

LESKIST: PROEF JE PTC?



MELANIE ROSENHART
ELLEN VAN DE LOGT
IRIS VERHOEFF
RICHARD GROEN



AMGEN® Biotech Experience

Scientific Discovery for the Classroom

Nederland

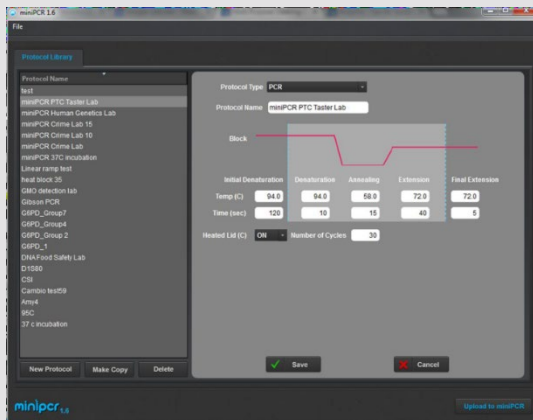
DOEL

- Practicum uitvoeren zoals op school
- Vragen beantwoorden
- Moeilijkheden voorkomen
- Ophalen en retourneren leskist

MINIPCR APP

MiniPCR 16

- Android en Iphone
- Laptop/pc



Download de gratis
miniPCR app bij
www.minipcr.com/downloads

Tip: geeft de miniPCR aan niet
de telefoon te herkennen, sluit
dan eerst het programma af en
start de app opnieuw op.

VOORBEREIDING

- **Ophalen leskist 1 van 3 locaties, alleen na afspraak**
- **Minikoeler aankomst school → vriezer**
- **Vooraf practicum:**
 - **Afdraaien reagentia**
 - **Uitpipetteren reagentia per groepje of individuele leerling**
 - **Gekleurde vloeistoffen uitpipetteren**
 - **Pipetteervloeistof maken**
 - **Optioneel: Agar oefengels gieten**
 - **Optioneel: Vooraf gels gieten**

PROEFOPZET



DNA isolatie – Neem je eigen DNA af met behulp van een tandenstoker.



PCR (Polymerase chainreaction) – specifieke DNA fragmenten worden vermeerderd.



Restrictie digestie – het knippen van DNA fragmenten met een restrictie enzym.



Gel-elektroforese – de geknipte DNA fragmenten van elkaar scheiden en zichtbaar maken



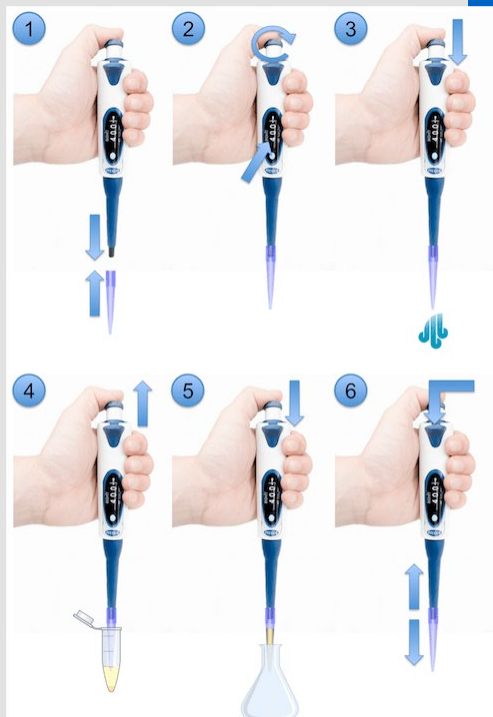
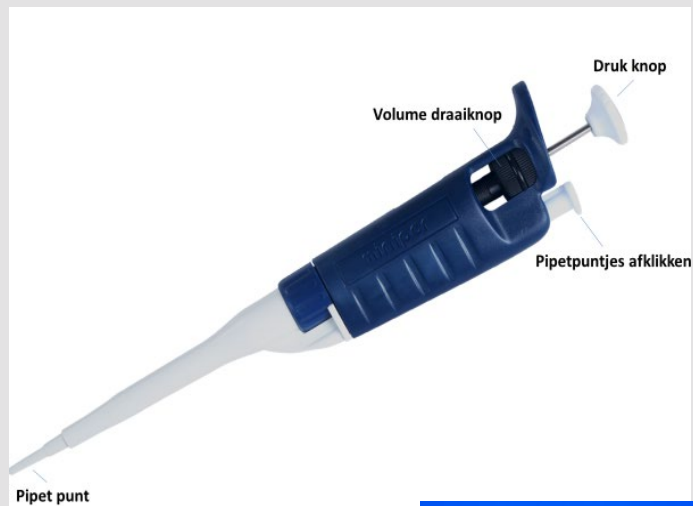
Smaaktest – proef jij PTC?

Lesuur: Pipetteoefening

Blokkuur: DNA-isolatie ~30 minuten en PCR ~1,5 uur

Blokkuur: Restrictie digestie ~15 minuten, Gelelectroforese ~30 minuten en Interpretatie resultaten

PIPETTEEROEFENING



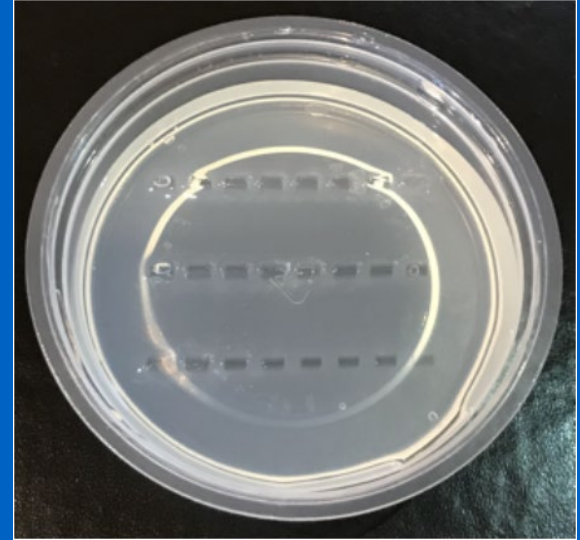
PIPETTEEROEFENING (1)

1. Gebruik de pipet van 2-20 μL .
2. Druk een pipetpunt op de pipet.
3. Pipeteer gekleurde vloeistof: 10 μL , 7,5 μL , 5 μL en 2,5 μL op een gelamineerd papiertje of in een petrischaaltje.
4. Ondersteun de pipet met je niet pipetteerde hand, zie foto.



PIPETTEEROEFENING (2)

1. Gebruik de pipet van 2-20 μL .
2. Draai de pipet naar het juiste volume: 10 μL .
3. Druk een pipetpunt op de pipet.
4. Pipeteer 10 μL gekleurde vloeistof in het welletje.
5. Voel met je pipetpunt waar de zijkanten van het welletje zitten en druk niet door de gel heen.
6. Oefen door in een paar welletjes.



Tip: Giet zelf vooraf agar platen met een kammetje of gebruik de herbruikbare siliconen gelletjes.



DNA-ISOLATIE

1. Pipetteer 50 μL X-tract DNA-extractiebuffer in het PCR-epje.
2. Spoel je mond met kraanwater, indien nodig.
3. Wrijf met de tandenstoker met de brede kant minimaal vijf keer langs de binnenkant van beide wangen. Het zou geen pijn moeten doen! Een klein beetje speeksel is ook prima, maar niet te veel!
4. Plaats de tandenstoker in je epje met de DNA-extractiebuffer.
5. Draai de tandenstoker goed in het rond, zodat zoveel mogelijk wangslimvliescellen in de oplossing komen. Haal de tandenstoker er vervolgens uit en sluit het epje. Je kan de tandenstoker weggooien.
6. Incubeer het epje in de miniPCR voor 10 minuten, op 95 °C. Volg de stappen in de handleiding

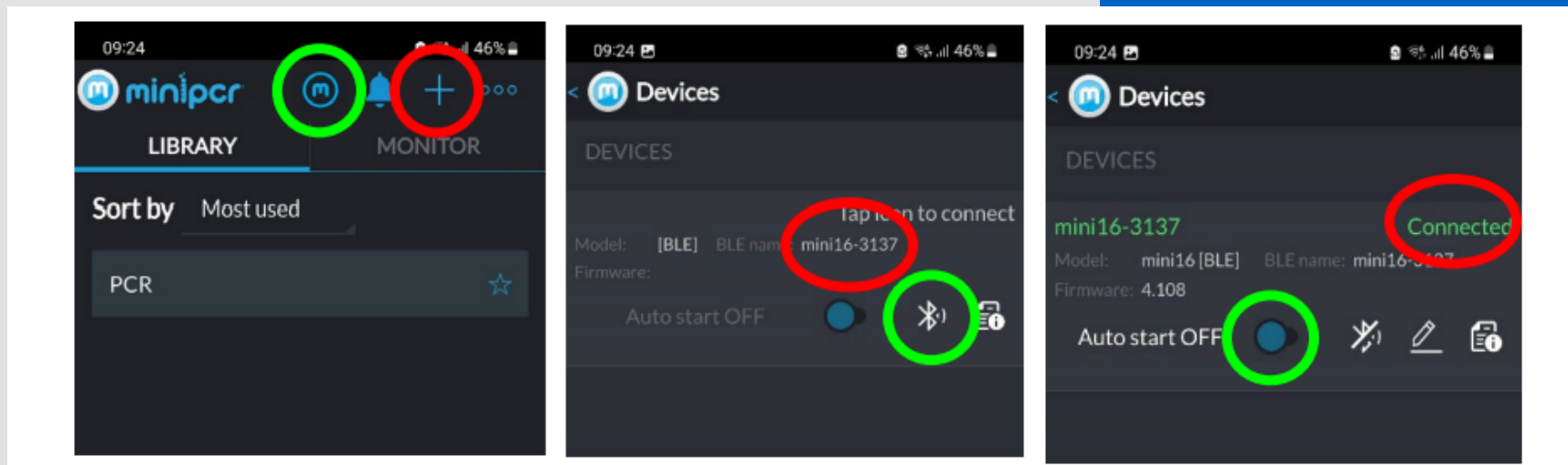
Tip: pipetteer per leerling of per groepje leerlingen de extractiebuffer uit.

Tip: geeft de miniPCR aan niet de telefoon te herkennen, sluit dan eerst het programma af en start de app opnieuw op.

Tip: zorg dat er goed DNA wordt geschraapt want dit is cruciaal voor de vervolgstappen.

Let op: Ga hygiënisch te werk

MINIPCR APP AANSLUITEN TELEFOON



PCR

- Pipetteer het PCR-reagens in je epje en zet het epje daarna weer op ijs. De PCR reagentia bevatten:
 - 12,5 μ L PTC-primermix
 - 12,5 μ L PCR-mastermix
- Pipetteer 3 μ L van je eigen DNA sample afkomstig uit de PCR in het nieuwe epje met de PCR-reagentia.
- Haal de 3 μ L uit de bovenkant van de oplossing.
- Start de PCR volgens de handleiding

Tip: pipetteer per leerling of per groepje leerlingen de extractiebuffer uit.

Tip: geeft de miniPCR aan niet de telefoon te herkennen, sluit dan eerst het programma af en start de app opnieuw op.

GEL VOORBEREIDEN EN GIETEN

- Los voor 1 gel 1 capsule GelGreen® Agarose Tabs™ op in 20 mL demiwater
- Zwenk de erlenmeyer zodat de reagentia goed mixen.
- Verhit de reagentia in een magnetron, waterbad of op de kookplaat totdat de capsule is opgelost en de oplossing helder oogt.
- Pak de erlenmeyer niet met blote handen maar met handschoenen en vergeet je veiligheidsbril niet op te zetten.
- Laat de oplossing afkoelen totdat de erlenmeyer met de hand is vast te houden.
- Zet het kammetje met de 13 slotjes in de gel-giet-bak in de bovenste stand.
- Giet de oplossing in de gel-giet-bak met kammetje.

Tip: Bedenk van te voren om zelf de gels vooraf te gieten of dit er groepjes leerlingen zelf te doen.

Tip: vooraf gegoten gels kunnen in plasticfolie in koelkast bewaard worden.

RESTRICTIE DIGESTIE (1)

- Voeg 1 μ l restrictie enzym toe aan het PCR product (14 μ l)
 - Om goed te mixen, pipetteer op en neer
 - Wanneer nodig, gebruik de minicentrifuge
 - Bewaar het overige pcr product
- *Let op: restrictie enzym en samples op ijs houden**

	Volume
PCR product	14 μ l
Restrictie enzym	1 μ l
Totaal	15 μ l

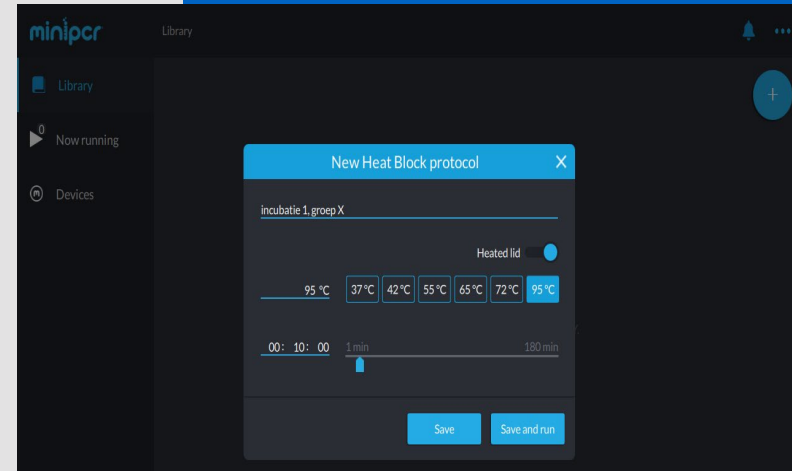
Tip: Kijk goed om het enzym in de vloeistof gepipetteerd wordt.

Tip: let op dat je niet door de weerstand pipetteert.

RESTRICTIE DIGESTIE (2)

- Zet de samples in de PCR machine
- Open Heat Block protocol dmv het plusje
- Incubeer de samples voor 15 minuten op 37 graden celsius

Tip: geeft de miniPCR aan niet de telefoon te herkennen, sluit dan eerst het programma af en start de app opnieuw op.

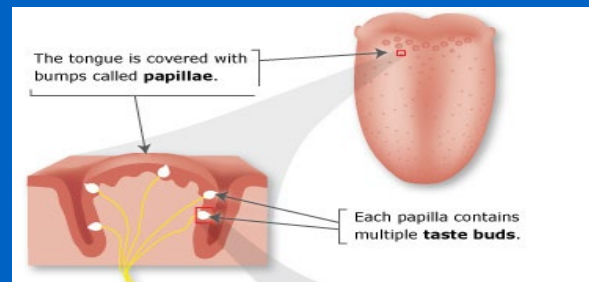


BITTER PROEVEN

- **PTC** (Phenylthiocarbamide) gen - **TAS2R38**
 - **Smaakreceptor voor bitter**
 - **3 SNP's**

Positie (bp)		Proever	niet-Proever	
145	C	Pro (P)	G	Ala (A)
785	C	Ala (A)	T	Val (V)
886	G	Val (V)	A	Ile (I)

De tong bestaat uit smaakpapillen, die elk verschillende smaken kan detecteren.



Bron: MiniPCR

ATGTTGACTCTAACTCGCATCCGCACTGTGTCTATGAAGTCAGGAGTACATTTTC
TGTTCAATTTAGTCCTGGAGTTTGCAGTGGGGTTTCTGACCAATGCCTTCGTTTT
CTTGGTGAATTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCAG¹⁴⁵CCACTGAGCAACAGTGATTGT

CCTCACTTCACAGTCACAACCTGTGCTATTTCATGAATAACAATAACAAGGCTCAACT
GGCAGATTAAAGATCTCAATTTATTTTATTTCCTTTCTCTTCTGCTATCTGTGGTC
TGTGCCTCCTTTCTATTGTTTCTGGTTTCTTCTGGGATGCTGACTGTCTCCCTG
GGAAGGCACATGAGGACAATGAAGGTCTATACCAGAACTCTCGTGACCCCAGCC
TGGAGGCCACATTAAAGCCCTCAAGTCTCTTGTCTCCTTTTTCTGCTTCTTTGT
GATATCATCCTGTG⁷⁸⁵CTGCCTTCATCTCTGTGCCCTACTGATTCTGTGGCGCGAC
AAAATAGGGGTGATGGTTTGTGTTGGGATAATGGCAGCTTGTCCTCTGGGCATG

GATATCATCCTGTG⁷⁸⁵CTGCCTTCATCTCTGTGCCCTACTGATTCTGTGGCGCGAC
AAAATAGGGGTGATGGTTTGTGTTGGGATAATGGCAGCTTGTCCTCTGGGCATG
⁸⁸⁶GTCCTGATCTCAGGCAATGCCAAGTTGAGGAGAGCTGTGATGACCATTCT
AGCTCTGGGCTCAGAGCAGCCTGAAGGTAAGAGCCGACCACAAGGCAGATTCCCGG
ACACTGTGCTGA



RESTRICTIE DIGESTIE

Taster Allele

...TGTGCTGCCTT...
...ACACGACGGAA...

↓
...GCNGC...
...CGNCG...
↑

**Restriction
digest**

...TGTGC TGCCTT...
...ACACGA CGGAA...

Non-Taster Allele

...TGTGTTGCCTT...
...ACACAACGGAA...

**No
restriction
site**

...TGTGTTGCCTT...
...ACACAACGGAA...

GEL-ELECTROFORESE KLAARMAKEN (1)

- Haal het kammetje voorzichtig uit de gel.
- Plaats de gel met bakje in de gel elektroforese
- Giet 25 mL 1x TBE buffer over de gel.
- Zorg dat de gel volledig onderstaat. Beweeg voorzichtig even het bakje en de gel.
- Vul 1x TBE buffer indien nodig. Maar niet te veel. Anders gaat het gelletje drijven en kan het breken.

Loading dye toevoegen aan de samples is niet nodig. Dit is al aanwezig in het sample.

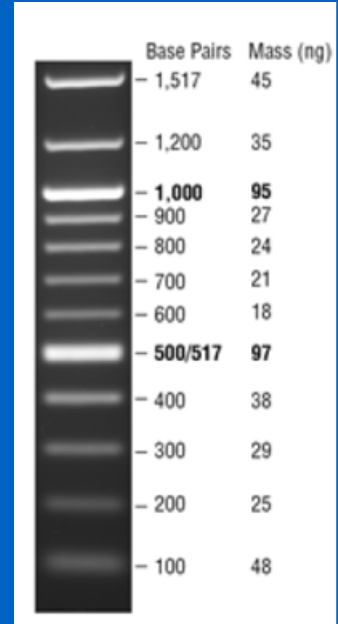
Tip: wanneer er ruimte is kan er naast het sample als controle ook het ongeknipte DNA op gel worden gebracht

Tip: 3 controle samples mee runnen, 10 μ L

GEL-ELECTROFORESE (2)

- Pipetteer in laan 1 10 μ L DNA ladder
 - Pipetteer 12 μ L van de samples in laan 2-9
- Tip: controleer of je pipetpuntje leeg is.
- Noteer in welke laan wiens sample zit
 - Zet de gel-elektroforese aan en klik op de 'run' knop
 - Bekijk na 35 minuten de gel, wanneer de laatste 5 bandjes van de ladder goed uit elkaar staan is de gel klaar.

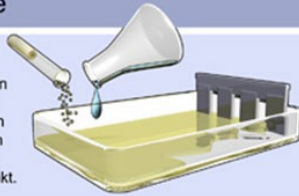
Tip: veeg de condens af voordat je kijkt, gebruik hierbij het lampje. Laat het lampje niet tijdens de run aanstaan.



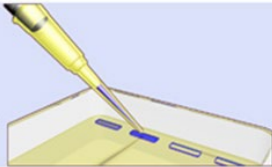
GEL-ELECTROFORESE (3)

Gelelectroforese

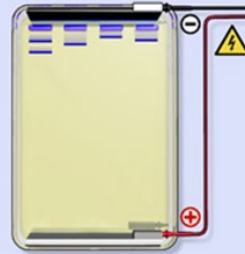
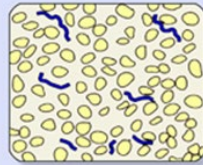
Gel wordt gemaakt door poeder en water te mengen en te verwarmen en deze oplossing te laten stollen in een bakje. In de gel zit een kleurstof dat aan het DNA bindt en het zichtbaar maakt.



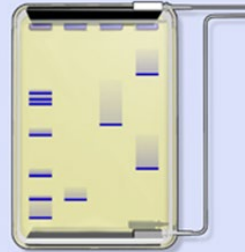
Oplossing met DNA-fragmenten van bekende grootte (linker laantje) en DNA-monsters worden in de gel geïnjecteerd.



Gel wordt aan de bovenkant negatief geladen: DNA begint te 'lopen'. Kleine DNA fragmenten bewegen sneller dan grote.



Spanningsverschil wordt opgeheven en DNA verloop is zichtbaar geworden.



gel met gescheiden fragmenten kan gefotografeerd worden voor vergelijkend onderzoek.

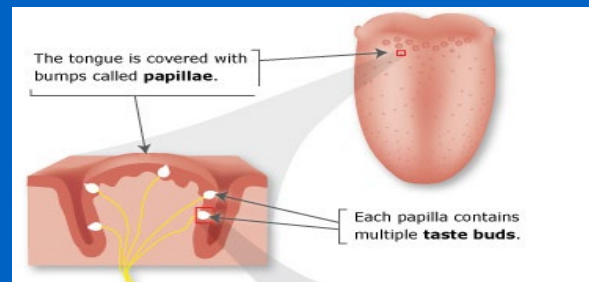


BITTER PROEVEN

- **PTC** (Phenylthiocarbamide) gen - **TAS2R38**
 - **Smaakreceptor voor bitter**
 - **3 SNP's**

Positie (bp)	Proever		niet-Proever	
145	C	Pro (P)	G	Ala (A)
785	C	Ala (A)	T	Val (V)
886	G	Val (V)	A	Ile (I)

De tong bestaat uit smaakpapillen, die elk verschillende smaken kan detecteren.



Bron: MiniPCR

ATGTTGACTCTAACTCGCATCCGCACTGTGTCTATGAAGTCAGGAGTACATTTTC
TGTTCAATTTAGTCCTGGAGTTTGCAGTGGGGTTTCTGACCAATGCCTTCGTTTT
CTTGGTGAATTTTGGGATGTAGTGAAGAGGCAG¹⁴⁵CCACTGAGCAACAGTGATTGT

CCTCACTTCACAGTCACAACCTGTGCTATTTCATGAATAACAATAACAAGGCTCAACT
GGCAGATTAAAGATCTCAATTTATTTTATTTCCTTTCTCTTCTGCTATCTGTGGTC
TGTGCCTCCTTTCTATTGTTTCTGGTTTCTTCTGGGATGCTGACTGTCTCCCTG
GGAAGGCACATGAGGACAATGAAGGTCTATACCAGAACTCTCGTGACCCCAGCC
TGGAGGCCACATTAAAGCCCTCAAGTCTCTTGTCTCCTTTTTCTGCTTCTTTGT
GATATCATCCTGTG⁷⁸⁵CTGCCTTCATCTCTGTGCCCTACTGATTCTGTGGCGCGAC
AAAATAGGGGTGATGGTTTGTGTTGGGATAATGGCAGCTTGTCCTCTGGGCATG

GATATCATCCTGTG⁷⁸⁵CTGCCTTCATCTCTGTGCCCTACTGATTCTGTGGCGCGAC
AAAATAGGGGTGATGGTTTGTGTTGGGATAATGGCAGCTTGTCCTCTGGGCATG
⁸⁸⁶GTCCCTGATCTCAGGCAATGCCAAGTTGAGGAGAGCTGTGATGACCATTCT
A
GCTCTGGGCTCAGAGCAGCCTGAAGGTAAGAGCCGACCACAAGGCAGATTCCCGG
ACACTGTGCTGA



BITTER PROEVEN

- **Wie houdt er van spuitjes?**
- **Wie houdt er van tonic?**

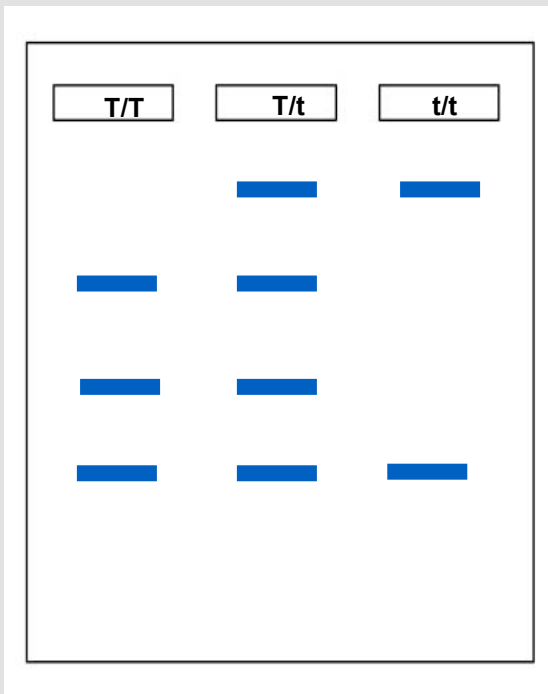
	Vies	Valt mee	Lekker
Spruitjes			
Tonic			

SMAAKTEST UITVOEREN

- Strookje papier met PTC erop
- Tegelijk proeven
- Smaakervaring voorhouden
 - Proeft, proeft een beetje of proeft niets
- Papier kan je weggooien

INTERPRETATIE

150 bp

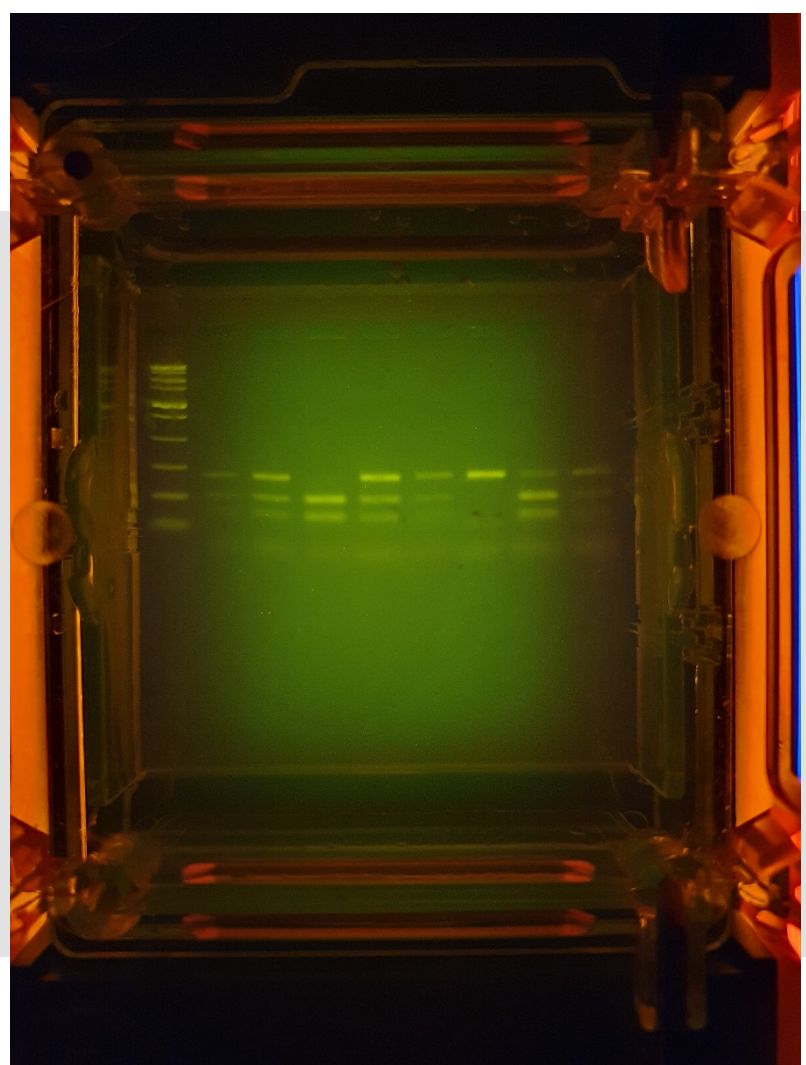


← 250 bp

← 100 bp

← 50 bp = primer dimer

RESULTATEN VAN EEN KLAS



TIPS INTERPRETATIE

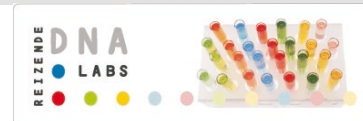
Bij geen resultaat. Dit gebeurt ook in de klas en in het onderzoek. Meerdere factoren spelen hierin een rol:

- 1. DNA afname met tandenstoker: bij geen DNA, geen bandje(s)**
- 2. Pipetteerstappen voor de DNA-isolatie en PCR, bij ontbreken van deze stappen, geen bandje(s)**
- 3. Pipetteerstap voor docent van het restrictie enzym, bij ontbreken van deze stap, geen geknipt DNA, hierdoor wellicht discrepantie met fenotype/genotype.**
- 4. Pipetteerstap inladen gel, bij het ontbreken van deze stap komt er geen DNA in het welletje, hierdoor geen bandje(s).**
- 5. Alleen een bandje rond de 50bp zichtbaar (onder het laatste bandje van de ladder), betekent geen DNA aanwezig, maar dat de PCR wel is voldaan ivm primer dimer.**

EVOLUTIE

- PTC is te vinden in groentes die bitter smaken
- Het evolutionair nut van bitter proeven is om bedorven voedsel of giftig voedsel te herkennen. Dat smaakt vaak bitter.
- [Video](#) (03:58-07:55 en 17:14-20:25)

```
TAS2R38_Papio_hamadryas      MLTLTHICTVSYEVRSTFLFISVLEFVAVGFLTNAFISLVNFWDVVKRQPLNSDCVLLCL 60
TAS2R38_Hylobates_klossii    MLTLTRICTVSYEVRSTFLFISVLEFVAVGFLTNAFIFLVNFWDVVKRQPLNSDCVLLCL 60
TAS2R38_Pongo_pygmaeus      MLTLTRICAVSYEVRSTFLFISVLEFVAVGFLTNAFIFLVNFWDVVKRQPLNSDCVLLCL 60
TAS2R38_Human                MLTLTRIRTVSYEVRSTFLFISVLEFVAVGFLTNAFVFLVNFWDVVKRQALNSDCVLLCL 60
TAS2R38_Gorilla             MLTLTRIRTVSYEVRSTFLFISVLEFVAVGFLTNAFVFLVNFWDVVKRQPLNSDCVLLCL 60
TAS2R38_Pan_troglodytes     MLTLTRIHTVSYEVRSTFLFISVLEFVAVGFLTNAFVFLVNFWDVVKRQPLNSDCVLLCL 60
TAS2R38_Pan_paniscus        MLTLTRIHTVSYEVRSTFLFISVLEFVAVGFLTNAFVFLVNFWDVVKRQPLNSDCVLLCL 60
TAS2R38_Rattus_norvegicus    MLTLTPVLTVSYEAKISFLFLSWEFVAVGILANAFIVLVNFWDVVKRQPLNDCIALLLCL 60
TAS2R38_Mus_musculus        MLSLTPVLTVSYEAKISFLFLSWEFVAVGILANAFIVLVNFWDVVKRQPLNDCIALLLCL 60
**:* : :****: :***:*:*****:***: **:*:*:* * * * * .****
```



LESKIST: PROEF JE PTC?



MELANIE ROSENHART
ELLEN VAN DE LOGT
IRIS VERHOEFF
RICHARD GROEN



AMGEN® Biotech Experience

Scientific Discovery for the Classroom

Nederland