

GENEXPRESSIE

HANDLEIDING VOOR DOCENTEN

Voor u ligt de docentenhandleiding bij het practicum genexpressie, onderdeel van de leskist DNA. De leskist DNA bestaat uit vier afzonderlijke practicumsets, verdeeld over negen kisten.

De kisten bevatten allerlei instrumenten waarmee leerlingen relatief zelfstandig onderzoek aan DNA en eiwitten kunnen doen. Onderdeel van de leskist zijn bijvoorbeeld een PCR-apparaat, apparatuur voor gelelektroforese, maar ook micropipetten en koelers en epjes. De practicumsets DNA (vijf kisten) en eiwit (vier kisten) worden in principe afzonderlijk aan scholen uitgeleend. De andere twee practicumsets (een stempelpracticum en een bioinformaticapracticum) kunnen zowel afzonderlijk geleend en gebruikt worden, als in combinatie met een andere set.

De practicumsets kunnen op verschillende manieren gebruikt worden. Per set is een practicum volledig uitgewerkt. Op deze manier kunt u met een hele klas één of meerdere lessen aan de slag. U kunt de apparatuur natuurlijk ook prima gebruiken voor andere activiteiten, bijvoorbeeld door leerlingen de gelegenheid te bieden om voor hun profielwerkstuk enkele weken gebruik te maken van de apparatuur.

De practica die speciaal voor deze leskist ontwikkeld zijn sluiten aan bij actueel onderzoek van wetenschappers van de UvA. We willen de betrokken wetenschappers, Pernette Verschure, Melanie Rosenhart en Martijs Jonker bijzonder hartelijk danken voor hun enthousiaste medewerking.

Wij wensen u en uw leerlingen leuke en leerzame lessen toe.

Namens De Praktijk,

Caspar Geraedts, Robin Kleian, Susanne Jansen en Alex Verkade



UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

De **P**raktijk

natuurwetenschappelijk onderwijs

PRAKTISCHE INFORMATIE

het practicum in het kort

Dit practicum staat in het teken van genexpressie. Leerlingen doen onderzoek naar de eiwitten die actief zijn in verschillende organen van een vis. Hiertoe worden eiwitprofielen gemaakt van verschillende organen of weefsels van één individuele vis. Het practicum bestaat uit vier stappen:

- stukjes van verschillende weefsels van een vis verzamelen (monsters nemen)
- eiwitten uit de weefsels halen (eiwitextractie)
- eiwitten 'sorteren' van groot naar klein (gelelektroforese)
- eiwitten op gel zichtbaar maken (kleuren)

Voorafgaand aan het practicum voeren de leerlingen een voorbereidende les uit, waarin de belangrijkste technieken van het practicum aan bod komen. Een vervolgopdracht, die een les na het practicum gedaan kan worden, gaat dieper in op het onderzoek van Dr. Pernette Verschure (Swammerdam Institute of Life Sciences, UvA).

doelgroep

De practica bij de leskist DNA zijn ontwikkeld voor leerlingen in de bovenbouw havo en vwo. De bedoeling is dat de leerlingen grotendeels zelfstandig aan de practica werken. Met enige aanpassingen en de nodige sturing van de docent zijn de practica en de instrumenten eventueel ook in onderbouwklassen en op het vmbo te gebruiken.

plaats in curriculum en voorkennis

Het ligt voor de hand om het practicum genexpressie in te zetten bij het vak biologie, bijvoorbeeld in aansluiting op de onderwerpen DNA en moleculaire genetica. Daarnaast is het natuurlijk ook mogelijk om het practicum te gebruiken bij het vak NLT of ANW. Het is belangrijk dat de leerlingen – voordat zij met het practicum aan de slag gaan – bekend zijn met de bouw van DNA en eiwitten, en dat zij in grote lijnen weten hoe de eiwitsynthese verloopt.

planning practicum

Het practicum genexpressie bestaat uit een voorbereidende les, het practicum zelf en een vervolgopdracht. Tabel 1 geeft de geschatte tijdsduur van elk onderdeel van het practicum.

Tabel 1. Geschatte tijdsduur van de onderdelen van het practicum.

monsters nemen	20-25 min. (als de vis al van tevoren ontleed is: 5 min.)
eiwitextractie	15 min. (waaronder 5 min. in buffer en 5 min. in dry block heater)
gelelektroforese	45 min. (ong. 15 voor laden gel, en 30 min. voor elektroforese)
kleuren	minimaal 2 uur (ong. 1 uur kleuren en minimaal 1 uur ontkleuren; voor het beste resultaat laat u de gel een nacht ontkleuren)

Omdat het kleuren van de gels tijdens het practicum minstens enkele uren in beslag neemt, moeten voor het practicum zelf in ieder geval twee lessen (op verschillende dagen) uitgetrokken worden. De voorbereidende les en de vervolgoopdracht kunnen ook als huiswerk gegeven worden. Een planning zou er dan bijvoorbeeld als volgt uitzien:

Tabel 2. Voorbeeld lesplanning van het practicum genexpressie.

vooraf:	leerlingen maken de voorbereidende les als huiswerk, de docent en/of TOA bereidt het practicum voor
les 1:	leerlingen voeren het eerste deel van het practicum uit (monsters nemen, eiwitextractie en inzetten gelelektroforese)
na les 1:	de docent en/of TOA kleurt de gels, en maakt eventueel al foto's van de gels
les 2:	leerlingen verwerken de resultaten van hun onderzoek (het tweede deel van het practicum)
na les 2:	leerlingen maken de vervolgoopdracht als huiswerk
les 3:	nabespreking

De planning hierboven dient slechts als voorbeeld. Natuurlijk kunt u uw eigen planning precies aanpassen aan de situatie in de klas en op school.

voorbereiding

Hou bij de voorbereiding van de lessen rekening met het volgende:

- Lees zelf voorafgaand aan de lessen de handleiding(en) een keer door.
- Kopieer het lesmateriaal voor de leerlingen:
 - de voorbereidende les (voor iedere leerling één exemplaar)
 - de practicumhandleiding (voor iedere leerling één exemplaar, of in ieder geval één exemplaar per groepje)
 - de vervolgoopdracht (voor iedere leerling één exemplaar, in kleur)
 - de handleiding instrumenten (enkele exemplaren per klas)
- Zorg voor een lokaal met computer, beamer en internet als u de voorbereidende les in de klas uitvoert.
- Voor het practicum heeft u, behalve de inhoud van de meegeleverde kit, de volgende materialen nodig:
 - één of enkele hele vissen
 - snijplankje(s) en mesje(s)
 - wegwerphandschoenen
 - markeerstiften om de epjes te labelen (stiften om cd's te beschrijven zijn hiervoor erg geschikt)

- een stopwatch
- 3 liter gedestilleerd water
- Zet de Dyna Chill koelers een dag van tevoren in het vriesvak.
- Bereid het practicum voor (zie verderop in deze handleiding).

na gebruik van de kist

U wordt verzocht om na gebruik van de leskist te controleren of alle onderdelen aanwezig en op de juiste plaats opgeborgen zijn. Raadpleeg hiervoor de checklist verderop in deze handleiding.

gebruik van de leskist zonder dit practicum

De apparatuur in de practicumset eiwit (onderdeel van de leskist DNA) is natuurlijk ook te gebruiken voor andere activiteiten dan het practicum genexpressie. Kijk bijvoorbeeld op www.bio-rad.com of www.edvotek.com voor het bestellen van kits en andere verbruiksmaterialen.

veiligheid

Het is niet strikt noodzakelijk om tijdens het uitvoeren van dit practicum handschoenen te dragen. Om leerlingen te trainen om (uit voorzorg) altijd de nodige veiligheidsvoorschriften in acht te nemen, raden wij aan om hen ook tijdens het pipetteren een wegwerphandschoen te laten dragen aan de hand die niet de pipet vasthoudt (meestal de linkerhand).

de kit

Bij dit practicum wordt gebruik gemaakt van de practicumkit *Comparative Proteomics Kit 1: Protein Profiler Module* van Bio-Rad (catalogusnummer 166-2700EDU). Deze kit is oorspronkelijk ontwikkeld voor gebruik in een evolutionaire context. Door monsters van spierweefsel van verschillende soorten vissen te verzamelen en op basis hiervan eiwitprofielen te maken kan de evolutionaire verwantschap tussen deze soorten in beeld gebracht worden. Voor het practicum genexpressie geldt dus dat er monsters van verschillende weefsels van één individu worden onderzocht. U kunt er natuurlijk ook voor kiezen om wel het oorspronkelijke practicum te doen (zie hiervoor de handleiding die bij de kit zelf zit). Er worden kant-en-klare polyacrylamidegels gebruikt (catalogusnummer 161-1103EDU).

Let er op dat sommige onderdelen van de kit tot gebruik in het vriesvak bewaard moeten worden.

VOORBEREIDING PRACTICUM

In dit hoofdstuk staat welke handelingen er verricht moeten worden ter voorbereiding op het practicum. U kunt maximaal acht groepjes tegelijk aan het practicum laten werken. In de beschrijving hieronder wordt uitgegaan van het maximale aantal. Als u met minder groepjes werkt kunnen de aantallen en hoeveelheden aangepast worden.

de vis

1. Zorg voor één of enkele hele vissen. De vis moet dus alle organen nog bevatten. Als u er voor kiest om elk groepje leerlingen zelf te laten ontleden, dan is per groepje één vis nodig. Als u zelf, voorafgaand aan de les, de vis ontleedt en de organen los snijdt dan is één vis in principe voldoende: per groepje is namelijk maar een kleine hoeveelheid monster nodig (0,25 cm x 0,25 cm x 0,25 cm).
2. Zorg voor voldoende snijplankjes, mesjes en handschoenen.
3. Ook als u er voor kiest om de leerlingen niet zelf te laten snijden, is het belangrijk om de leerlingen de vis en de afzonderlijke organen te laten zien en – bij voorkeur – voelen. Het is de bedoeling dat leerlingen van te voren nadenken over de vraag in welke organen of delen van de vis spierweefsel voorkomt.

de Laemmli sample buffer

4. Voordat de Laemmli sample buffer gebruikt kan worden kan er DTT aan toegevoegd worden (hierdoor worden de bandjes op de gel scherper). Voeg de inhoud van het potje DTT (in totaal ongeveer 0,3 g poeder) toe aan het flesje Laemmli buffer (30 ml). Meng goed. Eventueel kun je het flesje voorzichtig even verwarmen door het met de onderkant onder de warme kraan te houden.
5. Per groepje is 1,5 ml Laemmli sample buffer nodig. Verdeel de sample buffer met een wegwerppipet alvast over acht epjes. Je hoeft tijdens het practicum dan alleen de epjes uit te delen (één per groepje).
6. Let op: na het mengen moet de sample buffer worden bewaard bij -20°C. Tijdens het practicum, in het lokaal, kunt u hier de Dyna Chill koelers voor gebruiken.

de gelelektroforesebuffer

7. Maak de elektroforesebuffer (TGS) van tevoren. Voor 3 liter buffer moet 300 ml van de meegeleverde 10x TGS buffer worden gemengd met 2700 ml gedestilleerd water. Bij gebruik van één elektroforesetank is 700 ml (verdunde) buffer nodig. Bij gebruik van vier tanks (acht gels in totaal) is dus 2800 ml buffer nodig. De buffer kan op kamertemperatuur bewaard worden.

de actine en myosine standaard

8. Voor het bereiden van de actine en myosine standaard moet 500 μl Laemmli sample buffer toegevoegd worden aan het potje met de standaard. Laat de standaard vervolgens 20 tot 30 minuten incuberen op kamertemperatuur.
9. Breng de actine en myosine standaard over in een epje met schroefdop. Verwarm het epje 5 minuten in de dry block heater bij 95°C .
10. Per groepje is 12,5 μl actine en myosine standaard nodig. Label acht schroefdoepjes met de afkorting AM. Verdeel de standaard met een micropipet over de acht epjes. Je hoeft tijdens het practicum dan alleen de epjes uit te delen.
11. Let op: de actine en myosine standaard moet nu bewaard worden bij -20°C . Tijdens het practicum, in het lokaal, kunt u hier de Dyna Chill koelers voor gebruiken.

de gewichtsstandaard

12. Per groepje is 6 μl gewichtsstandaard nodig. Label acht (gewone) epjes met de afkorting ST. Verdeel de standaard met een micropipet over de acht epjes. Je hoeft tijdens het practicum dan alleen de epjes uit te delen.
13. Let op: de actine en myosine standaard moet nu bewaard worden bij -20°C . Tijdens het practicum, in het lokaal, kunt u hier de Dyna Chill koelers voor gebruiken.

AANDACHTSPUNTEN TIJDENS HET PRACTICUM

1. Plaats alle apparatuur op een handige, het liefst centrale, plek in het lokaal. U kunt er voor kiezen om de gels zelf in de houder te doen en de tanks te vullen, of om dit samen met de leerlingen te doen. In de handleiding instrumenten wordt uitgelegd hoe dit in zijn werk gaat.
2. Laat leerlingen van te voren even oefenen met de micropipet. Vertel in ieder geval...
 - dat je de pipet nooit mag gebruiken zonder pipetpunt
 - dat een micropipet bij het indrukken twee 'stops' heeft (laat ze dit voelen)
 - dat je bij het opzuigen van vloeistof de pipet tot de eerste stop moet indrukken, en dan – als de pipet in de vloeistof zit – de knop langzaam moet laten opkomen
 - dat je bij het uitpipetteren de knop helemaal moet indrukken tot de tweede stop.
3. Let er op dat de monsters die de leerlingen nemen niet te groot zijn. Een grootte van 0,25 cm x 0,25 cm x 0,25 cm is voldoende. Als het monster te groot is bestaat de kans dat er te veel van de Laemmli buffer wordt opgenomen, waardoor er te weinig vloeistof overblijft voor de gelelektroforese.
4. Let er bij het lopen van de gels op dat het blauwe streepje dat je ziet bewegen niet van de gel af loopt. De gels kunnen soms eerder klaar zijn dan de aangegeven 30 minuten.
5. Na de elektroforese kunnen de gels uit de tank gehaald worden. De gels zelf zitten tussen twee plastic plaatjes geklemd. Met de groene spatel die bij de kant-en-klare gels worden meegeleverd kun je plaatjes los wippen (zie de pijltjes die op de gels staan). Pas op, de gel blijft meestal aan één van de platen plakken.
6. Zie de leerlingenhandleiding voor de instructies voor het kleuren en ontkleuren van de gels.
7. Gebruik de lichtbak en de zwarte kap voor het maken van foto's van de gels. U kunt hiervoor de meegeleverde camera gebruiken, maar u kunt natuurlijk ook uw eigen camera gebruiken.
7. Mochten de resultaten tegenvallen, bijvoorbeeld omdat er geen of maar weinig bandjes op de gel te zien zijn, dan kan eventueel gebruik gemaakt worden van de foto in het meegeleverde bestand (zie *genexpressie voorbeeldgel*).

ANTWOORDEN

VOORBEREIDENDE LES

2. transcriptie (eerste pijl), translatie (tweede pijl)

3. De volgende begrippen moeten in de tabel worden doorgestreept:

	DNA	mRNA	Eiwit
Dit molecuul bestaat uit...	aminozuren / nucleotiden	aminozuren / nucleotiden	aminozuren / nucleotiden
Zit in alle cellen hetzelfde van deze moleculen, of verschilt dat per cel?	in alle cellen hetzelfde / verschilt per cel	in alle cellen hetzelfde / verschilt per cel	in alle cellen hetzelfde / verschilt per cel

4. Delen van het DNA die open gevouwen zijn zijn actiever dan andere gebieden. Een open structuur zorgt ervoor dat genen (beter) tot expressie kunnen komen.

5. c - b - d - a

6. Hart en 'filet' bevatten veel spierweefsel. Darm en maag bevatten weinig spierweefsel. Lever, ogen (m.u.v. de oogspiertjes) en huid bevatten geen spierweefsel.

7. Door het mes schoon te maken voorkom je dat het monster vervuild raakt met (resten van) het vorige monster.

8. De cellen moeten kapot gemaakt worden omdat de eiwitten grotendeels binnen in de cellen zitten.

9. De tabel moet als volgt ingevuld worden:

structuur...	hiermee wordt bedoeld...
secundair	de alfa-helices en bètasheets die ontstaan door waterstofbruggen
tertiair	de driedimensionale structuur van één aminozuurketen
primaair	de volgorde van de aminozuren
quartaair	verschillende aminozuurketens vormen samen één eiwit

10. De secundaire, tertiaire en quartaire structuur zijn verdwenen.

11. Korte aminozuurketens bewegen sneller door de gel dan lange aminozuurketens.

12. De eiwitten zijn negatief geladen.

13. De kleinste eiwitten bevinden zich onderin de gel.

14. Als je de gel te lang laat lopen dan komen alle eiwitten onder aan de gel terecht.
15. Als je de elektrodes van het apparaat om zou draaien, dan zouden de eiwitten gewoon in de slotjes blijven zitten.

HET PRACTICUM

1. Dingen die leerlingen mogelijk opgevallen zijn, zijn bijvoorbeeld:
 - Je moet behoorlijk kracht zetten om door de buikwand van de vis heen te snijden.
 - Het is niet gemakkelijk om de afzonderlijke organen van elkaar te onderscheiden.
 - De kleur van de verschillende organen is erg verschillend.
 - De organen van de vis liggen niet verspreid in het lijf, maar allemaal bij elkaar in de buikholte (een groot deel van de rest van de vis is spierweefsel).
2. [verschilt per orgaan]
3. Het gaat hier om de verwachtingen van de leerlingen. U kunt ze natuurlijk wel wijzen op de functie en de werking van de afzonderlijke organen. Voor veel leerlingen is het al een eyeopener om te horen dat het deel van een vis (of ander dier) dat je normaal gesproken eet spierweefsel is.
5. Een dik bandje wijst erop dat er een grote hoeveelheid van dat eiwit in het monster aanwezig was. Soms kunnen twee bandjes (dus van twee verschillende eiwitten) zo dicht tegen elkaar aan liggen dat het één bandje lijkt.
6. Als de hele baan onder een slotje licht gekleurd is dan wijst dat op de aanwezigheid van veel verschillende eiwitten, maar in lage concentraties. Bijzonder aan spierweefsel is dat een klein aantal eiwitten in relatief hoge concentraties voorkomt. In andere weefsels is dat in veel mindere mate het geval. Ook is er bij sommige monsters natuurlijk sprake van verschillende weefsels (in darm komt bijvoorbeeld spierweefsel, bindweefsel en epitheel voor).
7. Mogelijke verklaringen voor de lagere concentraties eiwit kunnen zijn:
 - Er zaten minder eiwitten in het monster.
 - Er was minder monster aanwezig.
8. Welke genen 'aan' en 'uit' staan kun je zien aan de aanwezigheid van bandjes. In het ene monster zien we andere bandjes dan in het andere monster: er stonden in die weefsels dus andere genen aan en uit. Hoeveel er van een bepaald eiwit gemaakt wordt is te zien aan de (relatieve) dikte van de bandjes.
11. [afhankelijk van de gekozen monsters]
12. [afhankelijk van de resultaten en de vooraf geformuleerde verwachtingen]
13. [afhankelijk van de gekozen monsters]
14. Nee, identieke bandjes wijzen op een gelijke grootte van de eiwitten. Het is best mogelijk dat verschillende eiwitten een (bijna) identieke lengte van de polypeptideketen hebben.
15. Bij celdeling is de kans groot dat de cellen deel (gaan) uitmaken van hetzelfde weefsel. Dat betekent dat daarin dezelfde genen aan en uit moeten staan.

VERVOLGOPDRACHT

1. Chromosomen zien er alleen zo uit tijdens de mitose (kerndeling).
2. Tijdens de mitose zijn de chromosomen volledig gespiraliseerd. In alle andere fases van de celdeling zijn chromosomen meer opengevouwen (gedespiraliseerd).
3. Ter beoordeling aan de docent. De donkere gebieden in het kernplasma en aan de rand van het kernmembraan zijn heterochromatine. Bij de lichtere gebieden gaat het om euchromatine.
4. Er wordt steeds verder ingezoomd.
5. De groene lijn stelt DNA voor. De grijze bolletjes stellen histoneiwitten voor.
6. d - a - c - b
7. Bij euchromatine kunnen eiwitten zoals transcriptiefactoren en polymerase makkelijker aan het DNA binden.
8. Bij een toename in het aantal methylgroepen wordt het DNA compacter gevouwen.
10. Een repressoreiwit blokkeert de binding van eiwitten die nodig zijn voor het tot expressie komen van een gen.
11. In de rechter afbeelding hebben de groene gebieden een compactere structuur dan in de linker afbeelding.
12. HP1 zorgt er voor dat DNA een compactere structuur krijgt, en dus dat genen 'uit' worden gezet.

CHECKLIST INHOUD KISTEN

Hieronder vind u een overzicht van de inhoud van de practicumset, verdeeld over de vier kisten. U wordt verzocht om na gebruik van de leskist nauwkeurig te controleren of alle materialen aanwezig en op de juiste plaats opgeborgen zijn.

Kist 1. Gelelektroforese

- voeding, inclusief snoer (1x)
- verticale elektroforesetank, inclusief deksel (4x)
- gelhouder (4x)
- bufferdam (4x)

Kist 2. Pipetten en epjes

- micropipet (14x)
- pipetrek (2x)
- epjeshouder (groen) (10x)
- epjeshouder (felgekleurd) (5x)
- doos pipetpuntjes (geel) (2x)
- doos pipetpuntjes (blauw) (1x)
- Dyna Chill koeler (2x)

Kist 3. Lichtbak en dry block heater

- dry block heater, inclusief snoer (1x)
- lichtbak, inclusief snoer (1x)
- fototoestel, inclusief USB-kabel (1x)
- zwarte kap (1x)

Kist 4. Schudplatform

- schudplatform, inclusief snoer (1x)
- extra plateau voor schudplatform (1x)
- cilinder voor bevestiging van extra plateau (4x)
- plastic bakje (8x)

COLOFON

Het lesmateriaal bij de leskist DNA is ontwikkeld door De Praktijk in opdracht van de Faculteit der Natuurwetenschappen, Wiskunde en Informatica (FNWI) van de Universiteit van Amsterdam (UvA).

Op dit lesmateriaal is de Creative Commons Naamsvermelding-NietCommercieel-GelijkDelen 3.0 Nederland Licentie van toepassing (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl>). Het beheer van de leskist is in handen van Itsacademy (<http://www.itsacademy.nl/vakgebieden/biologie/leskisten/>). Met vragen en/of opmerkingen kan contact worden opgenomen met Bart Groeneveld (a.groeneveld@uva.nl), of De Praktijk (info@praktijk.nu, 020 747 01 66, www.praktijk.nu).

CC BY-NC-SA 2013 – De Praktijk i.o.v. FNWI, UvA