

DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

Doelgroep	2 ^e fase VWO
Niveau	4 sterren
Vakken	BI/SK
Subdomeinen	Levenscyclus en erfelijke informatie/ eiwitsynthese
Werkvorm	Groep
Tijdsduur (leerling)	voorbereiding 1 uur, 5 uur op de universiteit
Auteurs	Jan Verver (Isg Moleculaire Biologie), Annelies Davis, Clasien Lever-de Vries (VWO-campus)
Vragen?	http://www.vwo- campus.net/vraagbaak

Samenvatting

Je gaat theoretisch en praktisch een proef doen, die typisch is voor een moleculair-biologisch onderzoekslab:
het knippen en daarna analyseren van recombinant plasmide-DNA.

Inleiding

In het moleculair-biologisch laboratorium is het maken van recombinant DNA aan de orde van de dag:
DNA wordt door middel van “plakken & knippen” geheel naar wens in elkaar gezet, meestal met behulp van plasmiden uit bacteriën.
En altijd moet door middel van gelelectroforese het DNA-construct worden gecontroleerd.
Want als je weet hoe het (correcte) construct in elkaar zit, weet je ook hoe het DNA-bandjespatroon in de gel uit moet komen te zien; en andersom...



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

vwo-campus
VWO-campus

Hoezeer knippen & plakken & cloneren standaard is in moleculair-biologisch onderzoek, kun je zien in het volgende praktijkvoorbeeld:

Een flink aantal laboratoria (b.v. binnen het departement Plantenwetenschappen van Wageningen Universiteit) maakt bij het onderzoek gebruik van een bepaald eiwit, dat inmiddels erg bekend is vanwege een bijzondere eigenschap: het is van zichzelf fluorescerend. Het is een groen-oplichtende eiwit (*Green Fluorescent Protein, GFP*), dat in de natuur voorkomt in een lichtgevende kwallensoort, en dat jaren geleden gecloneerd is in *E.coli* (knippen/plakken/ cloneren!).

Door de coderende basevolgorde van GFP in te bouwen (knippen/plakken/cloneren!) in, of in de plaats van, een te onderzoeken gen (bv een plantengen, dat dan wel al gecloneerd moet zijn (knippen/plakken/cloneren!)), kun je bv te weten komen wáar in de plant het eiwitproduct van dat gen gemaakt wordt. Breng dit gecombineerde DNA in de plant, en je weet: waar je nu fluorescentie ziet, daar staat normaal-gesproken dat gen dus áan! (meestal bepaalt de basenvolgorde van het stuk DNA, dat aan een gen voorafgaat (de zg *promoter*), of dat gen in bepaalde cellen al dan niet aanstaat). Waar een gen áanstaat, vormt natuurlijk een aanwijzing voor de mogelijke functie van het gen. En de functie van een gen achterhalen, dát is waar het veel DNA-onderzoekers om te doen is!

Dat GFP-gen is overigens gewoon te koop: als een stuk DNA, ingebouwd in allerlei *E.coli*-plasmides! Allemaal gedaan viaknippen/plakken/cloneren..



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

Doel

Een eerste (praktische) indruk krijgen van wat veelal de dagelijkse praktijk is in een moleculair-biologisch onderzoekslaboratorium: het cloneren van DNA-fragmenten in bacteriën.

Theorie

Plasmiden

Bacteriën kunnen, naast hun (éne) chromosoom, verschillende kopieën bevatten van een ánder, veel kleiner, DNA molecuul. Deze kleine, circulaire DNA-moleculen worden plasmiden genoemd.

In veel onderzoekslaboratoria worden plasmiden uit de bacterie *E.coli* gebruikt bij de constructie (knippen & plakken) van recombinant DNA. Recombinante plasmiden worden in elkaar geknutseld door fragmenten van het DNA van verschillende organismen (of van eerder geconstrueerde recombinante plasmiden) te combineren tot één molecuul.

Waarom zou je recombinante plasmiden willen maken?

Twee voorbeelden:

- Als het recombinante plasmide een compleet gen bevat, kun je dat in de bacterie snel en efficiënt laten vertalen tot een eiwit. Uit een bacteriekweek kun je dan het betreffende eiwit in grote hoeveelheden opzuiveren, om daar dan verder onderzoek aan te kunnen doen. Vaak gaat het dan om een eiwit, dat slechts in kleine hoeveelheden en met grote moeite uit zijn eigen organisme te zuiveren valt.
- Je kunt het plasmide ook overbrengen naar een ander soort bacterie, *Agrobacterium*, die een deel van de plasmides, die hij herbergt, in het genoom van planten kan inbouwen. Heb je een "vreemd gen" ingebouwd in je plasmide, dan kun je er dus zo voor zorgen, dat dit gen wordt ingebouwd in die plant. Dit is een manier om genetisch gemodificeerde planten te verkrijgen.

Het werken met de plasmiden (en niet met het grote, chromosomale DNA) is handig om verscheidene redenen:

- Plasmiden kunnen gemakkelijk in grote hoeveelheden gezuiverd worden uit bacteriekweken
- Plasmiden kunnen gemakkelijk worden ingebracht in "lege" bacteriën
- Bacteriën, die een plasmide hebben opgenomen, kunnen gemakkelijk daarop geselecteerd worden (meestal kun je gebruik maken van een antibioticum-resistentie-gen, dat op het plasmide ligt)



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

Restrictie-enzymen

Restrictie-enzymen (RE's) zijn enzymen, die DNA op bepaalde plaatsen kunnen doorknippen. Er zijn er een paar honderd bekend, en veel zijn er in gezuiverde vorm te koop voor gebruik in onderzoekslaboratoria. De namen van RE's worden afgeleid van de bacteriën waarin ze zijn ontdekt.

De functie van RE's is binnendringend DNA van bacteriële virussen ("bacteriofagen") onschadelijk te maken, door dat DNA kapot te knippen (het *eigen* DNA van de bacteriën is op een speciale manier beschermd tegen dit knippen).

Elk RE kan zijn eigen plekje in DNA herkennen, daaraan binden, en het DNA daar doorknippen. Zo'n plekje (herkenningsplaats, knipplaats) bestaat meestal uit 6 basen achter elkaar, in een bepaalde volgorde. Zo is de knipplaats van b.v. het restriction enzyme EcoR I (éékoo-eréen, uit de bacterie *Escherichia coli*) het DNA stukje: GAATTC. Ander voorbeeld: BamHI (bam haa-éen) komt uit *Bacillus amyloliquefaciens H* en herkent GGATCC.

In het lab werken we meestal met commercieel verkregen RE's en op het lab gezuiverde DNA's (in Wageningen veelal DNA uit bacteriën en planten). Je koopt en gebruikt altijd een bepaald aantal units restrictie-enzym. Eén unit is die hoeveelheid enzym, die in één uur, bij 37°C, één microgram lineair DNA knippen kan.

Geknipte stukken DNA kunnen (met behulp van een andersoortig enzym, zogenaamde ligasen) kunstmatig aan elkaar geplakt worden, waardoor z.g. recombinant DNA ontstaat.

De uiteinden van geknipt DNA zijn verschillend bij gebruik van verschillende RE's. Plakken kan alleen als uiteinden door hetzelfde RE zijn gemaakt: dus een EcoR I uiteinde kan alleen aan een ander EcoR I uiteinde geplakt worden (en niet aan b.v. een BamH I uiteinde). Daarbij ontstaat weer één intacte herkenningsplaats.

Agarose-gelelectroforese

Door middel van agarose-gelelectroforese kunnen de groottes bepaald worden van DNA -fragmenten in een DNA monstertje.

Een agarose-gel is een gelatine-achtige plak met aan één kant putjes ("slots") om DNA-bevattende monstertjes in aan te brengen. Door de gel in een elektrisch veld te brengen, gaan de DNA-moleculen (die negatief geladen zijn) bewegen (electroforese), vanuit die slots in de richting van de positieve electrode. Hoe kleiner het DNA molecuul, des te sneller kan het bewegen door de gelplak heen. De gel bevat een DNA-kleurmiddel (Ethidium Bromide) waardoor je in ultraviolet licht na verloop van tijd de DNA-moleculen van verschillende grootte als streepjes ("bandjes") in de gel zichtbaar kunt krijgen.



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

vwo-campus

Uitvoering

Materialen

- Pipetten met wegwerppuntjes
- Lege 1,5 ml eppendorf buisjes ("epjes")
- DNA-oplossing
- bufferoplossing
- 3 restrictie-enzymen (evtl. als mengsels)
- DNA-marker-oplossing
- Gelmonster-kleuroplossing
- water
- agarosegel in elektroforese-apparaat
- gelschepjes, petrischaaltjes
- stroombron
- wegwerphandschoenen, viltstiften, eppenrekjes, afvalbakjes



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

Proefbeschrijving

Programma

1. Inleiding
2. DNA-knipreactie inzetten
3. Theoretische opdrachten doen
4. Agarosegel laden en elektroforese starten
5. Lunch
6. Theoretische opdrachten doen
7. Elektroforese stoppen en UV-foto maken
8. Resultaten bespreken

Stel, je werkt op een moleculair biologisch laboratorium..

Een bevriende onderzoeker heeft op jouw verzoek een beetje DNA van een plasmideconstruct naar je opgestuurd. Een deel van dat plasmide heb jij nodig voor één van jouw eigen constructen. Hij levert er een beschrijving bij, en jij gaat controleren of het opgestuurde monster inderdaad het door jou gewenste DNA bevat...

In het laboratorium begin je dus met een klein beetje van die opgestuurde oplossing, met DNA, gezuiverd uit een bacterie. De identiteit van dat DNA moet gecontroleerd worden (*"heb ik wel het goede DNA gekregen?"*)

Je gaat daarvoor een paar DNA-knip-reacties inzetten, en daarna het geknipte DNA analyseren in een agarosegel, waarin de ontstane DNA-fragmenten op grootte te onderscheiden zijn. Dat geeft een "bandjespatroon", dat overeen moet komen met wat je verwacht (aan de hand van opdrachten kom je te weten, wat je moet verwachten)

Vanwege het verloop van het programma, ga je eerst de knipreacties inzetten, want die moeten minstens een uur "in staan". Tijdens het knippen maak je een paar theoretisch opdrachten.

Daarna ga je daadwerkelijk de gel-analyse doen. De start van de "gel run" is vlak vóór de lunch; ná de lunch doe je weer een paar opdrachten en als de gel ca 2 uur "gelopen" heeft, maak je een foto van het ontstane DNA-bandjespatroon en bekijken we gezamenlijk het resultaat.



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

Recombinante plasmiden en restrictie-enzymen

Van een klein beetje DNA oplossing, die het recombinante plasmide **pBRλ15** moet bevatten, wordt gecontroleerd of dat inderdaad het geval is..

Daartoe worden monstertjes van de DNA oplossing gemengd met verschillende restrictie-enzymen. Het DNA zal dan worden geknipt. Na gel-electroforese wordt het DNA bandjespatroon dat de gevormde DNA fragmenten laten zien, bekeken.

1. Start de knipreacties (nog vóóordat je meer info krijgt over dat plasmide pBRλ15).

In het onderstaande schema kun je zien hóeveel microliters van wélke oplossing je in wélk buisje moet doen (bekijk en begrijp het schema vóór je begint te pipetteren):

buisje nr. ►	1	2	3	4	5	6	7	8
oplossing ▼								
water ¹⁾	16	16	16	15	15	15	14	15
10x buf6 ²⁾	2	2	2	2	2	2	2	-
pBRλ15 DNA ³⁾	1	1	1	1	1	1	1	-
BamH I ⁴⁾	1	-	-	1	1	-	1	-
EcoR I ⁴⁾	-	1	-	1	-	1	1	-
Pst I ⁴⁾	-	-	1	-	1	1	1	-
DNA markers ⁵⁾	-	-	-	-	-	-	-	5

NB: Er kan ook een alternatief schema gebruikt gaan worden (zie achteraan)

Tips bij het pipetteren:

- Vergis je niet in de pipetinstelling! 2µl is ~4 mm vloeistof in een geel puntje..
- Oefen het pipetteren eerst een paar keer met een beetje water (de begeleiders doen vóór)
- Vink de regels van het schema, die je gedaan hebt, áf
- Verschuif buisjes waarin je hebt gepipetteerd, een plaatsje in je rekje; dan weet je altijd waar je gebleven bent..
- Ga niet sámen zitten pipetteren, maar doe het b.v. om beurten
- Bij pipetteren van de (visceuze) enzymoplossing: bij opzuigen: puntje nét even in de oplossing steken; bij uitdrukken: enzymoplossing uit het puntje spoelen door op en neer te zuigen ín de vloeistof in het epje.

¹⁾ met **water** wordt het volume telkens tot 20µl aangevuld

²⁾ **10x buf6** betekent: tien keer geconcentreerde bufferoplossing nr 6, die dus 1:10 verdund dient te zijn in het reactiemengsel. De te gebruiken enzymen knippen optimaal in deze buffer.

³⁾ **pBRλ15 DNA**: 100 nanogram per microliter (100ng/µl)

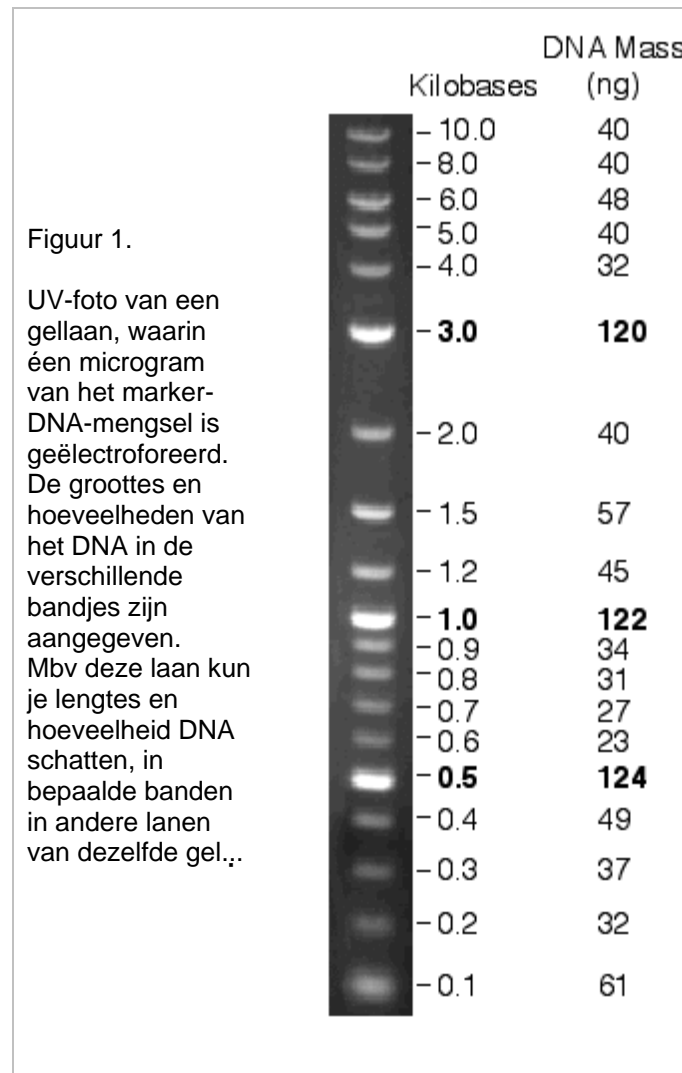
⁴⁾ BamH I, EcoR I en Pst I zijn restrictie-enzymen; alle **enzymoplossingen** bevatten 10 units per microliter (10u/µl)

⁵⁾ **DNA markers**: 200ng/µl van een mengsel van verschillende stukken DNA (in dit geval een commerciële "DNA-ladder"), waarvan de lengtes precies bekend zijn (zie Figuur 1).



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-



2. Doe de buisjes 1 t/m 7 in een tempex drijvertje en leg dat in een 37°C waterbad (bewaer buisje 8 in ijs)
De knip-reactiemengsels moeten bij voorkeur minstens één uur bij 37°C instaan, vóordat ze geëlectroforeerd kunnen worden.
3. Voorspel tijdens het DNA-knippen en de gelelectroforese, adhv informatie over pBRλ15, het bandjespatroon dat in de gel zichtbaar zal zijn.
4. Voeg, ná het knippen, vóór het z.g. “laden” in de gelslotjes, 3µl van een 60% sucrose/0.05% OrangeG aan alle 8 mengsels toe.
Sucrose verzwaart de monstertjes, zodat ze netjes in de slotjes blijven liggen; OrangeG “loopt” mee in het electrisch veld, vóór het DNA uit; daarmee kan de electroforese in de tijd gevolgd worden.
Bekijk nu ook de gel en de putjes ('slots') waar de geknipte DNA monstertjes in "geladen" moeten worden. Pas opl: de gel en de buffervloeistof waar hij in ligt, bevat de kankerverwekkende kleurstof Ethidium Bromide; raak de gel en de vloeistof niet aan!
5. Laad de mengsels in de slotjes, en start de gel-electroforese door 50Volt (bij onbeperkt amperage) over de gel aan te brengen.

DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

6. Neem na minstens één uur een foto van de gel (bij UltraViolet licht), bekijk het bandjespatroon op die foto, en vergelijk dat met je voorspelling.

INVULLEN:

Antwoord Opdracht 1:

Het/de volgende pipetteerschema('s) is/zijn correct:

Antwoorden Opdracht 2

Plaats ↓	Wordt herkend door enzym.. ↓
I	
II	
III	
IV	

DNA op positie ↓	Bevat (een combinatie van) fragment(en).. ↓
01	
02	
03	
04	
05	
06	
07	
08	

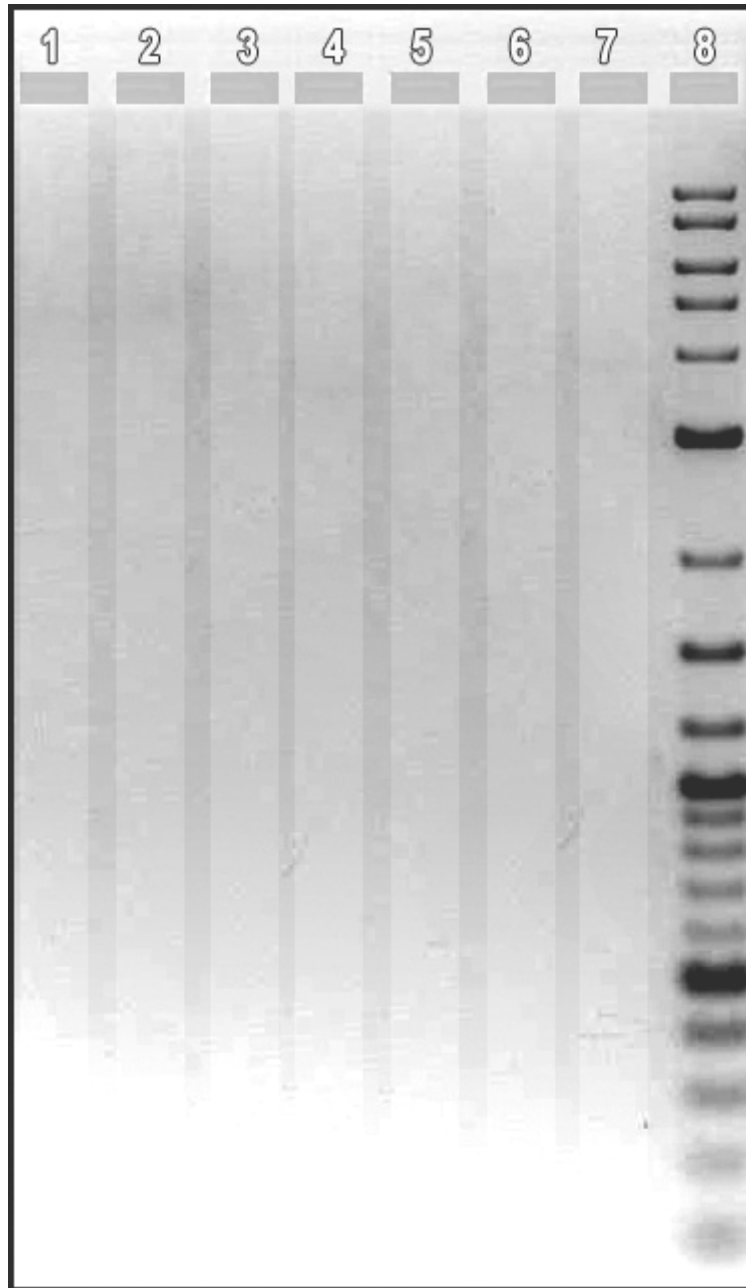
Antwoorden Opdracht 3:

Vul II t/m IV in: ↓		
I	=	Pst I herkenningsplaats
II	=	
III	=	
IV	=	
Vul lengtes (aantal baseparen) in ↓		
a	=	
b	=	
c	=	
d	=	

DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

Gebruik eventueel onderstaand plaatje (het negatief van een gebruikelijke gelfoto) om de te verwachten bandjes van de pBRλ15 – knipreacties (opdracht 4) in te tekenen.



DNA knippen

-Plasmiden en restrictie-enzymen-

Alternatief pipetteerschema voor het geval de restrictie-enzymen vooraf al gemengd zijn:

buisje nr. ►	1	2	3	4	5	6	7	8
oplossing ▼								
water ¹⁾	15	15	15	15	15	15	15	15
10x buf6 ²⁾	2	2	2	2	2	2	2	-
pBRλ15 DNA ³⁾	1	1	1	1	1	1	1	-
Enzym(mengsel) ⁴⁾	2B	2E	2P	2BE	2BP	2EP	2BEP	-
DNA markers ⁵⁾	-	-	-	-	-	-	-	5

¹⁾ met **water** wordt het volume telkens tot 20µl aangevuld

²⁾ **10x buf6** betekent: tien keer geconcentreerde buffer 6 oplossing, die dus 1:10 verdund dient te zijn in het reactiemengsel. De te gebruiken enzymen knippen optimaal in deze buffer.

³⁾ **pBRλ15 DNA**: 100 nanogram per microliter (100ng/µl)

⁴⁾ 2B betekent: 2µl van enzym(mengsel) B, etc
B = restrictie-enzym BamH I (5units per microliter (5u/µl))
E = restrictie-enzym EcoR I (5units per microliter (5u/µl))
P = restrictie-enzym Pst I (5units per microliter (5u/µl))
BE = een mengsel van BamH I en EcoR I (beide 5u/µl)
BP = een mengsel van BamH I en Pst I (beide 5u/µl)
EP = een mengsel van EcoR I en Pst I (beide 5u/µl)
BEP = een mengsel van BamH I, EcoR I en Pst I (alle 5u/µl)

⁵⁾ **DNA markers**: 200ng/µl van een mengsel van verschillende stukken DNA (in dit geval een commerciële "DNA-ladder"), waarvan de lengtes precies bekend zijn (zie Figuur 1).

Voor buisjes 1 t/m 7 geldt: water, 10x buffer en DNA kunnen als één compleet mengsel toegevoegd worden! Dit verhoogt de nauwkeurigheid van het pipetteren (moet dat mengsel wél even eerst gemaakt worden..).