



Leerlingenhandleiding

Niveau: **expert**

‘Prenataal’ onderzoek bij planten



Ontwikkeld door het Centre for BioSystems Genomics

in samenwerking met Wageningen University

Tekst

Arjen Schots, Sven van den Elsen e.a.

Illustraties

Wageningen University en
Sebastiaan Donders (via www.allesoverDNA.nl)

Vormgeving

Identim, Wageningen

Op alle lesmaterialen is de Creative Commons
Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen
3.0 Nederland Licentie van toepassing ([http://
creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl/](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl/)).
CC BY-NC-SA 2010 – Centre for BioSystems Genomics

Met vragen en/of opmerkingen kunt u contact opnemen
met het team Mobile Practica van Wageningen University
(dnalabs@wur.nl).

Inhoudsopgave

Inleiding	6
Les 1: Voorbereidende les	7
Casus 1 versie A: Duchenne spierdystrofie	7
Casus 1 versie B: Kleurenblindheid	9
Casus 1 bijlage	11
Casus 2: Nematoden	13
Les 2 en 3: Practicum	15
Inleiding	15
Onderdeel A: De analyse van het genotype	17
Theorie	17
Uitvoering	19
Resultaten	24
Onderdeel B: De analyse van het fenotype	25
Les 4: Afsluitende les	27

Inleiding

Voor je ligt de handleiding van het Reizend DNA-lab 'prenataal' onderzoek bij planten. Dit practicum is ontwikkeld door Wageningen University in samenwerking met het Centre for BioSystems Genomics.

Als introductie op het onderwerp DNA wordt er in groepjes gewerkt aan twee casussen. Van casus 1 zijn verschillende versies beschikbaar. De docent zal aangeven welke versie door jullie wordt behandeld. Casus 2 vormt een introductie op het onderwerp dat tijdens het practicum behandeld wordt: aantasting van aardappelplanten door nematoden.

Het practicum wordt gegeven door twee studenten van Wageningen University. Nu ga je zelf aan de slag als DNA-onderzoeker. We zullen stil staan bij de 'oude' klassieke en 'nieuwe' moderne manier van plantenveredeling. Door kruising van planten met bepaalde gewenste eigenschappen kunnen nieuwe planten worden gekweekt die alle gewenste eigenschappen bezitten. Zo worden rassen met de beste kwaliteit, de hoogste opbrengst en de minste gevoeligheid voor ziekten gekweekt. Met het gebruik van de klassieke veredelingstechnieken kan het jaren duren voordat een nieuwe soort geïntroduceerd kan worden. Dit proces kan tegenwoordig aanzienlijk versneld worden door gebruik te maken van moleculair genetisch onderzoek. Beide manieren van plantenveredeling komen in dit practicum aan bod.

In een les na het practicum wordt er nog ingegaan op de ethische en maatschappelijke kant van genetisch onderzoek.

Les 1: Voorbereidende les

Casus 1 – versie A

Michelle heeft een broertje gehad, Mark, dat leed aan Duchenne Spierdystrofie. Al op zijn derde jaar werd dat duidelijk. Hij liep moeilijk en was erg zwak. Ook kon hij niet met leren zijn leeftijdsgenootjes niet zo goed bijhouden. Zijn spieren werden steeds zwakker en vanaf zijn elfde kon hij helemaal niet meer lopen en kwam hij in een rolstoel terecht. Op zijn achttiende overleed Mark aan zijn ziekte. De ziekte van haar broertje heeft veel invloed gehad op het leven van Michelle. Vooral voor haar moeder was het erg zwaar, omdat Mark 24 uur per dag zorg nodig had.

Nu is Michelle twee maanden zwanger. Aangezien Duchenne een erfelijke ziekte is, bestaat de kans dat haar kindje deze ziekte ook zal krijgen. Ze weet alleen nog niet zeker of ze dat van tevoren wil weten. En als ze het wel weet en haar kindje heeft aanleg voor de ziekte, wat kan en mag ze dan met die informatie doen?

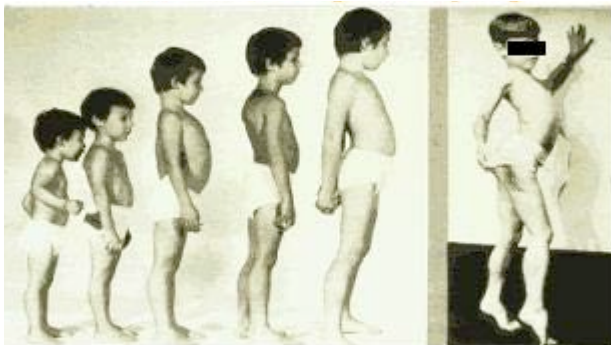
Duchenne Spierdystrofie

De ziekte wordt veroorzaakt door een defect in het dystrofine-gen, dat codeert voor een eiwit in de membranen van spiercellen. Dystrofine geeft de cel veerkracht en stevigheid. Zonder dit eiwit kan de cel beschadigen en afsterven.

De ziekte is recessief en X-chromosomaal. Het zijn daardoor vooral jongens die de ziekte krijgen. De eerste symptomen tonen zich meestal tussen het eerste en zesde levensjaar. Spieren worden zwak en botten kunnen vervormen. Hierdoor ontstaan vaak ook ademhalingsproblemen. In 30% van de gevallen is er ook sprake van geestelijke achterstand van de patiënt.

Door de spierverswakking hebben patiënten vanaf hun tiende meestal beugels nodig om te kunnen lopen en komen ze vanaf hun twaalfde in een rolstoel terecht. Meestal worden ze niet ouder dan 20 jaar.

Hoewel er nog geen behandeling mogelijk is voor de ziekte, is het gen wel in kaart gebracht en is bekend waar de afwijking zit en hoe deze eruit ziet.



Figuur 1: Effect van Duchenne spierdystrofie op lichaamshouding

Opdracht 1

De ouders van Michelle en ook haar man hebben de ziekte niet. Bereken hoe groot de kans is dat Michelle een kindje krijgt met Duchenne Spierdystrofie.

Opdracht 2

Een gezond persoon verschilt op een aantal manieren van iemand die lijdt aan de ziekte van Duchenne. Hoewel de oorzaak in het DNA zit, heeft dit consequenties voor het hele individu. Wat zijn de verschillen op:

- het niveau van het hele organisme;
- het niveau van de cel;
- op moleculair niveau.

Michelle weet nog niet zeker of ze van tevoren wil weten of haar kindje de ziekte van Duchenne zal krijgen. Dit onderzoek is wel mogelijk. Onderstaande opdrachten helpen je erachter te komen hoe dit in zijn werk gaat.

Michelle zal in het ziekenhuis begeleid worden bij het maken van dit soort keuzes. Dat heet genetic counseling. In de laatste les van deze module zullen we verder in gaan op dit soort ethische kwesties.

Opdracht 3

Onderstaande begrippen spelen een rol in het onderzoek. Geef van elk een definitie. Als er in de casus woorden staan die je niet begrijpt, zoek deze dan ook op. Gebruik zo nodig je biologieboek of een encyclopedie.

- Fenotype
- Genotype
- Allel
- Celkern
- Celmembraan
- Chromosoom
- DNA
- Gelelectroforese
- Gen
- PCR; polymerase-kettingreactie
- Vruchtwaterpunctie

Opdracht 4

In het ziekenhuis kan onderzocht worden of een ongeboren kindje later Duchenne Spierdystrofie zal krijgen. Dit onderzoek bestaat uit een aantal stappen. Bedenk welke stappen dat zijn. Formuleer de stappen en leg uit waarom deze nodig zijn.

Casus 1 – versie B

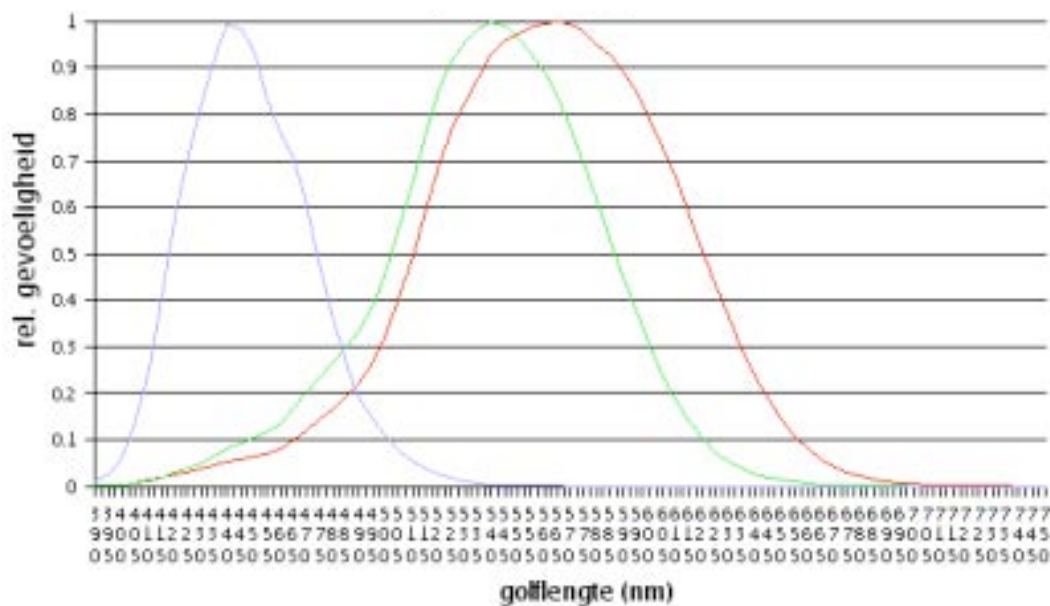
Daniëlle heeft een broertje, Martijn, dat kleurenblind is. Door een defect gen maakt hij geen receptoren voor groen licht aan. Dat is voor hem soms lastig en Daniëlle maakte daar vroeger vaak grapjes over.

Nu is Daniëlle twee maanden zwanger. Aangezien kleurenblindheid erfelijk is, bestaat de kans dat haar kindje dit ook zal worden. Of het kindje kleurenblind gaat worden ligt al vast in zijn DNA. Het is dus mogelijk om al tijdens de zwangerschap te bepalen of het kindje van Daniëlle kleurenblind wordt. Daniëlle weet niet of ze dat wel nodig vindt.

Zien

Als er licht op het netvlies in je oog valt, wordt dit geregistreerd door de aanwezige zintuigcellen. Deze cellen maken een signaal aan dat naar je hersenen gestuurd wordt, waar het wordt omgezet in een beeld.

Je hebt twee soorten zintuigcellen op je netvlies: Staafjes om licht en donker te onderscheiden en kegeltjes om kleuren te onderscheiden. Er zijn drie verschillende kegeltjes, die zich onderscheiden door de kleur die zij registreren: Blauw, groen of rood. Doordat verschillende kleuren kegeltjes tegelijk een signaal doorgeven ontstaan mengkleuren. Zo kun je alle kleuren van de regenboog zien.



Figuur 1: Gevoeligheid van kegeltjes. De eerste curve is voor blauwe kegeltjes, de tweede voor groene, de derde voor rode.

Welke kleur een cel kan registreren is afhankelijk van de receptoren die de cel heeft. Receptoren zijn eiwitten die door het membraan van de cel heen steken. Door het verschil in bouw tussen de drie receptoreiwitten absorberen ze licht bij verschillende golflengten. Ze zullen dus ook bij verschillende golflengten een sterker of minder sterk signaal doorgeven aan de hersenen

Opdracht 1

De ouders van Daniëlle en ook haar man zijn niet kleurenblind. Bereken hoe groot de kans is dat Daniëlle een kindje krijgt dat kleurenblind is.

Opdracht 2

Beschrijf het verschil tussen een 'kleurenziend' persoon en een kleurenblind persoon met dezelfde afwijking als Martijn. Hoewel de oorzaak in het DNA zit, heeft dit consequenties voor het hele individu. Wat zijn de verschillen op:

- het niveau van het hele organisme;
- het niveau van de cel;
- op moleculair niveau.

Daniëlle ziet niet in waarom ze nu al zou moeten weten of haar kindje kleurenblind zal worden. Dit onderzoek is wel mogelijk. Onderstaande opdrachten helpen je erachter te komen hoe dit in zijn werk gaat.

In het ziekenhuis worden mensen begeleid bij het maken van keuzes over genetisch onderzoek. Dat heet genetic counseling. In de laatste les van deze module zullen we verder in gaan op dit soort ethische kwesties.

Opdracht 3

Onderstaande begrippen spelen een rol in het onderzoek. Geef van elk een definitie. Als er in de casus woorden staan die je niet begrijpt, zoek deze dan ook op. Gebruik zo nodig je biologieboek of een encyclopedie.

- Fenotype
- Genotype
- Allel
- Celkern
- Celmembraan
- Chromosoom
- DNA
- Gelelectroforese
- Gen
- PCR; polymerase-kettingreactie
- Vruchtwaterpunctie

Opdracht 4

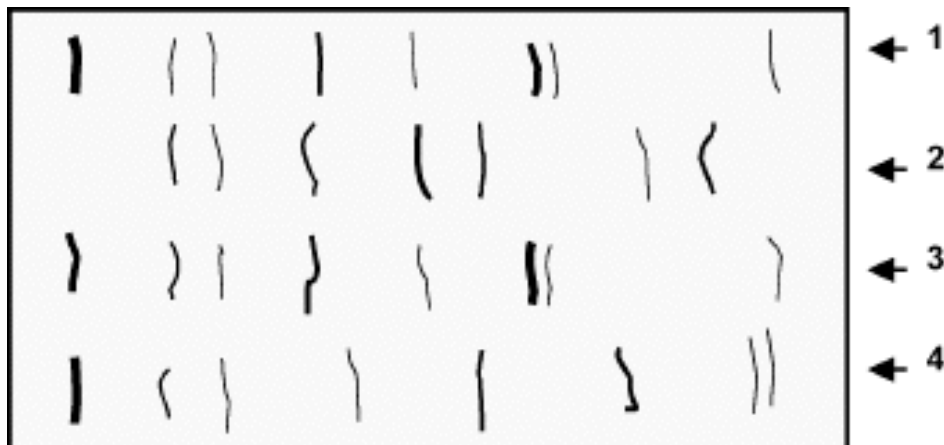
In het ziekenhuis kan onderzocht worden of een ongeborn kindje later kleurenblind zal zijn. Dit onderzoek bestaat uit een aantal stappen. Met behulp van bovenstaande opdrachten, moet je kunnen bedenken welke stappen dit zijn. Formuleer de stappen en leg uit waarom deze nodig zijn.

Casus 1 - Bijlage

Gelelectroforese

Om stukken DNA van verschillende lengtes te analyseren wordt gebruik gemaakt van gelelectroforese. Dit is een techniek om stukjes DNA op grootte van elkaar te scheiden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de negatieve lading die DNA bezit, veroorzaakt door de negatief geladen fosfaatgroepen in het molecuul. Om de verschillende DNA fragmenten van elkaar te scheiden wordt een monster, met daarin DNA fragmenten van verschillende grootte, aangebracht op een zogenaamde 'gel'. Aan de DNA fragmenten is een kleurstof toegevoegd, zodat de DNA fragmenten zichtbaar zijn in de gel. Over de gel wordt een spanningsverschil aangebracht; aan de bovenkant is de gel negatief geladen, aan de onderkant positief geladen. De DNA fragmenten worden aangetrokken door de positieve pool en zullen zich van boven naar beneden in de gel gaan bewegen. Door de structuur van de gel zullen kleine fragmenten zich sneller in de gel bewegen dan grotere fragmenten. Hierdoor zullen op het moment dat het elektrisch veld wordt opgeheven de kleine fragmenten verder naar beneden zijn 'gelopen' dan de grotere fragmenten.

Van de gel kan een foto worden gemaakt. Hierin zijn de verschillende gescheiden fragmenten zichtbaar als donkere 'bandjes'. De foto toont zodoende een soort streepjescode.



Figuur 1: Een voorbeeld van een DNA gel na elektroforese

Polymerase Kettingreactie

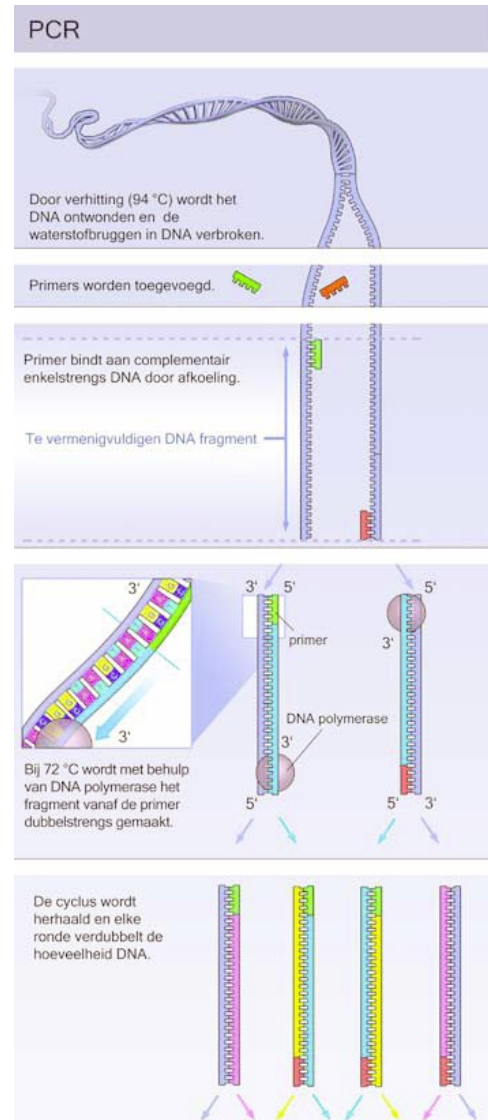
PCR staat voor 'Polymerase Ketting Reactie' (*Polymerase Chain Reaction*). Deze techniek wordt onder andere gebruikt om kleine hoeveelheden van een specifiek stuk DNA zo vaak te vermenigvuldigen (amplificeren) dat het bijvoorbeeld zichtbaar te maken is in een gel. PCR begint met het denatureren van DNA, het verbreken van de waterstofbruggen tussen de twee strengen. Dit gebeurt door verhitting tot 94 °C. Vervolgens wordt een *primer* toegevoegd. Dit is een klein stukje chemisch gesynthetiseerd DNA waarvan de volgorde van de nucleotiden *complementair* is met die van de uiteinden van het te amplificeren DNA fragment. Door het DNA vervolgens af te koelen tot de zogenaamde annealingstemperatuur (meestal tussen de 50 °C en 70 °C) bindt de primer zich aan het complementaire stukje van een enkelstrengs DNA fragment. Beginnend bij de primer wordt het te amplificeren fragment weer dubbelstrengs gemaakt. Dit gebeurt bij 72 °C met behulp van een enzym, het DNA polymerase, dat de vier toegevoegde nucleotiden, A, C, T en G, op de juiste plaats aan elkaar koppelt. Dit gebeurt voor beide strengen en hierdoor wordt de hoeveelheid DNA dus verdubbeld. Daarna kan de volgende cyclus beginnen. Op deze manier wordt de hoeveelheid dubbelstrengs DNA moleculen dus in elke ronde verdubbeld. Na veertig cycli is het fragment dus in principe $2^{30} = 1.073.741.824$ (1 miljard) keer aanwezig.

Het DNA-fragment dat je wilt kopiëren bestaat uit een dubbele streng nucleotiden. De twee strengen laten los als de temperatuur boven 90°C komt.

Na afkoelen tot 55°C kunnen de primers vastplakken op de plek waar ze passen.

Bij 72°C doet het enzym DNA-polymerase vervolgens zijn werk en zet de verse nucleotiden op de juiste plek. Het eindresultaat is 2 identieke stukken DNA.

Vervolgens begint de cyclus weer opnieuw: de temperatuur wordt verhoogd tot boven de 90°C en alle strengen laten los. Nadat de primers gehecht zijn (bij 55°C) en vanaf die plek het DNA weer verdubbeld is (bij 72°C) heb je vier identieke stukken DNA, enzovoort. Na ongeveer 20 tot 30 cycli heb je meestal genoeg kopieën om het gewenste stukje DNA zichtbaar te maken.



Figuur 2: Het principe van PCR

DNA-polymerase

DNA-polymerase is het enzym dat in de celkern zorgt voor het kopiëren van het DNA, ook wel DNA-replicatie genoemd. Tijdens de celdeling wordt zo al het DNA uit een cel verdubbeld. DNA-polymerase plakt aan elke base de complementaire base en verdubbelt zo het DNA. Het heeft een primer nodig om op gang te komen en kan het DNA maar één kant op vermeerderen. Deze eigenschappen worden in de PCR reactie handig toegepast om kunstmatig het DNA te kopiëren.

Casus 2

Evenals mensen en dieren staan ook planten steeds bloot aan bedreigingen door ziekteverwekkers: schimmels, bacteriën, insecten, virussen, parasitaire onkruiden en nematoden. Wij merken doorgaans weinig van dit soort problemen, omdat de ziekteverwekkers worden bestreden met chemische bestrijdingsmiddelen of omdat de planten resistent zijn tegen de ziekteverwekker. In de zich ontwikkelende landen is dat vaak wel een probleem, daar hebben ze vaak geen geld om bestrijdingsmiddelen of duur zaad van resistente plantensoorten te kopen.



Globodera rostochiensis,
de oorzaak van aardappelmoeheid.

Eén van de grote problemen in de aardappelteelt, is infectie door nematoden. Nematoden, ook wel aaltjes genoemd, zijn microscopische rondwormen die overal in de bodem voorkomen. Er zijn soorten die parasiteren op de wortels van planten, soorten die leven van bacteriën, soorten die andere nematoden eten, soorten die leven van organische stof in de bodem en bijvoorbeeld ook dierparasieten.

Het gevolg van een aantasting door plantenparasitaire nematoden is meestal dat de planten erg klein blijven en nauwelijks aardappelen produceren, de planten verhongeren als het ware. Deze plantenparasieten komen overal ter wereld voor, dus iedere boer kan er last van hebben. De nematode die in Nederland op aardappels

parasiteert, heet het aardappelcystenaaltje (er zijn twee soorten *Globodera rostochiensis* en *Globodera pallida*) en de ziekte heet aardappelmoeheid. Er wordt geschat dat wereldwijd 10% van de aardappeloogst jaarlijks verloren gaat ten gevolge van deze infectie. Chemische bestrijdingsmiddelen tegen deze aaltjes zijn niet toegestaan. Gelukkig zijn er aardappelrassen die resistent zijn tegen deze infectie. Gezien het grote verlies dat boeren op kunnen lopen ten gevolge van nematodeninfectie, is er een grote vraag naar resistente aardappelen.

Plantenveredelingsbedrijven steken veel geld in het kruisen en selecteren van aardappelen om er zoveel mogelijk gewenste eigenschappen aan toe te voegen. Dit kun je doen door een veld vol nakomelingen van kruisingen te zetten, de planten allemaal te laten uitgroeien en dan te onderzoeken welke planten de gewenste eigenschappen laten zien. Dit kost veel tijd en geld. Bovendien zegt dit niet veel over de nakomelingen van de geselecteerde planten. In een andere omgeving had de plant immers een ander fenotype kunnen ontwikkelen. Handiger is het daarom om van net gekiemde plantjes een stukje te nemen en het genotype te bepalen. Een soort prenataal onderzoek dus. Aan de hand hiervan kun je dan bepalen met welke planten je verder wilt. Dit scheelt ruimte en tijd. Op deze manier kan gemakkelijk van veel eigenschappen voorspeld worden of de plant een bepaalde eigenschap geërfd heeft.

Opdracht 1

In de casus wordt gesproken over resistentie. Leg uit wat resistentie is. (Zoek dit eventueel op het internet op)

Opdracht 2

Hetzelfde prenataal onderzoek als bij mensen willen we nu gaan uitvoeren op een plant. Tussen de mens en de plant bestaan echter een aantal verschillen.

- Welke verschillen zijn er tussen een plantaardige cel en een dierlijke cel?
- Welke verschillen zijn er tussen het DNA van een plant en het DNA van een dier?

Opdracht 3

De proef voor prenataal onderzoek bestond uit vier stappen. Loop deze stappen nog eens door. Hoe moeten de stappen aangepast worden om te kijken naar genen met verschillende eigenschappen (bijvoorbeeld resistentie van nematoden in een plant in plaats van Duchenne Spierdystrofie bij de mens?).

Les 2 en 3: Practicum

Inleiding

Iedere plant heeft zowel goede als slechte eigenschappen. Plantenveredelaars proberen planten te kweken met zoveel mogelijk goede eigenschappen. Planten met de gewenste eigenschappen worden met elkaar gekruist en de nakomelingen, die de meeste goede eigenschappen hebben geërfd worden weer verder gekruist. Zo worden rassen met de beste kwaliteit, de hoogste opbrengst en de minste gevoeligheid voor ziekten gekweekt.

Bij klassieke plantenveredeling kan het jaren duren voordat een nieuwe soort geïntroduceerd kan worden. Dit proces kan aanzienlijk versneld worden door gebruik te maken van moleculair genetisch onderzoek. Van jonge planten kan het genoom in kaart gebracht worden, waardoor van veel eigenschappen voorspeld kan worden, welke de plant (onder invloed van de omgeving) later zal krijgen. Dit onderzoek is vergelijkbaar met prenataal onderzoek bij de mens.

Context

Wellicht heb je er nooit bij stil gestaan dat Nederland op het gebied van voedsel en bloemen een sleutelpositie in de wereld inneemt. Nederlandse bloemen zijn wereldberoemd, dat weet iedereen, maar ook zaaizaad en pootgoed en de voedingsmiddelenindustrie staan goed bekend. Kortom, levenswetenschappen zijn 'big business', ook als het gaat om voedsel en bloemen. Wist je dat acht van de 10 grootste plantenveredelingsbedrijven hun hoofdvestiging of een belangrijk onderzoekscentrum in ons land hebben? Het zal je dan ook niet verbazen dat Nederland de grootste exporteur is van land- en tuinbouwzaden. Van alle siergewassen bestaat 40% uit Nederlandse rassen. Door al het veredelingswerk zijn zaden vaak heel veel geld waard en geven enorme opbrengsten. Hieronder als voorbeeld de prijs en opbrengst van tomatenzaad.

Voorbeeld: tomatenzaad

Prijs per zaadje	€ 0,35
Opbrengst per zaadje	€ 17,00
Tuinder betaalt per kg zaad	€ 87.500,00
Ter vergelijking: goudprijs per kg	€ 34.000,00
Opbrengst 1 kg zaad voor de tuinder	€ 4.250.000,00
Opbrengst 1 kg zaad voor supermarkt	€ 9.000.000,00

Wij danken die topositie aan het feit dat we in Nederland op dit terrein altijd heel innovatief bezig zijn. Telkens weten we weer met iets nieuws te komen om beter smakende of mooiere rassen, efficiënter en milieuvriendelijker te produceren. Er bestaan bijvoorbeeld al kassen die nauwelijks nog energie nodig hebben en waarin de opbrengsten hoger zijn dan in gewone kassen. De planten die in die kassen geteeld worden zijn door veredeling speciaal aangepast aan de omstandigheden die daarin voorkomen. Het is dan ook logisch dat het innovatieplatform van de Nederlandse regering Flowers & Food op de eerste plaats heeft gezet. De sector heeft als totaal een omzet van meer dan € 40 miljard, dat is 15% van het bruto nationaal product en draagt voor € 20 miljard bij aan het overschot op de handelsbalans, de winst van Nederland, dat is net iets minder dan de helft van de totaalwinst. Levenswetenschappen, vaak gecombineerd met slimme technische oplossingen, is een vakgebied met toekomst. Daardoor is het mogelijk om snel in te spelen op vragen van consument en grootwinkelbedrijf als het gaat om mooiere en beter smakende tomaten, paprika's of aardbeien. Het

zal ook helpen om de problemen op te lossen die we mogelijk gaan krijgen door het broeikaseffect en het opraken van fossiele brandstoffen. Immers planten kunnen met zonlicht koolzuur omzetten in suikers en andere chemische verbindingen. Het aantal verbindingen dat planten kan maken is zo groot dat we die nu slim moeten leren te gebruiken om chemische producten die nu nog uit olie komen te vervangen. En wat dacht je van geneesmiddelen uit planten? Of andere gezondheidsbevorderende stoffen? En die stoffen slim en efficiënt isoleren? We weten nog niet half wat planten allemaal kunnen maken. Om planten op al deze manieren optimaal te benutten zal het nodig zijn om moleculaire plantenveredeling, zoals je in dit practicum leert, verder te ontwikkelen.

Doel

Het practicum bestaat uit twee onderdelen. In onderdeel A ga je de moleculaire merker techniek toepassen op een aardappelplant. Daarmee kijk je of deze plant, na kruising, bepaalde genen meegekregen heeft, bijvoorbeeld een resistentiegen tegen nematoden of schimmels. In onderdeel B krijg je resultaten te zien en te proeven van moderne plantenveredeling.

Programma

De Polymerase Kettingreactie, waar we stap 3 van het experiment (onderdeel A) dat we zo meteen gaan uitvoeren mee afsluiten, duurt ongeveer 45 minuten. In die tijd zullen de studenten iets over zich zelf en over Wageningen University vertellen én voeren we onderdeel B uit. Daarna kunnen we verder met stap 4 van onderdeel A.

Onderdeel A: de analyse van het genotype

Theorie

Resistentie tegen nematoden

Het maken van een heel genenpaspoort kost erg veel tijd. In dit practicum kijken we daarom maar naar enkele eigenschappen, waaronder de resistentie tegen aardappelcystenaaltjes, een nematode die op aardappels parasiteert.

Nematoden zijn microscopische rondwormen of aaltjes die overal in de bodem voorkomen. Er zijn nematoden die parasiteren op de wortels van planten. Daardoor groeit de plant slecht en verhongert langzaam. Dit is natuurlijk een ongewenste situatie.

Er zijn ook aardappelrassen die resistent zijn tegen nematoden. Resistentie ontstaat door aanwezigheid van een dominant allel. Het eiwit waar dit allel voor codeert zorgt ervoor dat geïnfecteerde cellen gedood worden, waardoor de nematode verhongert en sterft. Deze reactie komt zeer snel op gang, waardoor de plant weinig hinder ondervindt van de infectie.

Polymerase Kettingreactie

PCR staat voor 'Polymerase Ketting Reactie' (*Polymerase Chain Reaction*). Deze techniek wordt onder andere gebruikt om kleine hoeveelheden van een specifiek stuk DNA zo vaak te vermenigvuldigen (amplificeren) dat het bijvoorbeeld zichtbaar te maken is in een gel.

PCR begint met het denatureren van DNA, het verbreken van de waterstofbruggen tussen de twee strengen. Dit gebeurt door verhitting tot 94 °C. Vervolgens wordt een *primer* toegevoegd. Dit is een klein stukje chemisch gesynthetiseerd DNA waarvan de volgorde van de nucleotiden *complementair* is met die van de uiteinden van het te amplificeren DNA fragment. Door het DNA vervolgens af te koelen tot de zogenaamde annealingstemperatuur (meestal tussen de 50 °C en 70 °C) bindt de primer zich aan het complementaire stukje van een enkelstrengs DNA fragment. Beginnend bij de primer wordt het te amplificeren fragment weer dubbelstrengs gemaakt. Dit gebeurt bij 72 °C met behulp van een enzym, het DNA polymerase, dat de vier toegevoegde nucleotiden, A, C, T en G, op de juiste plaats aan elkaar koppelt. Dit gebeurt voor beide strengen en hierdoor wordt de hoeveelheid DNA dus verdubbeld. Daarna kan de volgende cyclus beginnen. Op deze manier wordt de hoeveelheid dubbelstrengs DNA moleculen dus in elke ronde verdubbeld. Na dertig cycli is het fragment dus in principe $2^{30} = 1.073.741.824$ keer aanwezig.

DNA-polymerase

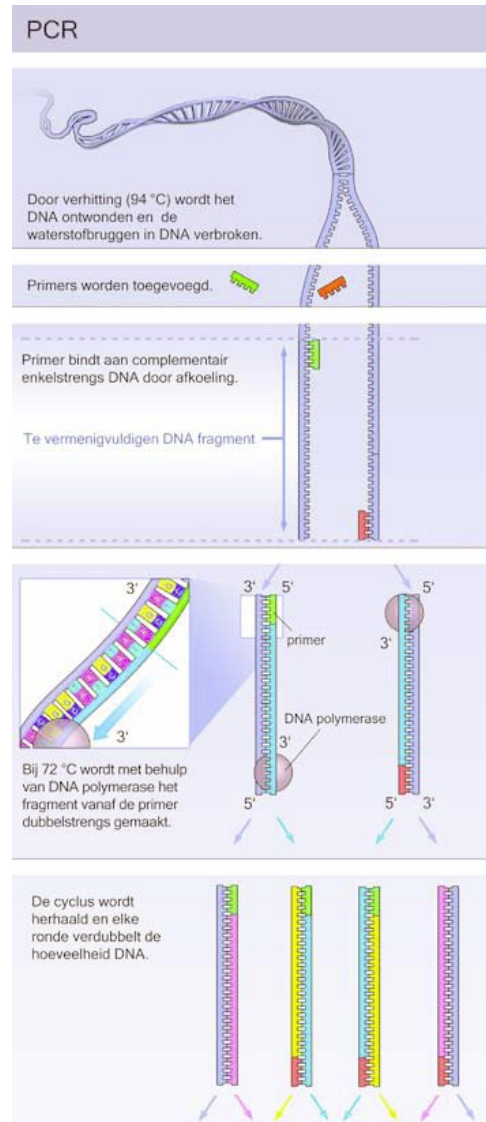
DNA-polymerase is het enzym dat in de celkern zorgt voor het kopiëren van het DNA, ookwel DNA-replicatie genoemd. Tijdens de celdeling wordt zo al het DNA uit een cel verdubbeld. DNA-polymerase plakt aan elke base de complementere base en verdubbelt zo het DNA. Het heeft een primer nodig om op gang te komen en kan het DNA maar één kant op vermeerderen. Deze eigenschappen worden in de PCR reactie handig toegepast om kunstmatig het DNA te kopiëren.

Het DNA-fragment dat je wilt kopiëren bestaat uit een dubbele streng nucleotiden. De twee strengen laten los als de temperatuur boven 90°C komt.

Na afkoelen tot 55°C kunnen de primers vastplakken op de plek waar ze passen.

Bij 72°C doet het enzym DNA-polymerase vervolgens zijn werk en zet de verse nucleotides op de juiste plek. Het eindresultaat is 2 identieke stukken DNA.

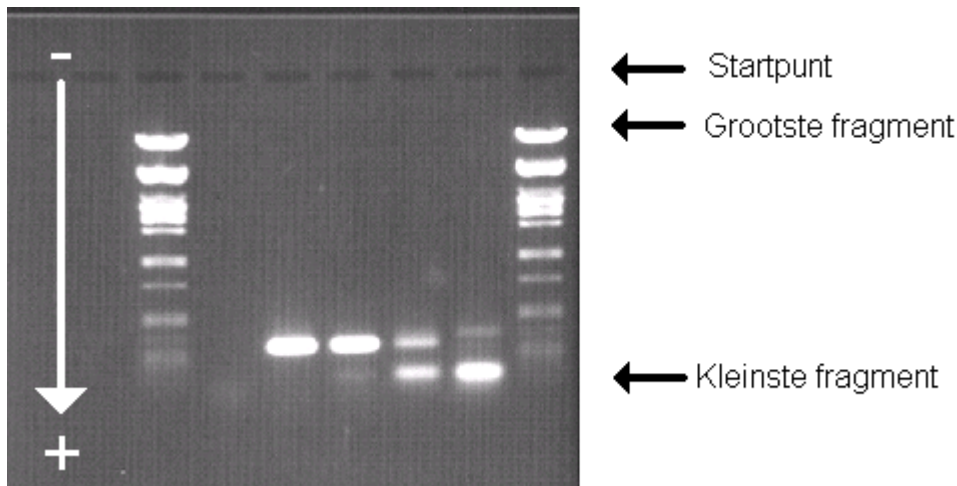
Vervolgens begint de cyclus weer opnieuw: de temperatuur wordt verhoogd tot boven de 90°C en alle strengen laten los. Nadat de primers gehecht zijn (bij 55°C) en vanaf die plek het DNA weer verdubbeld is (bij 72°C) heb je vier identieke stukken DNA, enzovoort. Na ongeveer 20 tot 30 cycli heb je meestal genoeg kopieën om het gewenste stukje DNA zichtbaar te maken.



Figuur 1: Het principe van PCR

Gelelectroforese

Om stukken DNA van verschillende lengtes te analyseren wordt gebruik gemaakt van gelelectroforese. Dit is een techniek om stukjes DNA op grootte van elkaar te scheiden. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van de negatieve lading die DNA bezit, veroorzaakt door de negatief geladen fosfaatgroepen in het molecuul. Om de verschillende DNA fragmenten van elkaar te scheiden wordt een monster, met daarin DNA fragmenten van verschillende grootte, aangebracht op een zogenaamde 'gel'. Aan de DNA fragmenten is een kleurstof toegevoegd, zodat de DNA fragmenten zichtbaar zijn in de gel. Over de gel wordt een spanningsverschil aangebracht; aan de bovenkant is de gel negatief geladen, aan de onderkant positief geladen. De DNA fragmenten worden aangetrokken door de positieve pool en zullen zich van boven naar beneden in de gel gaan bewegen. Door de structuur van de gel zullen kleine fragmenten zich sneller in de gel bewegen dan grotere fragmenten. Hierdoor zullen op het moment dat het elektrisch veld wordt opgeheven de kleine fragmenten verder naar beneden zijn 'gelopen' dan de grotere fragmenten. Van de gel kan een foto worden gemaakt. Hierin zijn de verschillende gescheiden fragmenten zichtbaar als donkere 'bandjes'. De foto toont zodoende een soort streepjescode.



Figuur 2: Een voorbeeld van een DNA gel na elektroforese

Uitvoering

Heeft de plant het allel voor (bijvoorbeeld) resistentie tegen infectie door nematoden?

Veiligheid

Tijdens het practicum wordt een aantal keer met gevaarlijke stoffen gewerkt. In stap 2 wordt gewerkt met vloeibare stikstof en een lysisbuffer. Het heeft een temperatuur van $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en kan dus zeer snel vriesbrand veroorzaken. Draag beschermende handschoenen. Lysisbuffer maakt cellen kapot. Of dit nu cellen van de plant zijn of van jezelf, maakt daarbij niet uit. Dat heb je bij het behandelen van casus 2 al gezien. Zorg er dus voor dat je plastic handschoenen draagt. Denk er ook aan, dat deze buffer aan je pincet en handschoenen zit, zodra je in aanraking bent gekomen met de buffer. Raak dus niemand meer aan met de pincet en ga ook niet in je ogen wrijven. Trek gerust een keer nieuwe handschoenen aan.

Naast de veiligheid voor jezelf, is er nog de veiligheid voor je monster. Je wilt niet dat er van buitenaf meer in je monster komt dan wat je er zelf in hebt gedaan. Werk dus de hele tijd met handschoenen aan.

Materialen

- Aardappelblad
- Vloeibaar stikstof om blad mee te bevriezen
- Vijzel en mortier om het blad mee fijn te malen
- Spatel
- Verschillende 'Eppjes' (Eppendorf vaatje = klein plastic reactievaatje)
- Groen eppje met Lysisbuffer om celmateriaal stuk te maken
- Geel eppje met $990\text{ }\mu\text{l}$ zeer zuiver water
- Klein PCR eppje met 'Ready-to-go PCR Beads'
- Middelgroot genummerd eppje met primers (forward en reverse)

- Thermomixer
- Micropipet
- Pipetpuntjes
- PCR apparaat
- 'Loading buffer'
- Lonza FlashGel® systeem

Beschrijving

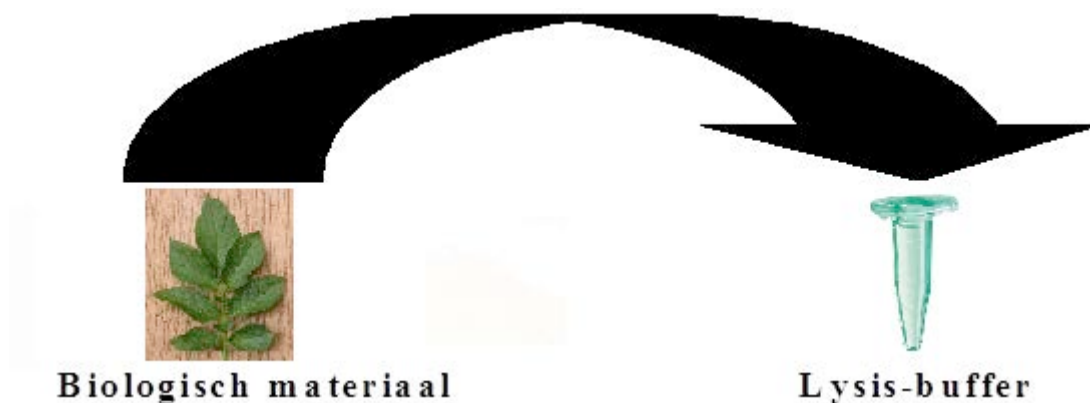
Voer dit hele practicum in tweetallen uit. Een aantal koppels onderzoeken van één plantje of deze resistent is en een aantal koppels voeren de controle-reacties uit. De controlegroep test of er DNA in het epje zit en of de PCR-reactie goed verlopen is.

Stap 1: Cellen verzamelen

De practicumbegeleiders gaan langs om iedereen een stukje aardappelblad uit te delen. Leg deze op de bodem van de mortier. Probeer stengelmateriaal en de bladsteeltjes te vermijden: Deze zijn moeilijker te vermalen.

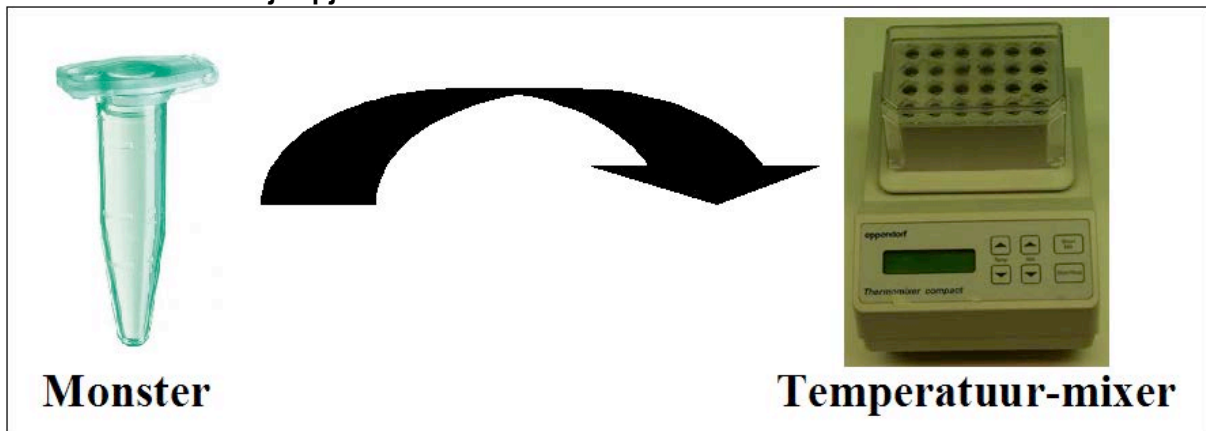
Stap 2: DNA isoleren

- 2.1. De practicumbegeleiders zullen vloeibare stikstof in de mortier scheppen om het blad te bevriezen. Het bladmateriaal wordt flink stevig vermalen tot een heel fijn lichtgroen poeder. Het is voor het eindresultaat heel belangrijk om het bladmateriaal zo fijn mogelijk te krijgen! Begin met malen zodra de vloeibare stikstof is verdamppt. Het verkregen poeder wordt met behulp van een spatel in het **groene** eppje gebracht met daarin 200µl lysisbuffer (deze buffer bevat o.a. β-mercaptoethanol en proteïnase-K). Dit wordt jullie monster. **Let op: deze buffer is giftig! Werk vanaf nu met latex handschoenen!**



Figuur 3: Stap 2.1

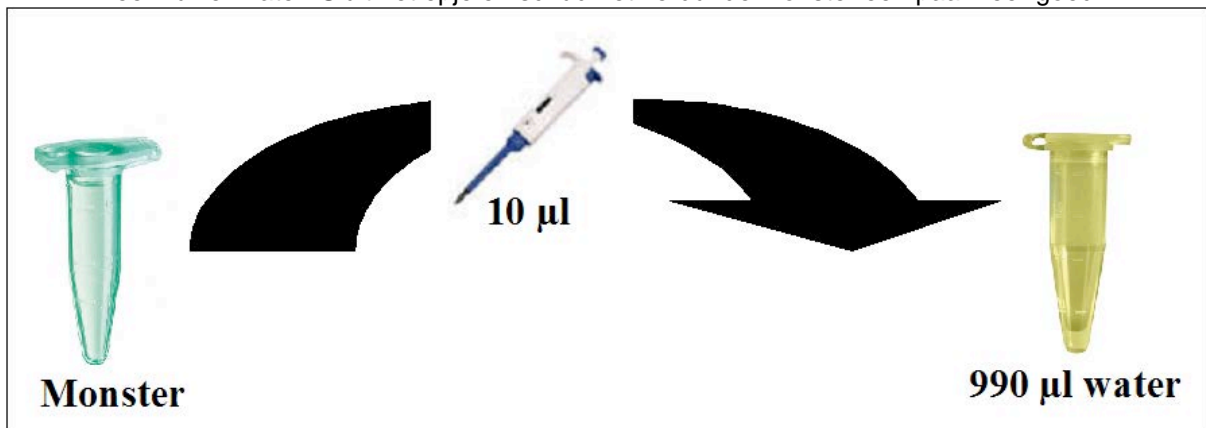
- 2.2. Plaats de epjes 10 minuten bij 65°C in de “Temperatuur-mixer” en laat deze schudden met 750 rpm. Tijdens het wachten krijgen jullie uitleg over de aard van de lysisbuffer en de functies van de afzonderlijke componenten en hoe je straks moet pipetteren. **Onthoud het nummer van je epje!**



Figuur 4: Stap 2.2

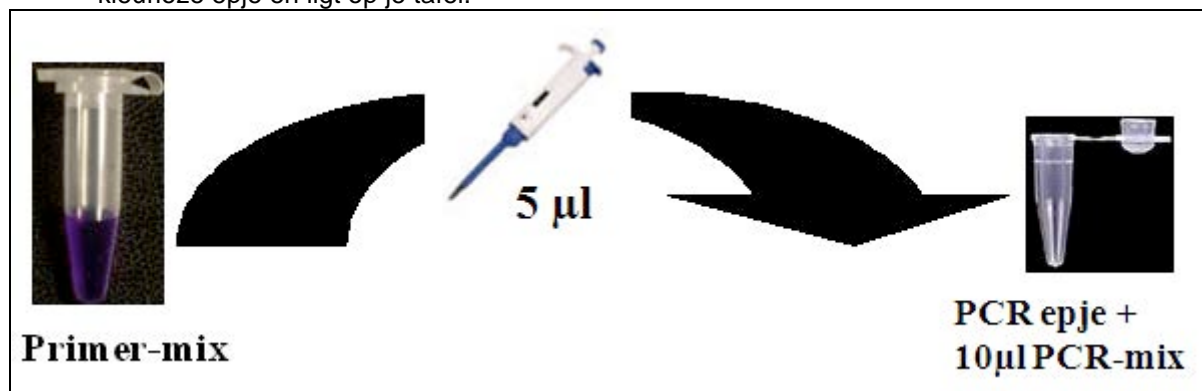
Stap 3: DNA vermeerderen

- 3.1. Verdun het monster. Pipetteer hiervoor 10 µl monster naar een geel epje met daarin 990 µl zeer zuiver water. Sluit het epje en schud het verdunde monster een paar keer goed.



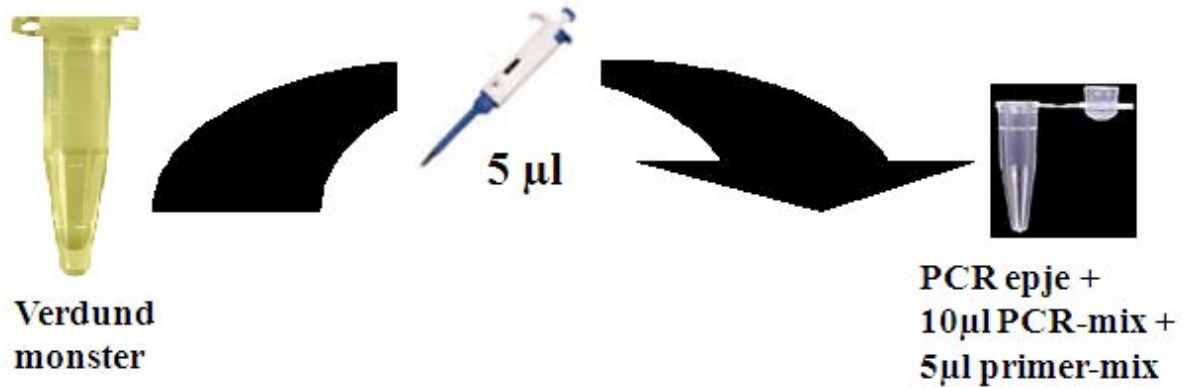
Figuur 5: Stap 3.1

- 3.2. Pipetteer 5µl Primer-mix (In deze Primer-mix zitten twee primers die een specifiek gen/eigenschap kunnen selecteren voor vermeerdering) in het kleine PCR-epje waarin al 10µl PCR-mix zit die bijna alles bevat wat nodig is om DNA te kopiëren. Dit is het allerkleinste kleurloze epje en ligt op je tafel.



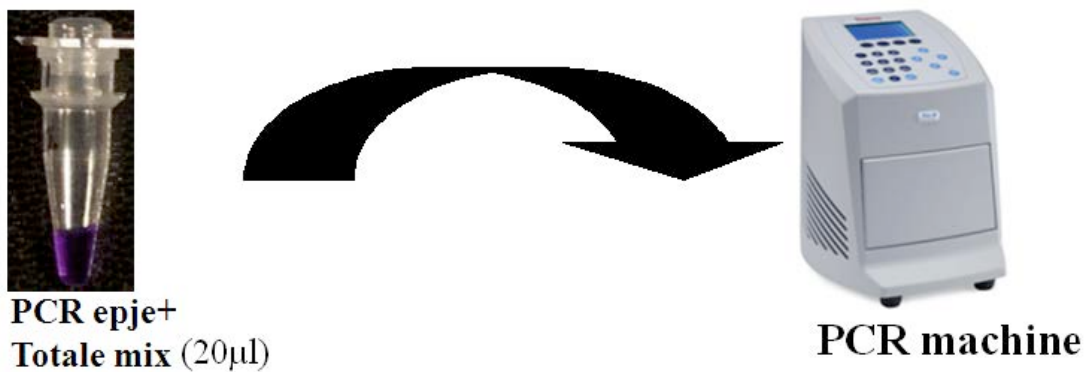
Figuur 6: Stap A.3.2

- 3.3. Pipetteer vervolgens 5 μ l vanuit het verdunde monster (zie stap 3.1) in het kleine PCR-epje waarin nu al 15 μ l PCR- en primer-mix zit (zie stap 3.2).



Figuur 7: Stap 3.3

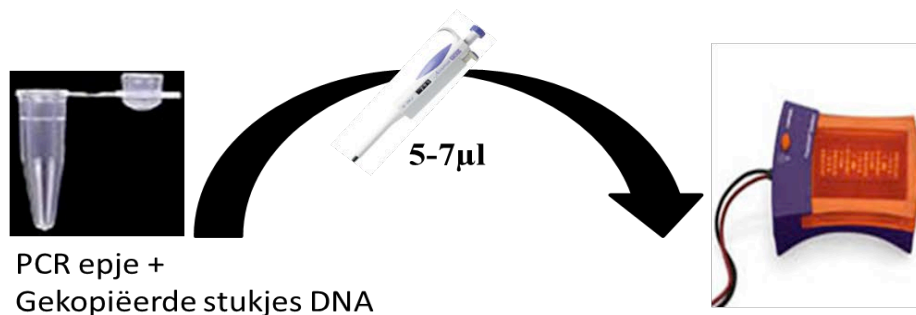
- 3.4. Plaats het kleine PCR epje in de PCR machine waarin geheel automatisch een stukje DNA wordt gekopieerd (voor de controlegroep een stukje gen dat codeert voor ribosomaal-DNA). Onthoud het nummer van je epje. Dit proces duurt ongeveer 40 minuten. Voer in deze tijd onderdeel B uit.



Figuur 8: Stap 3.4

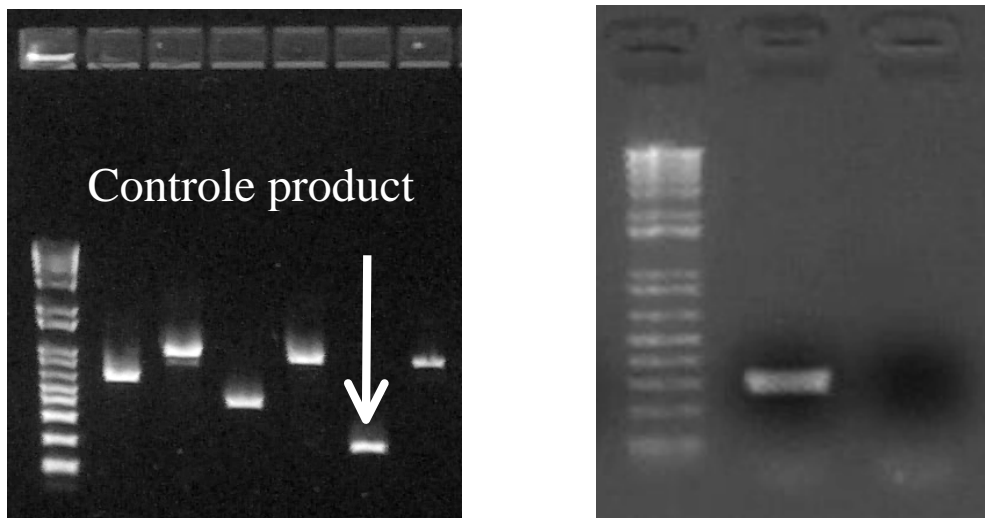
Stap 4: Analyse

- 4.1. Pipetteer 5-7 μ l vanuit het kleine PCR-epje (welke nu wel/niet de gekopieerde stukjes DNA bevat) in één van de putjes welke aanwezig zijn in de gelcassette. Gedurende 4 minuten wordt er nu stroom door de gel geleid, waardoor de DNA stukjes zullen gaan bewegen door de gel.



Figuur 9: Stap A.4.1

4.2. Vervolgens wordt de gel met UV-licht belicht zodat je de bandjes goed kunt zien.



Figuur 10: Een gel in UV-licht, links de controle en rechts de resistentietest.

4.3. Bekijk de gel en berekeneer wat je ziet. Wat voor genen heeft de plant meegekregen? Is het experiment eigenlijk wel betrouwbaar?

Resultaten

Vraag 1

Tijdens stap 2 wordt geschud bij 65°C. Waarom doe je dit?

Vraag 2

In stap 1 probeer je ervoor te zorgen zoveel mogelijk DNA in je monster te krijgen, terwijl je het in stap 3 gaat verdunnen. Waarom doe je dit?

Vraag 3

In de PCR reactie van stap 3.4 wordt de hoeveelheid DNA elke cyclus verdubbeld. In dit practicum voert onze PCR machine 40 cycli uit. Hoeveel DNA moleculen kun je dan in theorie maken als je begint met één molecuul DNA?

Vraag 4

Bij de gel-elektroforese in stap 4 zie je in veel laantjes een extra bandje dat heel snel over de gel loopt. Omdat dit bandje heel snel over de gel loopt, moet het een klein stukje DNA zijn. Wat zou dit stukje kunnen zijn?

Onderdeel B: de analyse van het fenotype

Theorie

Genenpaspoort

Vroeger moest je planten altijd helemaal laten uitgroeien om vast te stellen welke eigenschappen de plant had. Tegenwoordig is van veel eigenschappen bekend welk gen hiervoor verantwoordelijk is en wat de DNA volgorde van dat gen is. Door de aanwezigheid van dat gen aan te tonen kun je snel vaststellen of de plant een bepaalde eigenschap wel of niet heeft. Over het algemeen is het niet nodig het gehele gen aan te tonen, maar slechts een specifiek deel. Dit stukje DNA is dan de merker van de eigenschap, het markeert de aanwezigheid van het gen. Om erachter te komen of een plant een eigenschap gaat krijgen hoeft dus alleen gekeken te worden of de plant dit stukje DNA heeft. Dit is dus veel efficiënter dan de klassieke veredeling.

Door van veel verschillende eigenschappen naar de merker te kijken, kan snel onderzocht worden of het kiemplantje kan uitgroeien tot een plant met de gewenste eigenschappen. Bij aardappels kan bijvoorbeeld gekeken worden naar vorm, kleur, zetmeelgehalte, opbrengst, maar ook resistentie tegen bepaalde ziektes. Aangezien de omgevingsfactoren meestal bekend zijn, kan aan de hand van dit genotype het fenotype voorspeld worden. Alle eigenschappen van de plant die zo bepaald zijn noemen we bij elkaar het genenpaspoort.

Om een genenpaspoort te maken, moeten eerst eigenschappen aan genen gekoppeld worden. Dit is erg veel werk. Een goed voorbeeld daarbij is smaak. De smaak van een vrucht wordt bepaald door een combinatie van heel veel verschillende stoffen. Al die stoffen worden apart geproduceerd. Om een stof te maken zijn vaak veel omzettingen nodig. Al deze omzettingen worden mogelijk gemaakt door enzymen. De codering voor de productie van deze enzymen ligt in de genen. Om te kijken wat de combinatie van bepaalde genen oplevert, moet toch altijd weer gekeken worden naar het resulterende fenotype.

Doel

In dit onderdeel van het practicum gaan we twee dingen doen. Ten eerste gaan we kijken naar het verschil in fenotype tussen verschillende tomaten en paprika's/pepers die commercieel gekweekt worden. Uiteindelijk zijn het grotendeels de wensen van de consument die bepalen welke tomaten gekweekt gaan worden.

Ten tweede wordt er iets verteld over nematoden en hun infectie. Dit geeft je een beter idee van de grote invloed die deze infectie heeft en hoe groot het economische belang is om resistente planten te hebben.

Uitvoering

Materialen

- Verschillende soorten tomaten, paprika's of pepers

Beschrijving

Fenotypes vergelijken

Als een consument gaat bekijken welke tomaat hij wil kopen, kijkt hij naar een aantal kenmerken. Welke kenmerken dat zijn hangt natuurlijk af van het doel van de consument. Als dit een fabrikant van tomatenpuree is, zal hij andere dingen belangrijk vinden, dan een consument in de supermarkt die een lekkere salade wil maken.

Wat de producent belangrijk vindt (opbrengst, groeisnelheid, gemak van oogsten, resistentie) komt allemaal samen in één kenmerk voor de consument: de prijs.

Opdracht

Ga nu zelf een aantal vruchten met elkaar vergelijken. Let in ieder geval op de volgende kenmerken:

- De kleur, deze is ook afhankelijk van hoe rijp de vrucht is
- De grootte
- De stevigheid
- De vlezigheid, hoeveel vruchtvlees zit er in de tomaat ten opzichte van de hoeveelheid sap, bij pepers is dit niet van toepassing
- De geur
- De smaak

Als van al deze kenmerken bekend is welk gen verantwoordelijk is voor de eigenschap, kan een genenpaspoort worden gemaakt van de tomaten- of paprikaplant. Door hetzelfde onderzoek te doen als wij nu op de aardappel uitvoeren, kan een veredelaar snel bepalen welke planten verder veredeld moeten worden. Zo kunnen snel gewenste rassen worden gekweekt.

Let op!

Sommige pepersoorten zijn erg scherp. Proef hiervan maar een klein stukje. Denk er ook aan dat als er peper aan je handen zit je niet in je ogen moet wrijven of aan andere gevoelige lichaamsdelen komen.

Vraag

Alle vruchten die jullie bekeken hebben worden commercieel geteeld. Als jij een veredelaar was en een nieuw ras zou gaan kweken. Welke rassen zou je dan kruisen en waarom?

Les 4: Afsluitende les

Inleiding

Met de komst van moderne biologische technieken komt steeds meer de vraag naar voren: “Hoe en wanneer mogen we deze technieken gebruiken”. Deze vragen worden behandeld in de **bio-ethiek**. Wetenschappers die deze technieken gebruiken, zijn hier steeds mee bezig. Het is ook belangrijk dat jij goed over deze kwesties nadenkt, je mening goed kunt formuleren en deze met anderen kunt delen. Een mening over een ethische kwestie is nooit onjuist, maar kan wel slecht geformuleerd of ondoordacht zijn.

Analyse

Voordat je een mening over een ethische of maatschappelijke kwestie kunt vormen en erover kunt gaan discussiëren, moet je een probleem eerst objectief analyseren. De mening die je op gevoel al hebt geformuleerd moet je even opzij zetten.

- Oplossingen: Voor een ethisch of maatschappelijk probleem zijn vaak niet één of twee, maar meerdere oplossingen. Breng deze in kaart. Je kunt vaak geen goede mening vormen als je niet over alle oplossingen goed ingelicht bent.
- Betrokkenen: Bekijk wie er allemaal betrokken zijn bij de kwestie. In een casus staan de meeste hiervan wel genoemd. Bedenk echter dat bijvoorbeeld een actiegroep, ‘de maatschappij,’ de economie of ecologie ook een betrokkene kan zijn, zonder dat dit expliciet vermeld staat.
- Gevolgen: Bedenk voor alle oplossingen van het probleem wat de gevolgen zijn voor de betrokkenen en wat hun mening hierover is. Hierbij moet je rekening houden met de waarden die de betrokkene ergens aan hechten.

Waarden

Of iemand welgesteldheid, autonomie, verantwoordelijkheid of eerlijkheid belangrijk vindt, verschilt per persoon. Ook zul je ontdekken dat verschillende betrokkenen telkens andere zaken belangrijk vinden. Hierdoor zullen de meningen in de discussie waarschijnlijk verschillen. Dit is helemaal niet erg. Juist hierom is het belangrijk om met elkaar in discussie te treden en kennis te maken met elkaars standpunten.

Referentiekader

Om nu je mening te vormen, moet je eerst voor jezelf op een rijtje zetten waar jij prioriteiten legt. Welke betrokkenen vind je belangrijk? Welke waarden tellen voor jou het zwaarst? Wat je belangrijk vindt, heeft waarschijnlijk veel te maken met je opvoeding, de fase in je leven en je levensvisie. Deze zaken vormen samen je referentiekader. Houd er rekening mee dat dit voor iedereen anders is en dat iemands mening hierdoor sterk beïnvloed wordt.

Micro- en macro-ethiek

Ethische vraagstukken zijn grofweg in twee groepen te verdelen: micro- en macro-ethiek. Micro-ethiek heeft speciaal betrekking op jou of je directe omgeving, terwijl macro-ethiek veel algemener is en op de maatschappij slaat.

Een voorbeeld van een vraag in de macro-ethiek is: Vind je het goed als mensen die ongeneeslijk ziek zijn hulp krijgen bij zelfdoding als ze hierom vragen?

Een vraag uit de micro-ethiek kan zijn: Vind je het goed als een van je ouders hulp bij zelfdoding zou krijgen als deze ongeneeslijk ziek was? Hoewel het onderwerp hetzelfde is, zul je deze vraag op een hele andere manier aanpakken en beantwoorden.

Discussie

Voordat je daadwerkelijk gaat discussiëren, moet je eerst argumenten op papier zetten om je houvast te geven. Hierbij is het ook goed om de advocaat van de duivel te spelen; probeer van tevoren zelf zoveel mogelijk tegenargumenten te bedenken en probeer deze te weerleggen.

Casus 2

In de tweede casus van de inleidende les wordt gesproken over resistentie tegen nematoden. Lees deze casus nog eens door.

In praktijk wordt niet naar slechts één eigenschap gekeken, maar naar heel veel tegelijk. Zo kan een veredelaar precies uitzoeken welk plantje hij wil hebben. Als al deze eigenschappen in kaart worden gebracht, noemen we dit een genenpaspoort. Vind je het goed dat op deze manier veredeld wordt?

Analyseer deze casus. Bedenk dat naast de veredelaar ook de consument, boer of tuinder en plant zelf betrokkenen zijn.

Casus 1.1

Casus 1 uit de inleidende les gaat over prenataal onderzoek. Ook hier kan behalve één eigenschap ook naar meerdere eigenschappen gekeken worden. Naast aanleg voor een ziekte of afwijking kan bijvoorbeeld ook gekeken worden naar haarkleur of aanleg om dik te worden. Prenataal onderzoek uitvoeren brengt echter een risico voor moeder én kind met zich mee.

Zoals je in de inleidende les en tijdens het practicum hebt gezien is deze techniek precies hetzelfde. De vraag is nu wanneer we wel of niet prenataal onderzoek uit zouden moeten voeren. Wat kunnen en mogen we vervolgens doen met die informatie?

Casus 1.2

Van ongeboren kinderen kunnen we een genenpaspoort maken, maar na de geboorte kan dit bijvoorbeeld ook. In de forensische wetenschap zouden ze hier handig gebruik van kunnen maken. In hoeverre tast dit de autonomie van het individu aan? Is dit acceptabel voor jou en waarom wel of niet?

Casus 1.3

Als er van jou een genenpaspoort zou worden gemaakt, zou je nu al kunnen weten of je aanleg hebt voor kanker of Alzheimer. Verzekeringen zouden hier gebruik van kunnen maken door mensen met meer aanleg voor ziektes hogere premies te laten betalen en mensen met minder aanleg lagere premies. Ethische, maatschappelijke en economische kwesties zijn hier aan de orde. Wat weegt het zwaarst?