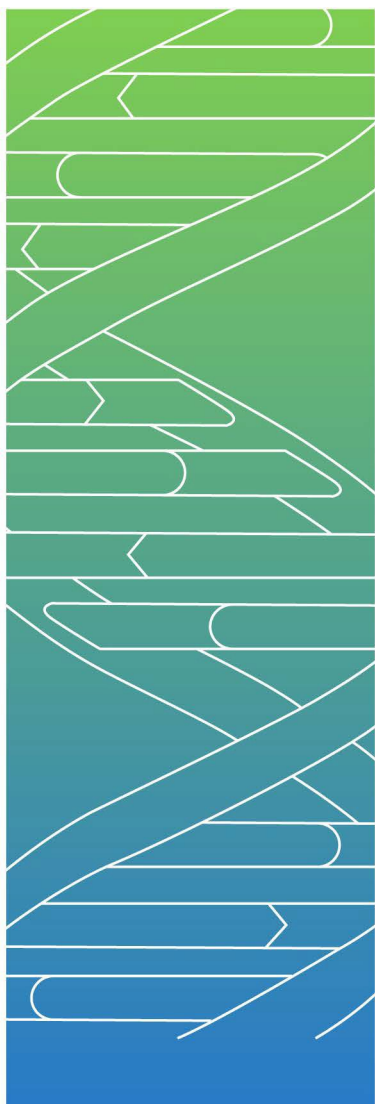


Leerlingenhandleiding



Amgen Biotech Experience

Scientific Discovery for the Classroom

Lab 1

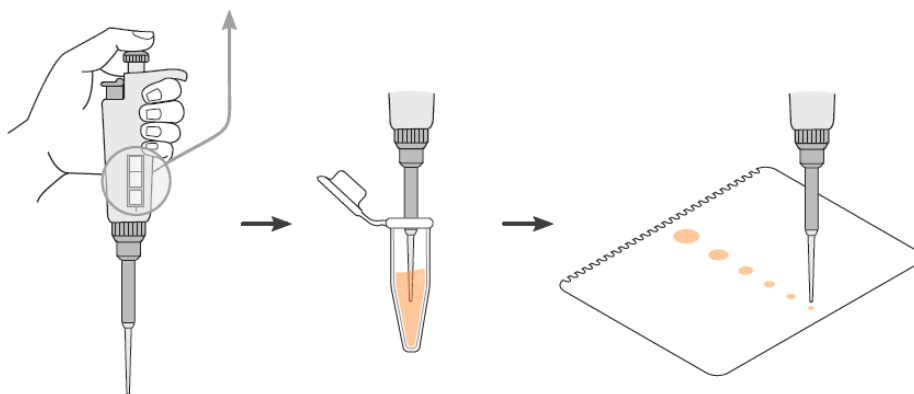
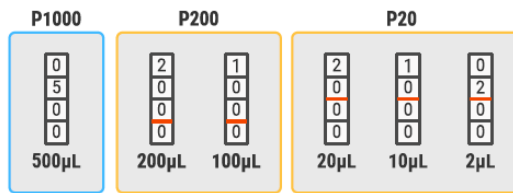
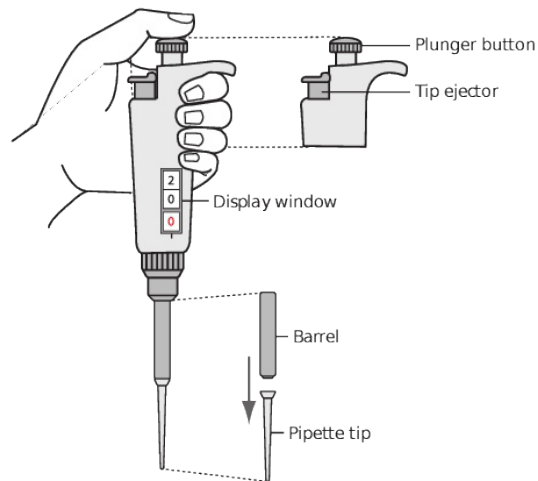
Pipetteoefeningen

OEFENING 1

Oefen met verschillende pipetten door verschillende hoeveelheden water met kleurvloeistof te pipetteren op een geplastificeerd A4 papier.

Benodigheden

- Pipetten
- Geplastificeerd A4 papier
- Pipetpuntjes
- Kleurvloeistof voor voedsel
- Water
- afvalbakje

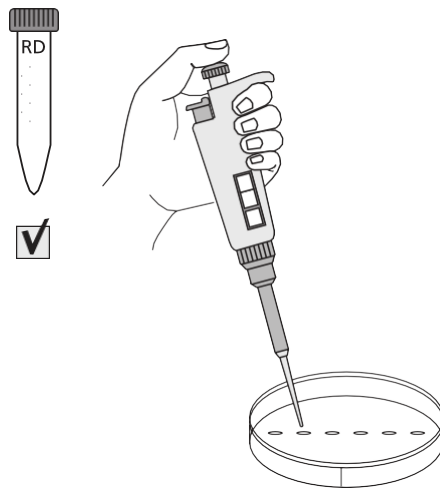


OEFENING 2

Oefen het laden van een gel door in agar in het gewenste welletje te pipetteren.

Benodigheden:

- Pipetten
- Petrischaal
- Agar
- Kammetje
- Kleurvloeistof



Amgen Biotech Experience

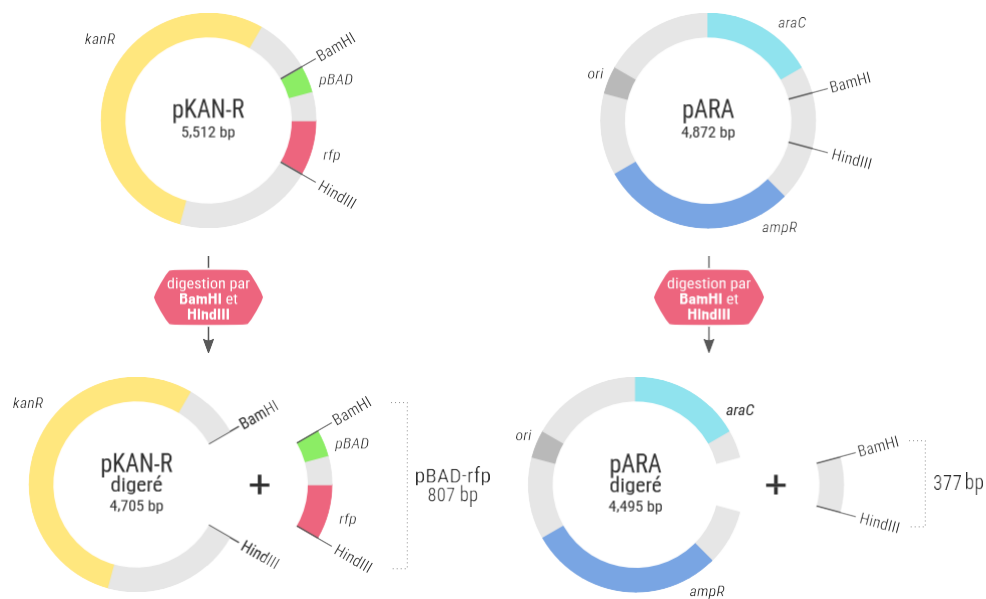
Scientific Discovery for the Classroom

Lab 2, 3 en 4

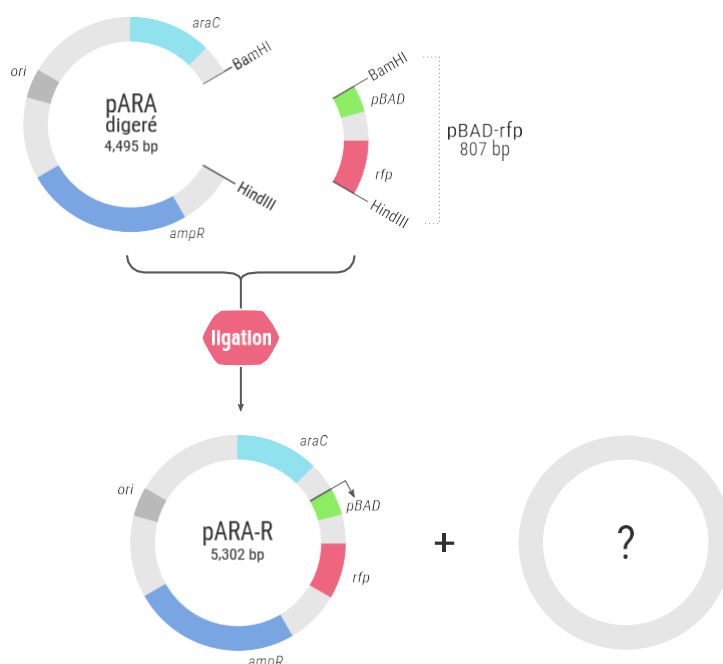
Lab 2

In lab 2 brengen we het gen met een fluorescerende rode eiwit, het *rfp*-gen, van plasmide pKAN-R naar het plasmide pARA om een vectorplasmide pARA-R te vormen. pARA-R kan namelijk een bacterie efficiënt transformeren. Het gewenste *rfp*-gen kan in de bacterie, *E. coli*, op grote schaal geproduceerd worden door groei.

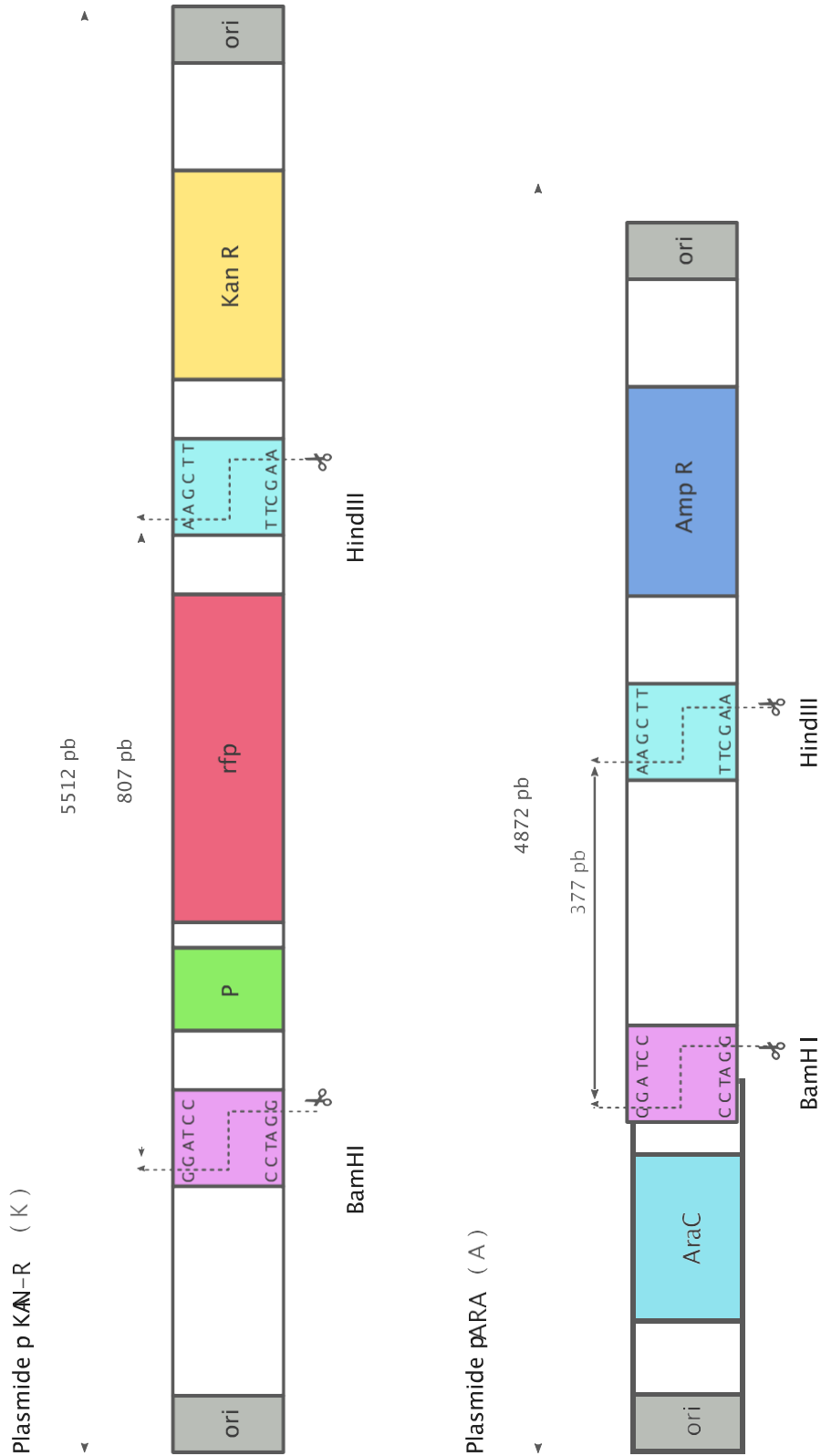
Om de vectorplasmide pARA-R te vormen wordt met behulp van de restrictie enzymen *Bam*HI en *Hind*III op bepaalde plekken in de plasmide geknipt, ook wel digestie van de plasmides pKAN-R en pARA genoemd. Zie hieronder in de plaatjes.



Het terugzetten van de geknipte stukjes plasmiden wordt de ligatie genoemd. Naast het gewenste stukje plasmide dat wordt teruggeplaatst, zodat vectorplasmide pARA-R ontstaat, ontstaan er ook andere nieuwe plasmides.



Construeer een nieuwe plasmide na het knippen door de restrictie enzymen:



Extra informatie

Plasmiden

Plasmiden zijn kleine cirkelvormige DNA-moleculen die in bacteriën worden gevonden. Plasmiden zijn favoriete hulpmiddelen voor het overdragen van genen van de ene bacteriestam naar de andere. Ze kunnen daarom als genetische vectoren dienen.

De volgende elementen zijn aanwezig op de plasmiden pARA en pKAN-R:

Ori : oorsprong van replicatie, laat de bacterie het plasmide in een aantal kopieën in zijn cytosol vermenigvuldigen.

P : promotor van het rfp-gen, maakt de productie van mRNA van het rfp-gen mogelijk.

rfp : gen dat codeert voor het rode fluorescerende eiwit.

Kan-R : gen coderend voor een enzym dat resistentie verleent tegen het antibioticum Kanamycin.

Amp-R : gen coderend voor een enzym dat resistentie verleent tegen het antibioticum Ampicillin.

AraC : controlesequentie van genexpressie. Maakt transcriptionele activering van het rfp-gen mogelijk wanneer arabinose, een suiker, wordt toegevoegd aan het kweekmedium van de bacterie.

Enzymen

Enzymen zijn eiwitten die de opmerkelijke eigenschap hebben chemische reacties te versnellen. Enzymen zijn ook de werkers van biotechnologie. In Genetic Engineering worden veel enzymen gebruikt om DNA-moleculen te modificeren. Om bijvoorbeeld een recombinant DNA te maken, is het nuttig om enzymen tot zijn beschikking te hebben om te knippen en anderen om het DNA te plakken. Dit is de reden waarom restrictie-enzymen en ligasen vaak worden gebruikt. Dit zijn enzymen die DNA knippen op specifieke plaatsen op het DNA-molecuul. In Lab 2 worden restrictie-enzymen BamHI en HindIII gebruikt om plasmiden pARA en pKAN-R te knippen.

Ligasen zijn enzymen die stukjes DNA kunnen opnemen die zijn geknipt door restrictie-enzymen. In Lab 3 wordt ligase gebruikt om de plasmide pARA-R te construeren die het rfp-gen draagt.

RFP (Red Fluorescent Protein):

rfp is een rood fluorescerend eiwit dat van nature voorkomt in het discosoma koraal. Het gen is gewonnen uit dit koraal en is beschikbaar voor genetische manipulatie. In het practicum wordt het rfp-gen, dat codeert voor het RFP eiwit, onder de controle van de AraC sequentie achter de P promoter geplaatst.

Lab 2 : Digestie van de plasmides pKAN-R en pARA

Reagentia

In het rekje:

- 2,5xB (restrictiebuffer)
- K (plasmide pKAN-R)
- A (plasmide pARA)
- dH₂O (demi water)

Op ijs:

- RE (Restrictie-enzymmengsel van BamHI en HindIII)

Benodigheden:

- Micropipet P20
- Pipetpuntjes
- 4 epjes à 1,5 mL
- Een marker pen
- Handschoenen
- Prullenbakje

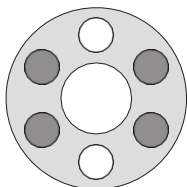
Volg de instructies:

1. Label de epjes als volgt: K+, K-, A+, A-, tezamen met jouw initialen.
2. Voeg de juiste reagentia volgens het schema toe aan de epjes.

	Tube K+	Tube K-	Tube A+	Tube A-
2,5xB	4µL	4µL	4µL	4µL
K	4µL	4µL		
A			4µL	4µL
RE	4µL		4µL	
dH₂O		4µL		4µL

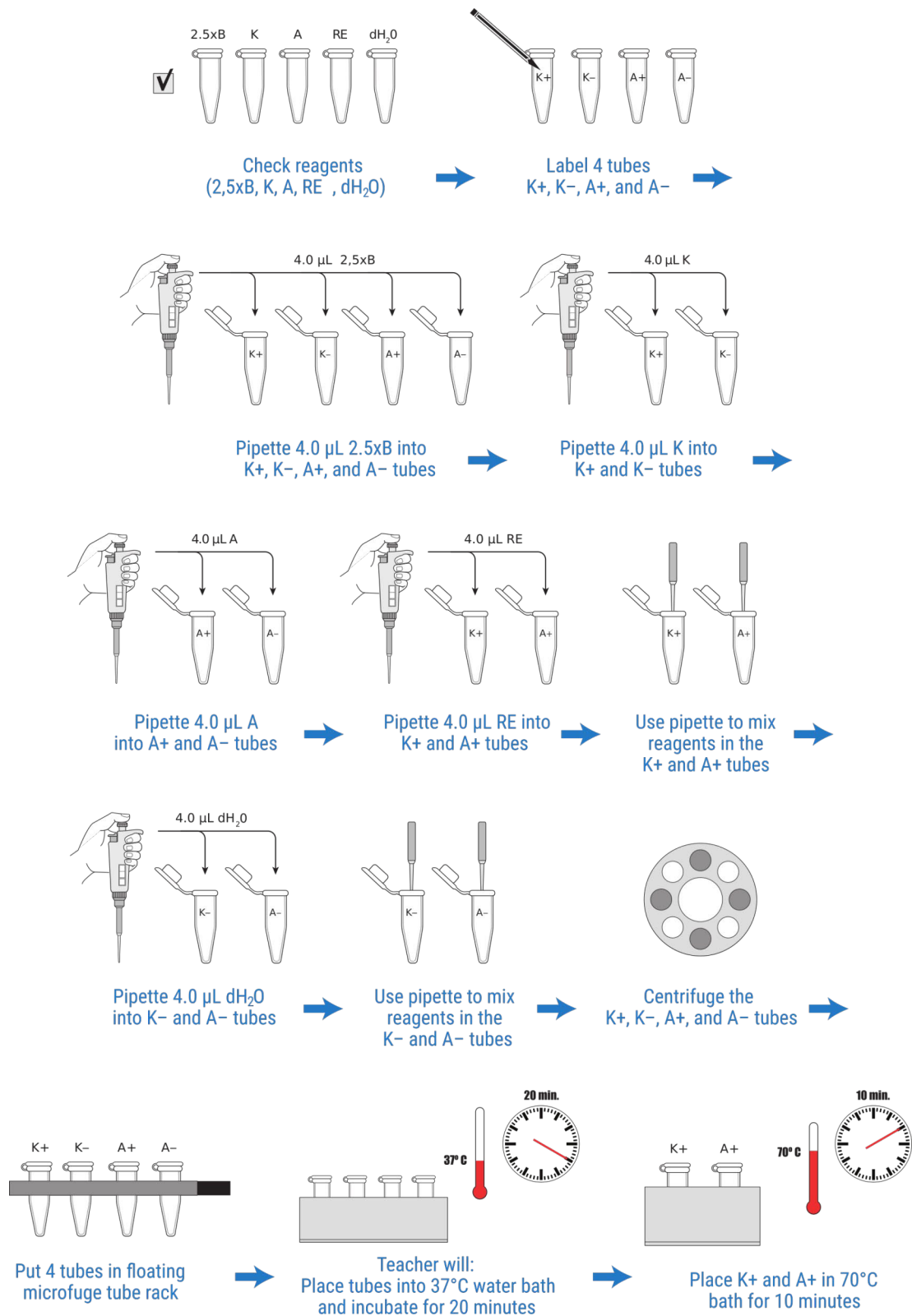
3. Centrifugeer de epjes voor een paar seconden.

ATTENTIE: Vergeet niet de epjes te balanceren in de centrifuge



4. Plaats alle buizen in een waterbad van 37 ° C voor minimaal 20 minuten.
5. Plaats vervolgens de K + en A + epjes in een thermoblok van 70 ° C voor 10 minuten, zodat de restrictie-enzymen inactiveren.

Lab 2 Flowchart



Lab 3 : Contrueer een recombinant plasmide

Reagentia

In het rekje:

- K+ (plasmide pKAN-R van lab 2)
- A+ (plasmide pARA van lab 2)
- 5xB (ligatiebuffer)
- LIG (DNA-ligase)
- dH₂O (demiwater)

Op ijs:

- LIG (DNA-ligase)

Benodigdheden

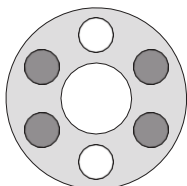
- Micropipet P20
- Pipetpuntjes
- 4 epjes à 1,5 mL
- Een marker
- Handschoenen
- Prullenbakje

Volg de instructies:

1. Noteer je initialen op het LIG epje.
2. Voeg de volgende reagentia toe aan het LIG epje met 2 µL DNA-ligase:
 - 4 µL A+
 - 4 µL K+
 - 4 µL 5xB
 - 4 µL dH₂O

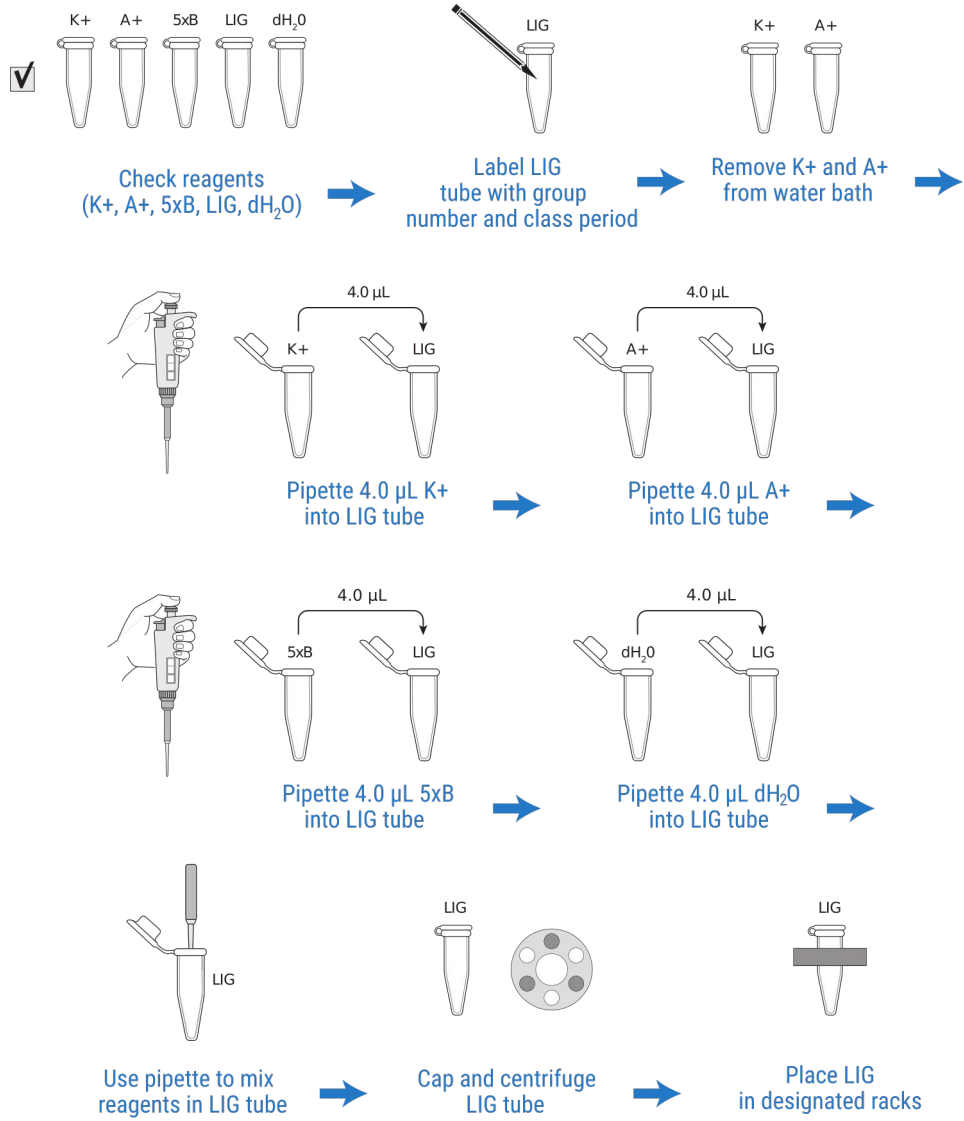
Nadat je demiwater (dH₂O) hebt toegevoegd tik je een paar keer het epje aan, zodat de reagentia mengen.

3. Centrifugeer de epjes voor een paar seconden.



4. Plaats de epjes terug in het rekje

Lab 3 Flowchart



Lab 4 : Controle van de digestie van de plasmide mbv gel-elektroforese.

Reagentia

- K-
- K+
- A-
- A+
- LD (Loading dye)
- M (DNA ladder)
- dH₂O (demiwater)

Benodigdheden

- 4 epjes à 1,5 mL
- Micropipet P20
- Pipetpuntjes
- Een marker pen
- 1 elektroforesetank met een 0,8% agarosegel
- 1x TAE buffer
- Handschoenen
- Prullenbakje

Volg de volgende instructies:

1. Label de 4 epjes als volgt geA-, geA+, geK-, geK+
2. Verdeel de reagentia als volgt:

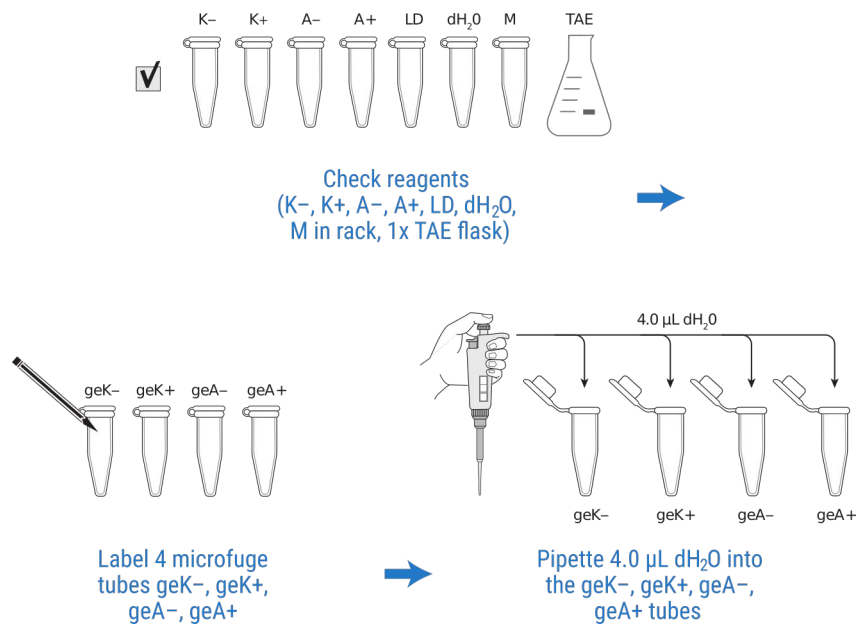
	Tube geK-	Tube geK+	Tube geA-	Tube geA+
dH₂O	4µL	4µL	4µL	4µL
LD	4µL	4µL	4µL	4µL
K-	4µL			
K+		4µL		
A-			4µL	
A+				4µL

3. Centrifugeer de epjes voor een paar seconden.
4. Noteer in welke gel-elektroforese tank en welletjes je de samples pipeteert.
5. Pipeteer 10 µL (voor de marker 4 µL) van elk sample als volgt:

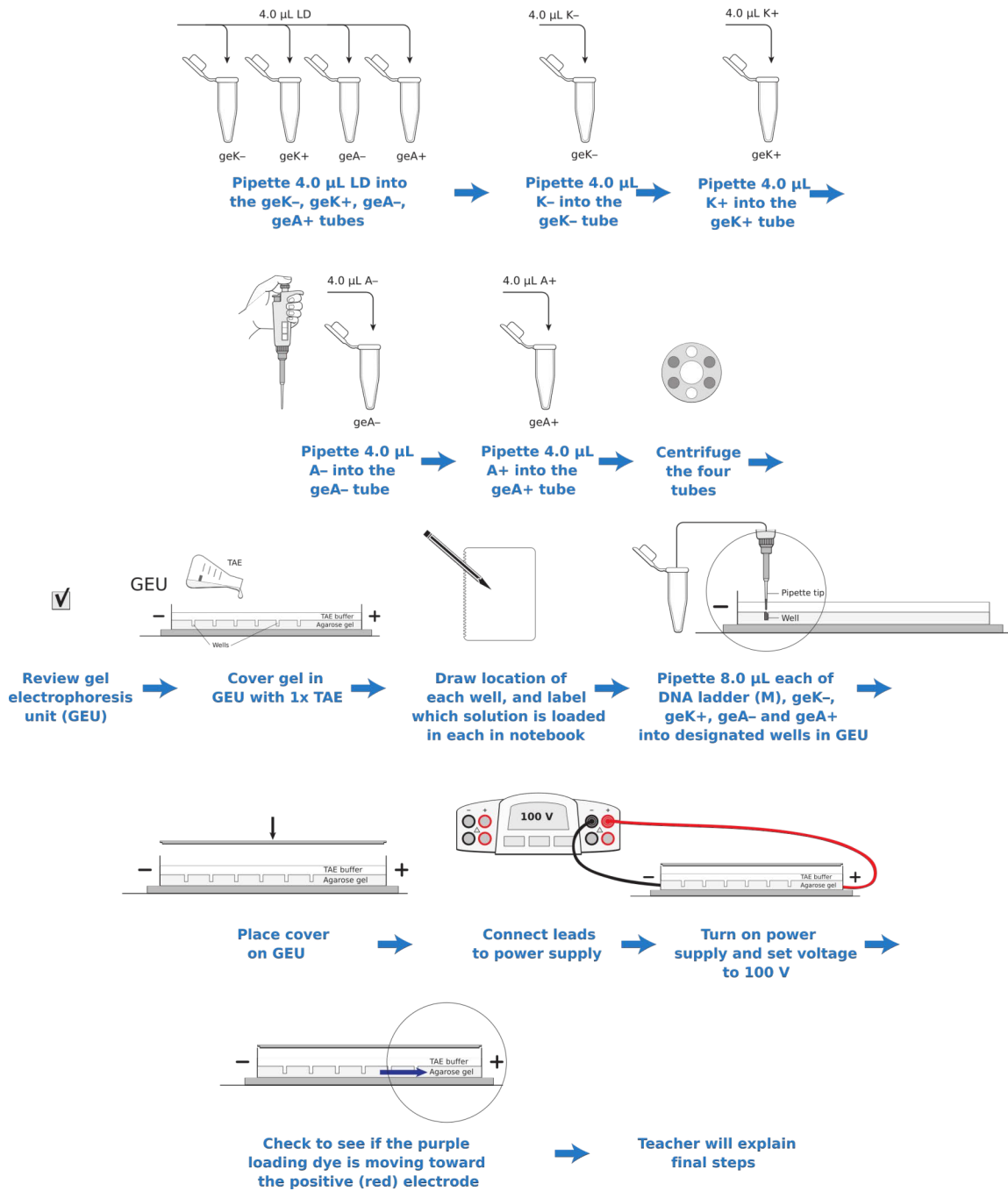
| M | geK- | geK+ | geA- | geA+ |

6. Wanneer alle samples zijn geladen, zet de gel-elektroforese aan en stel de spanning in op 100 V.
7. Laat de gel voor 20 minuten runnen.
8. Bekijk de resultaten met een transluminator of gel doc.

Lab 4 Flowchart



Labo 4 Flowchart (vervolg)



De resultaten

Lab 4 – Gel-elektroforese

Geef hier de verwachte resultaten van : geK-, geK+, geA-, geA+ aan.

	M	geK-	geK+	geA-	geA+
1	10 000 bp				
2	8 000 bp				
3	6 000 bp				
4	5 000 bp				
5	4 000 bp				
6	3 000 bp				
7	2 000 bp				
8	1 500 bp				
9	1 000 bp				
10	500 bp				

Amgen Biotech Experience

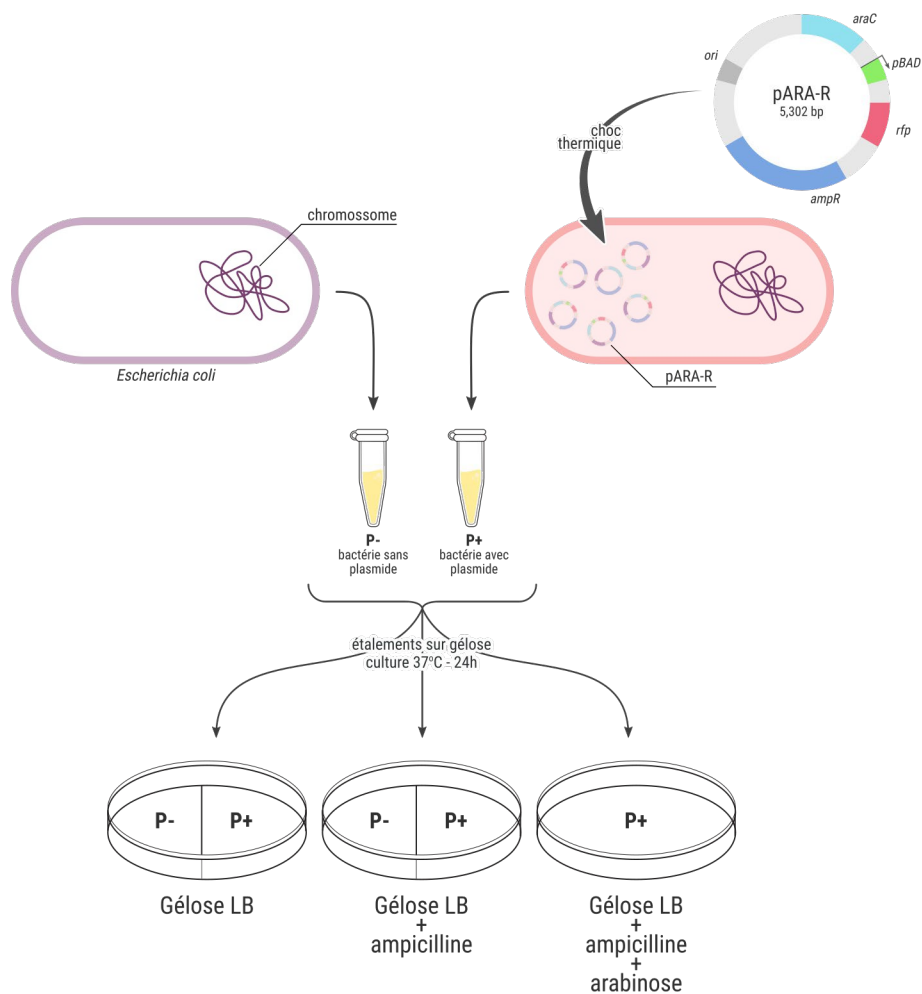
Scientific Discovery for the Classroom

Lab 5

Transformatie van een bacterië

Introductie Lab 5

De plasmide pARA-R geligeerd in lab 3 draagt het RFP-gen dat codeert voor het rode fluorescerende eiwit. Deze plasmide heeft de genetische elementen die het gemakkelijk maakt om grote hoeveelheden van het RFP-eiwit in *E. coli*-bacteriën te produceren. In lab 5 worden *E. coli*-bacteriën genetisch getransformeerd met behulp van de plasmide pARA-R (P+). Het gebruik van geschikte kweekmedia maakt het mogelijk om snel te verifiëren dat enerzijds de bacteriën zijn getransformeerd door de plasmide en anderzijds dat ze het RFP-eiwit produceren.



Genetische transformatie van *E. coli*-bacteriën door plasmide pARA-R en opkweken van de getransformeerde bacteriën.

Vorbereidingen lab 5

Alle reagentia staan voor gebruik in de vriezer. De competent cellen staan te allen tijde op ijs.

Benodigheden op een centrale plek in het laboratorium

- Waterbad à 42 °C (met thermometer)
- Drijvend rek
- Timer
- Microcentrifuge
- Handschoenen
- Bakken met ijs
- tape
- Incubator à 37°C

Haal de volgende reagentia 15 minuten van te voren uit de koelkast/vriezer:

- LIG (jouw epje van lab 4)
- LB (groeimedium Luria Broth)

Op ijs:

- CC (competent bacteriëcellen)

Bereid voor elke leerling

- 3 petrischaaltjes met:
 - 1 LB agar
 - 1 LB/amp agar
 - 1 LB/amp/ara agar
- 1 rek met LB en LIG epje
- 2 epjes à 1,5 mL
- Een marker pen
- Micropipet P20
- Micropipet P200
- Pipetpuntjes
- Steriele bacteriëspreiders
- Prullenbakje
- Labjas en veiligheidsbril
- Aan het einde van lab 5 worden de petrischalen van elke groep ondersteboven 24h-36h bij 37 ° C geïncubeerd en vervolgens tot 4 ° C geplaatst tot de volgende cursusdag.

Lab 5:



Voorzorgmaatregelen

- Behandel de bacteriën alsof ze pathogeen zijn!
- Gebruik een labjas, handschoenen en een bril.
- Laat de petrischalen niet lang open staan.
- Raak niets aan dat in contact is gekomen met bacteriën zonder handschoenen te dragen.
- Stel de docent onmiddellijk op de hoogte als u op uw werkoppervlak bacteriën spat.
- Gooi uw handschoenen, epjes aan het einde van het lab in de biologische afvalbak.
- Was uw handen grondig voordat u de zaal verlaat.

Reagentia

- LIG (van lab 4)
- LB (groeimedium Luria Broth)
- 1 epje CC (100 µL competent bacterie cellen) op ijs!

ATTENTIE: De bacteriën moeten altijd op ijs te blijven staan!

Benodigdheden

- 3 petrischaaltjes met:
 - 1 LB agar
 - 1 LB/amp agar
 - 1 LB/amp/ara agar
- 2 epjes à 1,5 mL
- Een marker
- Micropipet P20
- Micropipet P200
- Pipetpuntjes
- Steriele bacteriëspreiders
- Prullenbakje
- Handschoenen
- Labjas en veiligheidsbril

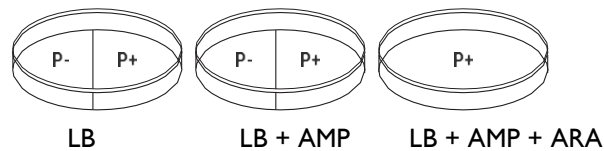
Volg de volgende instructies:

1. Label de twee epjes met: P- en P+. En zet op ijs.

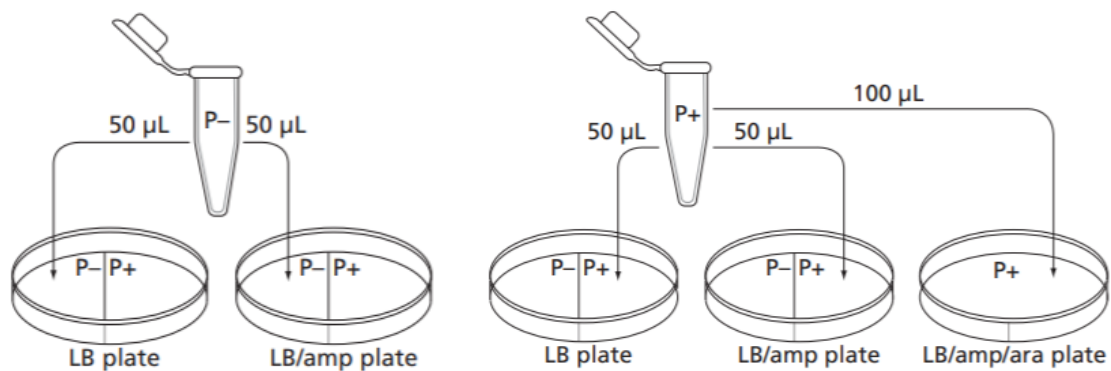
ATTENTIE: Volg de instructies goed. De transformatie dient in een steriele omgeving te gebeuren.

2. Gebruik de micropipet P200 en stel in op 50 µL. Mix de bacteriën in CC door 2 tot 3 maal op en neer te pipeteren.

3. Pipeteer 50 μL van de bacteriën (CC) in de epjes P- en P+ en zet op ijs.
4. Pipeteer met de P20 pipet 10 μL van LIG naar het epje P+. Mix de vloeistof door 2 tot 3 maal op en neer te pipeteren. En zet het epje terug op ijs.
5. Houdt de epjes P+ en P- voor 15 minuten op ijs.

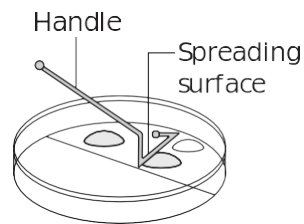


6. Label de petrischaaltjes zoals hierboven. En vergeet niet je initialen en datum op de rand te vermelden.
7. Zet de twee epjes P+ en P- na 15 minuten op ijs, precies 45 seconden in het waterbad van 42 °C.
8. Na de hitteschock zet de epjes meteen terug op ijs voor 1 minuut.
9. Na een minuut pipeteer je 150 μL LB in elk epje. Homogeniseer het mengsel door op het epje te tikken.
10. Incubeer de epjes op 37 °C voor 15 minuten in het thermoblok of waterbad.



11. Mix de vloeistof door 2 tot 3 maal op en neer te pipeteren. En pipeteer dan 50 μL op P- en daarna 50 μL op P+ op de verschillende helften van de petrischalen. En als laatste 100 μL P+ in de gehele petrischaal, zie flowchart.

12. Nadat de petrischalen zijn voorzien, spreidt je de vloeistof met de bacteriëspreider. Gebruik een spreider voor P- en een voor P+. P- helften: eerst van de LB plaat en dan de LB/amp plaat. P+ helften: eerst de LB plaat dan de LB/amp plaat en als laatste de LB/amp/ara plaat.

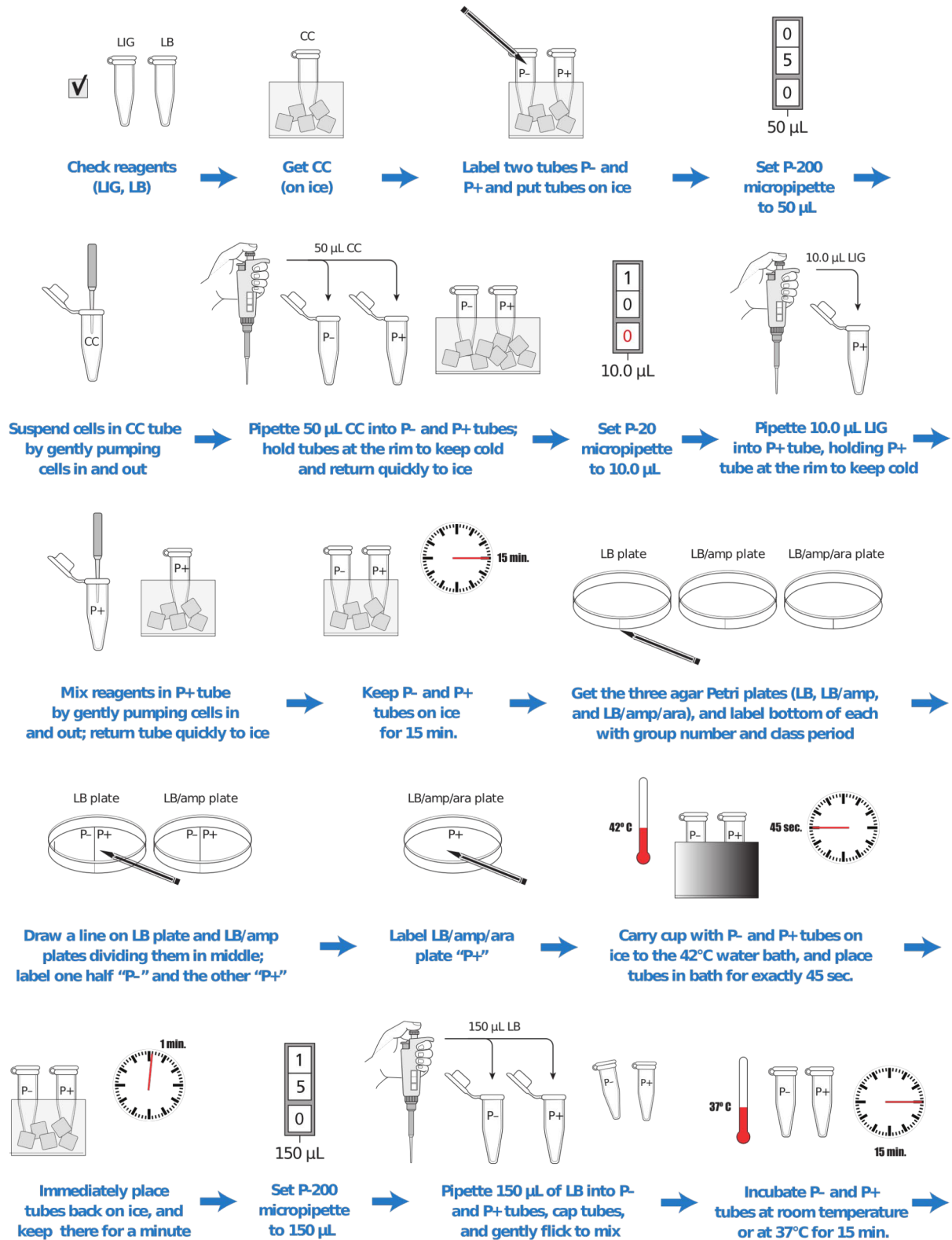


13. Laat de petrischalen zo voor 5 minuten staan.

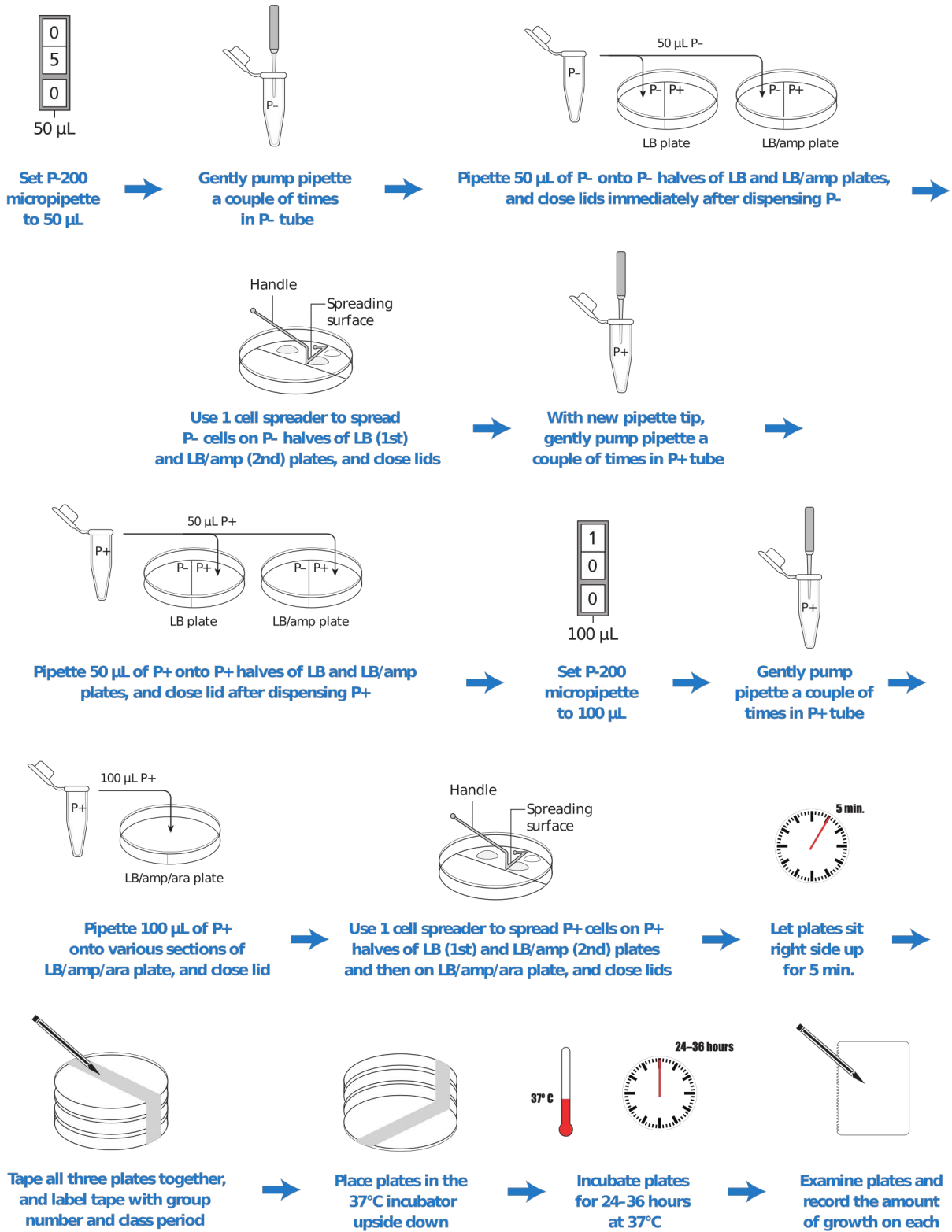
14. Tape de drie petrischalen aan elkaar vast. Draai ze om en plaats ze in de incubator op 37 °C.

15. Incubeer voor 24-36 uur op 37 °C

Lab 5 flowchart



Lab 5 flowchart (vervolg)



Amgen Biotech Experience

Scientific Discovery for the Classroom

Lab 6

Kolonie-PCR

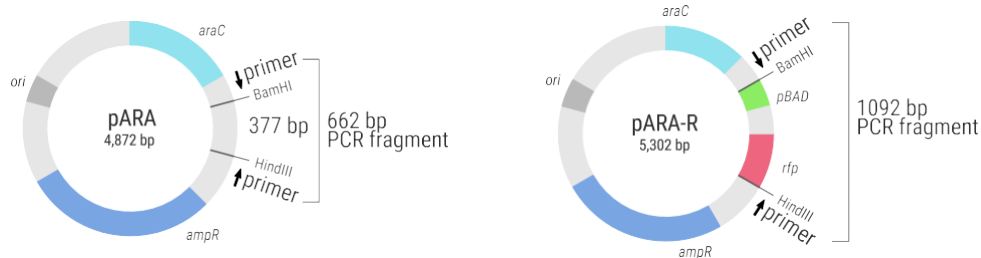
Lab 6 Kolonie-PCR om de aanwezigheid van plasmide pARA-R in rode bacteriën te verifiëren.

Sequencies van de primers

Forward primer: 5' -TGTAACAAAGCGGGACCAAAGC-3'

Reverse primer: 5' -GCGTTTCACTTCTGAGTTCGGC-3'

Plasmides pARA en pARA-R



Vorbereidingen lab 6

Haal de petrischalen uit de incubator.

Benodigheden op een centrale plek in het laboratorium

- Handschoenen
- R (plasmide pARA-R, resultaat van de ligatie van lab 3)
- A (plasmide pARA)
- LD (loading dye)
- M (DNA ladder)
- PCR
- Transilluminator/gel doc
- 1 elektroforesetank met een 0,8% agarosegel
- 1x TAE buffer
- Microcentrifuge

Op ijs:

- MIX (PCR mastermix)

Bereid voor elk duo

- 4 epjes à 0,2 mL
- 1 micropipet P200
- 1 micropipet P20
- Pipetpunten
- Een marker
- Bak met ijs
- Prullenbakje
- Labjas en veiligheidsbril
- Petrischalen



Voorzorgsmaatregelen

- Behandel de bacteriën alsof ze pathogeen zijn!
- Gebruik een labjas, handschoenen en een bril.
- Laat de petrischalen niet lang open staan.
- Raak niets aan dat in contact is gekomen met bacteriën zonder handschoenen te dragen.
- Stel de docent onmiddellijk op de hoogte als u op uw werkoppervlak bacterien spat.
- Gooi uw handschoenen, epjes aan het einde van het lab in de biologische afvalbak.
- Was uw handen grondig voordat u de zaal verlaat.

Lab 6

Deel A: PCR

Reagentia

- 1 bak met ijs
- MIX (PCR mastermix)
- R (plasmide pARA-R, resultaat van de ligatie in lab 3)
- A (plasmide pARA)

ATTENTIE: Altijd de epjes op ijs houden.

Benodigheden

- 4 epjes à 0,2 mL 1 micropipette P20
- 1 micropipet P200
- 1 micropipet P20
- Pipetpunten
- Een marker
- Bak met ijs
- Prullenbakje
- Labjas en veiligheidsbril
- Petrischalen

Volg de volgende instructies:

- I. Noteer zowel op de dop van de epjes als op de zijkant de nummers 1 tot en met 4 en je initialen:
 - Epje 1 bevat een rode kolonie
 - Epje 2 bevat een witte kolonie
 - Epje 3 bevat de controle plasmide pARA-R (R)
 - Epje 4 bevat de controle plasmide pARA (A)

2. Verdeel de vloeistoffen als volgt:

	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
MIX	23 μ L	23 μ L	23 μ L	23 μ L
Rode kolonie	*			
Witte kolonie		*		
R			2 μ L	
A				2 μ L

- Raak met een pipetpuntje voorzichtig een rode kolonie aan en stop het pipetpuntje in epje 1 met MIX, Meng met het pipetpuntje in de vloeistof zodat de cellen vrij komen van het pipetpuntje.
- Doe het zelfde met de witte kolonie voor epje 2.
-

ATTENTIE: Als er bellen in de epjes zitten, centrifugeer deze even een paar seconden.

3. Plaats de epjes in de PCR machine.

	Temperatuur	Tijd
Initiele denaturatie	95	180s
x30 cycles	Dénaturation	95
	Hybridation	53
	Extension	70
	Final Extention	70
		300s

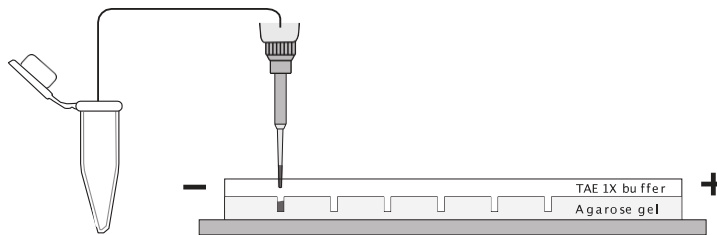
Deel B: Gel-elektroforese

Benodigdheden

- 4 epjes van de PCR van deel A
- LD (loading dye)
- 1 micropipet P20
- Pipetpuntjes
- Handschoenen
- Prullenbakje
- Gel-elektroforese bak met een 0,8% gel en 1x TAE buffer
- Transilluminator/gel doc

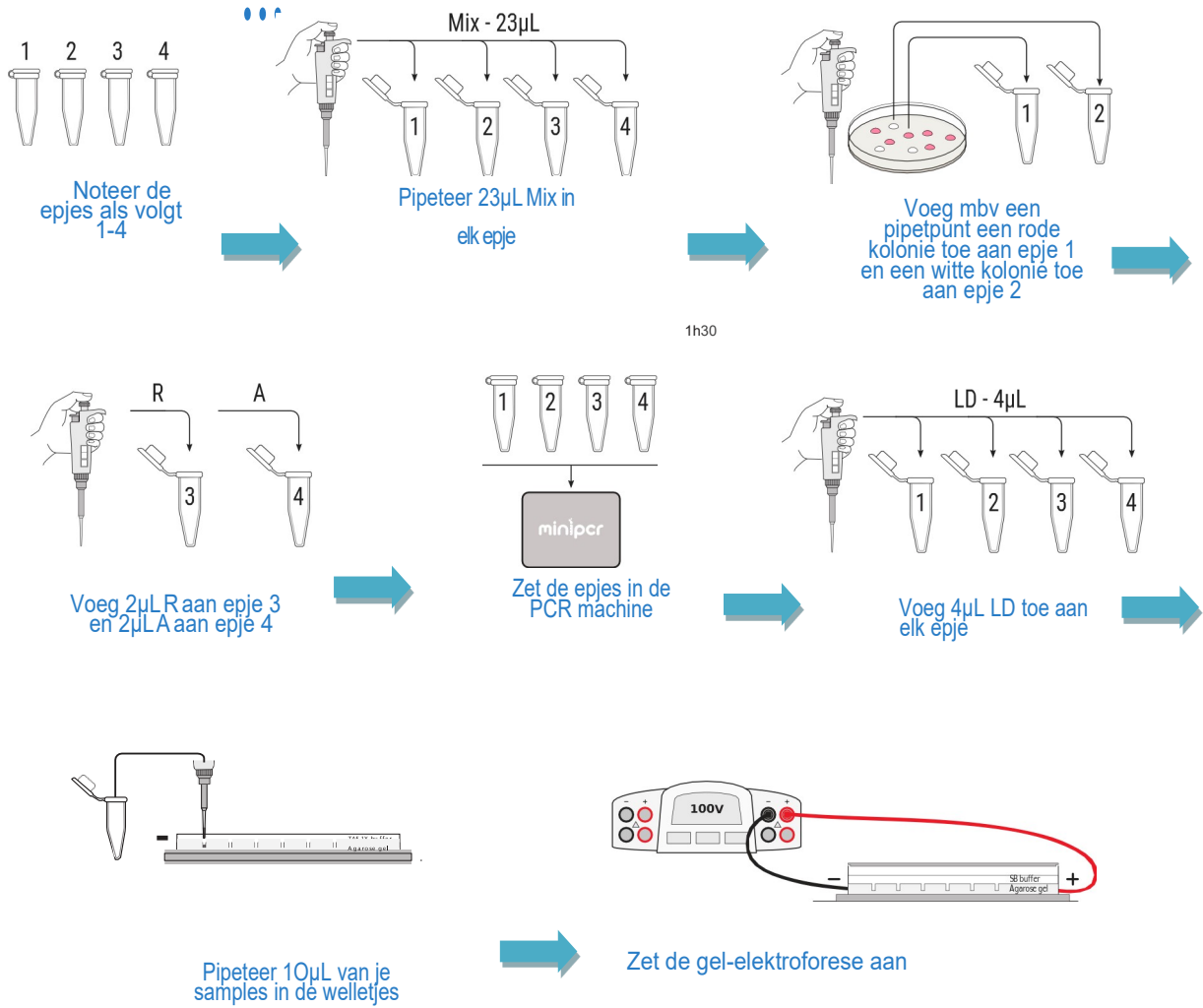
Volg de volgende instructies:

1. Voeg in elke epje 4 μL LD toe. En pipeteer een paar keer op en neer zodat de vloeistof zich goed mengt.
2. Pipeteer 10 μL in elk welletje na de M (DNA ladder).



3. Zet de Gel-elektroforese aan en zorg dat deze is ingesteld op 100 V.
4. Bekijk de gel na 20 minuten mbv de gel doc.

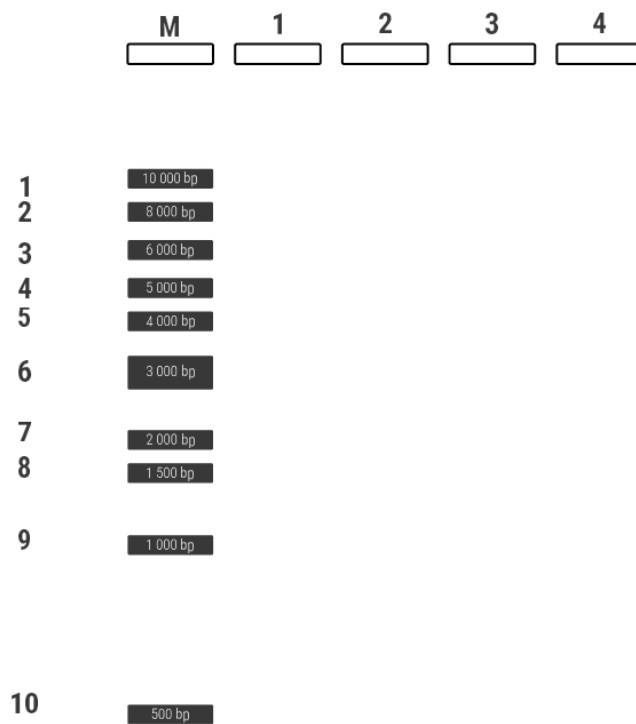
Lab 6 Flowchart



De resultaten

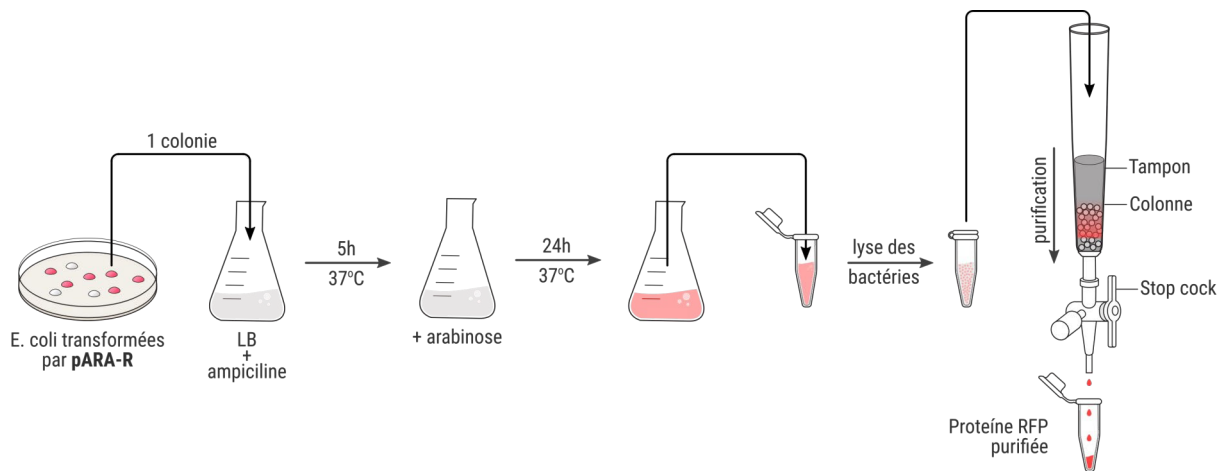
Lab 6 – Kolonie PCR

Welke resultaten verwacht je met de epjes 1 tot en met 4 (resp. Rode kolonie, witte kolonie, controle pARA-R, controle p-ARA)? Geef het hieronder aan:



Lab 7: Purificatie van het RFP gen dmv kolom-chromatografie

Om puur het rpf-gen te verkrijgen, wordt deze gepurificeerd dmv kolom-chromatografie. Hierna heb je alleen zuiver het rpf-gen. In het verhaal van insuline, heb je puur insuline wat nu gebruiksklaar is voor medicatie.



Reagentia

In het rekje:

- EB (elutie buffer)
- BB (binding buffer)
- WB (was buffer)
- Lyb (lyseer buffer)
- EC (cultuur met E.coli in LB/amp/ara)
- CEB (kolom buffer)

Benodigheden

- Micropipet P1000
- Pipetpuntjes
- 2 epjes à 1,5 mL
- Een marker pen
- Handschoenen
- Prullenbakje
- Kolom met constructie

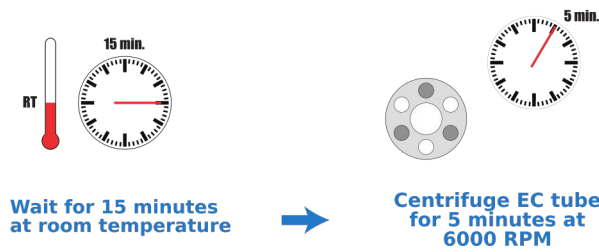
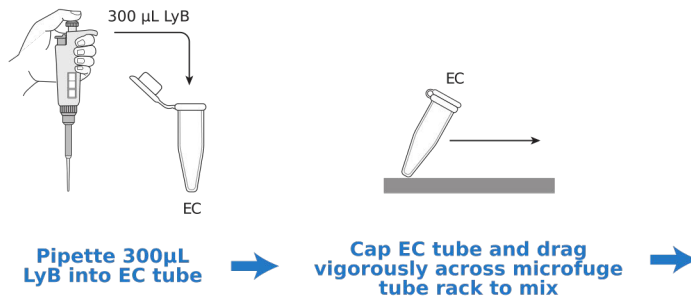
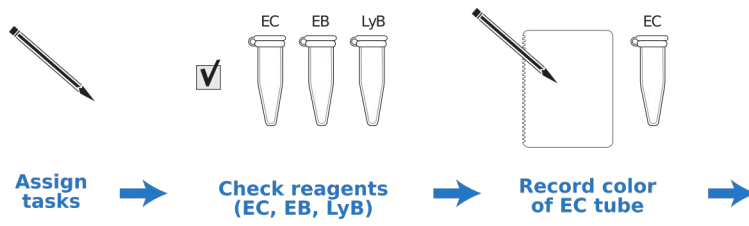
Volg de instructies:

1. Centrifugeer het epje met 1 ml EC voor 5 minuten op 6000 rpm.
2. Haal voorzichtig je epje uit de centrifugeermachine! Verstoor de pellet niet.
3. Pipetteer voorzichtig meerdere keren 200 µl de supernatant af, zorg dat je de pellet niet verstoort, anders opnieuw centrifugeren. Supernatant mag in de prullenbak.

4. Pipetteer nogmaals 1 ml van de cultuur met E.coli in LB/amp/ara bij EC.
5. Centrifugeer epje EC nogmaals voor 5 minuten bij 6000 rpm.
6. Pipetteer nogmaals voorzichtig meerdere keren 200 µl supernatant af, zorg dat je de pellet niet verstoord, anders opnieuw centrifugeren. Supernatant mag in de prullenbak. Verwijder voorzichtig zoveel mogelijk groeimedium.
7. Dan, pipeteer 300 µL lyseerbuffer in het EC epje. Mix de vloeistof door met het buisje over het rekje te gaan.
8. Laat staan voor 15 minuten.
9. Centrifugeer voor 5 minuten bij 6000 rpm.
10. Zet je kolom klaar voor gebruik. Zorg dat de kolom buffer nog net boven de resin (witte substantie) zit.
11. Label twee epjes met SUPER en RFP.
12. Pipeteer 200 µL supernatant (de vloeistof boven de neerslag) uit EC epje in SUPER epje.
13. Pipeteer 200 µL binding buffer (BB) in het SUPER epje.
14. Pipetteer heen en weer zodat het mixt.

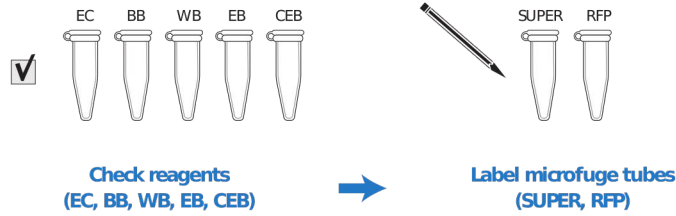
Let op: zet je pipetpunt tegen de wand van de kolom tijdens het pipetteren. Hiermee wordt de resin het minst verstoord.
15. Pipetteer dan 400 µL in de kolom en zet het kraantje open. Vergeet niet een afvalbakje onder de kraan te zetten.
16. Sluit het kraantje als de vloeistof nog net boven de resin is.
17. Pipetteer 1000 µL Was Buffer (WB) in de kolom en zet de kraan open. Vergeet niet een afvalbakje onder de kraan te zetten.
18. Sluit het kraantje als de vloeistof nog net boven de resin is.
19. Pipetteer 1000 µL ElutieBuffer (EB) in de kolom. Met de elutiebuffer komt het rfp-gen los van het kolom, rozige vloeistof. Wanneer alleen het rfp-gen (roze vloeistof) eruit komt, vang je dit op in het RFP epje. Dit doe je door geduldig te wachten en de kraan open te zetten wanneer de roze vloeistof eruit komt.
20. Wanneer nodig, pipetteer je nogmaals 1000 µL elutiebuffer (EB) in de kolom. Vang het gepurifieerde rpf-gen op in het RFP epje.
21. Sluit de kraan wanneer klaar.
22. Voeg 1000 µL CEB buffer toe zodat de resin niet uitdroogd.
23. Bekijk met de groep de verschillende RPF epjes onder de transluminator. Wat zie je?

Lab 7 Flowchart

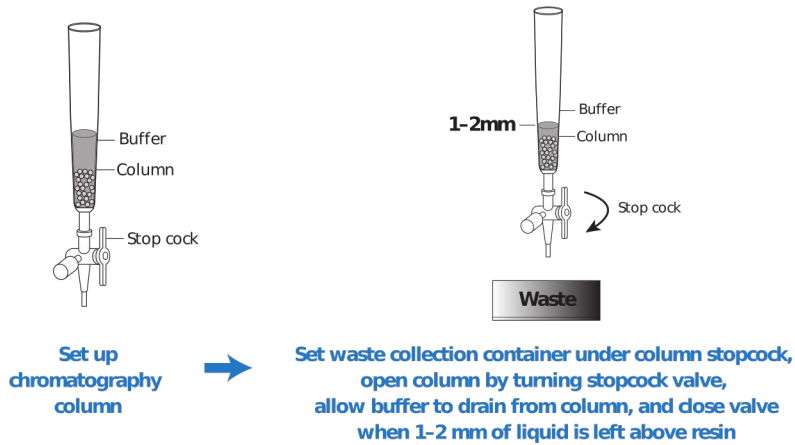


Lab 7 Flowchart (vervolg1)

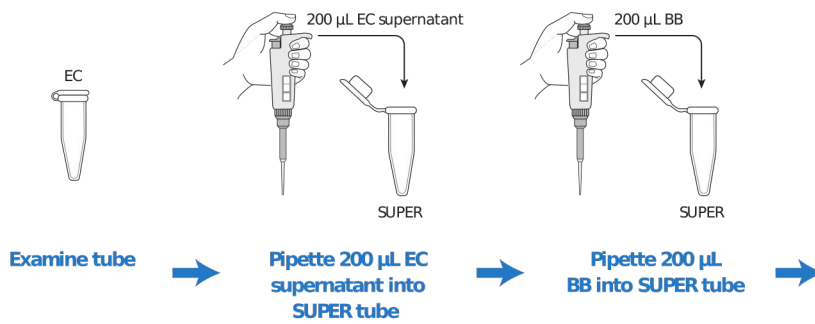
One group member:



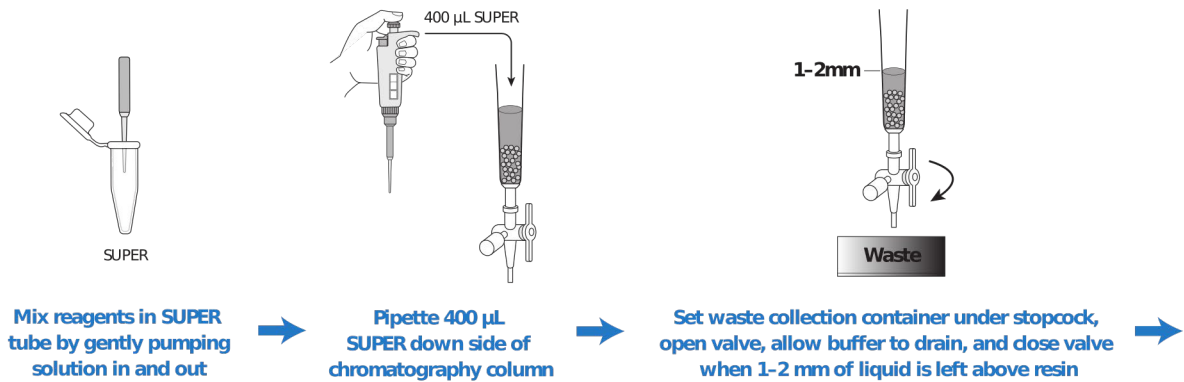
One group member:



One group member:



Whole group:



Lab 7 Flowchart (Vervolg2)

