8°C	∞

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

Bootcamp opdracht 1: chemisch rekenen

Voer de rekensom die op het white board geschreven staat uit en laat aan je assistent de uitkomst.

Bootcamp opdracht 2: 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.

Bootcamp opdracht 3: quiz

Beantwoord alle vragen van de labquizz zo goed en snel mogelijk en geef de antwoorden door aan je assistent.

Bootcamp opdracht 4: instellen microscoop

Stel de licht microscoop correct in (preparaten liggen klaar in de witte bak) en laat aan je assistent dit controleren.

Opdrachten

Kennis opdracht 1.1: Veiligheid en Milieu

- Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

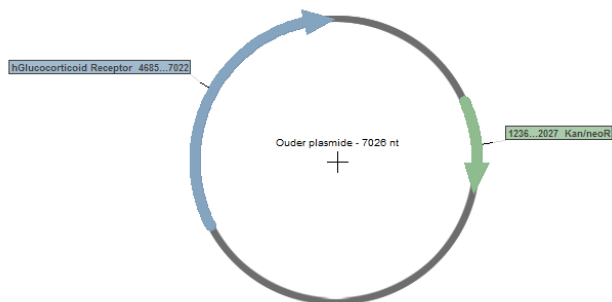
Kritisch denken opdracht 1.2:

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

Kritisch denken opdracht 1.3: Primers

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

De figuur hieronder is een schematische weergave van het ouderplasmide pBluescript SK+ met daarin het humane glucocorticoïd receptor gen. Geef in deze figuur aan waar het start- en waar het stopcodon 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 pBluescript SK+ met *humane glucocorticoïd receptor* gen.

Kritisch denken opdracht 1.4

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? Noem minimaal vier voorwaarden.

Kritisch denken opdracht 1.5

Voordat we kunnen beginnen met de PCR moeten eerst de primers worden opgelost. Op de datasheet van de primers staat hoeveel mg primer (peptiden) we hebben ontvangen. Bereken in hoeveel Tris-

EDTA je de primers moet oplossen om een 100 μ M stockoplossing te krijgen en vervolgens hoeveel je deze moet verdunnen om een 10 μ M werkoplossing te krijgen.



Researcher Name	Cindy Wagemans	Purification	Cartridge
Manufactory 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 μ M Solution dissolve in:	μ l



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 μ M Solution dissolve in:	μ l

Figuur 5: Datasheet pEGFP-hGR 1 primers.

Kritisch denken opdracht 1.6

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

Kritisch denken opdracht 1.7: Virtueel cloneren

Om de (sub)klonering van de glucocorticoïd receptor virtueel uit te testen kun je gebruik maken van het programma Serial cloner (te downloaden via link op BlackBoard.). Op deze manier kan je het practicum tot en met het dagdeel kolonie PCR virtueel nabootsen.

Tip: De antwoorden op de vragen kun je gebruiken bij het maken van de proefopzet van de respectievelijke dagdelen.

Importeren insert en expressieplasmide

- a) Importeer de files uit het mapje virtueel cloneren van blackboard en sla deze op. Open de file met sequentie van het **pBS-SK+_hGR ouderplasmide**. De eerste 10 basen zijn 5'- CACTAGTTCTA -3' en de laatste 10 basen 5'- CAAAAGTGAG -3'. De sequentie wordt in een 'sequence window' geopend. Beantwoord de volgende vragen:
- i. Uit hoeveel basen bestaat de sequentie?
 - ii. Is het DNA lineair of circulair?

PCR

Een van de eerste stappen van kloneren is het verkrijgen en amplificeren van je insert (het *hGR* gen) met behulp van een 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 **T7 Forward primer** (5'- GTAATACGA CCACTATAGGGC-3') en voor primer 2 de **T3 Reverse primer** (5'- AATTAACCTCACTAAAGGG-3'). Gebruik het opgeslagen '**pBS-SK+_hGR ouderplasmide**' bestand als 'matrix DNA sequentie'. Run de PCR en sla het resultaat op als '**PCR hGR insert**'. Beantwoord de volgende vraag:
- i. Hoe groot is het verkregen PCR product?

Restrictiedigestie (van PCR product en pEGFP-C1 donor plasmide)

Het PCR product is niet geschikt om direct in het expressieplasmide te (sub)kloneren. Om het wel geschikt te maken moeten de uiteinden eerst compatibel met het expressieplasmide worden gemaakt. Dit wordt gedaan met behulp van een restrictiedigestie.

- c) Selecteer 'restriction' en vervolgens 'virtual cutter'. Gebruik je PCR product (PCR hGR insert) als sequentie om te knippen en knip de sequentie met *XhoI* en *BamHI*. print het 'graphic report' en plak het in je labjournaal. Dit geeft het product weer zoals het er uit zou zien op agarose gel. Beantwoord de volgende vragen:
- i. Op welke plek (baseparen) knippen deze enzymen?
 - ii. Hoe groot zijn de producten?
 - iii. Welke van de producten ga je straks gebruiken om in het expressieplasmide te (sub)kloneren?

Je weet nu wat er met je PCR DNA gebeurt na restrictie digestie, om deze virtueel uit te kunnen voeren moet de sequentie file aangepast worden. Dit doe je als volgt

- d) Ga naar het sequence venster van '**PCR hGR insert**' en selecteer de 'graphic map'. In het graphic map venster dat nu wordt geopend selecteer je boven aan 'particular sites' (zorg dat de rest niet aangevinkt is). Selecteer bij 'choose sites' *Bam*HI en *Xho*I en klik op het plaatje. De geselecteerde sites worden gekleurd weergegeven in het venster. Selecteer *Xho*I door er 1x op te klikken (hiermee geef je aan dat dit het begin van de sequentie is) en dubbel klik op *Bam*HI (hiermee geef je aan dat dit het eind van de sequentie is). Klik met je rechter muis in het venster en selecteer 'extract fragment'. Je krijgt nu de melding 'ligation will produce a linear fragment', kies 'Yes'. Er wordt een nieuw venster geopend met daarin de sequentie van het virtueel geknipte fragment. Sla dit fragment op als '**insert hGR restrictie BamHI-XhoI**'.
- Hoeveel baseparen groot is het hGR insert?
 - Hoe zien de 5'- en 3'- uiteinden (extremities) van het insert eruit?

De pEGFP-C1 plasmide is het expressieplasmide waar de glucocorticoïd receptor in gekloneerd gaat worden. Om het geknipte PCR product in de vector te kunnen zetten moet de pEGFP-C1 donor vector ook geknipt worden met dezelfde restrictie enzymen.

- e) open de file 'pEGFP-C1', de eerste 10 basen hiervan zijn 5'-TAGTTATTAA-3' en de laatste 10 basen zijn 5'-CGCCATGCAT-3'. Beantwoord de volgende vragen:
- Zitten de restrictie sites *Xho*I en *Bam*HI in de polylinker van pEGFP-C1?
 - Geef met behulp van de 'enzym library' onder het kopje 'restriction' de sequentie van de site waar *Bam*HI en *Xho*I knippen, geef ook aan op welke manier de enzymen de sequentie knippen.
- f) Bekijk hoe het plasmide er op agarose gel uit zou zien door de restrictie beschreven in punt c uit te voeren met de file '**pEGFP-C1**' en plak ook hiervan het 'graphic report' in je labjournaal. Beantwoord de volgende vragen:
- Op welke plek (baseparen) knippen *Bam*HI en *Xho*I
 - Hoe groot zijn de restrictie producten?
 - Welk van de producten is je expressieplasmide?
- g) Voor de restrictie ook uit op de sequentie van pEGFP-C1 zoals beschreven onder 'd', maar let goed op of *Bam*HI of *Xho*I het begin of eind van je sequentie is. Sla de sequentie op als '**pEGFP-C1 restrictie BamHI-XhoI**'.
- Hoe gaat het expressieplasmide er straks uitzien na de ligatie? Maak een tekening waarin je het hGR insert, het pEGFP-C1 expressieplasmide en het *GFP* gen aangeeft. Geef ook aan op welke manier de 3'- en 5'-uiteinden van het insert en de plasmide aan elkaar gekoppeld zijn.

Ligatie

Je hebt nu één file met het geknipte pEGFP-C1 expressieplasmide en één met het geknipte hGR insert. Beide sequenties hebben compatible uiteinden die aan elkaar geligeerd kunnen worden zoals je ook bij het practicum zelf gaat doen.

- h) Selecteer 'construct' in de werkbalk. Fragment #1 is het pEGFP-C1 expressieplasmide, selecteer de '**pEGFP-C1 restrictie BamHI-XhoI**' file en vervolgens 'select all' (in sommige versies van het

programma kan je dit via een rechter muis klik in graphic map doen). 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 onderaan het venster te drukken, in een nieuw venster wordt de sequentie weergegeven. Als de ligate knop niet zichtbaar is, selecteer dan 'window' gevolgd door 'hide toolbar'. Sla de sequentie op als 'pEGFP-C1 -hGR'. Sla ook de graphic map van je plasmide op met daarin alleen de sites van *BamHI* en *XhoI* aangegeven. Beantwoord de volgende vraag:

- i. Klopt de plasmidekaart die je eerder getekend het met het kaartje dat je nu hebt?
- i) Voer een virtuele restrictie uit op je geligeerde product en sla de graphic map van de restrictie met *BamHI* en *XhoI* op. Beantwoord de volgende vraag:
- i. Klopt je restrictiekaart?

Vertalen van DNA naar proteïn sequentie

- j) Ga naar de website <http://web.expasy.org/translate/> en voer de sequentie van het pEGFP-C1_hGR plasmide in en 'translate sequence'. Er worden nu verschillende leesraams weergegeven. Klik op het juiste leesraam. Let op, het volledige humane glucocorticoïd receptor green-fluorescent proteïn fusie-eiwit wordt nu weergegeven. Beantwoord de volgende vragen:
- i. Welk leesraam kies je en waarom?
 - ii. Zit het green-fluorescent proteïn voor of achter het *humane glucocorticoïd receptor* gen ?
 - iii. Hoe groot is het fusie-eiwit (in Dalton)? (compute pI/MW)

Is de sequentie van het GFP-hGR fusieeiwit terug te vinden in de database?

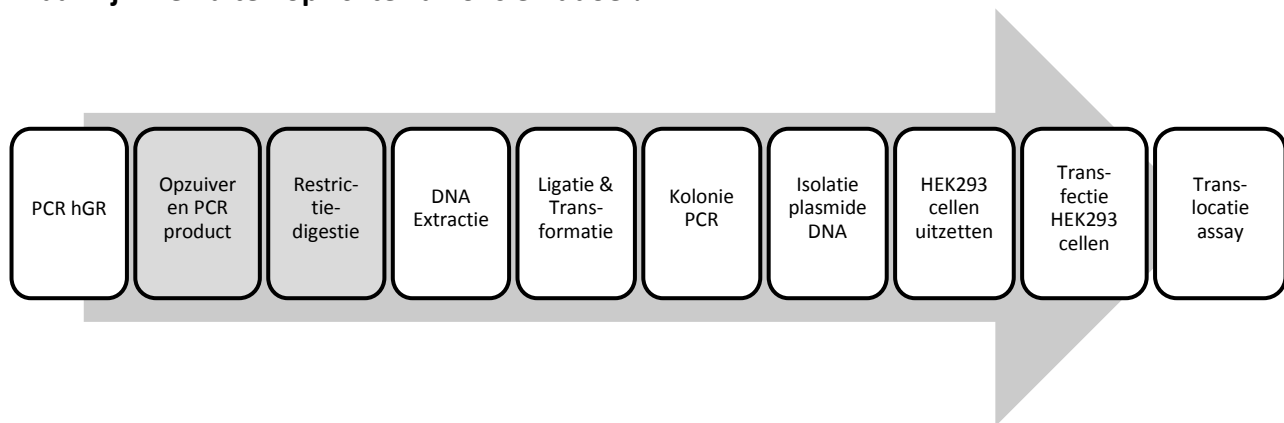
- k) Je krijgt nu een venster waar het leesraam wordt weergegeven, selecteer de 'Met' (Methionine is het startcodon) waar het fusie-eiwit begint. En selecteer in het volgende venster 'BLAST submission on ExPASy/SIB'. In het volgende scherm selecteer je 'Run BLAST'. De aminozuur sequentie wordt nu vergeleken met een database. Beantwoord de volgende vragen:
- i. Kies je voor het startcodon van het green-fluorescent proteïn of van de humane glucocorticoïd receptor? Leg uit
 - ii. Wordt de humane Glucocorticoïd receptor in de database gevonden? Is je fusie-eiwit volledig en in-frame? Leg uit.
 - iii. Waarom is het belangrijk om vooraf te testen of je eiwit in-frame is?
 - iv. Vind je andere eiwitten als je een ander startcodon kiest?
 - v. Vind je de humane Glucocorticoïd receptor als je een ander leesraam kiest?

Dagdeel 2: Opzuiveren PCR product en Restrictiedigestie

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van PCR purificatie en restrictiedigestie beschrijven
- Je kunt de bovenstaande technieken correct uitvoeren
- 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?



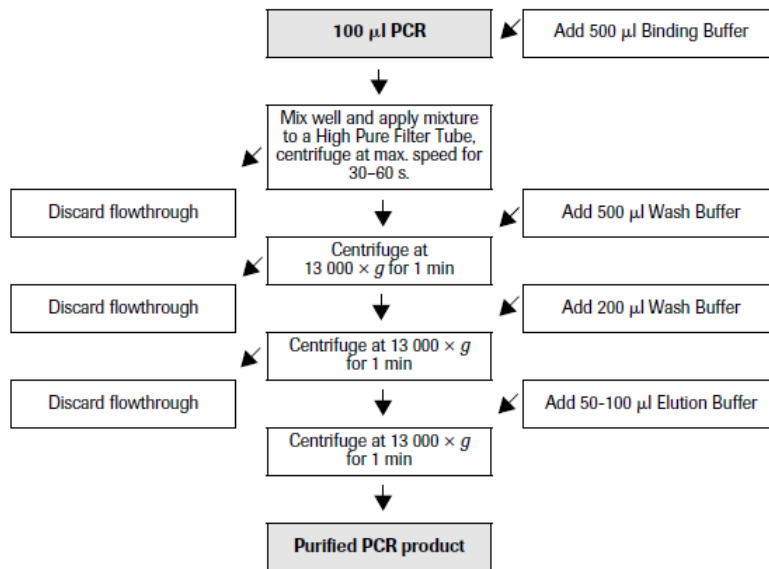
Inleiding

Vorig practicum dagdeel heb je het *humane glucocorticoïd receptor* gen geamplificeerd door middel van de PCR techniek. Vandaag ga je verder met subkloneren door zowel het insert (*humane glucocorticoïd receptor* gen) als het expressieplasmide pEGFP-C1 (dat het *GFP* gen bevat) met behulp van dezelfde restrictie-enzymen te knippen. Hiermee creëer je de zogenaamde complementaire sticky ends die je gaat gebruiken voor de ligatie van volgende week. Voordat je een restrictiedigestie kunt doen op het PCR product is het noodzakelijk om dit eerst te zuiveren met een PCR clean up-kit. De belangrijkste stappen van de PCR product zuivering worden weergegeven in figuur 1 (hint: goed te gebruiken bij het maken van de proefopzet).

Principle of PCR purification

The monster 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 monster 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 1: Overzicht belangrijkste stappen PCR opzuivering.

Na de PCR zuivering ga je verder met de restrictiedigestie door gebruik te maken van restrictie-enzymen. Restrictie-enzymen zijn nucleases die de suiker-fosfaat backbone van DNA kunnen knippen en worden geïsoleerd uit bacteriën. Deze enzymen herkennen specifieke palindromische nucleotide 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 een 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.

Experiment

PCR opzuiveren

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

Protocol

1. Vul het volume van elke PCR reactie tube aan tot 100µl met water en breng over in een nieuw 1.5ml epje. De negatieve controle hoeft niet gezuiverd te worden.
2. Voeg 500µl binding buffer toe aan elke PCR reactie en vortex.
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
 - *Let op: zorg dat je de kolommatrix niet raakt, dit heeft een negatieve invloed op de zuivering*
5. Centrifugeer 60 sec bij 13000 rpm.
6. Leeg het opvangepje en plaats de spinkolom weer in het gebruikte maar 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 weer op het opvangepje en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
11. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom op een schoon 1,5ml epje.
12. Voeg 25µl elutiebuffer toe aan de spinkolom, incubeer 1 min en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
 - *Let op: Dit volume trekt meteen in de kolom en is dan niet meer zichtbaar. Voeg bij twijfel geen extra elutiebuffer toe, maar draai eerst af om te zien of er daadwerkelijk geen buffer is toegevoegd.*
13. Pipetteer het eluaat nogmaals op de kolom en plaats de kolom terug in het 1,5ml epje en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
14. Het gezuiverde DNA (van >100bp) bevindt zich nu in oplossing in het 1,5ml epje.
15. Draai het epje met gezuiverde DNA 2 minuten af op maximale snelheid om 'storend' materiaal uit de kolom te verwijderen.

Restrictiedigestie

- Reagentia: restrictie-enzymen Fast digest *Xho*I en *Bam*HI, 10x Fast digest buffer, H₂O, gezuiverd PCR product, pEGFP-C1 expressieplasmide
- Benodigdheden: ijs, ijsbak (of -20 bakjes voor enzym) pipetpunten, 1,5 ml epjes
- Apparatuur: pipet, tafelcentrifuge, waterbad 37°C, hitteblok 80°C

Protocol

1. Het insert (gezuiverde PCR product) en expressieplasmide pEGFP-C1 worden geknipt met de restrictie-enzymen *Bam*HI en *Xho*I. Pipetteer aan de hand van je pipeteerschema je restrictiedigestie reactie voor ieder monster in een 1,5ml epje. Per practicumduo doen jullie een dubbeldigestie van het expressieplasmide en het insert. Per tafel nemen jullie de volgende controles mee: ongeknipte expressieplasmide pEGFP-C1, ongeknipt PCR product, expressieplasmide pEGFP-C1 geknipt met *Bam*HI of met *Xho*I. Laat voordat je begint je pipeteerschema controleren door je practicumassistenten.
 - a. Let op: Houd alle restrictie-enzymen (rode epjes) en je eigen restrictiedigestie mix op ijs om vermindering van de enzym activiteit te voorkomen.

Tabel 2: Samenstelling mastermix FastDigest restrictie-enzym reacties.

	Per duo		Per tafel			
	Dubbele digestie		Enkele digestie		Ongeknipt	
	hGR insert	pEGFP-C1	pEGFP-C1	pEGFP-C1	hGR insert	pEGFP-C1
10x Fast digest buffer	?	?	?	?	-	-
FD <i>Bam</i> HI	2µl	2µl	2µl	-	-	-
FD <i>Xho</i> I	2µl	2µl	-	2µl	-	-
Insert hGR (gezuiverd PCR product)	20µl	-	-	-	5ul	-
Expressieplasmide pEGFP-C1 (1µg/µl)	-	2µl	2µl	2µl	-	1µl
water	?	?	?	?	?	?
Totaal volume	40 µl	40µl	40µl	40µl	10µl	10µl

2. Sluit het epje goed af en centrifugeer kort, zodat alle vloeistof onderin zitten.
3. Incubeer 10 minuten bij 37°C in een waterbad
4. Inactieveer de restrictie enzymen 5' bij 80°C in een hitte blok (PAS OP heet).

Opdrachten

Kennis opdracht 2.1: Veiligheid en Milieu

- a) Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- b) Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- c) Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - i. Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - ii. Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kritisch denken opdracht 2.2

Welke controles neem je mee bij het inzetten van je restrictiedigestie en waarom?

Kritisch denken opdracht 2.3

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

Kritisch denken opdracht 2.4

Beantwoord de onderstaande vragen die horen bij de verschillende stappen van het PCR opzuiverings protocol.

- a) Waarom bevat de bindingsbuffer chaotropische zouten?
- b) Waarom voeg je wasbuffer in stap 7 toe en wat zou er gebeuren als je deze stap overslaat?
- c) Waarom is er een tweede wasstap en wat zou er gebeuren als je deze stap overslaat??
- d) Waarom centrifugeer je de spinkolom nogmaals bij stap 13 en wat zou er gebeuren als je deze stap overslaat?
- e) Waarom centrifugeer je het epje met gezuiverde DNA 2 minuten af op maximale snelheid? En wat zou er kunnen gebeuren als je dit niet zou doen?

Kennis opdracht 2.5

- 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 restrictie enzymen
- e) Wat zijn isoschizomeren en neoschizomeren?

Kennis opdracht 2.6

Stel je ziet te veel bandjes op gel na restrictiedigestie. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door steractiviteit of door partiële digestie.

- a) Wat is steractiviteit en wanneer kan dat optreden? Wat kan je doen om dit op te lossen?
- b) Wat is partiële digestie? Wat kan je doen om dit probleem op te lossen?
- c) Hoe kun je bepalen of er sprake is van steractiviteit of van partiële digestie?

Kritisch denken opdracht 2.7

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

Kritisch denken opdracht 2.8

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

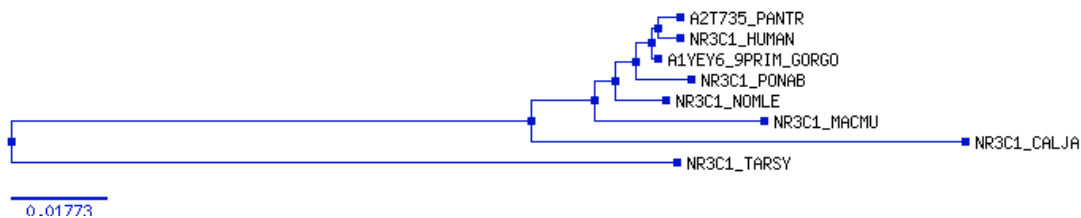
Kennis opdracht 2.9

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) 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?

Computer Opdracht 2.11: Fylogenie

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 (GREs). 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 2: 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 sequencies 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 is a search bar with 'Nucleotide' selected. Below the search bar, there are options for 'Limits' and 'Advanced'. The main content area displays information for 'Homo sapiens nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) (NR3C1), transcript variant 1, mRNA'. A 'Send' button is visible, and a dropdown menu is open, showing options: 'Complete Record', 'Coding Sequences', 'Gene Features', 'Choose Destination', 'File', 'Clipboard', 'Collections', and 'Analysis Tool'. The 'Clipboard' option is selected. Below the menu, it says 'Add 1 items.' and there is an 'Add to Clipboard' button.

Het bestand dat je nu hebt gemaakt kan je openen in MEGA. Waarschijnlijk wordt er automatische 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 CustalW. Geconserveerde basen zijn aangegeven met een *. Wat is er veranderd na de alignment?

MEGA kan de variatie in je DNA sequentie analyseren. Druk daarvoor eerst op Data en dan op Phylogenetic Analysis. Als je nu de alignment explorer minimaliseerd 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 2.11a

Is er verschil in het percentage totaal aantal geconserveerde baseparen en aminozuren? Leg uit. Wat is het verschil tussen homologe en identieke sequenties? Heeft dit consequenties voor de functie? Leg uit.

Selecteer nu de geconserveerde aminozuren.

Opdracht 2.11b

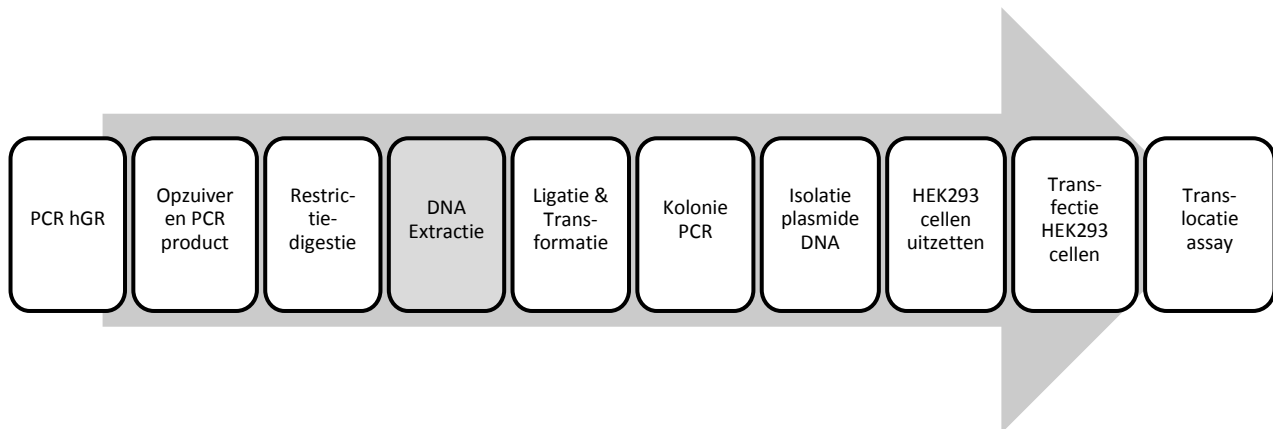
Kijk of je een verschil ziet in de hoeveelheid geconserveerde aminozuren op verschillende plekken in de sequentie. Kan je verschillende domeinen onderscheiden? Zo ja, welke en leg uit hoe deze domeinen gerelateerd zijn aan wat je al weet over de Glucocorticoïde receptor.

Dagdeel 3: Agarose Gelelektroforese en DNA extractie

Leerdoelen

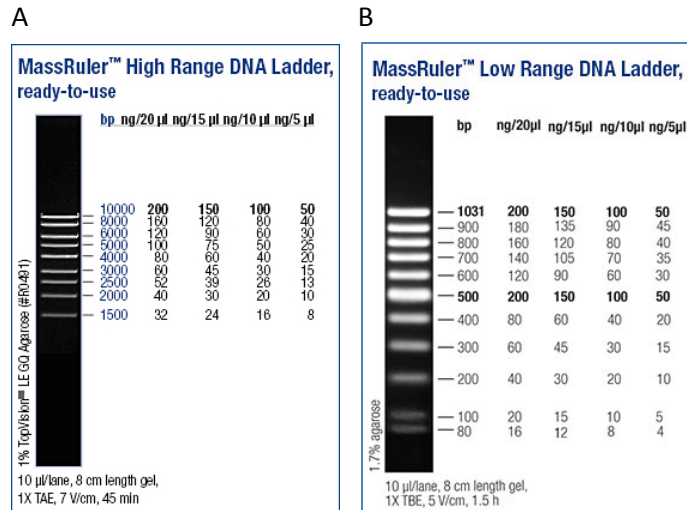
- Je kunt de theoretische achtergronden van agarose gelelektroforese en DNA extractie beschrijven
- Je kunt de bovenstaande technieken correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vandaag ga je DNA fragmenten (insert en opengeknipt expressieplasmide) opzuiveren die worden gebruikt voor de ligatie. Tijdens het opzuiveren worden restrictie-enzymen, zouten en ongewenste DNA moleculen (DNA fragmenten die uit het insert en expressieplasmide zijn geknipt) uit het restrictiedigestie mengsels verwijderd. Dit doe je door DNA monsters met behulp van agarose gelelektroforese op grootte te scheiden en vervolgens deze fragmenten uit de agarose gel te snijden en op te zuiveren. Agarose gelelektroforese 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 (Figuur 1), ook wel molecular-weight size marker genoemd. Van deze standaard is de grootte van de DNA fragmenten bekend. Door je 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 heb je dit al preciezer berekend door gebruik te maken van semi-logaritmisch papier. De principes van DNA extractie uit een agarose gel staat in de tekstbox kort beschreven (hint: goed te gebruiken voor het maken van de proefopzet).



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

Principle DNA extraction

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>

Na de DNA extractie worden DNA concentraties van de verschillende monsters bepaald met een nanodrop. Deze concentraties heb je nodig om thuis het ligatie pipeteerschema voor te bereiden voor het volgend dagdeel.

Experiment

Agarose Gelelektroforese

- Reagentia: agarose, 1x TAE, Midori green, High range DNA ladder, Low range DNA ladder, Orange loading dye, DNA monster
- Benodigdheden: gelbak, dikke kammen 2x 250ml erlenmeyer, 250ml en 1L maatcilinder weegbakje, spatel, eppenrek, 2,0ml epjes
- Apparatuur: elektroforese apparaat, weegschaal, pipet, magnetron

Protocol agarose gelelektroforese

1. Per practicumgroep zal één agarose gel gegoten worden. Je assistent verdeelt de taken.
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 50x buffer en moet dus voor gebruik 50x verdund worden in totaal 2L in een maatcilinder met demi-water (bewaar resterende 1x TAE in een gelabelde afgesloten fles).*
3. Kook de agarose oplossing in de magnetron om de agarose op te lossen (duurt ongeveer 3,5 minuten).
 - *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 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 zijkanten 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 ongeveer 30 minuten bij kamertemperatuur stollen.
 6. Als de gel 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 2mm onder de vloeistof staat. In de elektroforese bak gaat ongeveer 1L 1x TAE.
 7. 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.
 - *Vergeet niet de negatieve controle van de PCR op te brengen.*
 - *Monster dat niet in het slotje gepipetteerd is kan niet worden opgezuiverd en geeft dus product verlies voor de volgende stap.*
 8. 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. Na ongeveer 45 minuten bij 150 V heeft de gel lang genoeg gelopen.
 9. 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 op een dienblad en loop naar het gel Doc-systeem om de resultaten te bekijken
 10. 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 (bindingsbuffer, wasbuffer, elutiebuffer), isopropanol, DNA monster in agarose gel
- Benodigheden: scalpel, 2,0 ml epje, pipetpunten, eppenrek, afvalvat voor halogeen-arm afval

- Apparatuur: UV-bak of Blue light illuminator, beschermkap, pipet, hitteblok 56°C, vortex, tabletop centrifuge

Protocol DNA extractie

1. Bekijk de gel op de Blue-light transilluminator. Snijd vervolgens met behulp van een schoon scalpelmesje de gewenste DNA fragmenten uit de gel en stop deze in een 2,0ml epje. Vergeet niet te labelen. Maak tenslotte de plaat eerst schoon met water (DNA lost op in water) en daarna met ethanol (desinfecteert).
 - *Probeer zo precies mogelijk uit te snijden. Als je te krap uitsnijdt (in het geval dat **in** het DNA fragment snijdt) verlies je product, maar als je te ruim uitsnijdt heb je veel extra agarose gel om je fragment heen. Hoe meer agarose gel hoe langer het duurt om alle gel op te lossen. Daarnaast bestaat de kans dat je voor de extractie zelf niet één maar twee kolommen nodig hebt. Dit gaat levert altijd product verlies op.*
2. Weeg de hoeveelheid uitgesneden gel in de 2,0ml epjes. Leg hiervoor eerst een leeg 2,0ml 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 agarose gel toe.
4. Vortex de suspensie 30 seconden
5. Incubeer 10 minuten bij 56°C in het hitteblok (pas op heet) om de agarose gel op te lossen. Vortex tijdens deze incubatie de inhoud van het epje elke 2-3 minuten kort (om het oplossen van de agarose gel en vrijmaken van DNA te bevorderen). 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 in de zuurkast 1,5µl isopropanol per mg agarose gel aan de oplossing toe en vortex goed.
7. Plaats een spinkolom (High pure filter tube) op een opvangepje voor elke gel slice.
8. Pipetteer de gehele inhoud van je epje (max 700µl) in het bovenste reservoir van de spinkolom
 - *Let op: zorg ervoor dat je de kolommatrix niet raakt, dit beïnvloed de zuivering negatief*
 - *Bij een volume >700ul, draai af en voeg resterende volume toe.*
9. Centrifugeer 60 sec bij 13000 rpm.
10. Leeg het opvangepje en plaats de spinkolom weer in het gebruikte maar lege opvangepje
 - *Let op: in welk afvalvat leeg je het epje*
11. Voeg 500µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm, hoeft niet meer in de zuurkast.
12. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom weer op het opvangepje

13. Voeg 200µl wasbuffer toe en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm. Deze tweede was zorgt voor een optimale zuiverheid van het DNA en volledige verwijdering van wasbuffer van de glass fiber kolom matrix.
14. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom weer op het opvangepje en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm. Deze afdraaistap vermindert eventuele ethanol vervuiling in je eluaat.
15. Leeg het opvangepje en zet de spinkolom op een schoon 1,5ml epje.
16. Voeg 25µl elutiebuffer toe aan de spinkolom, incubeer 1 min en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
 - *Let op: Dit volume trekt meteen in de kolom en is dus niet zichtbaar. Voeg bij twijfel geen extra elutiebuffer toe (dit verlaagt de concentratie van het eluaat) maar draai eerst af om te zien of er daadwerkelijk geen buffer is toegevoegd.*
17. Pipetteer het eluaat nogmaals op de kolom en plaats de kolom terug in het 1,5ml epje en centrifugeer 1 min bij 13000 rpm.
18. Het gezuiverde DNA (>100bp) bevindt zich nu in oplossing in het 1,5ml epje.
19. Draai het epje met gezuiverde DNA 2 minuten af op maximale snelheid om eventueel meegekomen glass fibers neer te slaan.

Concentratiebepaling gezuiverde insert en expressieplasmide

Reagentia:	DNA monster, oplossing om blanco in te stellen, demiwater
Benodigdheden:	P2 pipetpuntjes, tissue
Apparatuur:	Xpose, pipet (P2)

De Xpose is een spectrofotometer waarmee je de concentratie van nucleïne zuren en eiwitten in een oplossing kunt 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 (nucleotiden, 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.

Opdrachten

Kennis opdracht 3.1: Veiligheid en Milieu

- a) Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- b) Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- c) Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - iii. Welke waarschuwpictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - iv. Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kennis opdracht 3.2:

Beantwoord de volgende vragen uit het filmpje How to clean up DNA — visual protocol shows the way:

- a) Kunnen uitgesneden agarose gel stukjes met DNA fragmenten bewaard worden om later een DNA extractie op uit te voeren?
- b) Waarom is het belangrijk om de gel volledig op te lossen?

Kritisch denken opdracht 3.3

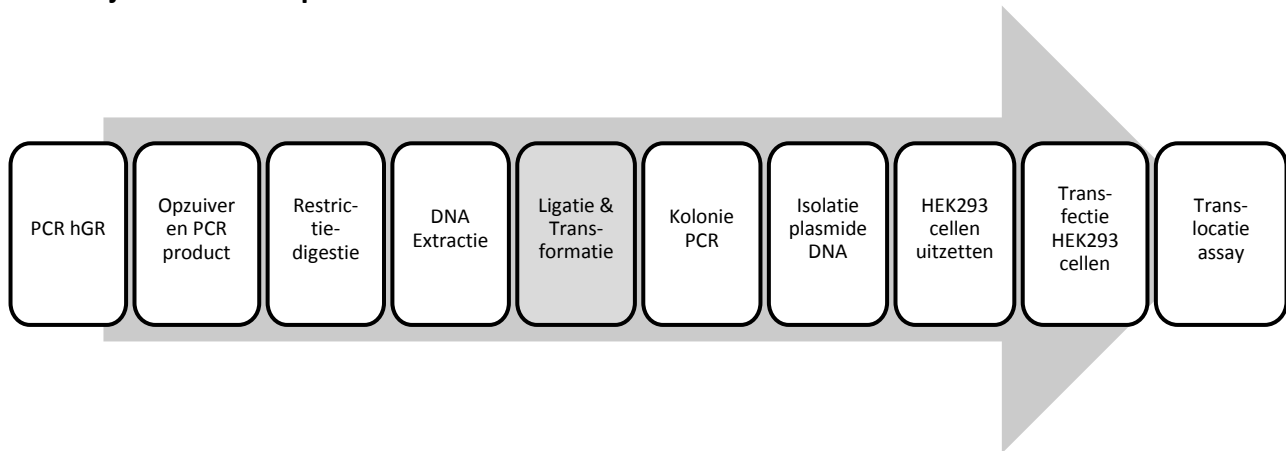
- a) Waarom wordt het PCR product na restrictiedigestie gezuiverd uit een agarose gel? Welke problemen kunnen er mogelijk optreden als je dit niet doet?
- b) Waarom is het belangrijk om de agarose volledig op te lossen?

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 het insert (*humane glucocorticoïd receptor gen*) en de expressieplasmide pEGFP-C1 (dat het *GFP* gen bevat) met behulp van DNA extractie klaar gemaakt voor de ligatie. Vandaag gaan jullie het insert kloneren in het opengeknipte 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 opengeknipt en beide uiteinden zijn compatibel (bijvoorbeeld als de plasmide is opengeknipt met één restrictie-enzym of is opengeknipt door een blunt-end knippend enzym) dan kan het gebeuren dat de twee uiteinden van het plasmide weer aan elkaar gaan 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 plasmide versus insert is 1:3, maar is afhankelijk van de grootte

van het insert. Een hogere ratio kan de intergratie van meerdere inserts tot gevolg hebben. 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 smeltemperatuur van de DNA uiteinden die moeten worden geligeerd. De smeltemperatuur 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 smeltemperaturen wordt er om praktische reden vaak gekozen voor een ligatie reactie temperatuur van tussen de 14-16°C of overnacht bij 4°C.

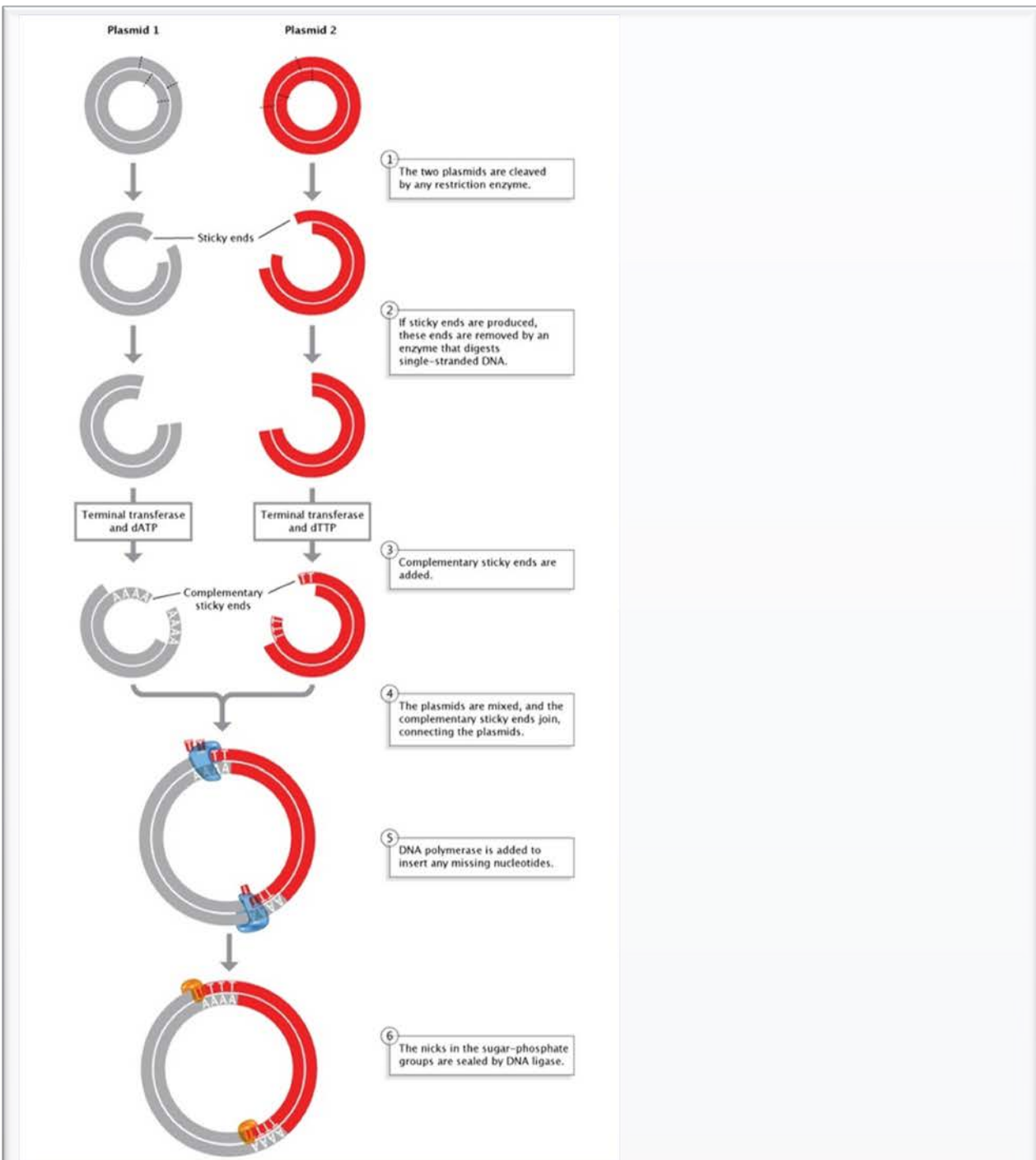


Figure 1: Constructing a recombinant plasmid. A recombinant plasmid can be constructed from two different plasmids in six steps: cleavage by restriction enzymes, removal of sticky ends, addition of complementary sticky ends, mixing and complementary binding of the two plasmids, addition of missing nucleotides by DNA polymerase, and sealing of sugar-phosphate nicks by DNA ligase. © 2013 [Nature Education](#) Adapted from Pierce, Benjamin. *Genetics: A Conceptual Approach*, 2nd ed. All rights reserved.

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), 20g 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.
 - Gebruik hiervoor je ligatie pipetteerschema.
3. De warme gesteriliseerde LB met agar staat in de incubator bij 80°C. Voor 1 petrischaal heb je ~20ml medium nodig. Voeg 1000x kanamycine toe tot een eindconcentratie van 50µg/ml (1000x 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.

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

Ligatie van het hGR gen in pEGFP-C1

- Reagentia: Quick T4 ligase; 5x rapid ligation buffer; gezuiverd DNA, H₂O
- 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

	Per duo		Per tafel		
	Ligatie 1:2	Controle 1	Controle 2	Controle 3*	Controle 4*
water	?	?	?	?	?
pEGFP-C1 <i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI	50ng = xμl	50ng = xμl	50ng = xμl	-	-
pEGFP-C1 <i>XhoI</i> of <i>Bam</i> HI	-	-	-	50ng = xμl	50ng = xμl
Insert hGR <i>XhoI</i> - <i>Bam</i> HI	50ng = xμl	-	-	-	-
5x rapid ligatiebuffer	?	?	?	?	?
Quick T4 ligase	1μl	1μl	-	1μl	-
Totaal volume	20μl	20μl	20μl	50μl	50μl

*De even tafels voeren de enzym controles uit voor *Bam*HI, de oneven tafels voor *XhoI*.

2. Meng goed door op en neer te pipetteren.
3. Incubeer 10minuten bij kamertemperatuur.
4. Zet de ligatie reacties op ijs.

We gaan verder.

Transformatie

- Reagentia: Ligatie reacties, competente cellen, ongeknipte plasmide, 1x LB Medium, LB agar platen met Kanamycine, EGFP-C1 plasmide 4ng/μl
- Benodigdheden: 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 fragiel, dus op ijs houden en niet vortexen.

Protocol

1. Ontdooi per conditie 45µl competente cellen 20 minuten op ijs. En koel voor elke conditie een epje op ijs.
2. Verwarm LB (zonder kanamycine) tot 37°C in de incubator
3. Pipetteer 5µl van de ligatie reacties in een voor gekoeld 1,5ml epje en zet terug op ijs.
 - *Neem 1 positieve controle voor de transformatie per tafel mee, welke 20ng EGFP-C1 bevat*
4. Voeg 45µl competente cellen toe, meng door zachtjes tegen het epje te tikken (voorzichtig!, niet vortexen)
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** kanamycine) 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 kanamycine (kijk of de plaat goed droog is)
9. Centrifugeer de cellen 3 minuten in een microcentrifuge bij 4000rpm
10. Verwijder 800µl 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.
 - *Opmerking: je hebt nu een plaat met een lage (10% van totaal) en hoge (90% van totaal) concentratie competente cellen. Aangezien niet te voorspellen is hoe efficiënt de transformatie is verlopen en hoeveel kolonies je dus kan verwachten is het verstandig om twee concentraties uit te platen.*
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.
 - *Als de agar platen met de agar naar beneden worden geplaatst dan kan na condensvorming vocht druppels op de agar vallen die kolonie groei kan beïnvloeden.*

Opdrachten

Kennis opdracht 4.1: Veiligheid en Milieu

- Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kennis opdracht 4.3

De concentratie kanamycine in de stockoplossing is 50mg/ml. Welk volume kanamycine voeg je per plaat (20ml) toe om een eindconcentratie van 50µg/ml te krijgen?

Kennis opdracht 4.4

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

Kritisch denken opdracht 4.5

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 1:2 is. Hoeveel ng van jouw insert moet je nu toevoegen aan je ligatie mix (zie tabel)?

Gebruik hiervoor de onderstaande formule:

De lengte van het insert hGR is: 2,3 kb (zelf invullen)

De grootte van de expressieplasmide pEGFP-C1 is: 4,7 kb (zelf invullen)

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

$$ng\ insert = \frac{ng\ plasmide * insert\ lengte\ in\ kb}{plasmide\ lengte\ in\ kb} * \frac{2\ (insert)}{1\ (plasmide)}$$

Vul nu de onderstaande tabel in:

Tabel 8: Verhoudingen ligatie mix

	1:2
pEGFP-C1 XhoI-BamHI (50ng/µl)	1µl
Insert hGR XhoI - BamHI (15 ng/ul)	?
5x ligatiebuffer	?
T4 ligase	1µl
water	?
Totaal volume	20µl

Kritisch denken opdracht 4.6

- a. Stel je hebt super competente cellen die een transformatie efficiëntie kunnen halen van $1 \cdot 10^9$ kolonie vormende eenheden per μg (KVE / μg) DNA. Voor de transformatie gebruik je 1ng plasmide DNA en plaat 1/1000ste uit. Hoeveel kolonies verwacht je?
- b. Vervolgens transformeer 2 μl plasmide (efficiëntie van 10^9 kolonie vormende eenheden per μg (KVE / μg) 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?

Kritisch denken opdracht 4.7

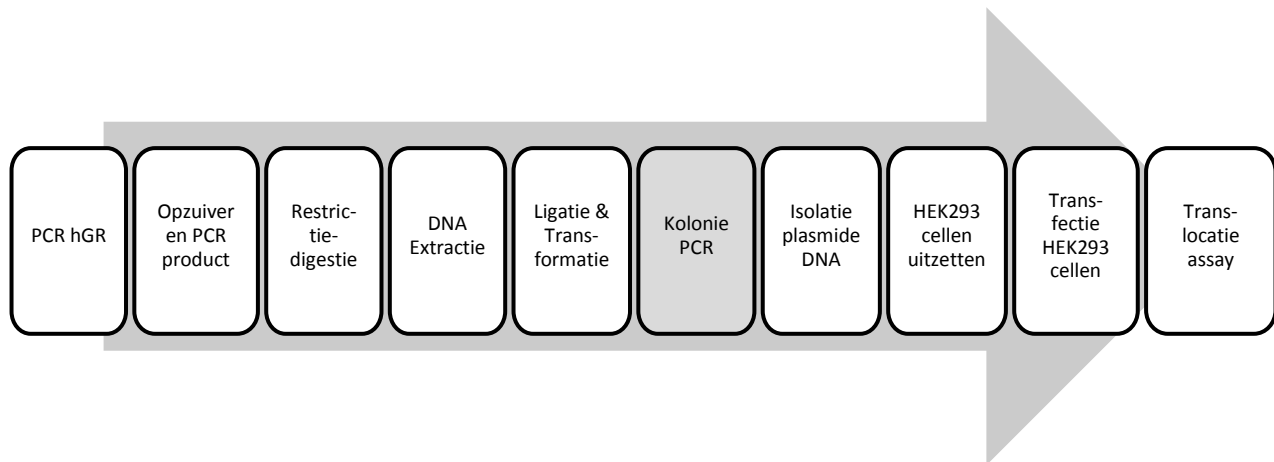
- a. Stel, op de LB plaat + kanamycine waar je je transformatie hebt uitgeplaat groeien geen kolonies.
 - i. Bij welke stappen zou er iets fout kunnen zijn gegaan?
 - ii. Welke experimenten zou je kunnen doen om er achter te komen wat er fout is gegaan?
- b. Stel, op alle LB platen + kanamycine groeien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

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 (*glucocorticoïd 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 plasmide 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 glucocorticoïd receptor en dus zullen alleen kolonies met het insert een PCR product opleveren.

Wat is het nut van een kolonie PCR?

Met wie zijn jullie het het meeste eens? Forumdeelnemer 1 of 2?

Author**Posts**

April 10, 2012 at 3:24 pm #8623



TL2010

Member

I wonder if anyone can clear this up for me?

I did it in a class once, and I know some people that do it routinely, but this idea of colony PCR seems unnecessary, at least for the things I do. Putting a gene insert into a plasmid, transforming that plasmid in to competent cells, expressing proteins.

The things I have read suggest that you would perform colony PCR to see if a particular colony contains the plasmid you are looking for, OR to see if your cloning actually worked, by checking to see if the plasmid size on an agarose gel matches what you would expect for correctly ligated plasmid/insert product.

For the first step, I don't really see necessity, particularly due to the usage of antibiotic resistance marker. If you transform in the evening on an amp plate and the plasmid confers amp resistance, doesn't the presence of colony in the morning virtually guarantee the presence of plasmid within that colony's cells, especially if you are going to transfer to liquid cultures right away in the morning?

The second purpose could be of merit, especially if you are not using ligation-independent methods, or if the insert is very large...

April 18, 2012 at 1:12 pm #18194



Heliothis

Member

Cloning isn't as easy as it sounds. When ligating an insert to a plasmid, some plasmids will self-ligate (when you have blunt-ended ligation, TA-cloning, non-dephosphorylated ends...) and thus plasmids without an insert will also be transformed into the bacteria. And sometimes you get "junk" ligated into your vector. Thus, by doing a colony PCR you will find out if the colony is a "good" transformant, i.e. carrying the plasmids + insert (then you get a PCR product of the expected size), or if it is a "bad" transformant, i.e. carrying plasmid only (small PCR product or no product at all depending on the primers) or plasmid + junk insert (band of unexpected size).

(bron: <http://bitesizebio.com/questions/topic/what-is-the-real-purpose-of-colony-pcr/>)

Experiment

Colony PCR

- Reagentia: PCR cocktail (5X Phire reaction buffer (eindconc. 1x), 2mM dNTP's (eindconc 200 μM), 10μM forward primer (eindconc 0,5μM), 10μM reverse primer (eindconc 0,5μM), H₂O, Phire hot start II DNA polymerase (eindconc 0.02%).
- Benodigdheden: PCR strip, ijs, ijsbak, pipetpuntjes
- Apparatuur: mini tafelcentrifuge, pipet

Primers voor de colony-PCR:

Forward hGR primer: 5'-AGATCCGCCACAACATCGAG-3'

Reverse hGR primer: 5'-TGATGGTTCACGTAGTGGGC-3'

Protocol PCR

1. Maak opdracht 2
2. Vanwege de kosten mogen jullie per practicumduo maximaal 2 kolonies testen. Als dit niet overeenkomt het antwoord op opdracht 2 overleg dan met je practicumassistent.
3. Neem 2 steriele 1,5ml 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 meenemen.*
4. Voeg 50μl steriel water toe aan de epjes.
5. Ent met steriele pipetpunt een **losliggende** kolonie aan en meng dit met het water in het epje.
 - *Teken eventueel voor je de kolonie aanent met een pen een cirkel op de petrischaal op de positie van de kolonie die je gaat aanenten en geef deze een naam/nummer.*
 - *Het maakt niet uit van welke plaat (verdunning) je kolonies aanprikt. Het gaat erom dat je een losliggende kolonie kunt enten.*
6. Pipetteer enkele malen op en neer zodat een homogene celsuspensie ontstaat.
7. Neem 1 nieuw steriel 0,2 PCR epje per kolonie en label ze op dezelfde manier als bij stap 4.
8. Voeg aan ieder epje 45μl PCR cocktail toe met een nieuw puntje.
9. Gebruik 5μl 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. Centrifugeren kort op de mini tabletop centrifuges om alle vloeistoffen in de punt van het PCR buisje te krijgen
11. De practicumassistent geeft aan wanneer jullie de monsters in het PCR apparaat kunnen zetten en het onderstaande programma gestart kan worden:

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

PCR programma		Temperatuur	Duur
Initiële denaturatie		98°C	30''
25 cycli	Denaturatie	98°C	5''
	Annealing	69°C	5''
	Extentie	72°C	45'' (10-15s/1kb)
Eind-extentie		72°C	1'
Bewaren		4°C	∞

12. Bereid als de PCR loopt alvast de agarose gelelektroforese en de miniprep startcultuur voor.

Agarose Gelelektroforese

- Reagentia: agarose, 1x TAE, Midori green, High range DNA ladder, Low range DNA ladder, Orange loading dye, DNA monster
- Benodigheden: gelbak, kammen 2x, 250/500ml erlenmeyer, 250ml maatcilinder weegbakje, spatel, eppenrek 0.2ml eppen
- Apparatuur: elektroforeseapparaat, weegschaal, pipet, magnetron, UV bak/ blue light illuminator, beschermkap

Protocol

11. Per practicumgroep zal één agarose gel gegoten worden. Je assistent verdeelt de taken.
12. 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 50x buffer en moet dus voor gebruik 50x verdund worden in totaal 2L in een maatcilinder met demi-water (bewaars resterende 1x TAE in een gelabelde afgesloten fles).*
13. Kook de agarose oplossing in de magnetron om de agarose op te lossen (duurt ongeveer 3,5 minuten).
 - *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!***
14. Laat de geloplossing afkoelen tot ongeveer 40-50°C en voeg 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.
15. 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.

16. Voeg 2µl Orange loading dye toe 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.*
17. Als de gel na 30-45 minuten 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 2mm onder de vloeistof staat. In de elektroforese bak gaat ongeveer 1L 1x TAE.
18. 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.
19. 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. Na ongeveer 45 minuten bij 150 V heeft de gel lang genoeg gelopen.
20. 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 op een dienblad en loop naar het gel Doc-systeem om de resultaten te bekijken
21. 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 50mg/ml (1000x stock)
- Benodigdheden: steriele bacteriebuisen, pipetpunten, entnaalden
- Apparatuur: pipet, schudstoof 37°C / 250rpm, brander

Protocol

1. Zorg voor een steriele en schone werkomgeving.
2. Gebruik twee pEGFP-C1_hGR transformanten op basis van de PCR analyse. Label 2 steriele bacteriebuisen per duo en 1 extra voor de negatieve controle en vul deze met 4 ml LB medium met Kanamycine (eindconcentratie van 50µg/ml (1000x stock is 50 mg/ml)).
3. Voeg 18µl van de bacterie-suspensie (bevat pEGFP-C1_hGR plasmide) toe aan 4ml LB medium met Kanamycine (50µg/ml).
4. Voeg voor de negatieve controle alleen een steriel geel puntje toe aan 4ml LB medium met Kanamycine (50µg/ml)
5. Zet de bacteriebuisen in de schudstoof en incubeer overnacht bij 37°C en 250rpm. De assistenten zetten de volgende dag jullie cultures in de koelkast.

Opdrachten

Kennis opdracht 5.1: Veiligheid en Milieu

- a. Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?

- b. Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- c. Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - i. Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - ii. Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kennis opdracht 5.2

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

Kritisch denken opdracht 5.3

Bepaal de transformatie efficiency en druk deze waarde uit in kolonies/ μg plasmide DNA. Ga er voor je berekening vanuit dat je 20ng gesloten circulair expressieplasmide hebt getransformeerd.

Kritisch denken opdracht 5.4

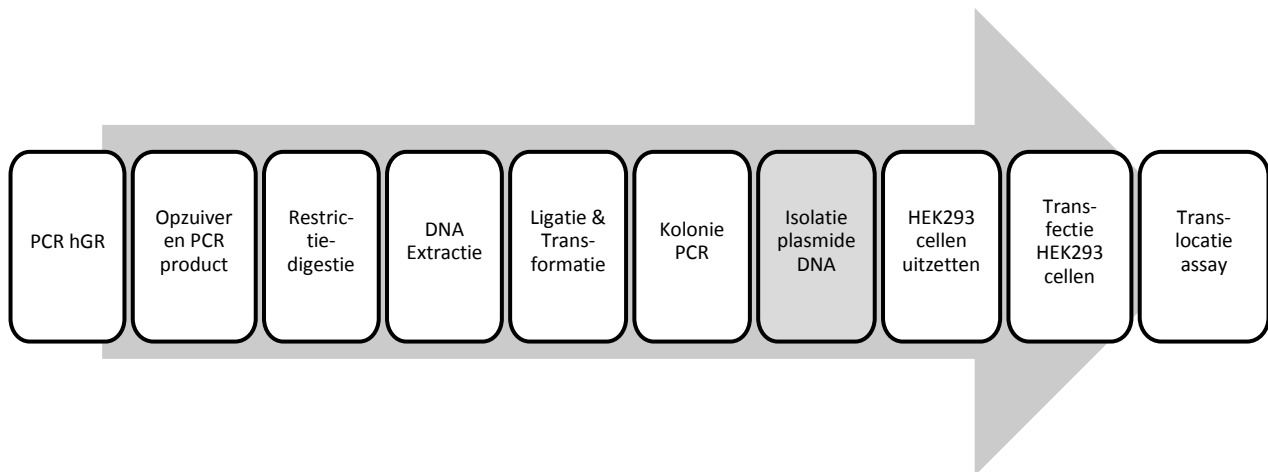
Waarom kan de PCR reactie direct op bacteriën worden uitgevoerd, ookal bevindt het plasmide DNA zich intracellulair?

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

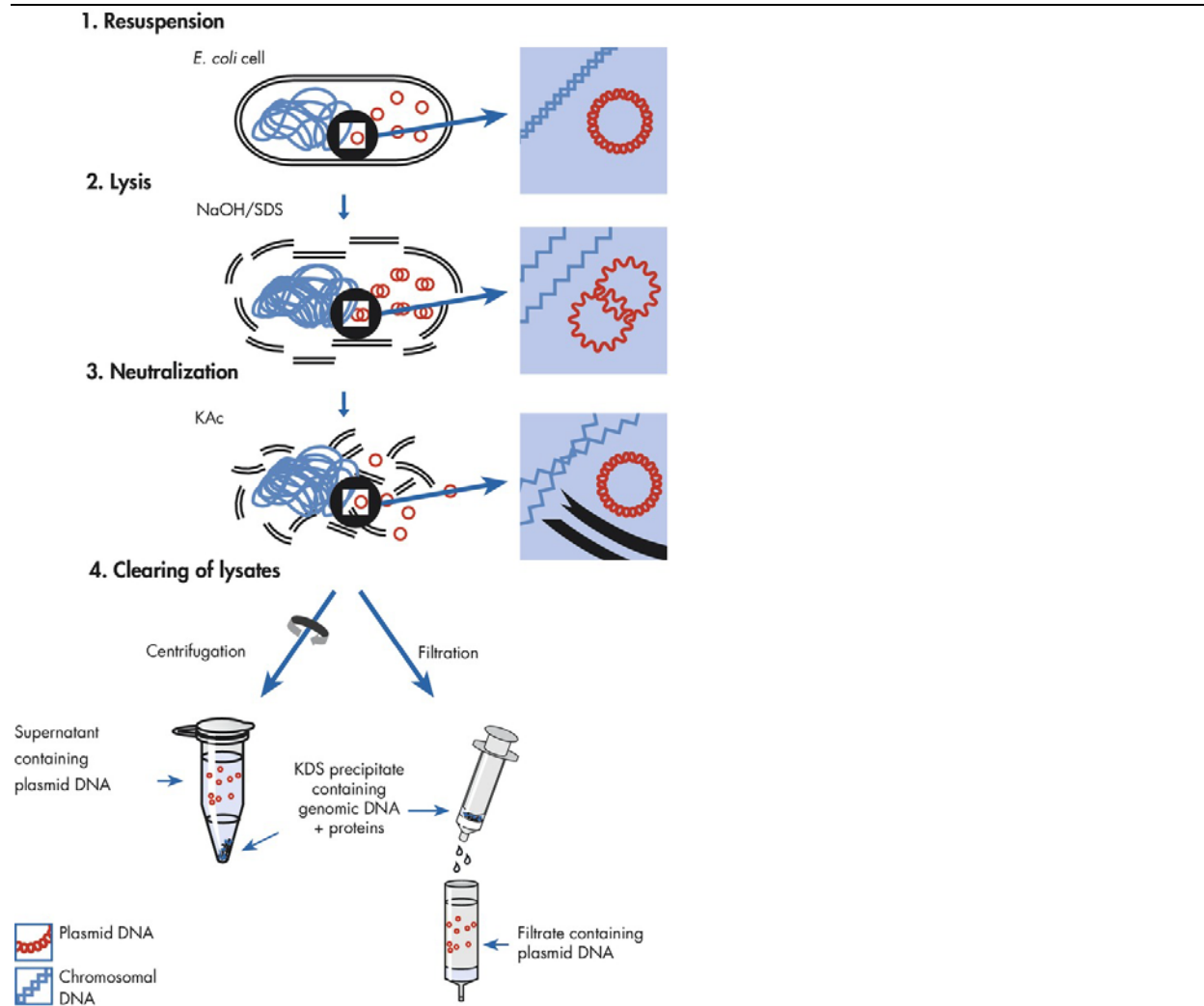
Het vorige practicum dagdeel hebben jullie gemerkt dat het relatief simpel is om een plasmide in een bacteriecel te brengen. De bacteriën zijn gegroeid en als het goed is, is jullie plasmide DNA vermenigvuldigd. Vandaag gaan jullie dit plasmide DNA weer uit de bacteriën isoleren. Ook deze techniek is 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, plasmide DNA en eiwitten denatureren en vervolgens alleen het plasmide DNA renatureert. 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. De principes van miniprep plasmide DNA isolatie staat in de tekst box en kort beschreven en worden overzichtelijk weergegeven in Figuur 1 (hint: goed te gebruiken voor het maken van de proefopzet).

Principle Qiaprep miniprep procedure

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 meest belangrijke stappen van plasmide DNA isolatie (bron: www.Qiagen.com).

This Week's Citation Classic®

CC/NUMBER 45
NOVEMBER 7, 1988

Birnboim H C & Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7:1513-23, 1979.

[Laboratoire de Génétique Moléculaire, Institut de Recherche en Biologie Moléculaire, Paris, France]

A screening procedure for extracting plasmid DNA from bacterial cells is described. Chromosomal DNA is selectively denatured by alkali treatment while covalently closed circular plasmid DNA remains double-stranded; on neutralization, a heavy precipitate forms leaving partially purified plasmid DNA in solution. [The *SC*® indicates that this paper has been cited in over 4,160 publications, making it the most-cited paper from this journal.]

H.C. Birnboim
Department of Experimental Oncology
Ottawa Regional Cancer Centre
Ontario Cancer Treatment and Research
Foundation
Ottawa, Ontario K1H 8L6
Canada

May 16, 1988

In 1978 I had arranged to take sabbatical leave from my position at the Atomic Energy of Canada laboratories in Chalk River to spend a year in Paris in the laboratory of Giorgio Bernardi. Several years earlier, Neil Straus, University of Toronto, and I had identified a class of repetitive sequences in the DNA of many higher eukaryotes that consisted of long polypyrimidine/polypurine tracts, up to 200 base pairs in length. As the recombinant DNA era was dawning, I chose to use my sabbatical period to clone some of these tracts in order to study them in more detail.

Necessity was the mother of invention, and the alkaline extraction procedure for screening plasmid DNAs grew out of a specific need related to this project. These tracts are resistant to acid treatment, which breaks the bulk of the DNA into fragments less than 20 nucleotides in length. The strategy I planned to use was to label individual clones from a mouse DNA library *in vivo* with ³²P, extract plasmid DNA in fairly pure form, treat it with acid, and then separate the products on a sequencing gel. I expected that perhaps 1 in 100 clones might have a long pyrimidine tract, which should be detectable

by autoradiography as a slow-moving band. Thus, the screening procedure had to be reasonably simple but also had to give fairly pure plasmid DNA largely free of chromosomal DNA, RNA, and other ³²P-containing material. In principle, the strategy worked; several clones of mouse DNA containing polypyrimidines were identified and one was eventually sequenced.¹

Although it had been shown earlier that alkaline conditions could be used selectively to denature bacterial chromosomal DNA and not covalently closed circular DNA, it required rather careful adjustment of pH using a pH meter.² Obviously, this would not be practical for tiny volumes. A copy of the *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*³ indicated that glucose could act as a buffer in the pH range 12-13, and then it was simply a matter of adjusting the ratio of alkali to glucose to give the proper final pH. On neutralization, chromosomal DNA forms a gel-like insoluble mass. High salt can precipitate high molecular weight RNA and protein-sodium dodecyl sulfate complexes. The final protocol combined these earlier findings into a single step.

I did not go to Paris armed with adequate fluency in the French language. This initially made it a little difficult for me to integrate into other projects in the lab, and I was thus able to concentrate on getting the alkaline extraction procedure to work. I used an old cylindrical electrophoresis system for running agarose gels because there was less competition for time on this piece of equipment. Janine Doly, a scientist in the lab at the time, befriended me and helped me set up some of the other techniques that were needed. In July 1979 the plasmid extraction method was introduced to a wider audience and tested for reliability when it was used as part of a European Molecular Biology Organization laboratory course on recombinant DNA held in Paris. It appeared to have passed the test. Further refinements and some applications to a preparative method were described subsequently, in 1983.⁴

The original publication continues to be widely cited as a basic tool of recombinant DNA technology because it has proved to be simple and reliable and produces fairly purified material. It led to no particular awards, but it is personally gratifying to have developed a procedure that has survived for nearly a decade.

Bron: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1988/A1988Q61660001.pdf>

Experiment

Mini-prep DNA isolatie

- Benodigdheden: 4ml overnachtcultuur, QIAprep® Spin Miniprep Kit (resuspensiebuffer (met RNase A en lyseBlue), cel lysisbuffer, neutralisatiebuffer, anti-endonuclease-buffer, ontzoutingsbuffer (met ethanol), elutiebuffer).
- Benodigdheden: pipetpunten 1,5ml epje, eppenrek
- Apparatuur: vortex, pipet, mini tafelcentrifuge, nanodrop

Protocol

1. Vortex de overnacht culturen voor gebruik.
2. Pipetteer 1,5ml van de cultuur in een 1,5 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.
4. Centrifugeer weer 3 minuten op maximale snelheid en pipetteer het supernatant eraf.
5. Herhaal stappen 3 en 4.
6. Resuspendeer het celpellet in 250µl resuspensiebuffer.
 - *Zorg ervoor dat de cellen volledig geresuspendeerd zijn door te vortexen of door op en neer te pipetteren zodat er geen klompjes cellen meer te zien zijn.*
7. Voeg 250µl cel lysisbuffer toe en mix goed door het epje 4-6 keer om te draaien (inverteren) tot de oplossing viskeus en blauw wordt.
8. Incubeer 5 minuten bij kamertemperatuur.
 - *Let op!: Niet vortexen en niet langer dan 5 minuten incuberen om fragmentatie van plasmide DNA te voorkomen.*
9. Voeg 350µl neutralisatie buffer toe en mix goed door het epje 4-6 keer om te draaien (inverteren).
 - *Niet vortexen om fragmentatie van het precipitaat te voorkomen.*
 - *Het lysaat moet troebel worden en witte vlokken vormen en de blauwe kleur volledig kwijt zijn.*
10. Centrifugeer 10 min op maximale snelheid om de celwand, de eiwitten en het chromosomaal DNA kwijt te raken.
11. 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.*
12. Centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid, leeg het opvangbuisje en plaats de kolom terug in het buisje.
13. Voeg 500µl anti-endonuclease buffer toe.
14. Centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid, leeg het opvangbuisje en plaats de kolom terug in het buisje.
15. Voeg 750µl ontzoutingsbuffer toe.
16. Centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid, leeg het opvangbuisje en plaats de kolom terug in het buisje.
17. 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 ethanol vervuiling in je eindproduct.*

18. Breng de kolom over naar een nieuw 1,5ml epje.

19. Pipetteer 30 μ l elutiebuffer op het midden van het membraan van de kolom.

- *Let op!: prik niet met de punt van de pipet in het membraan.*

20. Incubeer 2 minuten en draai 2 minuten af op maximale snelheid.

21. Pipetteer het eluaat nogmaals op een kolom en draai 2 minuut af op maximale snelheid.

22. Verwijder de kolom en bepaal de concentratie van de opbrengst met behulp van de Xpose.

Opdrachten

Kennis opdracht 6.1: Veiligheid en Milieu

- a. Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- b. Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- c. Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - i. Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - ii. Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kritisch denken opdracht 6.2

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

Kritisch denken opdracht 6.3

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

Kritisch denken opdracht 6.4

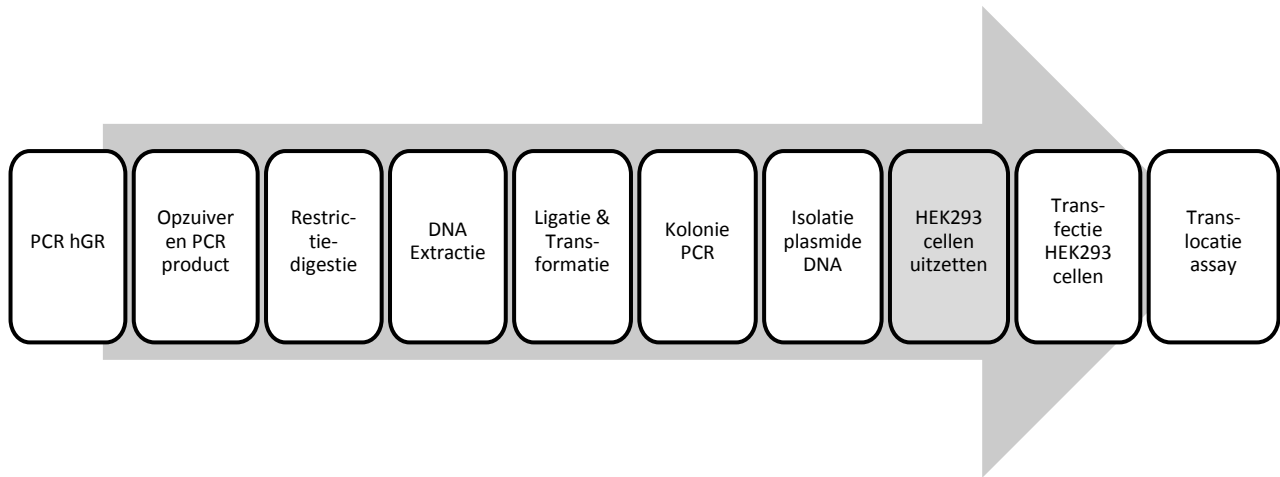
In verband met tijdsgebrek gaan we geen controle digestie uitvoeren. Stel dat we dat wel zouden doen. Welke restrictie-enzymen zou je hiervoor gebruiken? Teken het verwachte bandenpatroon in je labjournaal.

Dagdeel 7: Cellen uitzetten

Leerdoelen

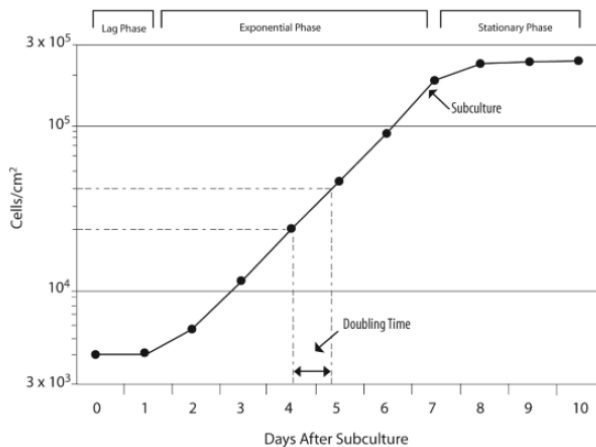
- Je kunt de theoretische achtergronden van cellen doorzetten beschrijven
- Je kunt de bovenstaande techniek correct uitvoeren

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vandaag ga je HEK293 cellen doorzetten op glaasjes in een 12-wells plaat in de juiste cel dichtheid. Dit zijn noodzakelijke voorbereidende stappen om het volgend dagdeel onder optimale condities te kunnen transfecteren. Onder transfecteren verstaan we het introduceren van vreemd DNA (expressieplasmide) in eukaryoten cellen (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 je de glaasjes het beste steriel in de 12-wells plaat kunt krijgen is te zien op de kennisclip (zie BlackBoard).



Figuur 1: Groeicurve van gekweekte cellen (bron: <http://www.lgcstandards.com>)

De hoogste transfectie efficiëntie wordt behaald als cellen in de logaritmische fase (log fase of exponentiele fase) van hun groei zitten. Om hechtende cellen in de juiste dichtheid te kunnen uitzetten moeten ze 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 alvleesklier. 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. Je kunt het daarom straks gebruiken voor knippen van de eiwitten die ervoor zorgen dat cellen kunnen hechten aan de bodem van de kweekfles.

Na de trypsinisatie worden de cellen geteld om ze in de juiste dichtheid te kunnen uitzetten. Hiervoor gebruik je een hemocytometer of Bürker telkamer. Naast het totaal aantal cellen kunnen hemocytometers ook worden gebruikt om cel viabiliteit (aantal doden tov aantal levende cellen) te bepalen. Het onderscheid tussen levende en dode cellen kan aangetoond worden met trypaanblauw. Deze testkleurstof kleurt dode cellen blauw. Levende cellen nemen de kleurstof niet op en blijven ongekleurd.

Samengevat: vandaag gaan jullie steriele glaasjes plaatsen in een 12-wells plaat; HEK293 cellen trypsiniseren, tellen en uitzetten.

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 cel morfologie 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
- Steriele benodigheden: pipetten van 5ml en 10ml, 15ml buisjes, dekglasjes, 12 well kweek plaat
- Apparatuur: pipetboy, brander, omkeermicroscop, 37°C incubator met 5% CO₂

Protocol

Cellen worden 1 op 4 doorgezet van een T75-kweekfles naar een 12-wells plaat.

Vorbereiding:

1. Trek een labjas aan van het kweek-lab.
 - *Trek handschoenen aan en maak ze steriel door met 70% ethanol kort op je handschoen te spuiten.*
2. Verwarm alle vloeistoffen die je gaat gebruiken voor op 37°C
3. Neem je werkplek in de kweekkast af met 70% ethanol en een papieren doek.
4. Neem alles dat van buiten af de kweekkast ingaat af met ethanol.
5. Controleer de volgende punten als je de cellen onder de microscoop bekijkt:
 - a) Zien ze er gezond uit?
 - b) Hoe confluent zijn je cellen?
 - *Je zet het liefst door bij een confluentie van 80-90%*
 - c) Is er mogelijk sprake van een infectie?
 - *Is het medium geel en zijn de cellen niet helemaal confluent? Is het medium troebel? Is er bacterie groei waarneembaar op de plekken tussen de cellen? Controleer ook op de groei van schimmels, vooral bij de hals van de fles.*
 - d) Drijven er veel dode cellen in het medium?
 - e) In welke fase zitten de cellen? (log fase of differentiatie fase)
 - *In de log fase zijn cellen 'rond' en delen. Cellen in differentiatie fase zijn plat en uitgerekt, en zitten dan heel goed gehecht aan de bodem.*
 - f) Zijn de cellen goed gehecht?

Dekglasjes in welltjes plaatsen

6. 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 glasje voorzichtig in 70% Ethanol.
 - c) Vlam het glasje even af in de blauwe vlam
 - d) Laat het glasje 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 wellletjes die je nodig hebt een dekglasje bevatten.

Trypsiniseren:

7. Zuig het medium van de celweek af met een steriele wegwerppipet. Zorg ervoor dat de cellen zo kort mogelijk droog staan en ga zo snel mogelijk door met de volgende stap
 - *Houd de kweekfles schuin zodat je gemakkelijk kan afzuigen en de cellen zo min mogelijk verstoort*
8. Was de cellen met 5ml PBS
 - *Houd de kweekfles scheef en pipetteer niet direct op de cellen maar op de rand van de kweekfles.*
 - *Het wassen is nodig om PBS te verwijderen dat de activiteit van trypsine remt en om cel debris te verwijderen.*
9. Zuig de PBS van de celweek af met een steriele wegwerppipet.
10. Herhaal de stappen 8 en 9.
11. 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 en pipetteer niet direct op de cellen*
12. Plaats de cellen 2–3 minuten terug in de stoof bij 37°C.
13. Voeg 5ml DMEM met FBS toe met een 10ml wegwerppipet om de reactie te stoppen.
14. Pipetteer een aantal keer (ongeveer 5 keer) op en neer
 - *Zet bij het terug pipetteren 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 eventueel nog aan elkaar vastzaten loslaten en je een mooie 'single cell suspension' krijgt.*
 - *Let op het juiste aantal op en neer pipetteren is niet eenvoudig te bepalen, maar vergt ervaring: te weinig pipetteren kan resulteren in celklompjes, te veel in celdood.*
15. Controleer onder de microscoop of je cellen los liggen ('single cell')

Cellen uitzetten

16. Breng het eindvolume naar 12ml medium met 10% FBS + gentamycine.
 - *Bedenk van te voren altijd in welk eindvolume je de cellen wilt hebben. Het eindvolume is afhankelijk van de plaat/schaal waarnaar je doorzet en in welke verhouding je doorzet. We gaan de cellen ¼ (van 1 schaal naar 4 schalen) doorzetten, 12 ml is dan een fijne hoeveelheid om door 4 te delen.*
17. 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.*
18. Vul twee buizen aan tot 12ml en meng voorzichtig.
19. Pipetteer hiervan 1ml celsuspensie per well in je 12-well plaat en doe dit voor alle benodigde wellletjes.

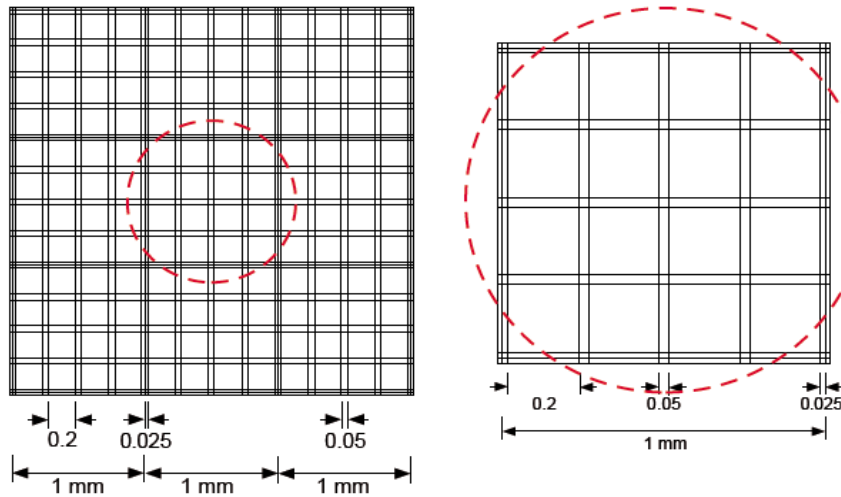
- *Werk snel EN zorgvuldig. Controleer of de cellen niet uitgezakken, want dit kan de celdichtheid per well beïnvloeden. Als dit wel het geval is pipetteer dan 1 a 2 keer voorzichtig en rustig op en neer.*
- *Controleer of alle dekglasjes op de boden liggen, als ze drijven kunnen er geen cellen op de glasjes groeien, maar dan groeien ze alsnog op het plastic van de kweekfles en heb je een probleem als je straks celpreparaten wilt maken.*

20. Plaats de cellen terug in de incubator en maak nog even een 'kruis' met je plaat om de cellen goed te verdelen.

- *Hiermee voorkom je dat cellen zich concentreren in het midden van de well.*

Cellen tellen

- Reagentia: 0,2% trypaanblauw in PBS / 10mM NaN₃, cellen in suspensie, 70% ethanol
- Benodigdheden: pipetpunten, 15ml buis, 1,5ml epje, tissue
- Apparatuur: telkamer van Bürker, microscoop, pipet, centrifuge



Figuur 2: Telkamer van Bürker (www.scienceservices.eu) heeft twee telnetten (in het Engels grid) met een kamerdiepte van 0,1mm en een oppervlak van 3 bij 3 mm (linker plaatje). Elk telnet bestaat uit 9 grootkwadraten van 1mm² (rechter plaatje) dat weer is onderverdeeld in 16 kwadraatgroepen (van 0,2 bij 0,2 mm), die gebruikt worden voor de telling van de cellen.

Protocol

- 1) Gebruik voor dit experiment 1ml van je geresuspendeerde celsuspensie (na de trypsinisatie).
- 2) Centrifugeer 3 minuten bij 500 RPM.
- 3) Resuspendeer de cellen in 3ml medium (DMEM zonder toevoeging)
- 4) Pipetteer hiervan 150µl in een 1,5ml epje.
- 5) Voeg 150µl 0,2% Trypaanblauw toe.
- 6) Meng door voorzichtig een paar keer op en neer te pipetteren.
- 7) Incubeer 5-15 minuten op kamertemperatuur.
- 8) Maak telkamer van Bürker schoon met 70% ethanol en droog met een papieren doekje.
- 9) Doe hetzelfde met het dekglasje.

- *Dekglasje worden hergebruikt, dus wees voorzichtig*
- 10) Plaats het dekglasje op de telkamer van Bürker en zet het voorzichtig vast met de bijbehorende klemmen zodat je 'Newtonringen' ziet.
- *Newtonringen zijn ringen die ontstaan door interferentie van licht dat weerkaatst wordt tussen twee oppervlakken die slechts een kleine, maar wel variërende afstand tot elkaar hebben. Als er een dun luchtlaagje tussen het dekglasje en het glas van de telkamer van Bürker zit dat niet overal even dik leidt tot het ontstaan van gekleurde ringen en vlekken. Het verschijnsel is vernoemd naar Isaac Newton die het als eerste analyseerde. De vroegste omschrijving komt uit het boek *Micrographia* van Robert Hooke gepubliceerd in 1664 (<http://nl.wikipedia.org/wiki/Newtonring>).*
- 11) Pipetteer volgens onderstaande instructies 5µl van de celsuspensie met trypaanblauw in elke telkamer:
- Zet de pipet voorzichtig in de hoek waar de telkamer van Bürker en het dekglasje samenkomen.
 - Pipetteer de suspensie voorzichtig, door capillaire werking wordt deze opgenomen door de kamer.
 - De kamer moet helemaal gevuld zijn, maar niet overladen
 - Zorg dat er geen luchtbelllen ontstaan.
- 12) Plaats de telkamer van Bürker onder de microscoop en visualiseer het telnet bij een 10x vergroting.
- 13) Tel het aantal levende en het aantal dode cellen:
- *Tel in totaal 25 kwadraatgroepen van 0,2 bij 0,2mm.*
 - *Als er cellen op de lijnen 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.*
 - *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.*
- 14) Maak de telkamer en het dekglasje schoon met 70% ethanol, droog af en leg het terug.

Opdrachten

Kennis opdracht 7.1: Veiligheid en Milieu

- a) Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- b) Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- c) Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - i. Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - ii. Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kritisch denken opdracht 7.2

Maak een indeling van je 12-wells plaat op basis van de onderstaande vragen:

- a) Hoeveel wellletjes van een 12-wells plaat heb je nodig per duo
- b) Welke plasmiden ga je in welk wellletje transfecteren?
- c) Welke wellletjes ga je met wat incuberen met antagonisten en/of steroïden?
- d) Welke controles komen in welk wellletje?

Kennis opdracht 7.3

Beantwoord de volgende vragen bij het 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?

Kennis opdracht 7.4

Waarom trypsineer je bij 37°C en is belangrijk om niet te lang en niet te kort te trypsiniseren?

Kritisch denken opdracht 7.5

Cellen tellen

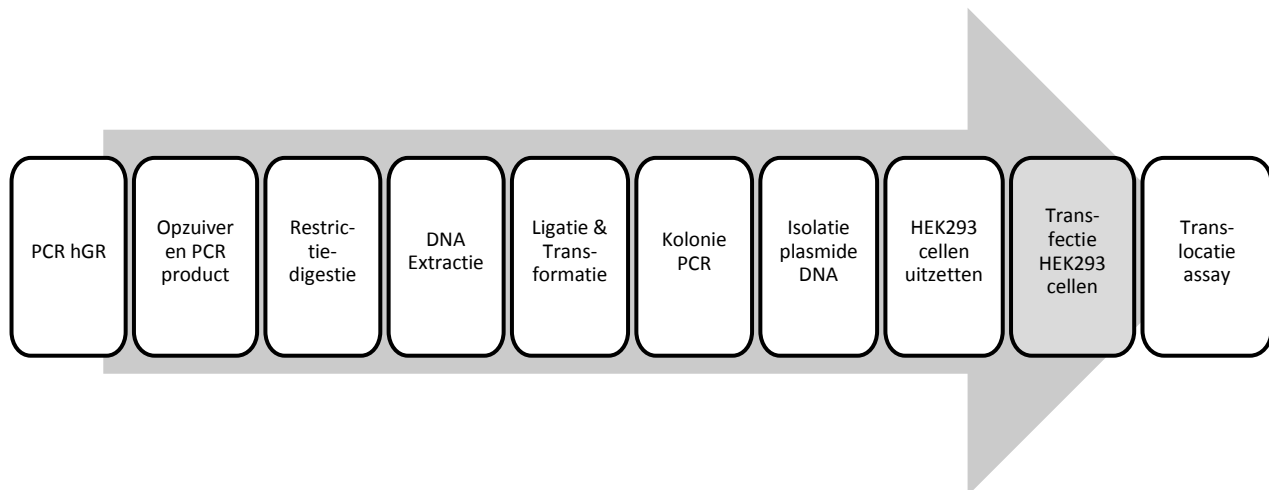
- a) Bereken het aantal cellen per ml.
- b) Hoeveel levende cellen zaten er in de fles die je door hebt gezet?
- c) Hoeveel levende cellen heb je per well uitgeplaat?
- d) Stel dat je cellen in 5ml medium met een celdichtheid van $2,4 \cdot 10^4$ cellen /ml wilt doorzetten, hoe zou je dit doen? Denk aan de formule $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$, waarbij V het volume is en C de concentratie. Gebruik voor deze berekening als uitgangspunt de hoeveelheid cellen die je hebt gerekend bij punt 1.
- e) Bereken het percentage levende cellen:

Dagdeel 8: Calciumfosfaat transfecties

Leerdoelen

- Je kunt de theoretische achtergronden van de calciumfosfaat transfectie methode
- Je kunt de bovenstaande techniek 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 maken om de K_m en de V_{max} van een enzymreactie te berekenen

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



Inleiding

Vandaag ga je het construct (hGR-GFP) 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 glucocorticoïd receptor green-fluorescent protein (GR-GFP) fusie-eiwit gesynthetiseerd worden dat jullie het volgend dagdeel gaan bestuderen. Een veel gebruikte, efficiënte en goedkope methode is 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.

Experiment

Transfectie

- Reagentia: 60-70% confluyente HEK293 cellen, DMEM medium (met antibiotica gentamicine, glutamine en 10% foetaal kalf serum, HEPES buffered Saline), 2,5M CaCl₂, 2X HBS pH 7.05, DNA 1µg/µl
- Benodigdheden steriel: pipetpunten, epjes, eppenrek
- Apparatuur: pipet, vortex, incubator 37°C 5% CO₂, 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.
 - *Voorkom dat cellen droog komen te staan, dus verwijder niet het medium van teveel welletjes tegelijk.*
 - *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 deel 1 van de transfectiemix in een steriel 1,5ml epje aan de hand van je transfectieschema deel 1.
3. Zet de vortex op constant en op ongeveer 75% van de maximale snelheid. Houd het epje bovenaan vast met de deksel open en zet het op de vortex, en voeg nu met 2 druppels per seconde 2xHBS toe (transfectieschema deel 2).
 - *Door de 2x HBS langzaam bij de CaCl₂/DNA oplossing te pipetteren ontstaat een fijner precipitaat dat zorgt voor een hogere transfectie efficiëntie.*
1. Druppel 100µl van de transfectiemix per well snel en voorzichtig (niet op cellen spuiten) op de cellen (niet zwenken)
2. Zet de cellen voorzichtig terug in de CO₂ stoof bij 37°C tot het volgende dagdeel.

Opdrachten

Kennis opdracht 8.1: Veiligheid en Milieu

- a. Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- b. Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- c. Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - i. Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - ii. Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kritisch denken opdracht 8.2: Pipetteerschema transfecties

Maak een transfectieschema en neem hierin mee dat je een mastermix wilt gebruiken en voor één well extra maakt. In elke well van een 12 well plaat gaat 1ml medium, je gaat 3 wellen transfecteren maar maakt voor 4 wellen. Bereken de samenstelling en hoeveelheid van de mix als bij 1ml kweekmedium 100µl transfectie mix gaat.

Tabel 1: Transfectieschema

Transfectie-mix deel 1	Reagentia	Berekening hoeveelheid reagentia	Totaal voor 4 wellletjes
	2.5M CaCl ₂	1/10 van totaal volume deel 1	x µl
	DNA	¼ w/v van CaCl ₂	5µg = x µl
	Steriel H ₂ O		aanvullen x µl
			Totaal deel 1: 200µl
Transfectie-mix deel 2			
	2x HBS	Verdunnen naar 1x HBS	x µl
			Totaal deel 2: x µl
			Totaal: x µl

Computer opdracht 8.3

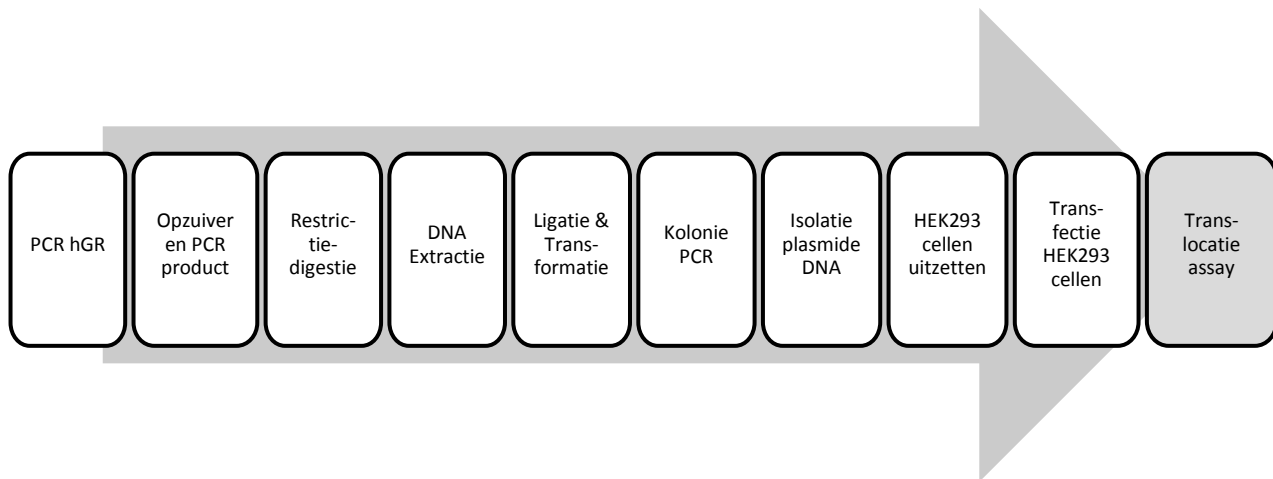
Maak de opdracht over enzymkinetiek die te downloaden is van Blackboard. In deze opdracht leer je dat een enzymreactie volgens een bepaalde wetmatigheid verloopt en dat er verschillende factoren zijn die de snelheid van een enzymreactie beïnvloeden.

Dagdeel 9: Translocatie assay

Leerdoelen

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

Waar zijn we nu ten opzichte van ons einddoel?



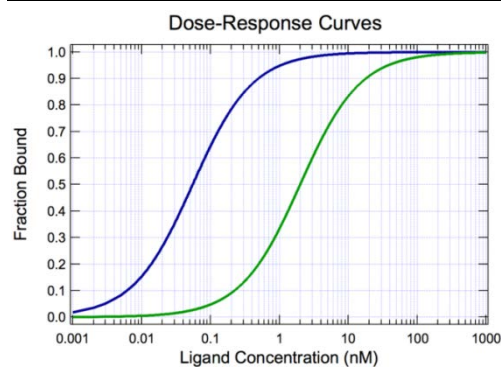
Inleiding

Vandaag ga je met behulp van de fluorescentie microscoop controleren of het glucocorticoïd receptor green-fluorescent protein (GR-GFP) fusie-eiwit wel tot expressie wordt gebracht in het juiste celcompartiment in HEK293 cellen. Vervolgens ga je bestuderen of na activatie van de glucocorticoïd receptor translocatie plaats vindt van het cytoplasma naar de nucleus en of je deze translocatie experimenteel kunt beïnvloeden. De conditie die je gaat testen is afhankelijk van de groep waarin je zit. Om dit te kunnen doen moeten eerst de getransfecteerde cellen worden geïncubeerd 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 intact blijft. Daarom ga je 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 computer opdracht fylogenie) op het betreffende targetmolecuul en vormt hierbij een complex. Deze binding wordt bewerkstelligd door inter-moleculaire 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 glucocorticoïd 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 bindingsplaatsen 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 invloed hebben onderzoeken met behulp van een zogenaamd translocatie assay. Tijdens deze assay gaan jullie de translocatie het glucocorticoïd 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 effect van de antagonist Mifepriston

Groep 3 effect van de antagonist Geldanamycine (17-AAG)

Experiment

Translocatie assay

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

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

Let op: Bescherm de cellen tegen licht!

Protocol

Translocatie assay

1. Ververs het medium (1ml) van de cellen minimaal 1 uur voor de behandeling.
2. Indien van toepassing: incubeer de antagonist(en) een uur in de incubator bij 37°C.
 - *De groepen die antagonist(en) (Mifeprestone of 17AAG) toevoegen moeten een uur voor het toevoegen van cortisol de antagonist toevoegen.*
3. Voeg de steroïden (cortisol of corticosteron) toe en incubeer 30-60min in de incubator bij 37°C.

Fixeren en inbedden

4. Verwijder het medium waaraan de antagonist(en) en/of steroïden zijn toegevoegd van de cellen.
5. Was de cellen 5 minuten met 1000µl PBS.
6. Fixeer de cellen 10-15 minuten in 300µl 4% PFA.
7. Verwijder de PFA oplossing.
 - *Let op afval verwerking!*
8. Was de cellen 2X met 500µl PBS.
 - *Let op afval verwerking van eerste wasstap!*
9. Druppel een 20µl VectaSHIELD op een gelabeld voorwerpglas.
10. Haal de objectglasjes voorzichtig uit de 12-welletjes en leg ze op zijn kop (cellen naar beneden) op het voorwerpglas met VectaSHIELD + DAPI.
11. De celpreparaten kunnen enkele weken bewaard worden in een doos in het donker bij 4°C.

Opdrachten

Kennis opdracht 9.1: Veiligheid en Milieu

- Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - Welke waarschuwingssymbolen zijn hiervoor van toepassing?
 - Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Kritisch denken opdracht 9.2

Tabel 1: Standaardoplossing voor translocatie assay

Steroïden/Antagonisten	$1 \cdot 10^3$ nM	$1 \cdot 10^4$ nM	$1 \cdot 10^5$ nM	$1 \cdot 10^6$ nM	Eindconcentratie per well (nM)
Cortisol	x	x			100nM
Cortisosterone		x	x		100nM
Mifeprestone			x	x	1000nM
17AAG			x	x	10000nM

Maak een pipetteerschema en geef hierin aan hoeveel (volume en eindconcentraties) en wat je gaat pipetteren. Gebruik hiervoor de bovenstaande tabel en bedenk zelf welke standaardoplossing je gaat gebruiken.

Kennis opdracht 9.3

- Waarom worden cellen, voordat ze bekeken worden met de fluorescentie microscoop, gefixeerd?
- Na het fixeren gebruiken we voor het inbedden VectaSHIELD met DAPI. Welk organel wordt door DAPI gekleurd en waarom maken we hiervan gebruik?

Opdracht 9.4: Kalibratie translocatie assay

Om je goed voor te bereiden op het analyseren van je eigen resultaten achter de fluorescentie microscoop hebben we een aantal foto's van resultaten van vorig jaar op BlackBoard gezet. Het is de bedoeling dat ieder duo alle experimentele condities bekijkt en start met de positieve controle, doe vervolgens de negatieve controle en dan de verschillende experimentele condities. Probeer per conditie 20 cellen te tellen en te bepalen of er sprake is van translocatie, partiele translocatie of geen translocatie. Als jullie klaar zijn bespreek dan de verschillende uitkomsten met elkaar en beantwoord de volgende vragen:

- Waar moet je op letten bij het afstellen van de fluorescentie microscoop?
- Waar moet je op letten als je foto's achter de fluorescentie microscoop gaat maken?
- Waar moet je op letten als je gaat tellen?
- Zijn er verschillen tussen de duo's en zo ja:
 - Waar komen deze verschillen vandaan?
 - Zijn deze verschillen acceptabel?
 - Moet je de manier waarop je translocatie scoort aanpassen voor je eigen data en waarom?

Dagdeel 10: Fluorescentie microscopie

Leerdoelen

- Je kunt de techniek achter een fluorescentie microscoop beschrijven
- Je kunt omgaan met de fluorescentie microscoop en deze op de juiste manier instellen
- Je kunt correcte en representatieve foto's maken van je preparaten

Inleiding

Vandaag ga je de resultaten van de translocatie assay bekijken onder de fluorescentie microscoop en hiervan foto's maken. Dit is de enige mogelijkheid om foto's te maken! Zorg ervoor dat de foto's van de hoogst haalbare kwaliteit zijn zodat je het volgend dagdeel deze foto's kunt analyseren. Dit betekent concreet dat de foto's: representatief moeten zijn voor je preparaat, voldoende cellen weergeven, de juiste licht intensiteit hebben en scherp zijn.

Begin straks eerst met de het maken van foto's van het preparaat met de positieve controle, vervolgens met de negatieve controle en ten slotte met de experimentele conditie. Je maakt van ieder preparaat drie foto's met twee verschillende filters (DAPI en GFP), dus per preparaat zes foto's. Aangezien je drie preparaten hebt maak je per duo 18 foto's.

Succes en veel plezier!

The Fluorescence Microscope

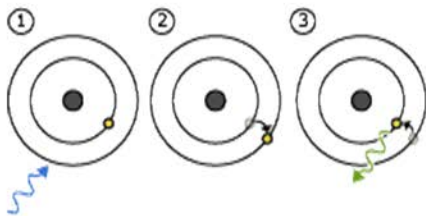
In fluorescence microscopy, the sample you want to study is itself the light source. The technique is used to study specimens, which can be made to fluoresce. The fluorescence microscope is based on the phenomenon that certain material emits energy detectable as visible light when irradiated with the light of a specific wavelength. The sample can either be fluorescing in its natural form like chlorophyll and some minerals, or treated with fluorescing chemicals.

The Sample Gets Excited

The basic task of the fluorescence microscope is to let excitation light radiate the specimen and then sort out the much weaker emitted light to make up the image. First, the microscope has a filter that only lets through radiation with the desired wavelength that matches your fluorescing material. The radiation collides with the atoms in your specimen and electrons are excited to a higher energy level. When they relax to a lower level, they emit light. To become visible, the emitted light is separated from the much brighter excitation light in a second filter. Here, the fact that the emitted light is of lower energy and has a longer wavelength is used. The fluorescing areas can be observed in the microscope and shine out against a dark background with high contrast.

Specific Details are Marked

Fluorescence microscopy is a rapid expanding technique, both in the medical and biological sciences. The technique has made it possible to identify cells and cellular components with a high degree of specificity. For example, certain antibodies and disease conditions or impurities in inorganic material can be studied with the fluorescence microscopy.



Principle of Fluorescence

1. Energy is absorbed by the atom which becomes excited.
2. The electron jumps to a higher energy level.
3. Soon, the electron drops back to the ground state, emitting a photon (or a packet of light) - the atom is fluorescing.

Bron: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/>

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. Henriksen/SCANPIX
Osamu Shimomura



Photo: J. Henriksen/SCANPIX
Martin Chalfie



Photo: UCLSD
Roger Y. Tsien



Jellyfish, Aequorea victoria

Protocol foto's maken:

Tip: vergeet niet alle instellingen te noteren in je labjournaal

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. Sluit de shutter (1) voor het UV licht.
5. Zet de oculair-camera-switch (2) op oculair (naar binnen).
6. Zet het GFP filter voor met behulp van de schuif filters (4).
7. Open de shutter voor het UV licht.
8. Plaats je preparaat op de tafel van de microscoop en stel scherp met de scherpstelschroef (3) op de 10x vergroting.
9. Bekijk je volledige preparaat oppervlakkig en zoek vervolgens een representatief gedeelte van je preparaat en centreer dit.
10. Zet de oculair-camera-switch op camera.
11. Als je beeld nog een beetje wazig is op het scherm stel dan nog een beetje scherp met behulp van de scherpstelschroef op de microscoop.
 - *De foto's die de camera gaat maken komen overeen met het beeld op je scherm. Dit is als alles goed staat afgesteld precies het zelfde als wat je door je oculair ziet.*
12. Stel de gain in op ongeveer 0.35 (maximaal 0.50).
13. Vink het AEC vakje uit en weer aan (dit stelt automatisch een exposure time in aan de hand van je beeld).
14. Klik op File -> Capture Image
15. Sluit de shutter op de microscoop
16. Klik op File -> Save as
 - *Zorg ervoor dat je een duidelijke naam geeft zodat je nog weet van welk sample deze foto is.*
 - *Check of de foto's inderdaad worden opgeslagen*
17. Wissel naar het DAPI filter met de schuif filters.
 - *Let op: verander geen andere instellingen je wil op precies dezelfde plek een DAPI foto maken. Anders is het straks niet mogelijk om je GFP en DAPI foto's over elkaar te leggen.*
18. Open de shutter
19. Klik op File -> Capture Image
20. Sluit de shutter op de microscoop
21. Klik op File -> Save as
 - *Zorg dat je nog kan terugzien bij welke GFP foto deze DAPI foto hoort!*
22. Maak 3 GFP én DAPI foto's per preparaat (dus een totaal van 18 foto's voor alle controles en de experimentele conditie).



1. Shutter
2. Oculair-camera-switch
3. Scherpstelschroef
4. Schuiffilters

Figuur 1: Overzicht fluorescentie microscoop

Opdrachten

Kennis opdracht 9.1: Veiligheid en Milieu

- a. Welke risicovolle handelingen zijn er dit dagdeel?
- b. Zijn er dit dagdeel speciale afvalvaten voor biologisch of chemisch afval nodig en zo ja welke?
- c. Werken we dit dagdeel met gevaarlijke stoffen en zo ja welke?
 - i. Welke waarschuwingspictogrammen zijn hiervoor van toepassing?
 - ii. Welke H en P zinnen zijn hiervoor van toepassing?

Dagdeel 11: Analyse resultaten

Leerdoelen

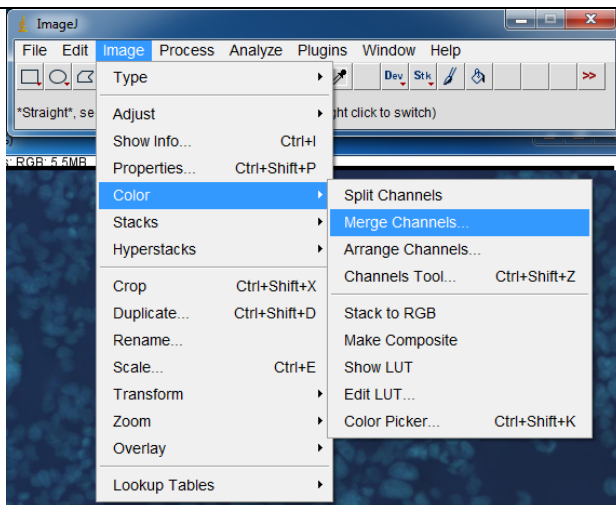
- Je kunt met behulp van ImageJ de resultaten analyseren
- Je kunt de bijbehorende statistiek toepassen
- Je kunt de keuze voor de toegepaste statistische test toelichten

Inleiding

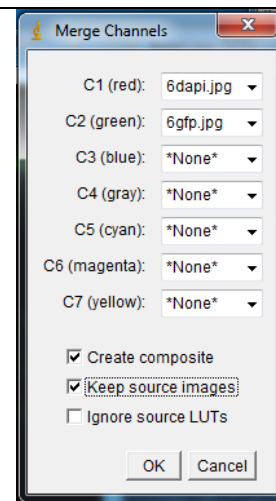
Vandaag ga je de foto's van de verschillende preparaten analyseren door gebruik te maken van het programma ImageJ. De verkregen resultaten worden per zaal in een Excelsheet ingevoerd en op BlackBoard gezet zodat je dit kunt gebruiken voor het schrijven van het onderzoeksverslag.

Protocol resultaten analyse met ImageJ

1. Download ImageJ en installeer: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>
2. Sleep een GFP en bijbehorende DAPI file in de ImageJ toolbar.
3. Ga naar Image -> Color -> Merge channels (zie figuur 1)



Figuur 1: GFP en DAPI afbeelding 'mergen' in een afbeelding.



Figuur 2: Instellingen voor 'mergen' van afbeeldingen.

4. Selecteer bij C3 (blauw) DAPI en bij C2 (green) GFP
5. Zet create composite en keep source image aan
6. Klik op OK
7. Nu heb je een mooie merge van je celkernen (DAPI) en je GFP (hGR-GFP)!
8. Ga naar Plugins -> Analyze -> Cellcounter
9. Zet keep original aan
10. Selecteer de afbeelding waar je cellen wilt tellen en klik op initialize
11. Selecteer een type 1

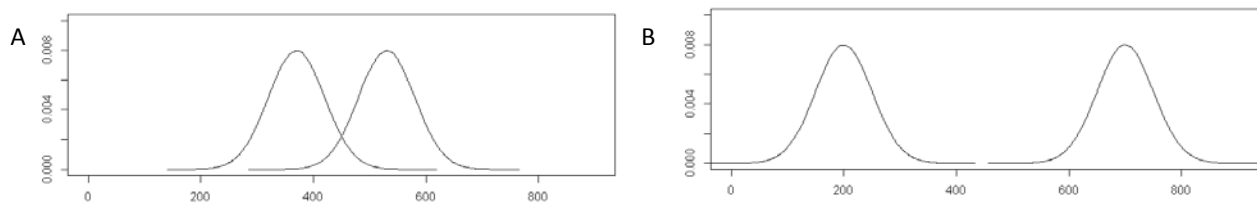
12. Je kan inzoomen op een deel van de afbeelding met behulp van het vergrootglas in de ImageJ toolbar en de rechter en linker muisknop
13. Als je goed hebt ingezoomd zodat je cellen kan tellen druk je op het vierkantje in de ImageJ toolbar
14. Als je nu op een cel klikt, komt er een 1tje te staan en telt hij hem als een type 1 cel
15. Vink het vakje delete mode aan om punten te verwijderen
16. Tel per conditie minimaal 50 cellen.

Type 1	Cellen waar volledige translocatie is opgetreden (alleen GFP signaal in de nucleus)	
Type 2	Cellen waar partiële translocatie is opgetreden (GFP signaal zichtbaar in zowel nucleus als cytoplasma)	
Type 3	Cellen waar geen translocatie is opgetreden (alleen GFP signaal in het cytoplasma; nucleus zichtbaar als 'uitsparing')	

17. Wanneer je klaar bent met tellen. Klik je op Results -> File -> Save as
18. Dit bestand kan je openen in Excel.
19. Voer je resultaten in op de computer bij je awesome assistant!

Protocol berekenen Z-factor in Excel

Nu ga je de Z-factor uitrekenen, deze zegt iets over de robuustheid van je assay. Hiervoor gebruik je je positieve en negatieve controles. Voor een robuust assay moeten de waarden bij je positieve en negatieve controle zo ver uit elkaar liggen zodat het niet mogelijk is dat een waarde en bij je positieve en bij je negatieve controle aansluit. Om te kijken hoe ver je positieve en negatieve controle uit elkaar liggen gebruik je gemiddeldes van deze condities. Hierbij is ook de spreiding van deze condities belangrijk, wanneer er een grote spreiding is kan er overlap tussen je positieve en negatieve controle optreden terwijl je gemiddeldes ver uit elkaar liggen.



Figuur 1: Uitkomsten Z-factor: (A) Twijfelachtig assay (B) Robuust assay

$$Z\text{-factor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

μ_p = gemiddelde positieve controle

μ_n = gemiddelde negatieve controle

op= standaard deviatie positieve controle

on= standaard deviatie negatieve controle

Reken de Z-factor uit in Excel met de data van alle negatieve en positieve controles uit de zaal:

1. Open Excel
2. File -> Open

Eerst maken we een nieuwe variabele in kolom G (getransloceerd). Hierin tellen we de waarde van nucleus en nucleus EN cytoplasma bij elkaar op, dus alle cellen waarin tenminste een beetje translocatie is opgetreden.

3. Dit doe je door op G2 de klikken en in te typen =D2+E2.
4. Klik op cel G2, nu zie je rechts onderin de cel een zwart vierkantje. Klik hierop en sleep naar beneden, zonder de linker muisknop los te laten (dit heet fillen).

Vervolgens zetten we in kolom H de cellen waarin geen translocatie is opgetreden en berekenen we voor het percentage getransloceerde cellen per sample.

5. Type in cel H2 =F2 en fill deze ook.
6. Type in cel I2 =(G2/(G2+F2))*100.

Nu gaan we het gemiddelde berekenen van alle cellen waar translocatie heft opgetreden in de positieve controle. Eerst berekenen we het gemiddelde proportie getransloceerde cellen in de positieve controle.

7. Type in **L2** de formule = *average*(selecteer van kolom I alle cellen met een positieve controle).

Daarna de standaard deviatie van de proportie getransloceerde cellen in de positieve controle.

8. Type in **M2** de formule = *stdev*(selecteer van kolom I alle cellen met een positieve controle).

En hetzelfde voor de negatieve controle.

9. Type in **L3** de formule = *average*(selecteer van kolom I alle cellen met een negatieve controle).

10. Type in **M3** de formule = *stdev*(selecteer van kolom I alle cellen met een negatieve controle).

Tenslotte bereken we de Z-factor.

11. Type in **N2** de formule = $1-(3*(M2+M3)/(L2-L3))$.

Het is gelukt! Nu heb je de Z factor! Gebruik de onderstaande tabel om voor de interpretatie:

Z-factor	Interpretatie
1.0	Een perfect assay (Z-factoren kunnen nooit groter zijn dan 1.0).
0.5 – 1.0	Een goed assay. Wanneer $\sigma_p = \sigma_n$, 0.5 betekent dat er 12 standaard deviaties verschil is tussen μ_p en μ_n .
0.0 – 0.5	Een twijfelachtig assay, er is weinig verschil tussen de positieve en negatieve controle.
< 0.0	Onbruikbaar assay, er is veel overlap tussen de positieve en negatieve controle.

Opdrachten**Kritisch denk opdracht 11.1**

Jullie kunnen de Excel data gebruiken voor het berekenen van de significantie in R (script staat op BlackBoard). De R output is onder andere een grafiek met op de Y-as het percentage translocatie in de nucleus en op de x-as de zes verschillende condities (positieve controle, negatieve controle en 4 verschillende experimentele condities). Deze grafiek morgen jullie gebruiken voor zowel je labjournaal als voor in je onderzoeksverslag. Significantie wordt getoetst met een ANOVA en post-hoc Tukey HSD. R geeft voor de post-hoc van alle onderlinge verschillen een p-waarde. Voor het beantwoorden van de deelvragen zul je niet alle vergelijkingen die de Tukey geeft gebruiken, want niet alle vergelijkingen tussen de verschillen zijn relevant. Om je te helpen met selecteren van de juiste vergelijking kun je je zelf de volgende vraag stellen: Waar vergelijk je de condities mee: met de negatieve controle (geen cortisol) of met de positieve controle (100 nM cortisol)?