

## EEN WOORD VOORAF...

Het eerste practicum. Alles is nieuw en het is vooral even wennen. Is het interessant? Wat wordt er van je verwacht?

Je hebt gekozen voor de studie Biologie. Dit basispracticum is bedoeld om je kennis te laten maken met een aantal begrippen en technieken, die ook aan bod komen tijdens de colleges en die in dit vakgebied een belangrijke rol spelen.

Of het aansluit bij jouw interesse? Wij denken van wel. En of het overeenkomt met je voorstelling? Dat is voor iedereen anders, maar wij doen ons uiterste best om je iets mee te geven van onze fascinatie voor ons vak, de biologie.

Wat je kunt verwachten is uitvoerig in de handleiding beschreven. Bij de opzet van dit practicum zijn we uitgegaan van een grote mate van discipline en zelfwerkzaamheid. Alle practica worden ingeleid met een voorcollege, waardoor je een aantal experimenten zelfstandig kunt uitvoeren. Bij andere wordt begeleiding gegeven, vooral wanneer je kennis maakt met nieuwe apparatuur.

Aarzel niet om je nieuwsgierigheid te tonen en stel je vragen.

Je gaat kennis maken met cellen en processen die zich in die cellen afspelen. We zullen voorbeelden ervan bestuderen. Voor het goede verloop van essentiële processen in een cel is het milieu in die cel, met name de zuurgraad (pH), van doorslaggevend belang. Bij het uitvoeren van celbiologische proeven is daarom begrip van de pH en het nauwkeurig kunnen berekenen en maken van oplossingen en buffers een vereiste. De nodige oefenstof wordt hiervoor aangeboden.

Een onmisbaar instrument is de microscoop. Daarmee ga je het gedrag van chromosomen tijdens de celdeling bestuderen. Dit gedrag van chromosomen heeft consequenties voor de erfelijke eigenschappen van een individu. De wetmatigheden daarvan komen aan de orde evenals de overdracht van genetische informatie tussen bacteriën.

De moleculaire biologie is niet meer weg te denken uit de natuurwetenschappen. Momenteel is dit vakgebied één van de meer opwindende onderdelen, dat ook het meest in de publieke belangstelling staat. Er worden veel spectaculaire ontdekkingen gedaan, niet in het minst omdat het een nog relatief jonge discipline is. Een aantal practica wordt besteed aan basistechnieken van deze tak van de biologie. We gaan een gen “klonen” met als resultaat een recombinant DNA-molecuul.

Je gaat kijken naar ééncellige en meercellige organismen. Met de microscoop en andere technieken bestudeer je bacteriën en plantencellen met hun organellen zoals chloroplasten en plastiden en de fysiologische processen die zich daarin afspelen.

Je maakt kennis met de techniek van het “steriel werken” en ontdekt dat voor bacteriën het adagium “alles is overal” in hoge mate opgaat.

Aan het einde van dit basispracticum heb je uiteenlopende onderzoeksvaardigheden opgedaan. Deze worden in het vervolg van de opleiding Biologie verder ontwikkeld.

# I N H O U D

	<b>Blz.:</b>
Een woord vooraf ...	1
Inhoud	2
 Rooster Blok 1	 3
Rooster Blok 2	5
Practicumteam	6
Huishoudelijk reglement	7
Tentamen CL + BioQ	8
Toets MG1	9
Tentamen MB	9
 Veiligheid	 11

## **BLOK 1:**

Bijhouden laboratoriumjournaal	20
Oplossingen en Verdunningen / Pipetten en Balansen	21
pH en Buffers	29
Microscopie	43
Type tekeningen	48
Genetica: De celcyclus	49
Mendelgenetica	61
Gekoppelde genen en geslachtsgek. overerving	69
Conjugatie	75
Recombinant-DNA	77

## **BLOK 2:**

Bacteriële groeicurve	95
Het maken van preparaten	101
De organisatie van cellen	105
Protoplasten / Membraantransport	109
Osmose	113
Fotosynthese	121
Steriel werken	131
Ophopingen	140
Regulatie $\beta$ -Galactosidase-synthese	144
De werking van penicilline	147

# ROOSTER BASISPRACTICUM 2015

## BLOK 1: Fundamenten van het leven

<b><u>PRACTICUM 1</u></b>	<b><u>maandag 7/9 13.30 groep A+B vanaf 14.30 gr A</u></b> <b><u>Dinsdag 8/9 09.00 groep B</u></b>
<b>OPLOSSINGEN EN VERDUNNINGEN / PIPETTEN EN BALANSEN</b>	
Vorbereiden:	Zie Pipetten en Balansen Opdrachten 1 t/m 10 (vooraf inleveren in map)
Uitvoeren:	Practicumopdrachten
<b><u>PRACTICUM 2/BioQ</u></b>	<b><u>woensdag 19/9: groep A: 9.00 / groep B: 13.30 uur</u></b>
<b>pH en BUFFERS</b>	
Vorbereiden:	Zie pH en buffers Opdrachten 1 t/m 4 (vooraf inleveren in map)
Uitvoeren:	Practicumopdrachten
<b><u>PRACTICUM 3</u></b>	<b><u>maandag 14/9: 9.00 uur</u></b>
<b>MICROSCOPIE/GENETICA</b>	
Vorbereiden:	Inleiding Microscopie Blackboard Powerpoint-presentatie: Microscopie
Uitvoeren:	Instellen van de lichtmicroscop/microscopie-opdracht
<b>GENETICA</b>	
Vorbereiden:	Blackboard Powerpoint-presentaties: <b>Mitose + Meiose</b> + <b>thuisopdracht Mitose + Meiose</b> (beide inleveren op 14/9) Inleiding: mendelgenetica en gekoppelde genen
Uitvoeren:	<b>Mitose opdrachten, start maken met opdracht mais</b>
<b><u>PRACTICUM 4</u></b>	<b><u>woensdag 16/9: 9.00 uur</u></b>
<b>GENETICA</b>	
Vorbereiden:	Blackboard Powerpoint-presentatie: <b>Meios</b> Inleiding: meiose en gekoppelde genen
Uitvoeren:	<b>Meios</b> opdrachten, mendelgenetica en gekoppelde genen (=thuisopdracht)
<b><u>PRACTICUM 5</u></b>	<b><u>vrijdag 18/9: 11.15 uur</u></b>
<b>GENETICA</b>	
Uitvoeren:	<b>Thuisopdracht gekoppelde genen inleveren</b> <b>Alle practicumopdrachten afronden en inleveren</b> <b>Presentatie over de onderwerpen practicum 3-5</b>
<b>Toets: tMG 1</b>	<b><u>maandag 21/9: 13.30 – 15.30 uur</u></b>
<b><u>TENTAMEN CL+BioQ</u></b>	<b><u>dinsdag 22/9: 13.30 – 16.30 uur</u></b>
<b><u>PRACTICUM 6</u></b>	<b><u>donderdag: 24/9 13.30 uur</u></b>
<b>CONJUGATIE//STERIEL WERKEN//RECOMBINANT DNA restrictie-enzymen</b>	
Vorbereiden:	Inleiding Conjugatie/Bacterial Growth/DNA knippen Inleiding steriel werken
Uitvoeren:	Conjugatie / DNA knippen

## **BACTERIELE GROEICURVE**

Dit is een computerproef die je zelfstandig uitvoert. De kennis die je daarbij opdoet is nuttig bij het uitvoeren van het recombinant-DNA experiment en conjugatie.

Inleveren:

**Met de hand ingevulde vragenlijst!**

### **PRACTICUM 7** **RECOMBINANT-DNA**

Voorbereiden:

Uitvoeren:

**vrijdag 25/9: 11.15 uur**

Zie inleiding Recombinant-DNA

Electroforese + ligatie inzetten

### **PRACTICUM 8** **RECOMBINANT-DNA**

Uitvoeren:

**maandag 28/9: 11.15 uur**

Transformatie

Uitwerking conjugatie en groeicurves

### **PRACTICUM 9** **RECOMBINANT-DNA**

Uitvoeren:

**dinsdag 29/9: 15.45 uur**

Transformanten aanenten

### **PRACTICUM 10** **RECOMBINANT-DNA**

Uitvoeren:

**donderdag 1/10: 11.15 uur**

uitwerken opdrachten recombinantDNA en **labjournaal**

### **PRACTICUM 11** **RECOMBINANT-DNA**

Uitvoeren:

**vrijdag 2/10: 11.15 uur**

DNA isolatie uit transformanten

**Labjournaal bijwerken**

### **PRACTICUM 12** **RECOMBINANT-DNA**

Uitvoeren:

**maandag 5/10: 11.15 uur**

DNA knippen met verschillende restrictie-enzymen

**Labjournaal bijwerken en inleveren**

### **PRACTICUM 13** **RECOMBINANT-DNA**

Uitvoeren:

**woensdag 7/10: 9.00 uur**

Electroforese en analyse van het gemaakte construct

Labjournaal afmaken

### **Herkansing toets MG1** **Herkansing T CL+BioQ**

**vrijdag 9/10: 10.00 – 12.00 uur**

**vrijdag 9/10: 13.30 – 16.30 uur**

### **PRACTICUM 14** **RECOMBINANT-DNA**

**maandag 12/10: 9.00 uur**

Eindpresentatie Recombinant-DNA voorbereiden

**Labjournaal bijwerken en inleveren**

### **PRACTICUM 15** **RECOMBINANT-DNA**

**dinsdag 15/10: 13.30 uur**

Eindpresentatie Recombinant-DNA

### **TENTAMEN MG1**

**vrijdag 16/10 13.30 – 16.30 uur**

## **BLOK 2: De cel in actie**

<b><u>PRACTICUM 1</u></b>	<b><u>maandag 26/10: 11.15 uur</u></b>
<b>DE ORGANISATIE VAN CELLEN</b>	
Voorbereiden:	Zie inleiding: De organisatie van cellen
Uitvoeren:	Practicumopdrachten
<b><u>PRACTICUM 2</u></b>	<b><u>dinsdag 27/10: 9.00 – 13.00 en 15.15 – 16.30 uur</u></b>
<b>PROTOPLASTEN/PLASMOLYSE</b>	
Voorbereiden:	Zie inleiding: Protoplasten/Plasmolyse (zie osmose)
Uitvoeren:	Practicumopdrachten
<b><u>PRACTICUM 3</u></b>	<b><u>woensdag 28/11: 9.00 uur</u></b>
<b>OSMOSE</b>	
Voorbereiden:	Zie inleiding: Osmose
Werkgroep	Vorbereiding berekeningen
Uitvoeren:	Osmose-exp. Minimaal tot opdracht 6
<b><u>PRACTICUM 3 a</u></b>	<b><u>donderdag 29/10: 9.00</u></b>
<b>OSMOSE</b>	
Werkgroep	Berekeningen en verslag osmose inleveren
<b><u>PRACTICUM 3 b</u></b>	<b><u>vrijdag 30/10: 11.15</u></b>
<b>OSMOSE</b>	
Werkgroep	Nabespreking osmose/vragenuur over behandelde stof
<b><u>PRACTICUM 4</u></b>	<b><u>maandag 2/11: 11.15</u></b>
<b>MIMOSA</b>	
Voorbereiden	Mimosa: zie syllabus celfysiologie
Werkgroep	Kennismaken met mimosa en experimenteren
	Opstelling maken
<b><u>PRACTICUM 4 a</u></b>	<b><u>dinsdag 3/11: 9.00 – 13.00 mimosa exp.</u></b>
<b>MIMOSA</b>	<b><u>13.00 – 15.15 college</u></b>
	<b><u>Na 15.15 mimosa exp. afmaken</u></b>
Uitvoeren	Actiepotentiaalmetingen en verslag maken
<b><u>PRACTICUM 5</u></b>	<b><u>woensdag 4/11: 9.00 groep A</u></b>
<b>FOTOSYNTHESE</b>	<b><u>donderdag 5/11: 9.00 groep B</u></b>
Voorbereiden:	Zie inleiding Fotosynthese
Uitvoeren:	Practicumopdrachten + verslag
<b><u>WERKCOLLEGE</u></b>	<b><u>donderdag 5/11: 9.00 groep A</u></b>
<b>FOTOSYNTHESE</b>	<b><u>vrijdag 6/11: 9.00 groep B</u></b>
<b><u>TENTAMEN CF</u></b>	<b><u>woensdag 11/11: 9.00 uur</u></b>
<b><u>PRACTICUM 6</u></b>	<b><u>donderdag 12/11: 11.15 uur</u></b>
<b>STERIEL WERKEN/ OPHOPINGEN</b>	
Voorbereiden:	Zie inleiding: Steriel werken/Ophopingen
Uitvoeren:	Practicumopdrachten Dag 1 <b>Steriel Werken</b>
	Practicumopdrachten Dag 1 <b>Ophopingen</b>

**PRACTICUM 7****maandag 16/11: 11.15 uur****STERIEL WERKEN/OPHOPINGEN**

Voorbereiden:

Zie inleiding: Het maken van preparaten

Uitvoeren:

Practicumopdrachten Dag 2 **Steriel Werken**Practicumopdrachten Dag 2 **Ophopingen****PRACTICUM 8****dinsdag 17/11: 9.00 – 13.00 en 15.45 – 16.30 uur****STERIEL WERKEN/OPHOPINGEN**

Uitvoeren:

Practicumopdrachten Dag 3

Gramkleuringen

**PRACTICUM 8a****woensdag 18/11: 11.15 uur werkgroep****PRACTICUM 9****maandag 30/11: 11.15 uur****β-GALACTOSIDASE/DE WERKING VAN PENICILLINE**

Voorbereiden:

Zie inleiding: Regulatie β-galactosidasesynthese

Uitvoeren:

Practicumopdracht Dag 1

Voorbereiden:

Zie inleiding: De werking van penicilline

Uitvoeren:

Practicumopdracht Dag 1

**OPHOPINGEN**

Uitvoeren:

Practicumopdrachten Dag 4 **Ophopingen****PRACTICUM 10****dinsdag 1/12: 9.00 – 13.00 en 15.45 – 16.30 uur****β-GALACTOSIDASE/DE WERKING VAN PENICILLINE**

Uitvoeren:

Voor beide onderdelen: Practicumopdrachten Dag 2

**Labjournaal inleveren****PRACTICUM 11****woensdag 2/12: 12.00 uur**

Voorbereiding presentatie/essay

**PRACTICUM 11a****vrijdag 4/12: 9.00 uur**

Presentaties (locatie Sylvius in 6 verschillende zalen)

**EXCURSIE microbiologie****maandag 7/12 en dinsdag 8/12 vanaf 11.00 uur****Plaats en exacte aanvangstijd: zie blackboard****TENTAMEN MICROBIOLOGIE vrijdag 11/12: 13.30 – 16.30 uur**

## Practicumteam

**Practicumdocent/coördinator: mw. T. Regensburg-Tuink 071-5275142.**Email: [a.j.g.regensburg@biology.leidenuniv.nl](mailto:a.j.g.regensburg@biology.leidenuniv.nl)**Studentassistenten:**

Elke gang (16 studenten) heeft een vaste assistent. Assistenten worden op de eerste practicumdag van elk blok aan jullie voorgesteld.

**Technisch onderwijsassistent (toa): mw. W. Post**Bereikbaar: **071-5274797**. Zij behartigt uitgifte/inname practicummaterialen/sleutels, zorgt voor de inhoud van je kastje en is meldpunt voor technische problemen.

# HUISHOUDELIJK REGLEMENT

## AANWEZIGHEID

De aanvangstijden van de practicumdagen wisselen, kijk goed in het rooster op voorgaande bladzijden en ook zeer geregeld op Blackboard. Het tijdstip van de middagpauze mag je, met inachtneming van de goede voortgang van de proeven, zelf bepalen. Elk practicum begint met instructies en praktische tips. **OP TIJD aanwezig zijn is een must.** Ga niet aan het werk voordat deze instructie gegeven is. Soms is het nodig om op het laatste moment enkele details in een proef te veranderen, met bijbehorende veranderingen in de handleiding.

Het practicum is een **VERPLICHT** studie-onderdeel. Een practicum kan alleen om een uiterst dringende reden worden verzuimd. Neem **VAN TEVOREN** contact op met mw. T. Regensburg-Tuïnk (071-5274797). **Verzuim door ziekte meld je dezelfde dag of in ieder geval z.s.m. per email met als subject van de mail: afwezigheid door ziekte plus datum.** Met de practicumcoördinator bespreek je de mogelijkheid om het gemiste practicum in te halen.

**In de handleiding staat bij elk onderwerp aangegeven welke voorbereiding er van je verwacht wordt. Tijdens het practicum is hiervoor géén tijd ingeroosterd. Bevat de voorbereiding ook het maken van opdrachten, lever deze in voordat het practicum begint! Te laat ingeleverd werk wordt niet geaccepteerd.**

## ORGANISATIE

In de zaal staan 9 practicumtafels; deze zijn vanaf de zaalingang genummerd van 1 t/m 9. Per tafel is er plaats voor 16 studenten. Deze 16 studenten vormen samen een groep met een vaste assistent. De groep heeft het nummer van de tafel. Tafel 10 is aan de raamzijde.

Elke groep heeft zoveel mogelijk zijn eigen spullen en gebruikt in principe zonder overleg geen spullen van andere groepen. **Binnen een groep vormen de studenten vaste paren.**

Het practicumteam zet de benodigdheden klaar, regelt de centrale werkzaamheden en is beschikbaar voor informatie. Schroom niet om de assistenten je vragen te stellen.

Het zorgvuldig lezen van het hoofdstuk **VEILIGHEID**, met name het onderdeel **NETJES WERKEN**, is een vereiste voor een goed verloop van het practicum.

## LABORATORIUMJOURNAAL

Aan het begin van het practicum krijg je een ingebonden notitieboek op folio-formaat. Dit wordt je **laboratoriumjournaal**. Een laboratoriumjournaal is een onmisbaar attribuut in elk laboratorium. Alles wat je doet wordt er overzichtelijk, netjes en nauwkeurig in opgeschreven, zodat iedereen vanuit dit journaal de proef zonder problemen op dezelfde manier kan overdoen. In de wetenschap is dit een onmisbare manier om de juistheid van resultaten na te gaan.

Schrijf daarom niet alleen de uitvoering precies op, schrijf ook de resultaten van de proeven overzichtelijk op en schrijf berekeningen gedetailleerd uit (zie p 20).

**Laat regelmatig tijdens het practicum het labjournaal aan je assistent zien.**

**Aan het eind van elk experiment of op aanvraag lever je je labjournaal in bij je assistent ter beoordeling.**

Bij sommige opdrachten worden **tekeningen** gemaakt. Volg hiervoor de aanwijzingen die tijdens het practicum en in je in de handleiding worden gegeven. **De tekeningen worden ingeleverd in een tekenmap met daarop je naam en plaatsnummer.**

De uitwerking van de diverse opdrachten komt te staan op Blackboard Basispracticum onder “Course Information”.

### **BioQ en Bacterial Growth**

Het programma **BioQ** geeft een herhaling van onderdelen van de VWO-stof: Scheikunde, Wiskunde en Natuurkunde. Diverse docenten van de Propedeuse Biologie hebben hiervoor onderdelen van deze vakken geselecteerd. Kennis van deze stof is nodig om het Basispracticum en de rest van de propedeuse goed te doorlopen. De stof dient **geheel zelfstandig** bestudeerd te worden voor de practica 1 en 2.

Met name de scheikunde stof wordt getentamineerd tijdens het tentamen Chemie van het Leven. Het programma staat op Blackboard onder Basispracticum.

Het programma **Bacterial Growth** is een voorbereiding op de practica Recombinant-DNA en microbiologie en dient geheel zelfstandig te worden bestudeerd.

Het programma staat geïnstalleerd op een aantal laptops in de practicumzaal (op aanvraag te gebruiken) en op PC's in zaal 1.5.07 in het Sylvius.

Via Blackboard wordt een url bekend gemaakt om op je eigen laptop het programma bewerken (zie BB: “course Basispracticum”...course documents). Je maakt de opdrachten op het uitgedeelde opdrachtformulier en dit formulier lever je in.

## **HOE HAAL IK DE TENTAMENS?**

### **TENTAMEN Chemie van het Leven (CL) bestaat uit 2 onderdelen**

De **collegestof Chemie van het Leven**: Campbell hoofdstukken van Unit1 plus wat de docent eventueel daarnaast heeft behandeld en practicum 1 en 2.

De stof van **BioQ**: voor de toets is de kennis van “Basic skills” vereist, van zowel wiskunde, natuurkunde en scheikunde.

### **Bij het tentamen heb je nodig:**

- **Binas en eventueel formule kaarten**
- **rekenmachine (GEEN grafische rekenmachine)**
- **geodriehoek**

Houd bij de beantwoording van je vragen altijd rekening met de eenheden. Maak complete berekeningen en reactievergelijkingen. **Onderstreep het antwoord en de juiste eenheid.**

**N.B.** Eenheden zoals molariteiten en liters worden in het dagelijks laboratoriumgebruik weergegeven als bijv. 1 mol of 1 liter. Als er op het etiket van een fles staat dat 1 mol 123,76 gram weegt dan is het vanzelfsprekend dat de mol eigenlijk aangegeven had moeten worden als 1,0000 mol.

Om te weten met welke afronding je te maken hebt, kijk je naar het meest precies aangegeven getal. Denk ook na over de logica van de afronding. Dit is misschien in tegenspraak met wat je op het VWO hebt geleerd. In de praktijk ga je op deze manier te werk. Zo ook tijdens het Basispracticum en op dit tentamen.



## **TOETS Moleculaire Genetica (MG)**

De toets gaat over de collegestof Moleculaire Genetica, Campbell H.12 t/m 15 en practica 3, 4 en 5 (zie handleiding).

### **Bij het tentamen heb je nodig:**

- **rekenmachine (GEEN grafische rekenmachine)**

De toets bestaat uit open vragen en berekeningen. De laatste moet je **helemaal en gedetailleerd uitschrijven**.

Je krijgt een diploide kruising uit te rekenen. Reken ook op een vraag over aantallen chromatiden/chromosomen/bivalenten/geslachtschromosomen in verschillende stadia van de mitose en van de meiose. Ook moet je de verschillende stadia kunnen herkennen.

Er zullen definities of omschrijvingen worden gevraagd die voorkomen in de inleidende tekst en in de antwoorden op de vragen behorend bij alle relevante practica. Ook de begrippen uit Campbell die **vet** zijn gedrukt behoren tot je kennis.

Uiteraard kun je ook vragen verwachten, die toetsen of je de stof niet alleen in sommetjes kunt toepassen maar of je de stof ook hebt begrepen.

Oefen zelf de Concept-Check en Self-Quiz die staan bij elk hoofdstuk en raadpleeg ook het oefenmateriaal op de website van Campbell via je Student Access Kit.

## **Tentamen Moleculaire Genetica (MG)**

Het tentamen gaat over de **collegestof**, plus de door de docent opgegeven hoofdstukken uit Campbell 16 t/m 20 en het practicumonderdeel **Recombinant-DNA en Conjugatie**

## **TENTAMEN Microbiologie (MI)**

Het tentamen gaat over de **collegestof**, plus de door de docent opgegeven hoofdstukken uit Campbell en de volgende **practica** met de bijbehorende theorie:

- Steriel werken
- Ophopingen
- $\beta$ -galactosidase
- Penicilline
- Bacteriële groeicurve (Bacterial Growth)

De tentamenvragen zijn open vragen en berekeningen. **De laatste moet je helemaal en gedetailleerd uitschrijven.**

### **Bij het tentamen heb je nodig:**

- **rekenmachine (GEEN grafische rekenmachine)**

Er zullen definities of omschrijvingen worden gevraagd die voorkomen in de inleidende tekst en in de antwoorden op de vragen behorend bij alle relevante practica. Ook de begrippen uit Campbell die **vet** zijn gedrukt.

Uiteraard kun je ook vragen verwachten, die toetsen of je de stof niet alleen in sommetjes kunt toepassen maar of je de stof ook hebt begrepen.

Oefen zelf de Concept-Check en Self-Quiz die staan bij elk hoofdstuk en raadpleeg ook het oefenmateriaal op de website van Campbell via je Student Access Kit.

Over de proeven kun je vragen verwachten (bijv. welke selectieplaten zou je bij de beschreven proef gebruiken en waarom; beschrijf een nuttige blanco; wat toon je aan met de Gramkleuring, welke criteria zijn belangrijk bij een ophoping etc.).

## **BEOORDELING**

### **Practica**

De **practica** van blok 1 en 2 worden beoordeeld met een cijfer.

Practicum blok 1 4 EC.

Practicum blok 2 3 EC. De projectweek in blok 2 1 EC.

Voor het **practicum** word je op de volgende onderdelen beoordeeld:

- voorbereiding
- uitvoering opdrachten (inclusief de thuisopdrachten)
- bijhouden labjournaal
- verwerken van de verkregen resultaten uit de experimenten
- verwerken van de opdrachten (w.o. presentaties)
- indruk op basis van werkhouding

Bij een eindbeoordeling van het practicum **lager dan 6,00** en bij onvoldoende presentie moet het practicum het daaropvolgende jaar worden overgedaan.

### **Toetsen en tentamens**

#### **Blok 1:**

- **CI + BioQ.** Het eindcijfer is opgebouwd uit 2 deeltijfers.  
Het deeltijfer behaald voor **CI** moet minimaal een **5,00** zijn en telt voor ¼ deel mee voor het eindcijfer.  
Het deeltijfer behaald voor **BioQ** moet minimaal een **5,60** zijn en telt voor ¾ deel mee voor het eindcijfer.

Het **eindcijfer** wordt bepaald door de verhoudingsgewijs gecombineerde deeltijfers.

- **MG.** Het eindcijfer is opgebouwd uit 2 deeltijfers.  
Het deeltijfer behaald voor de **toets MG1** moet minimaal **5,00** zijn en telt mee voor 3/8 deel van het eindcijfer.  
Het deeltijfer behaald voor het **tentamen MG1** moet minimaal **5,00** zijn en telt mee voor 5/8 deel van het eindcijfer.

Het **eindcijfer** MG wordt bepaald door de verhoudingsgewijs gecombineerde deeltijfers.

#### **Blok 2:**

De practicumonderdelen uit blok 2 worden getoetst als onderdeel van de tentamens **Celfysiologie (CF) en Microbiologie (MB)**.

De tentamens Celfysiologie, Microbiologie en Celbiologie leveren elk 3 EC op.

# **VEILIGHEID**

Alle activiteiten van de mens brengen bepaalde risico's met zich mee. Dat geldt ook voor het uitvoeren van experimenten in of buiten een laboratorium. Het is belangrijk een inschatting te maken van de kans op ongelukken en de gevolgen daarvan voor jezelf, anderen in je omgeving binnen en buiten het laboratorium en het milieu. Door het tevoren treffen van gerichte maatregelen op het gebied van informatie, instructie, voorzieningen, hulpmiddelen en gedrag kunnen veel risico's binnen aanvaardbare grenzen worden gehouden.

Er doen zich met enige regelmaat gevaarlijke situaties voor, die in sommige gevallen leiden tot ongelukken. Ongelukken ontstaan vaak door een samenloop van omstandigheden. Meestal had elk van deze omstandigheden kunnen worden voorkomen door het in acht nemen van preventieve maatregelen.

Dit hoofdstuk geeft je een overzicht van mogelijke risico's en de maatregelen die kunnen worden getroffen om de gevolgen van deze risico's zo klein mogelijk te houden.

Het is belangrijk om dit hoofdstuk goed te lezen en van de inhoud kennis te nemen, voordat je met het basispracticum begint.

Binnen de gebouwen van de faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen (Fac.W&N), waar studenten biologie practica volgen en later praktisch werk verrichten, gelden de regels en voorschriften die zijn opgenomen in het facultaire “**Veiligheidsreglement**”, waarvan de meest recente versie beschikbaar is op de website van de Arbo - en Milieu Dienst (AMD) (zie p. 16).

Tijdens het practicum zijn een aantal zaken verplicht, terwijl een aantal andere zijn verboden. Houd je zorgvuldig aan onderstaande regels.

## **Tijdens het practicum zijn de volgende zaken verplicht:**

- draag een witte labjas
- raadpleeg bij twijfel over een handeling de assistent
- ruim aan het eind van elk practicum de tafels geheel op en maak ze schoon (zie onder bij NETJES WERKEN)
- ruim alle afvalstoffen op de juiste manier op (zie onder bij AFVAL)
- was je handen voordat je de zaal verlaat
- gebruik apparaten alléén na instructie door de assistent
- houd warmtebronnen in de gaten
- gebruik een doek voor het vastpakken van heet glaswerk
- houd chemicaliën weg van warmtebronnen en buiten direct zonlicht
- gebruik vluchtige stoffen (bijv. ammoniak en organische oplosmiddelen) en sterke logen en zuren alleen in een werkende zuurkast
- waarschuw bij een ongeluk(je) meteen een assistent
- was na huidbesmetting met micro-organismen of chemicaliën direct met ruim water
- ruim gemorste chemicaliën en kapot glaswerk meteen op

**De volgende zaken zijn absoluut verboden:**

- roken, eten, drinken en het aanbrengen van cosmetica in de practicumzaal
- pipetteren met de mond
- tassen en jassen op de laboratoriumtafel
- het betreden van voorbereidingsruimten en het openen van voorraadkasten

**VEILIGHEID en MILIEU**

De volgende veiligheids- en milieu-aspecten worden hier nader toegelicht (raadpleeg voor meer informatie het eerdergenoemde Veiligheidsreglement en de aan het eind van dit hoofdstuk vermelde web-sites):

Netjes werken

Brandveiligheid

Calamiteiten

Biologische Agentia

Chemicaliën

Stralingsveiligheid

Afval

**NETJES WERKEN**

Het algemene credo luidt: **Eerst denken, dan doen!** Tijdens het practicum wordt gewerkt met verschillende chemische stoffen en micro-organismen. Bij dit werk is netheid een vereiste. Een slordige labgebruiker brengt haar / zijn nietsvermoedende collega's, zijn experimenten, zichzelf en mogelijk het milieu in gevaar.

- sluit na gebruik van chemicaliën de pot goed af en zet deze direct terug op de plek van herkomst
- houd de tafels bij de weegschalen overzichtelijk; weeglepeltjes schoonmaken voor en na gebruik
- haal niet meer stockoplossingen en media uit de kast of stoof dan absoluut noodzakelijk is en alléén voor jezelf en je partner
- zet de gasbrander zoveel mogelijk op de spaarvlam
- vóór inleveren het glaswerk eerst goed omspoelen en viltstift met aceton of alcohol verwijderen
- vuil glaswerk gaat op soort (buizen, flesjes, serumflessen e.d.) in witte bakken op de aangegeven zijtafels of kar
- doppen niet beschrijven en apart houden van vuil glaswerk
- zet vuile pipetten met de punt omhoog in de pipetkokers met zeep op tafel (let op voor opspattend zeep)

## **BRANDVEILIGHEID**

Brand ontstaat waar brandbaar materiaal, een voldoende hoge temperatuur en zuurstof voor handen zijn. Dit kan in een gebouw spontaan gebeuren b.v. door kortsluiting of door het vastlopen van apparatuur, tijdens dakbedekkingswerkzaamheden, het kan ook gebeuren tijdens of als gevolg van laboratorium werkzaamheden.

### **Brandpreventie**

Bij steriel werken met micro-organismen en bij sommige experimenten met chemicaliën wordt gewerkt met open vuur of met andere warmtebronnen, zoals verwarmingsplaten, verwarmingsmantels, -stoven of -baden. Vluchtige chemicaliën of combinaties van bepaalde chemicaliën kunnen leiden tot temperatuurstijging en/of ontbranding. Wees bedacht op de specifieke gevaren van vuur, chemicaliën en verwarming of combinaties daarvan.

Speciale aandacht verdient alcohol, dat tijdens biologisch werk veelvuldig wordt gebruikt als ontwateringsmiddel, ontsmettingsmiddel of om macromoleculen te precipiteren, vaak op of nabij plaatsen waar met open vuur wordt gewerkt.

### **Brandbestrijding**

Indien onverhoopt brand uitbreekt is het belangrijk om snel en adequaat te handelen zodat de gevolgschade aan personen, zaken en milieu zo veel mogelijk wordt ingeperkt.

Tijdens het practicum volg je een instructie waarbij je eigenhandig kunt oefenen met mobiele blusmiddelen, zoals branddeken en handblusser.

Kijk goed rond waar in de zaal en elders in het gebouw zich de branddouches, branddekens, handblussers, brandhaspels en brandmelders bevinden.

## **CALAMITEITEN**

In het geval van calamiteiten waarbij hulp nodig is, zoals brand, ernstige verwondingen, molest, bomalarm of ernstige defecten aan de gebouwtechniek (ramen, deuren, liften, water, stroom, gas, ventilatie, lekkages): volg de instructies op die zijn aangegeven op geplastificeerde kaarten die in het gebouw (ook in de practicumzaal) aan de muur hangen. Bel in ieder geval naar de receptionist (tst. 3500) die verdere actie in gang zal zetten.

**In het geval van ontruimingsalarm: verlaat direct het gebouw via de aangegeven vluchtroute's; volg de instructies van brandweer, bedrijfshulpverlening (BHV) of ontruimingsploeg; iedereen verzamelt zich op het pleintje bij de fietsenstalling en meldt zich daar.**

## **BIOLOGISCHE AGENTIA**

Voor het werken met proefdieren, pathogene organismen (micro-organisme, plant of dier) en voor het werken met genetisch gemodificeerde organismen (micro-organisme, plant of dier) gelden specifieke voorschriften, bedoeld om de labwerker te beschermen en om het milieu te beschermen. Voor experimenten met genetisch gemodificeerde organismen, waarvoor inperkingsvoorschriften van kracht zijn, vindt er een voorlichting plaats over "veilige microbiologische technieken" in het 2<sup>e</sup> jaar en verdere training gedurende onderzoeksstages.

## **CHEMICALIEN**

In een lab kunnen ongelukken gebeuren, die extra vervelend kunnen uitpakken omdat er brandbare, giftige, explosieve of etsende stoffen aanwezig zijn. Er moet daarom op een verantwoorde wijze met chemische stoffen worden omgegaan; dit geldt ook voor onverdachte stoffen zoals water of sucrose (zie onder).

Dit betekent allereerst dat de lab-werker tijdens het experiment netjes en zuinig werkt. Bewust gebruik van chemicaliën betekent ook dat de lab-werker vóór uitvoering van een experiment weet waarom juist déze chemicaliën worden gebruikt en welke handelingen moeten worden verricht voor het opruimen van gebruikte chemicaliën en het schoonmaken van gebruikt labmateriaal.

De eigenschappen van chemicaliën en de daarbij behorende risico's en veiligheidsmaatregelen staan op het etiket van voorraadpotten aangegeven met symbolen en R(risc)- & S(safety)-zinnen. Uitleg van deze zinnen en meer uitgebreide informatie is beschikbaar op een poster die in de practicumzaal hangt en in het bij de practicumzaal aanwezige Chemiekaartenboek (boek met gele kaft). Voor stoffen die niet in dit boek zijn vermeld, raadplege men het MSDS (material safety data sheet) dat elke leverancier bij de levering van een chemicalie moet meesturen of dat via de website van de leverancier of een database kan worden gedownload.

Let op dat de naamgeving van stoffen niet altijd even inzichtelijk is. Ter voorkoming van misverstanden heeft elke stof een vast "CAS"-nummer, dat te vinden is op etiketten en in documentatie, zoals catalogi, handboeken en MSDS.

In deze handleiding zijn uit het Chemiekaartenboek als voorbeeld de gegevens over zoutzuur op één van de volgende bladzijden afgedrukt.

Verder is een overzicht opgenomen van de gevarensymbolen en hun betekenis. De meeste stoffen die van een dergelijk symbool zijn voorzien leveren potentieel gevaar op bij opname via de mond, inademing of huidcontact. Voor sommige stoffen geldt een combinatie van deze gevareneigenschappen.

Oxiderende stoffen zijn vooral gevaarlijk in combinatie met andere materialen en chemicaliën.

Er bestaan lijsten waarin is te vinden welke chemicaliën zich niet met elkaar verdragen. Daarmee moet ook tijdens opslag rekening worden gehouden (zie Chemiekaartenboek). Een aantal stoffen is bijzonder reactief met water. Deze mogen daarom niet met water worden opgeruimd of geblust.

Ongevaarlijk is een relatief begrip. Een beetje water bij een sterk zuur of sterke base geeft een gevaarlijke warmteontwikkeling. Mengen voor gebruik of voor onschadelijk maken moet dus omgekeerd gebeuren: zuur bij overmaat water.

Op de vloer gelekte of gemorste vloeistof is een belangrijke oorzaak van lab-ongelukken (uitglijden). Ruim zulke vloeistof daarom zo mogelijk direct op en zet de plek af zo lang er nog niet is opgeruimd.

## **STRALINGSVEILIGHEID**

Het hanteren van radio-actieve stoffen (nvt. voor dit basispracticum) vergt specifiek inzicht en speciale voorzieningen. Daartoe volgt iedereen die tijdens een praktische stage met radioactiviteit te maken krijgt een meerdaagse cursus. Verdere training vindt plaats gedurende de onderzoeksstage.

## **AFVAL**

### **Bedrijfsafval (huishoudelijk en niet-gevaarlijk lab-afval)**

In de zitruimten, kantines en de bibliotheek staan afvalbakken met grijze plastic zakken. Hierin wordt huishoudelijk afval gedeponeerd. In laboratoriumruimten staan gele afvalbakken met plastic zakken (grijs, geel of transparant). Deze zijn bedoeld voor niet-gevaarlijk lab-afval. Ook wordt daarin gedeponeerd geautoclaveerd bacterieel afval en (niet van toepassing voor dit practicum) vast radio-actief materiaal dat is vervallen.

Bedrijfsafval wordt door de schoonmaakdienst afgevoerd naar rolcontainers. De inhoud hiervan wordt door een afvalverwerkingsbedrijf opgehaald voor verdere verwerking.

### **Scherp afval**

Scherp afval (pipetpunten, pasteurpipetten, naalden, microscoopglasjes, kapot glaswerk), mits niet biologisch besmet, wordt gedeponeerd in de daartoe bestemde witte emmer met opschrift "scherp afval". Zulke emmers staan op het hoge gedeelte van de labtafels. Dit materiaal mag niet worden verzameld in gewone afvalbakken om te voorkomen dat de mensen die het afval afvoeren verwondingen oplopen.

### **Biologisch afval**

Plastic petrischalen en wattenproppen worden weggedaan in speciale zakken (zie opschrift) aan het eind van de tafel; deze zakken zijn (alléén) bestemd voor biologisch afval en zijn bestand tegen autoclaveren (gewone vuilniszakken of pedaalemmerzakken zijn dat niet!).

Oude ophopingen en ander vloeibaar biologisch afval niet in de gootsteen schenken, maar binnen de zuurkast overbrengen in serumflessen die in een witte plastic bak staan. Als deze flessen vol zijn worden zij gesteriliseerd in een autoclaaf.

Stoffen die irritante dampen of gevaarlijke splisingsprodukten opleveren mogen niet worden gesteriliseerd in een autoclaaf. Vast en vloeibaar biologisch afval dat met dergelijke stoffen is besmet, moet op een andere wijze worden gesteriliseerd, bijv. door toevoeging van daarvoor geschikte chemicaliën.

Biologisch besmet scherp materiaal (pipetteertips, scalpels, injectienaalden) wordt verzameld in een geel plastic "naaldbeker", die hermetisch afgesloten kan worden en in een autoclaaf wordt gesteriliseerd.

### **Vast gevaarlijk (chemisch) afval**

Vaste chemicaliën die niet langer worden gebruikt of divers materiaal (glas, papier, plastic) dat is verontreinigd met chemicaliën, zoals fenol, acrylamide of ethidiumbromide, worden verzameld via zaalbeheerder of medewerker van de laboratoriumdienst en uiteindelijk afgevoerd naar een bedrijf waar het wordt verbrand.

### **Vloeibaar gevaarlijk (chemisch) afval**

Waterige oplossingen van niet-toxische zouten, suiker enz. worden niet beschouwd als chemisch afval en worden in de gootsteen geloosd. Vloeibaar chemisch afval wordt in speciale plastic vaatjes overgeschonken, die altijd in de zuurkast staan. Het vloeibaar chemisch afval wordt gescheiden in verschillende klassen die ieder op een andere manier worden verwerkt. De vaten voor de verschillende typen afval zijn herkenbaar aan een kleur codering: gekleurde band om vat of handvat, terwijl ze ook van passende etiketten zijn voorzien.

zwarte band: anorganische stoffen in oplossing, zoals (zware) metalen in oplossing, verdunde zuren of basen of fotografische ontwikkelaar, kleurstoffen in waterige oplossing

rode band: organische, halogeenvrije vloeistoffen, zoals ether, methanol en andere organische oplosmiddelen (brandbaar)

blauwe band: organische, halogeenbevattende vloeistoffen, chloroform, dichloormethaan en andere F-, Cl-, Br- of I-bevattende vloeistoffen

groene band: afval-oliën en vetten, zoals olie afkomstig uit een vacuümpomp.

### **Algemene aanwijzingen voor het hanteren van vloeibaar gevaarlijk afval:**

- vat vullen tot maximaal 5 cm onder de rand
- absoluut geen vaste stoffen in het vat deponeren
- vat na gebruik altijd afsluiten met de daarvoor bestemde schroefdop
- bij morsen het vat aan de buitenkant schoonvegen
- reactieve chemicaliën eerst onschadelijk maken: zie hiervoor het gele Chemiekaartenboek

### **INFORMATIE**

Zeer veel informatie op het gebied van veiligheid en milieu is beschikbaar op internet.

Faculteit W&N: arbo- en milieudienst(AMD): [www.amd.leidenuniv.nl](http://www.amd.leidenuniv.nl)

Universiteit Leiden: VGM: <http://www.vgm.leidenuniv.nl>

Buiten de universiteit: zoek via portal-sites, zoals:

<http://www.vgm.leidenuniv.nl> kies: "Links" en dan "Startpunt Interne Arbodienst"

<http://www.arbo.favos.nl> & <http://www.milieu.favos.nl>

Voor advies en beantwoording van concrete vragen:

Neem contact op met de facultaire arbo- en milieudienst: [amd@science.leidenuniv.nl](mailto:amd@science.leidenuniv.nl)

Tel.: (071-527)4333

Veel kan worden geleerd door analyse van ongelukken (die gelukkig weinig voorkomen) en van bijna-ongelukken (die veel vaker voorkomen). Wanneer zo'n gebeurtenis voorvalt, meld dit dan op een meldingsformulier, digitaal te vinden via:

[www.amd.leidenuniv.nl](http://www.amd.leidenuniv.nl)




CAS-nummer: [7647-01-0]  
**chloorwaterstofzuur**  
**waterstofchloride**

HCl

## ZOUTZUUR<sup>1)</sup>

(30% in water)

FYSISCHE EIGENSCHAPPEN		BELANGRIJKE GEGEVENS	
Kookpunt, °C (azeotroop)	108	<b>KLEURLOZE OPLOSSING IN WATER MET STEKENDE GEUR</b>	
Smeltpunt, °C	-50	De damp mengt zich goed met lucht. De oplossing in water is een sterk zuur en reageert heftig met basen en is corrosief. <sup>2)</sup> Tast vele metalen aan onder vorming van brandbaar gas ( <i>waterstof</i> , zie aldaar). Reageert heftig met oxidatiemiddelen onder vorming van giftige dampen (o.a. <i>chloor</i> , zie aldaar). Kan reageren met formaldehyde onder vorming van het zeer giftige <i>dichloordimethylether</i> (zie aldaar).	
Dampspanning in mbar bij 20°C	21		
Relatieve dampdichtheid (lucht = 1)	1,3		
Relatieve dichtheid bij 20°C van verzadigd damp/luchtmengsel (lucht = 1)	1,01		
Relatieve dichtheid (water = 1)	1,1	MAC-waarde <sup>3)</sup> 5 ppm 8 mg/m <sup>3</sup>	
Oplosbaarheid in water, g/100 ml	volledig	MAC TGG-15 min. 10 ppm 15 mg/m <sup>3</sup>	
Log P octanol/water (ber.)	0,3		
Brutoformule:	ClH		
Relatieve molecuulmassa	36,5		
		<b>Geurwaarneming:</b> Het is onbekend of bij geurwaarneming schadelijke effecten te verwachten zijn. <b>Acuut inademingsgevaar:</b> Een voor de gezondheid gevaarlijke concentratie in de lucht kan door verdamping van deze stof bij ca. 20°C zeer snel worden bereikt. <b>Wijze van opname:</b> De stof kan worden opgenomen in het lichaam door inademing van de damp en na inslikken. <b>Directe gevolgen:</b> De stof werkt bijtend op de ogen, de huid en de ademhalingsorganen. Inademing van damp en/of nevel kan longoedeem veroorzaken, echter uitsluitend na verschijnselen van bijtende effecten op de slijmvliezen van ogen en/of hogere luchtwegen. <sup>4)</sup> Blootstelling kan bij hoge concentraties de dood tot gevolg hebben. De uitwerking kan vertraagd intreden. <b>Gevolgen bij langdurige, herhaalde blootstelling:</b> Contact met de huid kan door beschadiging een eczeemachtige huidaandoening veroorzaken. <b>Gevolgen voor het milieu:</b> Deze stof is schadelijk voor het watermilieu.	
DIRECTE GEVAREN		PREVENTIE	BLUSSTOFFEN
<b>Brand:</b> niet brandbaar.			bij brand in directe omgeving: alle blusstoffen toegestaan.
SYMPTOMEN		PREVENTIE	EERSTE HULP
		VORMING VAN NEVEL VOORKOMEN! STRENGE HYGIENE!	IN ALLE GEVALLEN ARTS RAADPLEGEN!
<b>Inademen:</b> <i>bijtend</i> , keelpijn en hoesten, kortademigheid, ademnood, piepende ademhaling.		ruimtelijke afzuiging, plaatselijke afzuiging, adembescherming (combinatiefiltertype BE/P2).	frisse lucht, rust, halfzittende houding en direct spoedeisende medische hulp inzetten.
<b>Huid:</b> <i>bijtend</i> , roodheid en pijn, blaren, brandwonden.		handschoenen (butylrubber, PVC), gerichte beschermende kleding.	bij verbranding aan de huid vastgeplakte kleding NIET lostrekken, eerst spoelen met veel water, dan pas kleding uittrekken, daarna weer spoelen, arts raadplegen en direct spoedeisende medische hulp inzetten.
<b>Ogen:</b> <i>bijtend</i> , roodheid, slecht zien, ernstige brandwonden, tranenvloed.		zurbil, gelaatsscherm of oogbescherming in combinatie met adembescherming.	minimaal 15 minuten spoelen met water (evt. contactlenzen verwijderen), dan naar (oog)arts brengen, blijven spoelen tijdens vervoer.
<b>Inslikken:</b> <i>bijtend</i> , blaren op de lippen en in de mond, branderig gevoel, pijn in de mond, de keel, de slokdarm en de maag, misselijkheid, braken, diarree.			mond laten spoelen, GEEN braken opwekken en direct spoedeisende medische hulp inzetten.
NOODSITUATIE EN OPRUIMING		ETIKETTERING EN OPSLAG	
<b>NOODSITUATIE:</b> Acuut gezondheidsgevaar! Bij grotere hoeveelheden: gevaarzone ONMIDDELIJK ontruimen en (laten) afzetten. Deskundige waarschuwen!		<b>Afleveringsetiket:</b>	
<b>Opruimen gemorst product:</b> Draag chemicaliënpak-uitrusting en verse luchtkap/ademluchtmasker. Extra ventilatie. <b>Gemorst product</b> indammen, zorgvuldig opzuigen en eventueel hergebruiken. <b>Restant</b> verwijderen met water. <b>Spoelwater</b> afvoeren naar riool. Eventuele vaten etiketteren en afvoeren volgens regionale regels.		 Bijtend	
		R: 34-37 S: (1/2)-26-45 Nota B	
		<b>Opslag:</b> Gescheiden van oxidatiemiddelen en sterke basen, ventilatie langs de vloer.	
<b>Interventiewaarden:</b> niet vastgesteld			
OPMERKINGEN			
<sup>1)</sup> Voor zuiver <i>chloorwaterstof</i> , zie aldaar. <sup>2)</sup> Bij oplossen of verdunnen ALTIJD zuur bij water voegen, NOOIT andersom. <sup>3)</sup> In Duitsland wordt een MAK-waarde van 2 ppm en een STEL van 4 ppm geadviseerd. <sup>4)</sup> De verschijnselen van longoedeem openbaren zich veelal pas na enkele uren en worden versterkt door lichamelijke inspanning; rust en opname in een ziekenhuis is noodzakelijk. Bij vergiftiging door deze stof is specifieke eerste hulp noodzakelijk; laat arts zo nodig het NVIC (030-274 88 88) of het Belgisch Antigifcentrum (070-245.245) bellen voor aanwijzingen over verdere behandeling. Gebruik stevige houder bij intern transport van glazen flessen.			
TREM-stofkaart: 80S1789; TREM-groepskaart: 80GC1-II+III; ERIC-kaart: 8-03		GEVI: 80; UN-nummer: 1789	

1362

Kaartnummer C-1329

Chemiekaarten® 21<sup>e</sup> editie 2006

## Gevaarsymbolen en –aanduidingen van gevaarlijke stoffen en preparaten



**E :**  
Ontploffbaar



**O :**  
Oxiderend



**F+ :**  
Zeer licht  
ontvlambaar



**F :**  
Licht  
ontvlambaar



**T+ :**  
Zeer  
vergiftig



**T :**  
Vergiftig



**C :**  
Bijtend



**X<sub>n</sub> :**  
Schadelijk



**X<sub>i</sub> :**  
Irriterend



**N :**  
Gevaarlijk voor  
het milieu

## Definities

"Gevaarlijk" in de zin van de EEG-richtlijn zijn de volgende stoffen en preparaten:

**Ontploffbare:** stoffen en preparaten in vaste, vloeibare, pasta- of gelatineachtige toestand, die ook zonder de inwerking van zuurstof in de lucht exotherm kunnen reageren, hierbij snel gassen ontwikkelen en onder bepaalde (proef)voorwaarden detoneren, snel explosief verbranden of door verhitting bij gedeeltelijke afsluiting ontploffen.

**Oxiderende:** stoffen en preparaten die bij aanraking met andere stoffen, met name ontvlambare stoffen, sterk exotherm reageren.

**Zeer licht ontvlambare:** stoffen en preparaten in vloeibare toestand met een uiterst laag vlampunt en een laag kookpunt, alsmede gasvormige stoffen en preparaten die bij normale temperatuur en druk aan de lucht blootgesteld kunnen ontbranden.

**Licht ontvlambare:** stoffen en preparaten die

- bij normale temperatuur aan de lucht blootgesteld, zonder toevoer van energie, in temperatuur kunnen stijgen en ten slotte kunnen ontbranden of
- vaste stoffen en preparaten die na kortstondige inwerking van een ontstekingsbron gemakkelijk kunnen ontbranden en na verwijdering van de ontstekingsbron blijven branden of gloeien of
- vloeibare stoffen en preparaten met een zeer laag vlampunt of
- stoffen en preparaten die bij aanraking met water of vochtige lucht een gevaarlijke hoeveelheid van zeer licht ontvlambare gasen ontwikkelen.

**Ontvlambare:** vloeibare stoffen en preparaten met een laag vlampunt.

**Zeer vergiftige:** stoffen en preparaten waarvan reeds een zeer geringe hoeveelheid bij inademing of opneming via de mond of via de huid acute of chronische aandoeningen en zelfs de dood kan veroorzaken.

**Vergiftige:** stoffen en preparaten waarvan reeds een geringe hoeveelheid bij inademing of opneming via de mond of via de huid acute of chronische aandoeningen en zelfs de dood kan veroorzaken.

**Schadelijke:** stoffen en preparaten die bij inademing of opneming via de mond of via de huid acute of chronische gevaren en zelfs de dood kunnen veroorzaken.

**Bijtende:** stoffen en preparaten die bij aanraking met levende weefsels daarop een vernietigende werking kunnen uitoefenen.

**Irriterende:** niet-bijtende stoffen en preparaten die bij directe, langdurige of herhaalde aanraking met de huid of de slijmvliezen een ontsteking kunnen veroorzaken.

**Sensibiliserende:** stoffen en preparaten die bij inademing of bij opneming via de huid aanleiding kunnen geven tot een zodanige reactie van hypersensibilisatie dat latere blootstelling aan de stof of het preparaat karakteristieke nadelige effecten veroorzaakt.

**Kankerverwekkende:** stoffen en preparaten die bij inademing of bij opneming via de mond of via de huid kanker kunnen veroorzaken of de frequentie daarvan doen toenemen.

**Mutagene:** stoffen en preparaten die bij inademing of bij opneming via de mond of via de huid erfelijke genetische afwijkingen kunnen veroorzaken of de frequentie daarvan doen toenemen.

**Voor de voortplanting vergiftige:** stoffen of preparaten die bij inademing of bij opneming via de mond of via de huid niet-erfelijke afwijkingen bij het nageslacht en/of aantasting van de mannelijke of vrouwelijke voortplantingsfuncties of -vermogens veroorzaken, dan wel de frequentie daarvan doen toenemen.

**Milieugevaarlijke:** stoffen en preparaten die, wanneer zij in het milieu terechtkomen, onmiddellijk of na verloop van tijd gevaar voor een of meer milieucompartimenten opleveren of kunnen opleveren

## Bijhouden laboratoriumjournaal voor eerstejaarsstudenten biologie:

- **Titel, namen, en datum**  
Schrijf de titel van het experiment op en vermeld de naam/namen van medestudent(en) met wie je hebt samengewerkt en de datum (dag, maand en jaartal) waarop het experiment wordt uitgevoerd. Nummer de blz! Zorg voor een index zodat de assistent snel het na te kijken experiment kan vinden.
  - **Inleiding**
    - a. Formuleer **het doel** van het experiment in één zin.
    - b. Geef de verwachte resultaten kort aan.
    - c. Beschrijf beknopt de theoretische achtergrond en/of de benodigde formules.
  - **Materiaal en Methode**  
Geef kort weer welke apparatuur en uitgangsmateriaal gebruikt is.
    - a. Apparatuur: soort en *type* bv. Micropipet P200 *Gilson* of *Eppendorf*
    - b. Uitgangsmateriaal: geef de herkomst en de voor het experiment relevante bestanddelen aan (bv. type voedingsbodem en concentratie antibioticum waarop geselecteerd wordt).
    - c. Vermeld volgens welk protocol gewerkt is (bv. Practicumhandleiding, blz..).  
**Vermeld alle afwijkingen van het protocol. Is er géén protocol dan maak je deze zelf!** Gebruik hiervoor telegramstijl (de tekst uit de handleiding **niet** exact te herhalen).
  - **Waarnemingen**  
Noteer alle waarnemingen van de verkregen gegevens overzichtelijk. Van te voren gemaakte tabellen zijn hiervoor handig.
  - **Berekeningen**  
Geef de methode die gebruikt wordt om berekeningen uit te voeren. Verwerk de resultaten in overzichtelijke figuren (bv. in grafieken en tabellen).
  - **Conclusie en discussie**  
Analyseer de resultaten uitgaande van het doel van het experiment en de geformuleerde verwachtingen (zie Inleiding).
1. Schrijf niet met potlood.
  2. Schrijf duidelijk en leesbaar. Niet eerst in het klad, maar direct in het journaal.
  3. Haal verschrijvingen en vergissingen met een dun streepje door, zodat de oorspronkelijke tekst toch leesbaar blijft. Ook foutieve handelingen, berekeningen en conclusies niet weglakken of overplakken.
  4. Vermeld alle experimenten in een index aan het begin van het labjournaal.

### De volgende aandachtspunten gelden alleen in het propedeusejaar!

- Begin elk experiment op een nieuwe bladzijde. Beschrijf alleen de rechterbladzijde. De linkerbladzijde wordt gebruikt om vragen uit de handleiding te beantwoorden.
- Laat tussen een nog niet beëindigd experiment en een volgend experiment voldoende bladzijden over om het vervolg te noteren, zodat de experimenten niet door elkaar staan. Dit is een tijdsbesparing voor de assistent die je labjournaal nakijkt!

# OPLOSSINGEN EN VERDUNNINGEN / PIPETTEN EN BALANSEN

## VOORBEREIDING

- Lees onderstaande inleiding door.
- **Blackboard: programma BioQ: molariteit + verdunningen.**
- **Blackboard: powerpoint oplossingen en verdunningen etc.**
- **Opdrachten 1 t/m 10 uit de handleiding. Inleveren bij aanvang.**

Een oplossing is een homogene vloeistof die wordt gevormd door de toevoeging van chemicaliën aan een oplosmiddel. Dit laatste is in biologische systemen meestal water, immers, de inhoud van levende cellen is een waterige oplossing. Leven wordt onder meer gekenmerkt door complexe en wisselende chemische interacties. Voor het mogelijk maken van bio-reacties onder laboratoriumomstandigheden worden bij proeven met biologisch materiaal dan ook allerlei chemicaliën en dus ook oplossingen hiervan gebruikt. Voor het succesvol verlopen van dit soort proeven is het van groot belang dat de benodigde chemicaliën en oplosmiddelen nauwkeurig worden afgemeten. Bio-reacties verlopen doorgaans optimaal binnen nauwe grenzen en kleine afwijkingen van de proefomstandigheden kunnen grote en meestal ongewenste gevolgen hebben voor de resultaten.

De **concentratie** van stoffen in oplossing wordt uitgedrukt in **molariteit** (mol/l of M). 1 M van een stof wil zeggen dat het aantal gram van die stof in één liter oplossing even groot is als de getalwaarde van de atoommassa of de molecuulmassa van die stof. Om de molariteit van een oplossing te kunnen bepalen moeten we de atoommassa of het molecuulgewicht van de opgeloste stof kennen. Bijv. het molecuulgewicht van keukenzout, NaCl, is 58.44. Een 1 M oplossing bevat 58,44 gram per liter. De concentratie van deze NaCl-oplossing is 1 M.

Een concentratie van een stof in een oplossing kan ook in gewichtsprocenten per volume (% w/v) worden uitgedrukt. Zo is een 5,0% sucrose-oplossing een oplossing van 5,0 gram sucrose in 100 ml vloeistof. Het voordeel van dit systeem is dat er nauwelijks behoeft te worden gerekend. Het is echter voor lang niet alle doeleinden toepasbaar.

We hebben in bovenstaande alinea de uitdrukking “w/v” gebruikt. “w” staat voor gewicht en “v” voor volume. Je kunt ook tegenkomen “w/w” en “v/v”. Bijv. op het etiket van een fles glycerol kun je tegenkomen: 87% glycerol v/v, dat betekent dat deze glycerol-oplossing per liter 870 ml glycerol bevat en 130 ml water.

87% w/w zou in het geval van glycerol betekenen dat 1 kg oplossing 870 gram glycerol bevat en 130 gram water. Om te weten wat het volume van 1 kg van deze oplossing is moet je de dichtheid van glycerol en van water weten.

Uit bovenstaande voorbeelden blijkt hoe belangrijk het is om te weten of je moet rekenen met w/v, w/w of v/v.

Wat is nu de beste manier om te berekenen hoeveel gram stof je nodig hebt voor een oplossing van een bepaalde molariteit, van een gewenst volume?

**Rekenvoorbeeld:** Je hebt nodig 250 ml 0,10 M NaCl.

- Zoek eerst het molecuulgewicht (MW) op van NaCl. Dat kan je vinden op het etiket van de pot. Ook is het te vinden in chemische handboeken of uit te rekenen door de atoomgewichten van de samenstellende delen op te tellen (atoomgewicht van Na = 22.99 en van Cl = 35.45. Samen is dat 58.44).
- Geef zowel de molariteit als het volume in gelijkwaardige eenheden weer.  
Voorbeeld: 0,10 **M** per 0,25 **liter** of 100 **mM** per 250 **ml**.
- De af te wegen hoeveelheid NaCl is nu:  
 $\text{MW} \times \text{volume} \times \text{molariteit} = 58,44 \times 0,25 \times 0,10 = 1,46 \text{ g NaCl}$ .

In een laboratorium wordt vaak met zogenaamde **stockoplossingen** gewerkt. Als je een bepaalde oplossing regelmatig nodig hebt, maar in verschillende concentraties, kan het handig zijn om een stockoplossing te maken van de hoogste concentratie of van een hogere en gemakkelijk uit te rekenen concentratie. Vanuit deze stockoplossing kunnen dan d.m.v. verdunningen de gewenste concentraties worden gemaakt.

Voor NaCl-oplossingen met bv. concentraties 0,10 M, 0,30 M en 0,65 M, is het handig om één stockoplossing te maken van bv. 1,0 M en van hieruit de gewenste concentraties te maken.

**Rekenvoorbeeld:** 1 liter 0,65 M NaCl maak je door 650 ml af te meten van de 1,0 M stockoplossing en dit aan te vullen met water tot 1 liter.

Een ander type verdunningen zijn de **verdunningsreeksen** (zie BioQ). Deze kunnen nodig zijn om snel en nauwkeurig van een hoge tot een lage concentratie te komen. Er zijn verschillende typen verdunningsreeksen. Voorbeelden zijn lineaire, logaritmische en harmonische verdunningsreeksen. Stel je voor dat je 1 ml NaCl nodig hebt met een concentratie van 1,0 mM. Er is een stockoplossing van 1.0 M aanwezig. Het is erg onnauwkeurig om 1,0 µl van de stockoplossing te pipetteren in 1,0 ml. Het is veel nauwkeuriger om eerst 100 µl stockoplossing toe te voegen aan 900 µl water, je hebt dan een oplossing van 100 mM. Vervolgens kun je dit herhalen door 100 µl van de oplossing 100 mM toe te voegen aan 900 µl water. De concentratie is dan 10 mM NaCl en dit dan nogmaals doen. Of je kunt 10 µl van de eerste verdunning toevoegen aan 990 µl water, afhankelijk van de gewenste nauwkeurigheid.

Voor het calibreren (ijken) van analytische instrumenten, voor immuno-essays, in de microbiologie en voor tal van andere toepassingen, kan het nodig zijn om reeksen te maken van verdunningen die steeds de halve concentratie hebben t.o.v. de vorige verdunning, bijv. 1,0 M / 0,50 M / 0,25 M / 0,125 M etc. Of 1/10 concentratie, zgn. logaritmische reeksen: 1,0 M / 0,10 M / 0,010 M / 0,0010 M etc.

De gewenste nauwkeurigheid bepaalt in hoeveel stappen je tot de volgende verdunning komt. Hierbij moet je ook rekening houden met de foutenmarge van de maatcilinder of pipet die je hierbij gebruikt. Denk hier daarom altijd goed bij na!

Een formule die bij het berekenen van verdunningen kan worden gehanteerd is de volgende:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

C1 = concentratie vóór verdunning.      V1 = volume vóór verdunning.

C2 = concentratie na verdunning.      V2 = volume na verdunning.

**Rekenvoorbeeld:** Er is een stockoplossing van 2,5 M NaCl. Je hebt 100 ml 0,50 M NaCl-oplossing nodig. Hoeveel van de stockoplossing hebben we nodig?

Je past de formule toe:  $2,5 \text{ M} \times \text{onbekend volume} = 0,50 \times 100 \text{ ml}$ .

Dus: onbekend volume =  $0,50/2,5 \times 100 \text{ ml} = 20 \text{ ml}$ . Je neemt 20 ml stockoplossing en vult dit aan met water tot een eindvolume van 100 ml.

Bij het maken van oplossingen en verdunningen gebruik je balansen (de bovenweger voor grammen, de fijnbalans voor milligrammen) en nauwkeurige volumetrische instrumenten zoals de micropipet (voor volumes van 0,001 tot 1,0 ml), de pipet (1,0 tot 25 ml) en de maatcilinder (25 tot 2000 ml). Het volumetrische instrument dat je gebruikt moet een maximaal bereik hebben dat in de buurt ligt van het af te meten volume, anders wordt de gemaakte fout erg groot. Overigens is tien keer 10 ml afmeten met een 10 ml pipet absoluut niet nauwkeuriger dan één keer 100 ml afmeten in een 100 ml maatcilinder.

Voor het afmeten van een hoeveelheid van een vaste stof gebruikt men de eigenschap dat een zekere hoeveelheid materie een bepaalde massa heeft. De eenheid van massa is de kilogram (kg). Een hoeveelheid van een vloeistof wordt weergegeven door een bepaald volume. De eenheid van volume is de liter (l). De relatie tussen beide eenheden is als volgt: bij een temperatuur van 4°C komt de massa van 1 kg zuiver water overeen met een volume van 1 l.

De massa van een hoeveelheid stof wordt gemeten met een balans. Afhankelijk van de vereiste nauwkeurigheid wordt een bovenweger of fijnbalans (schaalverdeling in 0,10 g resp. 0,10 mg) gebruikt. Alle balansen berusten op hetzelfde werkingsprincipe: het vergelijken van het gewicht van de onbekende massa met een nauwkeurig bekende referentiekracht.

Volumina worden afgemeten met behulp van speciaal geconstrueerde apparatuur van glas of plastic, zoals een maatcilinder, een pipet of een pipetteerspuit. Dit noemen we **volumetrische** instrumenten.

Volumetrische instrumenten van een bepaald volume zijn door de fabrikant met zuiver water geijkt bij een afgesproken normaaltemperatuur van 20°C. De fabrikant markeert zijn instrument met: 'In' = geijkt op **bevatten** of: 'Ex' = geijkt op **leveren** van het vermelde volume. Bijvoorbeeld:

- 50 ml In/20° betekent dat het instrument bij 20°C een volume bevat dat gelijk is aan het volume van 50 gram zuiver water bij 4°C.
- 50 ml Ex/20° betekent dat het instrument bij 20°C een volume aflevert dat gelijk is aan het volume van 50 gram zuiver water van 4°C.

Als de temperatuur waarbij volumetrische instrumenten worden gebruikt meer dan 5% afwijkt van de normaaltemperatuur, vertoont het werkelijke volume significante afwijkingen van het vermelde volume. De uitzettingscoëfficiënt van water (circa 0,025 % per graad) is de belangrijkste oorzaak. De invloed van de uitzettingscoëfficiënt van het apparaat is gering. Volumetrische apparatuur mag echter nooit te sterk worden verwarmd of gekoeld.

### **GEBRUIK VAN EEN 10 ml PIPET**

De pipet wordt bediend met behulp van een pipetteerballon. De in- en uitlaatventielen hiervan bevatten een plastic kogel die in het rubber is ingebed. Bij druk op het omringende rubber gaat het ventiel open. Duw een pipet niet te ver in de daartoe bestemde opening, want dan wordt de kogel uit het ventiel gedrukt en is de ballon onherstelbaar beschadigd. Zorg ook dat er geen vloeistof in de ballon terecht komt, dat verkort de levensduur aanzienlijk. Indien dat wel gebeurt, spoel dan de ballon uit

met demiwater, knijp hem zo goed mogelijk leeg en leg hem te drogen in de 60°C-stoof. **De werking ervan zal worden gedemonstreerd door een assistent de eerste keer dat je hem bij een proef nodig hebt.**

### **GEBRUIK VAN EEN MICROPIPET (PIPETMAN): P20, P200, P1000**

Het pipetteermechanisme van de Gilson Pipetman bestaat uit een zuiger van roestvrij staal, een teflon afdichtingsring en een neopreen O-ring. De pipet is voorzien van een metalen pipetpuntafwerper, waarmee door een druk op de bijbehorende knop de gebruikte pipetpunten te verwijderen zijn. Volumebereik van P20-P200-P1000 is 1 tot 1000,0  $\mu\text{l}$  waarbinnen op elke gewenste waarde mag worden ingesteld. Instellen buiten het volumebereik kan blijvende schade veroorzaken. Het volume wordt ingesteld door met de zwarte ringen de digitale volumeter op de gewenste waarde te draaien. Draai altijd iets voorbij de gewenste instelling. Draai daarna terug tot deze instelling. Aflezing volumeter-instelling: van boven naar beneden in  $\mu\text{l}$ .

**De werking wordt gedemonstreerd in de powerpointpresentatie (Blackboard) en bij elke proef waar deze pipet gebruikt wordt krijg je uitleg van de assistent.**

### **PRACTICUMOPDRACHTEN (thuis maken, inleveren in zichtmap)**

**Opdracht 1** (Gebruik **geen** machten van 10, schrijf opdracht en getal helemaal uit)

- |                            |                  |                            |                   |                         |     |
|----------------------------|------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|-----|
| a. 5,3 ml =                | l.               | g. 0,391 m <sup>3</sup> =  | dm <sup>3</sup> . | m. 0,455 g =            | mg. |
| b. 25 l =                  | m <sup>3</sup> . | h. 0,751 dm <sup>3</sup> = | cm <sup>3</sup> . | n. 120,5 mg =           | g.  |
| c. 0,0033 m <sup>3</sup> = | ml.              | i. 15 cm <sup>3</sup> =    | ml.               | o. 0,235 kg =           | g.  |
| d. 0,44 ml =               | $\mu\text{l}$ .  | j. 0,024 dm <sup>3</sup> = | l.                | p. 0,0880 kg =          | mg. |
| e. 0,16 $\mu\text{l}$ =    | ml.              | k. 4,3 cm <sup>3</sup> =   | l.                | q. 554,3 mg =           | kg. |
| f. 2,88 l =                | ml.              | l. 661 ml =                | m <sup>3</sup> .  | r. 3320 $\mu\text{g}$ = | mg. |

#### **Opdracht 2**

- We mengen 700 g water, 400 g ethanol en 200 g suiker. Wat zijn de gewichtspercentages aan water, ethanol en suiker in dit mengsel?
- Een zout bevat kristalwater. Bij verwarmen blijkt 35 g zout 5 g water te verliezen. Bereken het gewichtspercentage kristalwater in het onverwarmde zout.

#### **Opdracht 3**

Reken uit hoeveel  $\text{MgCl}_2$  je moet afwegen om 300 ml te maken van een 0,20 M  $\text{MgCl}_2$ -oplossing (molecuul gewicht=MW  $\text{MgCl}_2 = 59,21$ ).

#### **Opdracht 4**

Je weegt 500 mg NaCl af en lost dit op in 500 ml water. Hieruit neem je 25 ml en je verdunt dit tot 250 ml. Hoeveel mg NaCl totaal zit in deze laatste verdunning?

#### **Opdracht 5**

Je voegt 30,3 g  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bij 70 g water. Dit blijkt 82,0 ml oplossing te geven. Hoeveel gram  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bevat deze oplossing per ml?

#### **Opdracht 6**

Bereken de concentraties in mol/l van elk van de volgende oplossingen:

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| a. 5,00 mol NaCl in 5,00 l.                  | d. 30 mol suiker in 10 l.      |
| b. 2,50 mol $\text{NH}_4\text{Cl}$ in 500 ml | e. 0,23 mol glycol in 3000 ml. |
| c. 200 mmol KBr in 100 ml                    |                                |



**Opdracht 7**

Een stockoplossing van ureum bevat 50 mmol/l. Een stockoplossing van glucose bevat 2,5 mmol/l.

- tot welk volume moet 3,00 ml ureumoplossing met de glucose-oplossing worden verdund om een ureumconcentratie van 2,00 mmol/l te krijgen?
- Hoe groot is de concentratie glucose in deze laatste oplossing?

**Opdracht 8**

In de zuurkast staat een fles met 81% (v/v) van een vloeistof. Het etiket vermeldt dat 1 liter van deze vloeistof 1,305 kg weegt. Het MW (molgewicht) van deze vloeistof is 89,9. Wat is de concentratie in mol van deze vloeistof?

**Opdracht 9**

In de zuurkast staat een fles met 81% (w/w) van een vloeistof. Het etiket vermeldt dat 1 liter van deze vloeistof 1,305 kg weegt. Het MW (molgewicht) van deze vloeistof is 89,9. Wat is de concentratie in mol van deze vloeistof?

**Opdracht 10**

In de zuurkast staat een fles met 81% (w/v) van een vloeistof. Het etiket vermeldt dat 1 liter van deze vloeistof 1,305 kg weegt. Het MW (molgewicht) van deze vloeistof is 89,9. Wat is de concentratie in mol van deze vloeistof?

**PRACTICUMOPDRACHTEN****Experiment 1: gebruik van een 10 ml pipet (individueel uitvoeren)**

Nodig: - 10 ml pipet

- pipetteerballon
  - balans met nauwkeurigheid van 0,1 g (= bovenweger)
  - 100 ml erlenmeyer
  - fles met demiwater
- Zet een erlenmeyer op de bovenweger en stel deze op nul ("Tare" linkerknop).
  - Zuig de pipet vol met demiwater tot even boven de 10 ml merkstreep.
  - Houd de pipet verticaal met de merkstreep ter hoogte van het oog en de punt tegen de wand van de demiwaterfles. De wand moet hierbij een hoek van  $45^\circ$  maken met de punt van de pipet.
  - Stel de onderkant van de meniscus in de pipet in op de bovenrand van de merkstreep van 10,0 ml.
  - Verwijder de punt van de pipet van de wand van de demiwater-fles zonder afstrijken.
  - Breng de erlenmeyer naar de pipet (en niet andersom), houd de pipet verticaal, plaats de punt onder een hoek van  $45^\circ$  tegen de erlenmeyerwand en laat de pipet vrijelijk leeglopen. Wacht nog circa 5 seconden nadat de meniscus de punt van de pipet bereikt heeft en neem dan de pipet weg zonder afstrijken (niet uitblazen). Zorg dat de erlenmeyer op een droge plek staat.
  - Weeg het water in de erlenmeyer (totaal gewicht G1 g).
  - Stel de bovenweger met erlenmeyer en inhoud weer op nul en herhaal deze procedure in totaal vier maal met **dezelfde** pipet (gewichten G2, G3, G4 en G5). Steeds in dezelfde erlenmeyer pipetteren. Zet de weegschaal na elke weging weer op 0.
  - Vergelijk de gevonden waarden met die van je practicumpartner.

**De vuile pipetten worden na gebruik meteen in de koker voor vuile pipetten gezet. Zo voorkom je contaminatie.**

**Opmerking:** als je meteen ziet dat er iets is fout gegaan bij het pipetteren of wegen, tel deze meting dan niet mee, maar begin opnieuw op de juiste manier.

Verzamel de verkregen meetwaarden in de tabel “Uitwerking pipetten en balansen” (waarbij geldt dat  $1,0 \text{ g} = 1,0 \text{ ml}$ ). **Laat de waarden door een assistent beoordelen.** Bij grote afwijkingen krijg je persoonlijke pipetteerinstructies. **Bewaar de tabel voor het werkcollege Statistiek.**

### **Experiment 2: gebruik van een 200 $\mu\text{l}$ micropipet (individueel uitvoeren)**

Nodig: - Gilson Pipetman P200 plus bijbehorende plastic pipetpunten

#### **LET OP: P200 gebruiken vanaf 20 tot 200 $\mu\text{l}$**

- balans met nauwkeurigheid van 0,10 mg ( $1,0 \mu\text{l} = 1,0 \text{ mg}$ )
  - epje
  - fles met demiwater
  - geel afval Emmertje voor gebruikte pipetpunten en epjes
- a. Leg een epje op de schaal van een fijnweger en stel deze in op nul (T, rode balk). Let erop dat de deurtjes van de fijnweger dicht zijn bij het instellen en aflezen.
  - b. Stel de pipetman P200 in op 200  $\mu\text{l}$ .
  - c. Schuif met een draaiende beweging de pipetpunt op de pipet.
  - d. Druk de pipetteerknop in tot de eerste stop.
  - e. Houd de pipetman verticaal, terwijl je de punt enkele millimeters in de te pipetteren vloeistof laat zakken.
  - f. Laat nu de pipetteerknop langzaam omhoog komen.
  - g. Wacht een seconde, haal daarna de pipetpunt uit de vloeistof en verwijder eventuele vloeistof aan de buitenkant van de pipetpunt door voorzichtig afstrijken langs de rand van de waterfles. Voer een snelle visuele controle uit: is het gepipetteerde volume min of meer juist ? (dit vereist enige pipetteerervaring).
  - h. Plaats de pipetpunt verticaal onder een hoek van  $45^\circ$  tegen de wand van het epje waarin de inhoud dient te worden gespoten.
  - i. Druk de pipetteerknop nu langzaam in tot de eerste stop en druk daarna de knop nog verder in tot de tweede stop om alle achtergebleven vloeistof er uit te stuwten.
  - j. Houd de knop ingedrukt en haal de pipetpunt langs de wand van het epje omhoog.
  - k. Laat nu de pipetteerknop los.
  - l. Weeg het epje met inhoud (totaal gewicht  $G_1$  g).
  - m. Stel de fijnweger met het epje weer op nul en herhaal deze handelingen in totaal vier maal met telkens een verse pipetpunt (gewichten  $G_2$ ,  $G_3$ ,  $G_4$  en  $G_5$ ). Steeds in hetzelfde epje pipetteren!
  - n. Vergelijk de gevonden waarden met die van je practicumpartner.
  - o. Als je klaar bent on/off indrukken om de weegschaal op stand-by te zetten.

**De gebruikte pipetpuntjes en epjes deponeer je direct na gebruik in het gele afval Emmertje. Zo voorkom je contaminatie.**

**Opmerking:** als je meteen ziet dat er iets is fout gegaan bij het pipetteren of wegen, tel deze meting dan niet mee en doe de meting op de juiste manier over.

Verzamel de verkregen meetwaarden van experiment 1 en 2 in de tabel “Uitwerking pipetten en balansen” (waarbij geldt dat  $1,0 \text{ mg} = 1,0 \mu\text{l}$ ). **Laat deze waarden door je assistent beoordelen.** De Gison pipetten zijn getest en geijkt op 1% nauwkeurig. Bij grote afwijkingen krijg je persoonlijke pipetteerinstructies.

### Practicumopdracht 1 en 2: (per paar, 15 min.)

Bij **experiment 1 en 2** heb je de waarden die je zelf vond vergeleken met die van je practicumpartner.

- Bereken de verschillen tussen de hoogste en de laagste waarde in %.
- Vergelijk deze waarden met die van je practicumpartner.
- Welke meetwaarde zou je niet mee willen tellen? Geef aan waarom.
- Geef aan wat de belangrijkste foutenbronnen zouden kunnen zijn.

### UITWERKING PIPETTEN EN BALANSEN

#### 10 ml pipet: Noteer je waarneming op het formulier

Naam: student 1				Naam: student 2			
gewicht (g)		volume (ml)		gewicht (g)		volume (ml)	
G1		1		G1		1	
G2		2		G2		2	
G3		3		G3		3	
G4		4		G4		4	
G5		5		G5		5	

#### P200 micropipet: Noteer je waarneming op het formulier

Naam: student 1				Naam: student 2			
gewicht (mg)		Volume ( $\mu\text{l}$ )		gewicht (mg)		volume ( $\mu\text{l}$ )	
G1		1		G1		1	
G2		2		G2		2	
G3		3		G3		3	
G4		4		G4		4	
G5		5		G5		5	

**Experiment 3: stockoplossing maken (per paar, 20 min.)**

Weeg ongeveer 0,093 g kaliumdichromaat ( $K_2Cr_2O_7$ ) af en bepaal het gewicht exact. Breng de afgewogen hoeveelheid over in een infuusflesje van 100 ml.

Om het goed op te kunnen lossen pipetteer je er voorzichtig 10 ml 0,05 M zwavelzuur bij (bijtend). Vervolgens voeg je onder voortdurend zwenken 90 ml demi-water (afmeten in een maatcilinder) toe. Nu heb je de stockoplossing.

**Practicumopdracht 3:** Bereken de exacte concentratie van de kaliumdichromaat stockoplossing (het molecuulgewicht is 294,2) in mol/l oftewel M.

**Experiment 4: verdunningsreeks maken (per paar, 30 min.)**

Maak in reageerbuizen een reeks van 5 verdunningen met water van de stockoplossing van opdracht 3. Het eindvolume van elke verdunning moet steeds max. 5 ml zijn. Verzin deze serie zelf, maar zorg dat de opeenvolgende verdunningen een logisch verband met elkaar hebben. Schrijf precies op hoe je elk van deze verdunningen maakt.

**Practicumopdracht 4:** Bereken de concentraties in molariteit van deze verdunningen en geef an welke type verdunningsreeks je hebt gemaakt.

**Practicumopdracht 5: (per paar, 5 min. )**

Bereken de verdunningsfactor van elk van deze oplossingen:

- uit 500 ml suikeroplossing wordt 5 ml gepipetteerd en aangevuld tot 100 ml
- 9,95 ml water wordt gemengd met 0,050 ml NaCl-oplossing
- 50 ml NaCl-oplossing wordt gemengd met 450 ml water
- 2,00 ml water wordt gemengd met 25  $\mu$ l KCl-oplossing.

**Experiment klaar?** Giet de kaliumdichromaat-oplossingen in het afvalvat met de zwarte band (zuurkast). Spoel het glaswerk om met water en leg het in de daartoe bestemde witte bakken (zie opschrift). Heb je op het glaswerk geschreven met viltstift, verwijder dit dan met een tissue bevochtigd met alcohol (spuitfles).

# pH EN BUFFERS

## VOORBEREIDING

1. Bestudeer H. 3.3 uit Campbell en je college-aantekeningen.
2. pH en buffers inleiding in deze handleiding.
3. Blackboard: Programma BioQ tekst + pH-oefensommen.  
Powerpoint waarin 4 pH opdrachten staan.  
Lever de opdrachten in aan het begin van het practicum.

## Wat is pH?

pH is een uitdrukking voor de zuurgraad van waterige oplossingen. Veel biologische processen spelen zich af in een neutraal waterig milieu. Bij het bestuderen van biologische processen in de “reageerbuis” is het van belang om de natuurlijke omstandigheden zo goed mogelijk na te bootsen. Cruciaal is dan de juiste pH. De meest natuurlijke omgevingen hebben een min of meer neutraal karakter wat neerkomt op een pH 5 – 9.

## Wat betekent pH?

Een pH geeft de zuurgraad van een oplossing aan. Bij een  $pH < 7$  spreken we over een zure oplossing,  $pH > 7$  noemen we een basische oplossing en bij  $pH = 7$  is de oplossing neutraal. Deze pH waarde wordt bepaald door de effectieve  $H_3O^+$  concentratie in een oplossing.  $H_3O^+$  wordt gevormd als water een proton ( $H^+$ ) opneemt. Als dit gebeurt gedraagt water zich als een base (proton acceptor). De stof die een proton afstaat noemen we een zuur (proton donor). Deze reactie verloopt dan als volgt:

$$HA + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + A^-$$

Hierbij is gedefinieerd dat:  $pH = -\log a_{H_3O^+}$

De effectieve concentratie, ( $a$  = activiteit) van een ion is mede afhankelijk van de concentratie aan andere ionen in de oplossing. Dit komt doordat water ook (in verschillende mate) interacties aangaat met de andere ionen. De effectieve concentratie wordt dan als volgt bepaald:  $a = \gamma \cdot M$ . In deze formule staat  $\gamma$  voor de activiteitscoëfficiënt en  $M$  voor de molariteit. Echter, in verdunde waterige oplossingen benadert  $\gamma \sim 1$  ( $\gamma$  van zuiver  $H_2O = 1$ ). Hierdoor mogen we, om praktische redenen, uitgaan van de concentratie ( $M$ ). De bovenstaande formule wordt dan als volgt:

$$pH = -\log [H_3O^+]$$

*Bijvoorbeeld:*

- 1) Een 0.01 M HCl oplossing heeft een  $[H_3O^+]$  van 0.01 mol/l, ofwel  $10^{-2}$  mol/l. De pH van deze oplossing is dan:  $-\log (10^{-2}) = 2$
- 2) Een 0.001 M HCl oplossing heeft een  $[H_3O^+]$  van 0.001 mol/l, ofwel  $10^{-3}$  mol/l. De pH van deze oplossing is dan:  $-\log (10^{-3}) = 3$

Uit dit voorbeeld blijkt tevens dat een verschil van 1 pH eenheid een factor 10 verschil in  $[H_3O^+]$  heeft.

Tabel 1: Voorbeelden uit de praktijk

	pH		pH		pH
Menselijk bloed	7,4	Huid	5,5	Coca cola	2,3
Zuiver water	7	Tomaten	4,5	Citroensap	2
Melk	6,6	Zure regen	4	Maagzuur / accuzuur	1
Natuurlijke regen	6	Consumptieazijn	3	Zoutzuur (1 mol/l)	0

Voor we het aspect pH verder behandelen is het handig om eerst te kijken naar zuren en basen en hun chemische evenwichten.

Door de Deen Brönsted is in 1923 een definitie opgesteld: een zuur is een deeltje dat protonen ( $H^+$ ) kan afstaan en een base is een deeltje dat protonen ( $H^+$ ) kan opnemen.

De mate waarin een deeltje in staat is om protonen ( $H^+$ ) op te nemen of af te staan wordt gemeten in een reactie met  $H_2O$ . Deze maat heet de **zuurconstante** ( $K_a$ ) respectievelijk **baseconstante** ( $K_b$ ). Water heeft de capaciteit om als protonacceptor en als protodonor te fungeren (amfolyt).

### Chemisch evenwicht:

1. dissociatie van water :  $2 H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$
2. dissociatie van zuren :  $H-A \rightleftharpoons H^+ + A^-$
3. dissociatie van basen:  $X-OH \rightleftharpoons X^+ + OH^-$

1. Water wordt slechts voor een heel klein deel in ionen ( $H_3O^+$  en  $OH^-$ ) gesplitst, toch zijn juist deze ionen zeer belangrijk in de biologie.

Bij water ligt het evenwicht sterk naar links. De concentratie van water is ongeveer 55 mol/l. Bij 25 °C zijn er slechts  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/l  $H_3O^+$  ionen en evenveel  $OH^-$  ionen tijdens het evenwicht. Op basis van deze gegevens kan de *waterconstante* ( $K_w$ ) berekend worden volgens:

$$K_w = [H_3O^+] [OH^-] = 1 \cdot 10^{-7} \cdot 1 \cdot 10^{-7} = 10^{-14} \text{ mol}^2 \text{ l}^{-2}$$

Deze formule kan men ook in logaritmische vorm schrijven:

$$pK_w = pH + pOH$$

Hierin is  $pK_w = -\log K_w$  en  $pOH = -\log [OH^-]$  en volgt dat bij 25 °C  $pK_w = 14$ .

Bij 25°C is de pH van zuiver water neutraal, de waarde is 7,0. Oplossingen met een pH-waarde lager dan 7 zijn zuur, met een pH hoger dan 7 zijn basisch.

Het chemisch evenwicht van de reacties 2 en 3 kun je als volgt bekijken:



In het evenwicht wordt er per seconde evenveel “C” en “D” door de heengaande reactie gevormd als er door de teruggaande reactie verdwijnt. Het evenwicht wordt bepaald door snelheidsconstanten (k), waarbij de heengaande reactie wordt aangegeven met  $k_1$  en de teruggaande reactie met  $k_2$ . De reactiesnelheden (v)

zijn dan als volgt:  $v_1 = k_1[A][B]$  en  $v_2 = k_2[C][D]$ . Als het evenwicht is ingesteld zijn beide snelheden gelijk en is  $k_1[A][B] = k_2[C][D]$ . Ook het evenwicht wordt bepaald door een constante, evenwichtsconstante (K), en deze wordt bepaald door het quotiënt van de snelheidsconstanten.

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Deze basis regels kunnen ook toegepast worden bij het oplossen van zuren ( $\text{pH} < 7$ ) en basen ( $\text{pH} > 7$ ). Wel moet hier rekening gehouden worden met sterke zuren en basen, welke (nagenoeg) volledig dissociëren, en zwakke zuren en basen, welke maar gedeeltelijk dissociëren en waarbij dus een evenwichtsreactie plaatsvindt. Indien een zwak zuur oplost in water, verloopt de volgende reactie:  $\text{HA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{A}^-$ . Hierbij treedt water op als base, en wordt omgezet in het zuur  $\text{H}_3\text{O}^+$ . Hierbij is de zuurconstante  $K_a$  gedefinieerd als:

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}][\text{H}_2\text{O}]} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Om deze formule makkelijker te kunnen gebruiken extraheren we  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  uit deze vergelijking, dan krijgen we het volgende:

$$K_a \cdot \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]} = [\text{H}_3\text{O}^+] \rightarrow [\text{H}_3\text{O}^+] = K_a \cdot \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

De negatieve logaritme hiervan levert de pH op, want  $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$   
We krijgen dan de volgende vergelijking:

$$\rightarrow \text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Deze vergelijking staat bekend als de **Henderson-Hasselbalch** vergelijking, en is de basis voor alle berekeningen voor titraties en buffers.

Ook kunnen we uit deze vergelijking opmaken dat wanneer  $\text{pH} = \text{p}K_a$  de helft van het zuur is gedissocieerd.  $\log [\text{A}^-]/[\text{HA}] = 0$  wat betekent dat  $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ .

Deze formule voldoet vaak aan de eisen voor berekeningen, maar mag *niet altijd* gebruikt worden. Naast de onvolledige dissociatie van  $\text{HA} \rightarrow \text{A}^-$ , vindt namelijk nog een reactie plaats.  $\text{A}^-$  is namelijk de corresponderende base van het zuur HA in deze reactie, en  $\text{A}^-$  is in staat weer een proton op te nemen volgens de reactie:  $\text{A}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HA} + \text{OH}^-$

Van deze reactie kunnen we de  $K_b$  bepalen:  $K_b = \frac{[\text{HA}][\text{OH}^-]}{[\text{A}^-]}$

Met de formule  $K_w = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]$  en de logaritmische vorm  $\text{p}K_w = \text{pH} + \text{pOH}$  kunnen we nu invullen:

$K_w = K_a \cdot K_b$  De logaritmische vorm is:  $\text{p}K_w = \text{p}K_a + \text{p}K_b$ . Hiermee kunnen verdere berekeningen uitgevoerd worden.

Als regel mogen we aannemen dat de Henderson-Hasselbalch vergelijking **niet** gebruikt mag worden bij sterke zuren ( $pK_a < 2,5$ ), sterke basen ( $pK_b < 2,5 = pK_a > 11,5$ ), oplossingen met een concentratie lager dan 10 mM en wanneer het een meerwaardig zuur of base is (kan meerdere malen een proton op nemen of afstaan) waarvan de  $pK_a$  waarden minder dan 2 eenheden van elkaar liggen. In deze situaties wordt de fout te groot om verwaarloosd te mogen worden.

Sterke zuren		Zwakke zuren		Zwakke basen		Sterke basen	
zuur	$pK_a$	zuur	$pK_a$	Base	$pK_a$	Base	$pK_a$
HCl	< 0	HCOOH	3,80	$H_2PO_4^-$	7,21	$H_2O_2$	11,62
$NH_3^+-CH_2-COOH$	2,40	$CH_3COOH$	4,77	$NH_4^+$	9,24	$HPO_4^{2-}$	12,32
$H_3PO_4$	2,13	$H_2S$	6,52	$NH_3^+-CH_2-COO^-$	9,80	$NH_3$	>14

**Rekenvoorbeeld:**

Bereken de pH van een 0,1 M HCOOH oplossing

Antwoord:

	HCOOH	+	$H_2O$	$\longleftrightarrow$	$H_3O^+$	+	$HCOO^-$
Concentratie begin	$C (= 0,1)$				0		0
Concentratie eind	$C-X (=0,1-X)$				X		X

Vullen we de eerder genoemde Henderson-Hasselbalch vergelijking in, dan zien we nog 2 onbekenden, de pH en de concentratie  $H_3O^+$  ( $= [HCOO^-]$ ).

De  $K_a$  van deze reactie is  $1,6 \cdot 10^{-4}$  ( $= 10^{-3,8}$ , af te lezen uit de tabel). Hiermee is de  $[H_3O^+]$  te berekenen, volgens:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][HCOO^-]}{[HCOOH]} \Rightarrow K_a \cdot [HCOOH] = [H_3O^+][HCOO^-] \Rightarrow K_a (0,1 - X) = X^2$$

Tijdens de reactie zal *vermoedelijk* maar een zeer klein gedeelte van het HCOOH dissociëren, daarom verwaarlozen we in eerste instantie de vermindering van HCOOH. De vorming van  $H_3O^+$  en  $HCOO^-$  mag niet verwaarloosd worden omdat de beginconcentratie 0 is, en elke verandering een sterke invloed heeft op de pH. Hierdoor wordt de vergelijking:

$$K_a \cdot 0,1 = X^2 \rightarrow 1,6 \cdot 10^{-4} \cdot 0,1 = X^2 \rightarrow X = \sqrt{1,6 \cdot 10^{-5}} = 4 \cdot 10^{-3}$$

Invullen van de Henderson-Hasselbach vergelijking levert op:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = 3,8 + \log \frac{4 \cdot 10^{-3}}{0,1} = 2,4$$

Als we deze formule narekenen zonder de eerdere verwaarlozing komen we uit op een pH van 2,42. **Ga dit zelf na!** Deze verwaarlozing is binnen de biologie vaak gerechtvaardigd.

**Nog even dit:**

Een  $10^{-8}$  M HCl oplossing heeft een  $[H_3O^+]$  van  $10^{-8}$  mol/l. De pH van deze oplossing zou dan uitkomen op  $-\log(10^{-8}) = 8$ , welke basisch is. Nu worden er bij zuren, per definitie, geen  $OH^-$  ionen vrijgemaakt, en kan de oplossing nooit een pH van 8 hebben. Vanwege de lage concentratie  $[H_3O^+]$  van HCl moet in deze situatie ook de



dissociatie van water betrokken worden omdat deze een significante bijdrage levert aan de totale  $[\text{H}_3\text{O}^+]$ . Hiervan weten we dat een klein gedeelte dissocieert en dat de  $[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot 10^{-7}$  is. Door nu beide concentraties bij elkaar op te tellen, komen we uit op een  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  van  $1 \cdot 10^{-7} + 0,1 \cdot 10^{-7} = 1,1 \cdot 10^{-7}$ . De pH wordt dus  $-\log(1,1 \cdot 10^{-7}) = 6,96$ .

## Neutralisatie reacties en buffers

Als we met biologische systemen werken, is het meten van de pH alléén natuurlijk niet genoeg. Vaak is het belangrijk om bij een bepaalde pH te werken. Een voorbeeld hiervan is het werken met DNA. Tijdens een DNA isolatie wordt gebruikt gemaakt van wisselingen in pH om het DNA of eiwitten te laten denatureren. DNA wordt namelijk enkelstrengs bij hoge pH's en zal weer dubbelstrengs willen worden als de pH weer verlaagd wordt, renatureren. Plasmide DNA (klein dubbelstrengs DNA) kan renatureren en blijft in oplossing. Genomisch DNA kan dit niet, en zal precipiteren. Eiwitten bevatten naast enkele basische groepen een groter aantal zure (carboxyl) groepen en hebben hierdoor een negatieve oppervlaktelading. De dissociatie van deze groepen is afhankelijk van de pH. Grote veranderingen in pH kunnen leiden tot een volledige denaturatie (verlies van secundaire/tertiaire structuur) van de eiwitten bij een lage pH. Op deze manier kunnen eiwitten uit het DNA monster verwijderd worden. Kleine pH veranderingen kunnen activiteitsveranderingen van het actieve centrum van een enzym veroorzaken. Willen we nu juist de werking van de eiwitten bestuderen dan werken we met bufferoplossingen, die een goed bufferend vermogen hebben in de buurt van het pH-optimum van het enzym.

Om een specifieke pH te verkrijgen moet een oplossing vaak “gesteld” worden op deze pH. Dit gebeurt d.m.v. neutralisatie reacties, oftewel titraties.

Een neutralisatie reactie is een reactie tussen een zuur en een base waarbij een zout en water worden gevormd. Omdat sterke basen en zuren volledig dissociëren in water, kunnen we bij menging precies berekenen hoeveel ionen  $\text{H}_3\text{O}^+$  of  $\text{OH}^-$  in de oplossing aanwezig zijn, en dus ook hoeveel we moeten toevoegen voor een volledige neutralisatie ( $\text{pH} = 7$ ). Het essentiële kenmerk van een neutralisatie reactie is de reactie tussen  $\text{H}_3\text{O}^+$  en  $\text{OH}^-$  tot beide volledig geëlimineerd zijn. Dit punt is karakteristiek als we de reactie uitzetten in een **titratiecurve**.

Wanneer we de sterke base bij het sterke zuur voegen, zien we de pH eerst langzaam toenemen. Op het **equivalentiepunt**, het punt waarop  $\text{H}_3\text{O}^+$  en  $\text{OH}^-$  in gelijke (equivalente) hoeveelheden aanwezig zijn ( $\text{pH} = 7$ ), treedt er een steil pH verloop op.

### Rekenvoorbeeld:

We starten met 100 ml van een 0,2 M HCl oplossing, deze bevat 0,02 mol HCl.

We gaan deze oplossing titreren met een 0,2 M NaOH.

De reactie die plaatsvindt is:  $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^- \leftrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$

Hieruit blijkt dat:  $\text{H}_3\text{O}^+ : \text{OH}^- = 1:1$ . Conclusie: 1 mol NaOH neutraliseert 1 mol HCl.

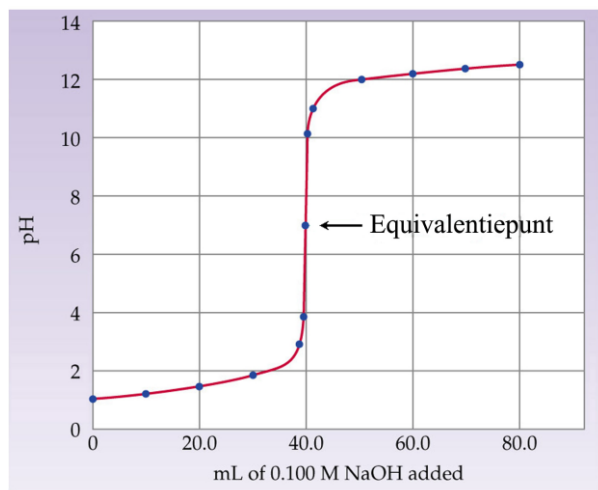
De pH van de HCl oplossing waarmee we begonnen is uit te rekenen mbv

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+] = -\log [0,2] = 0,699$$

Als we 50 ml 0,2 M NaOH toevoegen wordt er 0,01 mol HCl weggenomen. Er is nu nog 0,01 mol in 150 ml oplossing aanwezig. De concentratie HCl = 0,067 M.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+] = -\log [0,067] = 1,17$$

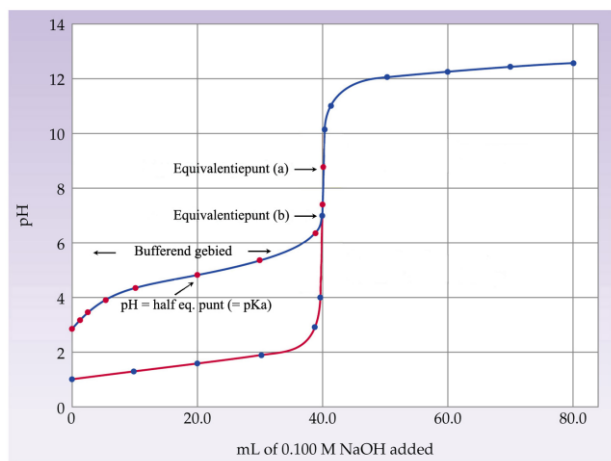
We voegen 99 ml 0,20 M NaOH toe, dan is slechts 1/100 deel van de oorspronkelijke hoeveelheid zuur nog aanwezig, terwijl het volume bijna 2x zo groot is geworden, nl. 199 ml. De concentratie HCl is nu ca. 0,001 M geworden. De  $\text{pH} = 3,0$ . Bij verdere toevoeging van NaOH stijgt de pH zeer snel. Bij gelijke hoeveelheden HCl en NaOH is de  $\text{pH} = 7$  (neutraal). Is er 200 ml NaOH 0,20 M toegevoegd, dan is de helft hiervan voor de neutralisatie van het zuur verbruikt, terwijl het volume 300 ml is geworden. De concentratie van de OH-ionen is dan 0,067 M.  $\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-] = -\log [0,067]$   $\text{pOH} = 1,17$ . We weten dat de  $\text{pH} + \text{pOH} = 14$ .  $\text{pH} = 14,0 - 1,17 = 12,83$ . Hieruit blijkt dat zowel de titratie alsmede de verdunning bijdragen tot de toename in pH.



De titratie van een sterk zuur met een sterke base (40 ml 0,1 M HCl met 0,1 M NaOH)

Voor de titraties van zwakke zuren en basen is de berekening niet zo snel te maken. Deze dissociëren niet volledig. Voor deze berekeningen kunnen we weer de Henderson-Hasselbalch vergelijking gebruiken.

Wanneer we een zwak zuur titreren met een sterke base, zal er net zoveel zout worden gevormd als dat er aan base wordt toegevoegd. Hierdoor zal de pH slechts geleidelijk veranderen. Dit is de karakteristieke eigenschap voor een buffer. Pas als al het zuur is geneutraliseerd zal de pH sterk gaan veranderen. Als we deze titratie in de grafiek bekijken, zien we dat deze een compleet ander verloop heeft dan de titratie van een sterk zuur met een sterke base.



(a) titratie van een zwak zuur met een sterke base (40ml 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH met 0,1 M NaOH)

(b) titratie van een sterk zuur met een sterke base (40 ml 0,1 M HCl met 0,1 M NaOH)

Als we beide grafieken vergelijken zien we dat azijnzuur bij de start al een hogere pH heeft. Voegen we NaOH toe, dan zien we dat de pH eerst snel en vervolgens steeds langzamer stijgt. Na het omslagpunt (het neutralisatiepunt;  $\text{pH} = 4,76$ ) stijgt de pH weer steeds sneller en valt de curve uiteindelijk samen met de curve van de titratie van HCl.

Het **bufferend gebied** wordt in deze grafiek ook duidelijk. Tussen  $\text{pH} \sim 4$  en  $\sim 5,5$  stijgt de pH maar heel langzaam bij toevoegen van NaOH. De oorzaak hiervoor ligt in de evenwichtsreactie. Bij toevoegen van NaOH zullen de  $\text{H}_3\text{O}^+$  ionen in de oplossing geneutraliseerd worden. Dit zorgt er voor dat het evenwicht uit balans raakt. Hierdoor zal  $\text{CH}_3\text{COOH}$  weer wat verder dissociëren om het evenwicht weer te herstellen en wordt er dus weer  $\text{H}_3\text{O}^+$  gevormd. Door deze eigenschap stijgt de pH dus maar heel geleidelijk, en is er veel NaOH nodig om de pH van 4 naar 5 te laten stijgen. Hierdoor is de oplossing 0.1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (azijnzuur) geschikt om te gebruiken als buffer op dit pH traject.

*NB: ook sterke zuren en basen voldoen aan dit criterium voor zeer lage, en zeer hoge pH-waarden. Deze waarden liggen echter vaak (ver) buiten het bereik dat tijdens experimenten wordt gebruikt. Daarom bespreken we hier alleen maar buffers van zwakke zuren en zwakke basen. Het bufferende pH-traject ligt in de buurt van het neutrale milieu.*

Ook is te zien dat het **equivalentiepunt** van de titratie van het zwakke zuur met een sterke base **niet** op  $\text{pH} 7.0$  ligt, maar voor dit zuur op  $\sim 8,7$ . Dit komt doordat  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , de corresponderende base van  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , wederom een proton kan opnemen van  $\text{H}_2\text{O}$  via de volgende reactie:  $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COOH} + \text{OH}^-$ , waardoor er een overmaat aan  $\text{OH}^-$  in de oplossing aanwezig is. **Het equivalentiepunt van titraties van zwakke zuren en zwakke basen is afhankelijk van de  $\text{pK}_a$ .**

### Rekenvoorbeelden

1. Het equivalentiepunt is ook te berekenen. Stel, we titreren 500 ml van een 0,1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  oplossing met 0,1 M KOH ( $\text{pK}_a = 4,77$ ). We weten dat in het equivalentiepunt er evenveel base is toegevoegd, als dat er zuur aanwezig was. Hierdoor is  $\text{CH}_3\text{COOH}$  volledig gedissocieerd. We kunnen deze vergelijking dan ook samenvatten als:

$$\text{OH}^- + \text{CH}_3\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$$

C begin	0,05 mol	0,05 mol	
C eind			0,05 mol

We weten ook dat  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  weer een proton kan opnemen volgens:

$$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COOH} + \text{OH}^-$$

C begin	0,05 mol	0	0
C eind	0,05 - X	X	X

Aan deze reactie is te zien dat er  $\text{OH}^-$  wordt gevormd. Aangezien we nu in een basische oplossing werken gaan de berekeningen in eerste instantie niet via de  $\text{pK}_a$  en de pH, maar via  $\text{pK}_b$  en pOH.

We kunnen de Henderson-Hasselbalch vergelijking ook uitschrijven voor een basische buffer. De vergelijking wordt dan:

$pOH = pK_b + \log \frac{[OH^-]}{[CH_3COO^-]}$  en om de  $[OH^-]$  te berekenen gebruiken we:

$$K_b = \frac{[CH_3COOH][OH^-]}{[CH_3COO^-]} \Rightarrow K_b \cdot [CH_3COO^-] = [CH_3COOH][OH^-] = X^2$$

Ook weten we dat  $K_a \cdot K_b = K_w = 10^{-14} \Rightarrow K_b = \frac{K_w}{K_a} = \frac{10^{-14}}{10^{-4,77}} = 5,9 \cdot 10^{-10}$

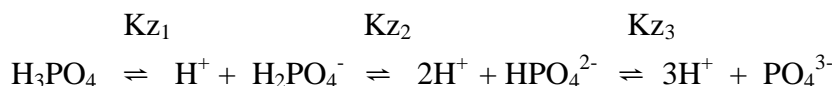
Vullen we deze waarden in, dan zien we dat  $X = 5,43 \cdot 10^{-6}$ . **Reken zelf na!**

Alle gegevens zijn nu bekend om de Henderson-Hasselbalch vergelijking in te vullen.

$$pOH = pK_b + \log \frac{[OH^-]}{[CH_3COO^-]} = -\log \left[ 5,9 \cdot 10^{-10} \right] + \log \frac{5,43 \cdot 10^{-6}}{0,05} = 5,26$$

$$pH = 14 - pOH = 14 - 5,26 = \underline{8,73}$$

2. Je maakt volgens voorschrift 1,0 l van een 0,50 M fosfaatbuffer pH=7,2 door 0,50 mol  $NaH_2PO_4$  op te lossen in water. De pH wordt op 7,2 gesteld met NaOH en het volume vervolgens aangevuld tot 1,0 l. Fosforzuur ( $H_3PO_4$ ;  $NaH_2PO_4$  is het natriumzout van fosforzuur) kan dissociëren volgens:



met  $pK_{Z1} = 2,1$  ;  $pK_{Z2} = 7,2$  ;  $pK_{Z3} = 12,7$ .

Houd er verder rekening mee dat een natriumzout gewoonlijk volledig opgelost is (d.w.z. in ionen is gesplitst).

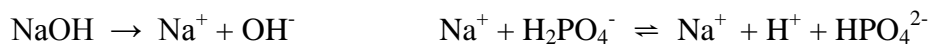
a. Wat is de  $[HPO_4^{2-}] / [H_2PO_4^-]$  verhouding bij deze pH?

$$pH = pK_z + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]},$$

$$7,2 = 7,2 + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

$$\log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 0 \quad \text{dus} \quad \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 1$$

b. Wat is de  $[Na^+]$  in de buffer?



De hoeveelheid toegevoegde NaOH =  $[HPO_4^{2-}] = [H_2PO_4^-] = 0,25 \text{ M}$

**Eind concentratie  $[Na^+]$**  = Aanwezig  $[Na^+]$  + toegevoegde  $[Na^+]$  =  
 $0,5 \text{ M} + 0,25 \text{ M} = \underline{0,75 \text{ M}}$

### Kiezen van de juiste buffer

Bij het werken met biologische systemen is de keuze van de juiste buffer uiterst belangrijk. Zo dient de buffer naast de buffercapaciteit in het juiste pH-gebied, nog een aantal andere eigenschappen te bezitten zoals:

- water oplosbaar
- geen interactie met biologische processen (substraat, activator of remmer voor bepaalde enzymen, bijvoorbeeld fosfaat)

- geen interactie met biologische membranen (zoals penetratie, oplossen of adhesie aan het oppervlakte)
- geen toxische effecten (bijvoorbeeld TRIS)
- bekende complex formaties met metaal ionen

en, bij voorkeur, een lage absorptie bij 260 nm.

Om de nadelen van traditionele buffers te ontwijken zijn er ook buffers ontwikkeld op basis van “zwitterionische” moleculen. Deze moleculen bevatten dan zowel negatieve als positieve groepen en zijn mild t.a.v de functie van enzymen.

*Enkele voorbeelden van regelmatig gebruikte buffers in de biologie*

effective pH range	pKa 25°C	Buffer	effective pH range	pKa 25°C	buffer
1.7-2.9	2.15	phosphate (pK1)	6.1-7.5	6.76	PIPES *
2.2-6.5	3.13	citrate (pK1)	6.5-7.9	7.14	MOPS*
3.0-6.2	4.76	citrate (pK2)	6.8-8.2	7.48	HEPES *
3.2-5.2	4.21	succinate (pK1)	7.0-8.3	7.76	triethanolamine (TEA)
3.6-5.6	4.76	acetate	7.5-9.0	8.06	TRIS
5.5-6.5	5.64	succinate (pK2)	7.6-8.6	8.00	EPPS, HEPPS *
5.5-6.7	6.10	MES*	7.6-9.0	8.26	BICINE *
5.5-7.2	6.40	citrate (pK3)	7.7-9.1	8.40	TAPS*
5.8-7.2	6.46	bis-tris	8.8-10.6	9.78	glycine (pK2)
5.8-8.0	7.20	phosphate (pK2)	8.8-9.9	9.25	ammonium hydroxide
6.0-8.0	6.35	carbonate (pK1)	9.5-11.1	10.33	carbonate (pK2)
6.1-7.5	6.78	ACES *		12.33	phosphate (pK3)

\* zwitterionische buffers

## **pH-Meter**

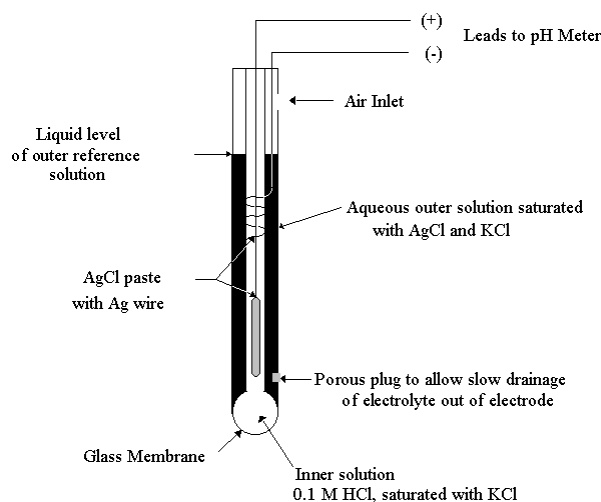
Het meten van een pH kan op verschillende manieren. De makkelijkste manier is om pH papier te gebruiken zoals lakmoes papier. Hiermee kan een zuur of base onderscheiden worden. Er bestaat ook gevoeliger pH papier, dat geeft nog steeds een grove indicatie van de pH. Wil je nauwkeurig de pH weten, dan maken we gebruik pH-electroden.

pH-electroden zijn in staat potentiaalverschillen te meten. Deze verschillen worden verwerkt en weergegeven op de pH-meter.

De pH-electrode (zie p.38) is in principe opgebouwd uit de volgende onderdelen:

- een proton gevoelige glaselektrode, gevuld met een HCl oplossing,
- een referentie-elektrode, gevuld met een KCl oplossing
- een zilver-zilverchloride-elektrode die de potentiaalverschillen doorgeeft naar de pH-meter.

De werking van de pH-elektrode kan het makkelijkst als volgt worden uitgelegd: Het glazen of kunststof membraan is alleen doorlaatbaar voor protonen. De elektrode is gevuld met een sterke HCl oplossing. Wanneer de elektrode in een oplossing wordt gedompeld, diffunderen de protonen naar binnen of naar buiten afhankelijk van het pH-verschil tussen beide oplossingen. Hierdoor ontstaat een elektrisch potentiaalverschil over het membraan. Dit potentiaalverschil is, binnen bepaalde grenzen, recht evenredig met de pH van de oplossing.



### Calibratie van de pH meter

Voordat de pH meter gebruikt mag worden voor experimenten is het noodzakelijk deze te calibreren (ijken). Een goede pH-meter wordt 1 keer per dag geijkt. Dit doet men onder andere omdat er door veroudering van de elektroden afwijkingen optreden. Dit kan met een kleine instelbare tegenspanning in de meter gecompenseerd worden. De knop voor deze

“nulpuntsinstelling” heet meestal “asymmetrie-potentiaal” of “calibratie” (cal).

Doordat het signaal van de elektrodencombinatie van nogal wat factoren afhangt, kunnen kleine afwijkingen ontstaan. Deze worden op de meter gecorrigeerd met een knop die doorgaans met “mV/pH”, “sensitivity” of “slope” (helling) wordt aangeduid. Ook moet voor nauwkeurige metingen de meter geijkt worden bij dezelfde temperatuur als waarbij wordt gemeten. Dit is echter vaak niet erg handig (denk aan oplossingen in koelkast, of juist bij kamertemperatuur). De wat geavanceerdere pH-meters bezitten dan ook een temperatuurknop, welke kan worden ingesteld op de temperatuur van de gebruikte ijk- of meet oplossing.

### pH METEN VAN EEN OPLOSSING

- Ijk de pH-meter in het gewenste pH-traject volgens onderstaande procedure.
- Spoel de elektrode af en verwijder losse druppels.
- Dompel de elektrode in de oplossing, die goed geroerd moet worden.
- Wacht tot er een stabiele pH-waarde wordt geregistreerd.

### IJKEN VAN DE pH-METER

De volgende procedure is de meest gangbare. Enig theoretisch inzicht is nodig om geen vergissingen te maken. Een goede pH-meter wordt 1x per dag geijkt.

1. pH-meter aanzetten. Doe dit enige tijd voor gebruik i.v.m. de stabilisatie van de pH-meter. De meeste pH-meters worden zelden uitgeschakeld.
2. Haal de elektrode uit de parkeeroplossing. Op het practicum wordt gewerkt met een moderne, gesloten combinatie-elektrode met een beschermhuls van epoxy-hars. Laten uitdrogen of stoten tegen het glasmembraan is funest voor deze anderszins stevige elektrode. Bij een ouderwetse elektrode bevat de referentie-elektrode een vulopening die tijdens de meting open moet zijn. De

elektrode en ook het glasmembraan, moet grondig worden afgespoeld met water (spuitfles). De beschermhuls moet vervolgens worden afgedroogd met een tissue. De druppels aan het glasmembraan worden afgeschud met een korte polsbeweging.

3. Elektrode onderdompelen in ijkbuffer pH=7,0.
4. Temperatuurknop, indien aanwezig, instellen op de temperatuur van de ijkbuffer.
5. Asymmetrie-potentiaalknop (cal) verdraaien tot de pH-meter de pH van de ijkbuffer aanwijst.
6. Elektrode grondig afspoelen.
7. Elektrode onderdompelen in ijkbuffer pH=4,0 of pH=10,0, afhankelijk van of je in een gebied lager of hoger dan pH=7,0 wil meten.
8. Gevoeligheidsknop (sensitivity, mV/pH, slope) verdraaien tot de meter de pH van de ijkbuffer aanwijst.
9. Elektrode grondig afspoelen en in parkeeroplossing of in de te meten oplossing dompelen (let op temperatuurinstelling).

**N.B.** Voor zeer nauwkeurig werk (of voor de zekerheid) wordt 2 t/m 8 herhaald. Meestal is een nauwkeurigheid van 0,10 pH-eenheid voldoende. Voor sommige biochemische procedures (stellen van oplossingen voor incubatiemengsels of van elektroforesebuffers) is een relatieve nauwkeurigheid (reproduceerbaarheid) van 0,010 pH noodzakelijk. Voor het meten van pH-veranderingen in de tijd wordt soms met een pH-interval van 0,0010 gewerkt.

Omdat de referentie-elektrode een vloeistofbrug bevat “lekt” daaruit elektrolytvloeistof (meestal KCl). De elektroden mogen daarom niet te lang in de te meten oplossing staan. Vooral bij kleine volumina kan dit kritisch zijn !

Een alternatieve en zeer nauwkeurige ijkprocedure gaat als volgt: in plaats van de ijkbuffers met pH=7,0 en pH = 4,0 of 10,0 neem je twee nauwkeurig bereide ijkbuffers met waarden net onder en boven die van de te meten/stellen oplossing. Neem bij hetijken het eerste de ijkbuffer die het dichtste bij pH=7,0 ligt.

### **IJKBUFFERS EN ONDERHOUD VAN DE pH-METER**

Ijkoplossingen zijn kant en klaar te koop. Een andere mogelijkheid is het oplossen van ijkpoeder in uitgekookt (i.v.m. opgelost CO<sub>2</sub>), gedemineraliseerd water. De bekendste ijkoplossingen zijn paars-blauw (pH=7,0) en rood (pH=4,0). Hun pH varieert maximaal 0,020 pH-eenheid tussen 15° en 25°C.

Onderhoudsvoorschriften worden bij elk stel nieuwe elektroden meegeleverd. Meestal wordt een nieuwe elektrode enkele uren tot een nacht in 3,0 M KCl gezet. Bij een ouderwetse elektrode wordt de referentie-elektrode volledig bijgevuld met verzadigd KCl (als er geen KCl-kristallen in de elektrode meer zichtbaar zijn moeten ze erin worden gebracht waarna langdurig moet worden gemengd (kantelen). Controleer dit altijd! Een trage elektrode wordt soms weer bruikbaar door hem 15 sec. in een 0,10 M HCl-oplossing te dompelen, dan spoelen en vervolgens 15 sec. dompelen in een 0,010 M NaOH-oplossing. Dit 3x herhalen. Als dit niet werkt kunnen drastischer methoden worden toegepast.

Veelgebruikte pH-elektroden worden geparkeerd in demiwater, minder gebruikte in een 3,0 M KCl-oplossing. De pH van de parkeeroplossing moet tussen 4,0 en 6,0

liggen. Eventueel kan een schimmelwerende stof (0,02% natriumazide) worden toegevoegd. (De groei van micro-organismen veroorzaakt een vliesje dat lastig is te verwijderen).

Sommige elektrodes kunnen droog worden opgeborgen. De veroudering van de elektrode gaat dan minder snel. De elektrodes die we op het practicum gebruiken worden opgeborgen met een watje over het membraan dat bevochtigd is met 3,0 M KCl waaraan 0,020% van de schimmelwerende stof natriumazide is toegevoegd. Het geheel wordt afgesloten met een rubber dopje.

(Een gangbare pH-elektrode kost 150 Euro en gaat 1-3 jaar mee).

## **PRACTICUMOPDRACHTEN**

- **IJk de pH meter (2x) in het traject tussen pH 4 en pH 7 bij de actuele kamertemperatuur.**
- Maak **oplossing A**: 150 ml 0,20 M Na-acetaatoplossing in demiwater. Schrijf in je labjournaal hoeveel Na-acetaat je afweegt. MW Na-acetaat = 82,03.
- Maak **oplossing B**: breng 50 ml van oplossing A over naar nieuwe fles en voeg 50 ml 0,2 M azijnzuur toe.
- Meet de pH van **oplossing A**, en voeg vervolgens 20 keer 1 ml 1,25 M HCL toe. Bepaal na elke toevoeging de pH en noteer de waarde in je labjournaal.
- Meet de pH van **oplossing B**, en voeg vervolgens 20 keer 1 ml 1,25 M HCL toe. Bepaal na elke toevoeging de pH en noteer de waarde in je labjournaal.

## **VRAGEN:**

1. Geef de reactievergelijkingen van de oplossingen A en B.
2. Bereken de  $pK_z$  van oplossing A.
3. Beredeneer de pH van oplossing B (gebruik hiervoor je binas)
4. Maak grafieken van de titratiecurves.
5. **Geef in beide grafieken de  $pK_z$  aan:**
  - a. berekend uit de gemeten begin pH.
  - b. geschat uit de grafiek
  - c. waarde uit Binas
6. **Verklaar de verschillen.**
7. Wat betekent het equivalentiepunt in termen van positief en negatief geladen ionen. **Geef het equivalentiepunt aan.**
8. Geef het punt aan waar de  $pH=pK_z$
9. Geef het bufferende gebied aan.
9. Verklaar het verloop van beide curves



Namen:

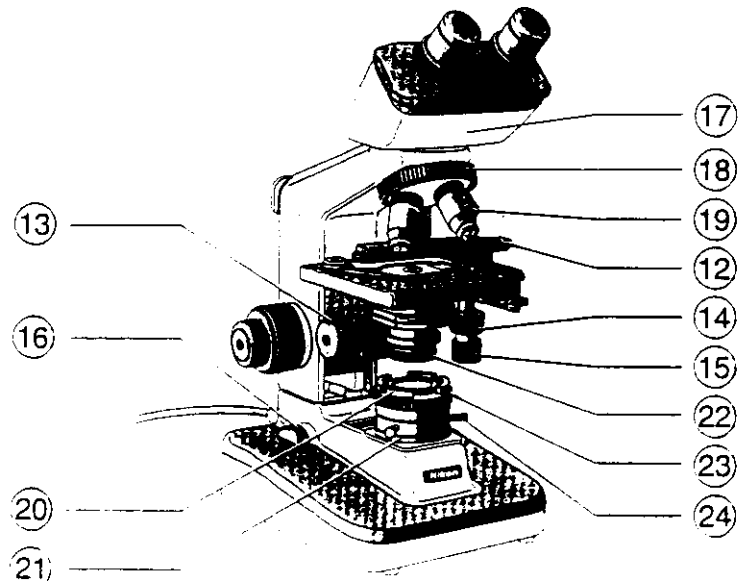
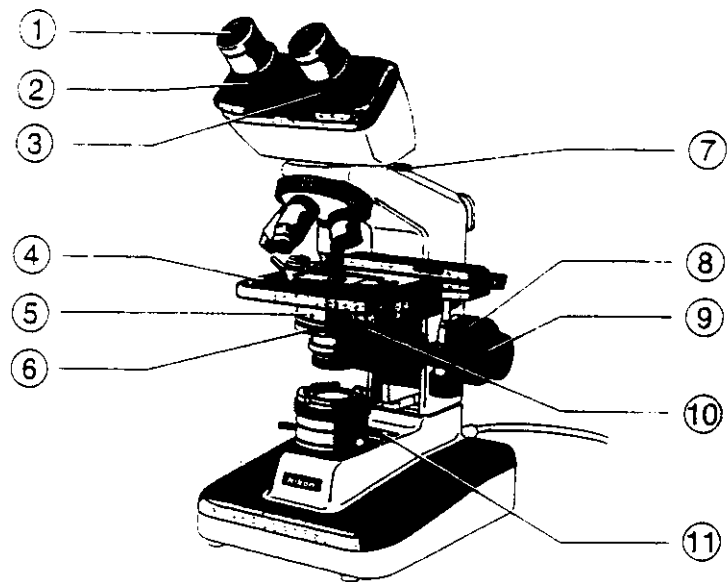
**Noteer je waarneming op het formulier**

ml HCl	pH		ml HCl	pH		ml HCl	pH		ml HCl	pH		ml HCl	pH
0			5			10			15			20	
1			6			11			16				
2			7			12			17				
3			8			13			18				
4			9			14			19				

Namen:

**Noteer je waarneming op het formulier**

ml HCl	pH		ml HCl	pH		ml HCl	pH		ml HCl	pH		ml HCl	pH
0			5			10			15			20	
1			6			11			16				
2			7			12			17				
3			8			13			18				
4			9			14			19				



**Practicummicroscoop met ingebouwde verlichting volgens Köhler**

# MICROSCOPIE

Voor gewone lichtmicroscopie is een Nikon Alphaphot-2 YS2-H microscoop beschikbaar met ingebouwde verlichting volgens Köhler. De prepareermicroscoop is een Nikon stereozoom microscoop.

## ONDERDELEN VAN DE LICHTMICROSCOOP

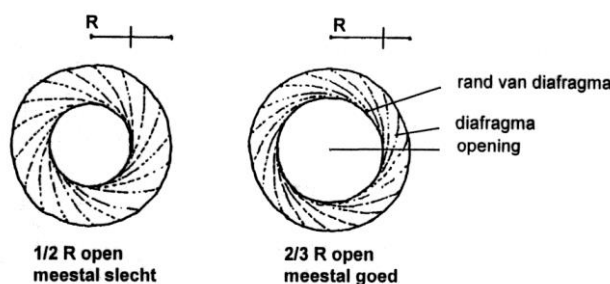
1. Oculairen : zijn vastgeschroefd vanwege de kwetsbaarheid. Het rechteroculair bevat een wijzer om structuren in het object te kunnen aanwijzen.
2. Ring om het ene oculair scherp te stellen (dioptrie-ring).
3. Ring om het andere oculair scherp te stellen (dioptrie-ring).
4. Objecttafel.
5. Condensor.
6. Apertuurdiafragma van de condensor met handeltje voor openen en sluiten.
7. Schroef om oculairbuis vast te zetten.
8. Macro-instelknop (één hele slag is 26,5 mm).
9. Micro-instelknop (één hele slag is 0,2 mm).
10. Schroef om condensor vast te zetten.
11. Ventilatie-openingen.
12. Mechanische kruistafel.
13. Knop om condensor in hoogte te verstellen.
14. Knop om kruistafel voorwaarts/achterwaarts te bewegen.
15. Knop om kruistafel zijwaarts te bewegen.
16. Lichtschakelaar/regelknop lichtsterkte (let op: cijfers zijn lastig te zien).
17. Binoculaire oculairhouder.
18. Revolver.
19. Objectieven : 4x, 10x, 40x en 100x (alleen met olie gebruiken).
20. Plaats voor filters.
21. Lamphuis met lens (collector) en velddiafragma.
22. Plaats voor daglichtfilter.
23. Ring om velddiafragma open/dicht te draaien.
- 24. Stelschroeven om velddiafragma te centreren, deze zijn gefixeerd door de practicumleiding.**

Bovenstaande nummers verwijzen naar de onderdelen van de microscoop zoals getekend op de bladzijde hiernaast.



## INSTELLEN VAN DE LICHTMICROSCOOP

1. Zorg voor een juiste zithoogte: ogen bij de oculairen, rug recht.
2. Zet de microscoop zodanig op tafel dat het snoer naar achteren wijst. Links van de microscoop zit een aan/uit schakelaar (16). Doe de microscoop aan. Zet de lichtsterkte op stand 5.
3. De oculairen zijn draaibaar. Draai ze zodanig dat de onderkant van het draaibare deel gelijk staat met de gleuf in het vaste deel van de oculairen. Dit is de **uitgangsstand** van de oculairen. De noodzakelijke onderlinge afstand van de oculairen is voor iedereen ongelijk en moet daarom worden afgesteld. Dit kan gebeuren door de oculairen (1) naar elkaar toe of van elkaar af te bewegen.
4. Leg een preparaat op de kruistafel (12).
5. Draai het 10x objectief (19) voor en maak een scherpe afbeelding van het preparaat met behulp van de macro- en micro-instelknop (8 en 9).
6. Wanneer de oculairen in de **uitgangsstand** (zie punt 3) staan, kun je punt 6 overslaan. Brildragers moeten dan wel hun bril ophouden bij het microscopiseren. Wil je zonder bril microscopiseren, stel dan de oculairen scherp voor beide ogen. Knijp eerst het linkeroog dicht en stel scherp voor het rechteroog m.b.v. de ring onderaan het rechteroculair (3). Sluit dan het rechteroog en regel de scherpste voor het linkeroog met de ring onderaan het linkeroculair (2).
7. Plaats de condensor in de hoogste stand (13). De noodzakelijke centrering van de beide diafragma's (6 en 23) ten opzichte van elkaar, is al door de practicumleiding uitgevoerd. **Niet zelf aan de schroeven van het lamphuis (24) draaien.** Bij enkele microscopen ontbreekt het deel met diafragma 23 en met de veldlens, maar er kan gewoon met deze microscopen worden gewerkt. (Beschrijving van de uitgevoerde centrering: velddiafragma (23) dichtdraaien, je ziet dan een zeshoek in je preparaat verschijnen. Breng de condensor met knop 13 op de hoogte waarbij de randen van de zeshoek zo scherp mogelijk zijn (verlichting volgens Köhler). Mocht de zeshoek niet in het midden van je preparaat zitten, stel de positie dan bij met de schroeven van het lamphuis (24). Draai het velddiafragma weer open, tot net buiten het gezichtsveld.)
8. Het apertuurdiafragma (6) dient om het juiste contrast van het beeld te verkrijgen: te ver open geeft strooilicht, te ver dicht geeft buigingsverschijnselen. Om de juiste openingsstand van het apertuurdiafragma te kunnen instellen moet in de tubus naar het diafragma worden gekeken. Omdat de oculairen vastzitten is dit echter niet mogelijk. De juiste stand van het apertuurdiafragma moet daarom worden geschat. Het diafragma op 2/3 open is meestal goed.



9. Het 4x en het 10x objectief worden gebruikt om een overzicht van het preparaat te krijgen. Voor meer details kun je het preparaat bekijken met het 40x objectief. Draai het objectief voor door aan de revolver (18) te draaien. Als de scherpte bij 10x goed was, dan hoef je na het voorzetten van het 40x objectief alleen nog met de micro-instelknop (9) de scherpte te regelen. Voor het waarnemen van details is het belangrijk om de condensor op de juiste hoogte te hebben staan. Herhaal punt 7, maar nu met het 40x objectief.
10. Om waarnemingen vast te leggen in een preparaat kun je de coördinaten noteren. Hiervoor gebruik je de aanduiding voor de X-as en de Y-as op de kruistafel. Deze heeft een schaalverdeling met nonius, zie blz. 115.

### **KIJKEN MET EEN OLIE-IMMERSIE OBJECTIEF**

1. Zoek het gewenste detail op in het preparaat en breng dit in het centrum van het gezichtsveld van het 40x objectief.
2. Sluit het apertuurdiafragma (6) wanneer het preparaat weinig contrast heeft. Laat het velddiafragma in dezelfde stand staan.
3. Breng met de macro-instelknop de kruistafel naar beneden.
4. Breng een kleine druppel immersie-olie aan op het dekglas boven het object (op de verlichte plek; mocht er geen verlichte plek te zien zijn, voer dan de lichtsterkte wat op, breng olie aan en zet de lichtsterkte weer op stand 5).
5. Draai het olie-immersie objectief (100x; met de zwarte band) voor.
6. Breng de kruistafel – van opzij kijkend! – omhoog tot het olie-immersie objectief contact maakt met de druppel immersie-olie.
7. Breng dan **zeer voorzichtig en langzaam**, terwijl je door het oculair kijkt, met de micro-instelknop de microscoop verder omhoog tot je het object scherp ziet.
8. Stel het diafragma bij voor een optimaal verlicht gezichtsveld.

### **N.B.**

**Nooit het immersie-objectief direct wegdraaien. Steeds eerst de kruistafel omlaag draaien! Hierdoor vermijd je dat het 40x objectief met de immersie-olie in aanraking komt. Deze lens kan daar absoluut niet tegen. Alleen het olie-immersie objectief is olie-dicht. Maak het olie-immersie objectief schoon met kleenex.**

## **INSTELLEN VAN DE PREPAREERMICROSCOOP**

1. Als ópvallende verlichting wordt de bureau-lamp gebruikt .
2. Draai beide oculairbuizen op stand .. (punten tegenover elkaar) bij microscooptype SMZ1 of draai de gekartelde ring op de oculairbuizen zodanig dat de ingegraveerde ring op het vaste tubusdeel net te zien is bij microscooptype SMZ1b.
3. Draai de zoominstelling op cijfer 3,5 (grootste vergroting).
4. Plaats een object onder de microscoop.
5. Stel de juiste pupilafstand tussen de twee oculairen in.
6. Stel het object scherp met de macro-instelknop.
7. Draai de zoominstelling terug van 3,5 naar 0,8.
8. Het linker- en het rechteroculair apart scherpstellen met de draairingen.
9. Nu moet bij iedere zoominstelling (vergroting) het beeld volkomen scherp blijven. Controleer dit.
10. Het optische blok zit met een vaststelschroef vast op het statief. **Draai deze schroef los** als je de positie van het optische deel wilt wijzigen.

## **PRACTICUMOPDRACHT**

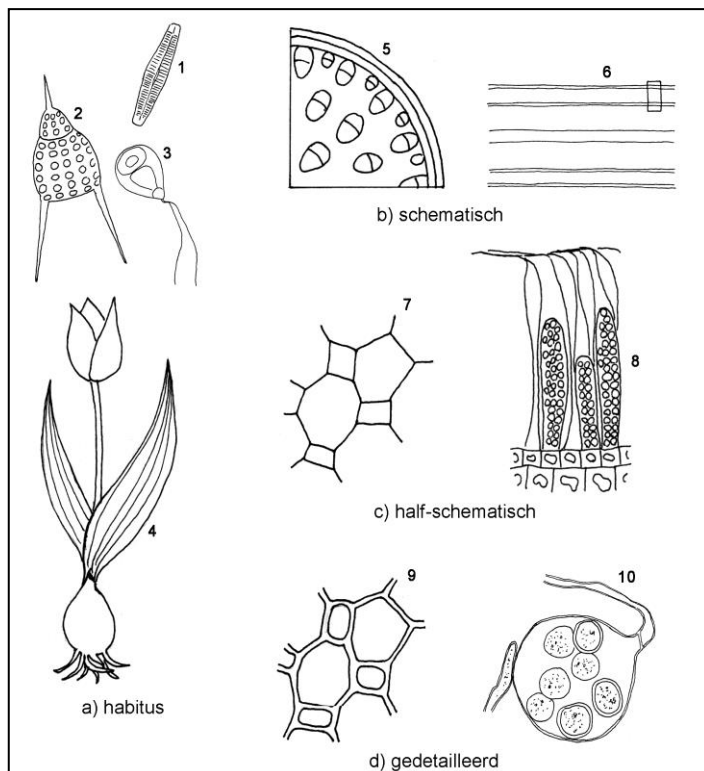
### **Instellen microscoop en verlichting (individueel, 30 min.).**

Met behulp van een vast preparaat (bv. lengtedoorsnede worteltop *Zea mays*) wordt de microscoop ingesteld. Welk deel van de worteltop je bekijkt is niet belangrijk. Ook het kijken met een olie-immersie objectief wordt uitgevoerd. Gebruik hetzelfde preparaat. Bekijk celkernen in het deel van de wortel vlakbij de wortelmuts.

## Type tekeningen

Het doel van tekenen is het vastleggen en interpreteren van waarnemingen. Waarnemen zonder tekenen kan natuurlijk ook, maar voldoet in de praktijk niet. Om goed te kunnen waarnemen is het nodig al enigszins geïnformeerd te zijn over wat er te zien is (zoekbeeld). Voorbereiden en illustraties bekijken is nodig.

Teken objecten in de juiste positie, b.v. een lengtedoorsnede door een worteltop met de wortelmuts naar beneden. Teken groot, hooguit 2 tekeningen op één vel en gebruik bij voorkeur maar één zijde van het vel (of volgens opdracht). De gevraagde practicumtekeningen zijn geen schetsen. Je gebruikt tekenkarton, een hard potlood (2H) en tekent met strakke lijnen en je brengt geen schaduwen aan.



We onderscheiden 4 typen tekeningen. Vermeld deze in het opschrift.

### a. Habitustekening

waarin de buitenkant van een organisme getekend wordt met uiterlijke kenmerken.

### b. Schematische tekening

doorsnede van een organisme of van een deel van een organisme, waarbij weefselgebieden worden aangegeven.

### c. Half-schematische tekening

van doorsneden van een organisme of van een deel van een organisme. Er worden cellen getekend, waarvan de **celwand of twee aangrenzende celwanden met een enkele lijn** worden aangegeven (7, 8). Behalve celwanden worden ook kenmerken van de protoplast weergegeven, b.v. een geplasmolyseerde protoplast, kern, cytoplasma (gestippeld) (8).

### d. Gedetailleerde tekening

van doorsneden van een organisme of van een deel van een organisme. Er worden cellen getekend, waarvan de **celwand of twee aangrenzende celwanden met een dubbele lijn** worden aangegeven (9, 10). Celwandkenmerken zijn in deze tekeningen van belang zoals de dikte en sculptuur van de celwand. Bij dikwandige cellen zoals sommige sklerenchymvezels is het handig de middenlamel te tekenen. Bij dunwandige cellen in een weefsel wordt geen middenlamel getekend. Net als bij de half-schematische tekeningen worden kenmerken van de protoplast weergegeven (10).



# GENETICA

Genetica omvat:

- **Klassieke Genetica: Mitose en Meiose, Mendelgenetica en Gekoppelde genen en Geslachtsgekoppelde Overerving. Practicum 3-5.**
- **Moleculaire Genetica en Conjugatie. Practicum 6-14.**

## VOORBEREIDING

- **Campbell: H. 12 en 13 en je college-aantekeningen. Test je kennis met de concept check en self quiz van deze hoofdstukken.**
- **Blackboard: powerpoint mitose en meiose met bijbehorende thuisopdrachten. Beide lever je in aan het begin van practicum 3.**

**Bereid thuis het geprogrammeerde onderwerp goed voor. Lever aan het eind van elk practicum de opdrachten in die je klaar hebt.**

**Neem de tijd voor de voorbereiding, dat is niet alleen nodig voor de practica, maar ook voor het tentamen. Tijdens de practica heb je voor deze voorbereidingen geen tijd! Neem Campbell en je laptop mee.**

## De celcyclus MITOSE en de sexuele levenscyclus MEIOSE

Elk organisme is in staat om genetisch identieke dochtercellen voort te brengen, van belang voor groei en herstel van het organisme en voor **de niet-seksuele voortplanting**. Dit proces heet de **MITOSE**. Bij **de seksuele voortplanting** is het juist van belang dat de dochtercellen genetisch een beetje van elkaar verschillen. Het is de basis van de evolutie. Dit is het proces van de **MEIOSE**.

### MITOSE

De mitotische celdeling bestaat uit een kerndeling, de **karyokinese**, gevolgd door een celdeling, de **cytokinese**. De celcyclus bestaat uit de **interfase** en de **mitotische celdeling** of de **mitotische fase**.

De **interfase** is het stadium waarbij de cellen de juiste omstandigheden bereiken om tot deling over te kunnen gaan. De **mitose** of kerndeling is het stadium waarin de chromosomen zich zodanig over de beide dochterkernen verdelen dat deze dochterkernen identiek zullen zijn aan de moederkern. De kerndeling wordt gevolgd door de **cytokinese**, dit is de verdeling van het cytoplasma over de twee dochtercellen. Na de cytokinese is de mitotische celdeling beëindigd.

Elk organisme heeft een bepaald aantal verschillende chromosomen in elke celkern, bij de mens zijn dit er 23. Dit is het **haploïde** aantal: **n = 23**. Is een organisme **haploïd (n)**, dan is er van elk chromosoom in principe maar één exemplaar in elke celkern aanwezig. Een mens is, zoals veel hogere organismen, **diploïd (2n)**. Dat wil zeggen: in elke celkern komen in principe van elk chromosoom twee identieke exemplaren voor, **homologe chromosomen**. Het diploïde aantal bij de mens is dan  $2 \times 23 = 46$ .

## INTERFASE

De interfase is in een aantal fasen te onderscheiden:

- de **G1-fase** (first gap).
- de **S-fase** (DNA-synthesis).
- de **G2-fase** (second gap).

Tijdens deze drie fasen groeit de cel door aanmaak van eiwitten en celorganellen. Bij planten wordt bovendien de celwand gevormd. Tijdens de S-fase vindt overlangse verdubbeling plaats van de chromosomen: van elk chromosoom wordt een exacte kopie gemaakt (replicatie). Als resultaat zullen de dochtercellen voorzien worden van voldoende eiwitten en celorganellen om te kunnen voortleven en ook van hetzelfde aantal chromosomen als de moedercel.

De juiste verdeling van de in de S-fase verdubbelde chromosomen over de beide dochterkernen vindt plaats in de mitose. Dit proces ga je onder de microscoop bekijken in preparaten van de worteltop van de tuinboon, *Vicia faba*.

Na de overlangse verdubbeling van de chromosomen in de S-fase bestaat elk chromosoom uit twee overlangse helften. Deze helften worden **chromatiden** genoemd. Een chromosoom bestaat nu uit twee (**zuster-)****chromatiden**. De chromatiden worden bijgehouden over hun gehele lengte door eiwitten. Als de chromosomen maximaal zijn gespiraliseerd is m.b.v. een elektronenmicroscop op elk chromosoom een insnoering te zien, deze plaats heet het **centromeer**.

In de interfase zijn de chromosomen gedespicaliseerd en niet als aparte structuren te zien. Na chromosoomkleuring op een interfasekern zien we een korrelige of draderige massa (= chromatine).

De kern ligt meestal midden in de cel en is mooi afgerond want er is een **kernmembraan** aanwezig. In de kern zijn gewoonlijk één of twee **nucleoli** te zien. Dit zijn plaatsen op het chromosoom die betrokken zijn bij de synthese van **ribosomen**. In het cytoplasma van dierlijke cellen bevinden zich twee **centrosomen**, Microtubule Organizing Centers genoemd, die elk één paar **centriolen** bevatten. Dit zijn structuren waaraan de draden van de **spoelfiguur** zich zullen gaan hechten.

De **spoeldraden** zijn opgebouwd uit **microtubuli**, holle structuren die opgebouwd zijn uit **tubuline-eiwit**. Rond de centrosomen vormen korte microtubuli een kransvormige figuur, de **aster**.

Gistcellen en plantencellen hebben geen centrosomen met centriolen, maar hebben goed georganiseerde microtubuli (Campbell p. 160).

Na de interfase volgt de mitose met de volgende fasen:

**Profase:** de chromosoomdraden gaan spiraliseren waardoor de chromosomen als aparte, draadvormige structuren zichtbaar worden. De spoeldraden (**spindle fibers**) worden gevormd in het cytoplasma vanuit de centrosomen. De centrosomen verplaatsen zich elk naar een pool en de spoelfiguur wordt langer.

**Prometafase:** de kern lijkt groter. Dit komt omdat het kernmembraan in de profase verdwijnt en de chromosomen vrij in het cytoplasma komen te liggen. De chromosomen worden korter en dikker door verdere spiraliseren. De beide chromatiden worden nog bijeengehouden door het centromeer. De nucleoli zijn niet meer te zien. De eerste spoeldraden bereiken de chromosomen en hechten aan de **kinetochoren**. Dit zijn eiwitachtige structuren die gelegen zijn aan beide zijden van elk centromeer.

Er zijn ook spoeldraden die niet aan een kinetochoor hechten. Zij zullen gaan overlappen met spoeldraden van het tegenoverliggende centrosoom en zo een doorlopende spoelfiguur vormen van pool tot pool.

**Metafase:** de chromosomen zijn nu zo kort mogelijk geworden doordat ze maximaal zijn gespiraliseerd. In deze fase zijn de chromosomen goed te zien. De spoelfiguur is nu geheel gevormd. De centromeren worden door de spoeldraden in het **equatorvlak** (Campbell:metaphase plate) van de **spoelfiguur** gebracht. De **chromosoom-armen** steken uit in de richting van de polen. Onder een goede microscoop kun je soms zien dat elk chromosoom uit twee chromatiden bestaat. De positie van de chromosomen in het equatorvlak is vaak typisch voor een organisme en wordt het **karyogram** genoemd. Meestal liggen de kleine chromosomen in het centrum en de grote aan de buitenzijde. Bij sommige organismen komen alle chromosomen in de metafase in een cirkel te liggen of in een sikkelvorm zoals bij enkele sprinkhaansoorten. Aan het eind van de metafase splitsen de centromeren van alle chromosomen gelijktijdig.

**Anafase:** de **zusterchromatiden** gaan los van elkaar. De nu enkelvoudig geworden centromeren bewegen zich in de richting van de polen doordat de spoeldraden korter worden en trekken als het ware de chromatiden achter zich aan. De spoeldraden die niet aan een kinetochoor waren verbonden worden langer en duwen zo de beide polen verder uit elkaar. De dierlijke cel wordt langer. De plantencel behoudt zijn grootte door de celwand.

In de anafase zijn de chromosomen nog goed apart te onderscheiden. De chromosomen bestaan nu elk uit maar één chromatide. Naar elke pool gaat hetzelfde aantal chromosomen. Dit aantal per pool is hetzelfde als het aantal chromosomen in de oorspronkelijke moederkern.

Aan het eind van de anafase gaat de spoelfiguur verdwijnen.

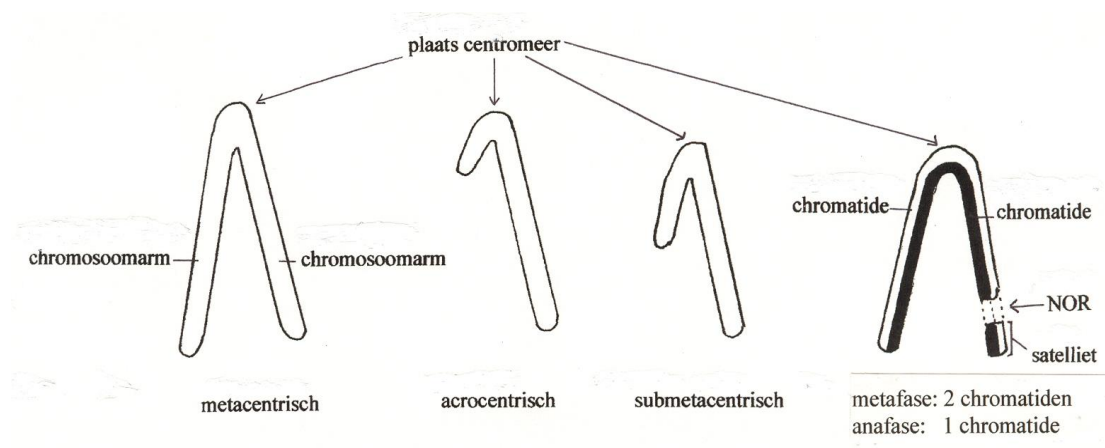
**Telofase:** de spoelfiguur is verdwenen. De chromosomen hebben zich bij de polen verzameld en gaan despiraliseren. Ze gaan er weer uit zien als in de interfase. Rondom de chromosomen wordt een nieuw kernmembraan gevormd en de nucleoli verschijnen weer. Er zijn nu dus twee genetisch identieke zusterkernen, ontstaan uit één moederkern. De mitotische kerndeling is voltooid.

Nu begint de **cytokinese**. Tussen de twee nieuwe kernen wordt bij plantencellen een nieuwe celwand gevormd. Bij dierlijkecellen vindt een insnoering tussen de twee dochterkernen plaats. Hiermee is ook de cytokinese voltooid en daarmee de gehele mitotische celdeling.

## KNEUSPREPARAAT WORTELTOP TUINBOON

We gaan de verschillende stadia van **MITOSE** bestuderen in de **worteltop** van de tuinboon, *Vicia faba*. De tuinboon heeft zes verschillende chromosomen en is diploïd:  $2n = 12$ .

De worteltop is in zijn geheel gekleurd met een kleurstof die het chromosoommateriaal blauw kleurt. Van de gekleurde worteltop zijn vervolgens dunne plakjes afgesneden. Deze zijn op objectglaasjes gelegd in een beetje vloeistof en afgedekt met een dekglas. Door vervolgens op het dekglas enige druk uit te oefenen, worden de cellen kapot gedrukt en worden de chromosomen van iedere cel over een grotere oppervlakte verspreid. Dit wordt een **kneuspreparaat** genoemd, waarin de “vorm” van de chromosomen goed te zien is. De vorm wordt bepaald door de plaats van het **centromeer**. Zit het centromeer ongeveer in het midden en zijn de beide chromosoomarmen dus ongeveer even lang, dan is het chromosoom **metacentrisch**. **Acrocentrisch** betekent dat het centromeer vlakbij maar net niet helemaal aan het einde zit. We spreken van **submetacentrisch** als het centromeer op zo’n driekwart van het chromosoom zit. Een chromosoom kan ook **polycentrisch** zijn. Dat wil zeggen dat er sprake is van een “diffuus” centromeer: de spoeldraden hechten dan aan op verschillende plaatsen van het chromosoom.



Vijf paar chromosomen van de tuinboon zijn acrocentrisch, één paar is metacentrisch. De metacentrische chromosomen van de tuinboon hebben iets bijzonders: naast de insnoering op de plaats van het centromeer heeft één van de twee chromosoomarmen nog een tweede insnoering. Dit is de plaats van de **NOR** of **Nucleolus Organizing Region**. Op deze plaats wordt de nucleolus gevormd. Onder de microscoop is deze plaats goed te herkennen. Het lijkt alsof van deze chromosoomarm een stukje los ligt: de NOR is te zien als een “onderbreking” van het chromosoom, want dit stukje wordt niet gekleurd. Dit schijnbaar losliggende stukje chromosoomarm wordt **satelliet** genoemd.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN**

Op Blackboard vind je een powerpoint-presentatie van de MITOSE. Deze mag je ter ondersteuning bij de practicumopdrachten gebruiken.

### **Opdracht 1 (thuisopdracht)**

#### **Opdracht 2**

Zoek met de microscoop in het worteltoppreparaat naar de volgende stadia:

- **interfase & telofase**
- **profase**
- **metafase**
- **anafase.**

*Individueel*: noteer de coördinaten van bovengenoemde stadia (zie blz. 115). Hiervoor is 45 min. beschikbaar. Laat de gegevens door de assistent controleren.

*Per paar* practicanten wordt van alle stadia een duidelijke tekening gemaakt. Overleg dit samen en meld de werkverdeling bij je assistent. **Aanwijzingen** voor het tekenen staan op blz. 60. **Per tekening is maximaal 30 min. practicumtijd beschikbaar.**

Gebruik bij het tekenen van de stadia je kennis, d.w.z. denk aan het aantal en aan de vorm van de chromosomen (positie centromeer) en aan de plaats van de centromeren en de positie van de chromatiden t.o.v. het equatorvlak.

- Vermeld bij elke tekening hoeveel chromosomen er per pool theoretisch aanwezig zijn en uit hoeveel chromatiden de chromosomen bestaan. Schrijf dit aan de rechterzijde van het tekenvel (zie p. 60).
- Vermeld bij elk getekend stadium **alle relevante** kenmerken die hieronder genoemd worden:

**chromatine,**  
**chromosoom, chromatide**  
**plaats centromeer,**  
**richting/plaats equatorvlak,**  
**kernmembraan,**  
**NOR,**  
**satelliet,**  
**nucleolus.**

Een aantal tips:

- Kijk in Campbell handleiding Engels-Nederlands
- Let op het juiste potlood gebruik. Hardheid minimaal 2H (3H)
- Niet schetsen
- Groot tekenen
- Juiste papierindeling.

## **MEIOSE**

Door **mitose** ontstaan uit een diploïde moedercel twee dochtercellen die ook diploïd zijn en die **genetisch identiek** aan de moedercel zijn. In tegenstelling hiermee ontstaan door **meiose** uit *een* diploïde ( $2n$ ) moedercel uiteindelijk *vier* dochtercellen die haploïd ( $n$ ) zijn. Zij bevatten van elk type chromosoom slechts één exemplaar en bevatten, vergeleken met de moedercel, de helft van het aantal chromosomen. Bovendien kunnen tijdens deze deling nieuwe combinaties ontstaan door uitwisseling van genetisch materiaal tussen de twee exemplaren van elk afzonderlijk type chromosoom. De haploïde cellen noemen we **gameten**, bv. eicel en spermatozoon. Waar mitose zorgt voor genetische gelijkheid van cellen, zorgt meiose voor **genetische variabiliteit** door nieuwe combinaties van chromosomen in de gameten en nieuwe combinaties van chromosoomsegmenten binnen een enkel chromosoom.

Meiose is een uit twee stadia bestaande celdeling bij organismen met een seksuele voortplanting en bestaat uit een **interfase** en **meiotische fase**.

In de S-fase van de interfase vindt replicatie plaats van de chromosomen en van de centrosomen, als voorbereiding op de meiose. Elk chromosoom bestaat nu uit twee identieke zusterchromatiden die bij de centromeren zijn verbonden.

De meiotische fase halveert het aantal chromosomen in de cellen door twee opeenvolgende kerndelingen, **Meiose I en II** (ook wel reductiedeling I en II genoemd), elk gevolgd door een cytokinese. De beide kerndelingen van de meiose bestaan in principe uit dezelfde stadia als de mitose, de chromosomen gedragen zich echter anders:

- Meiose-I heeft een lange profase die in verschillende stadia wordt ingedeeld; de telofase is extreem kort of ontbreekt. De **homologe** chromosomen gaan uit elkaar. Hierna volgt een **cytokinese**. Het resultaat is twee cellen met elk één exemplaar van ieder paar homologe chromosomen.

- In de Meiose-II ontbreken de interfase en de profase vrijwel. De beide **chromatiden** van een homologe chromosoom gaan uit elkaar, de Meiose-II is daarom in feite een mitotische kerndeling. Hierop volgt een cytokinese. Het resultaat is vier haploïde cellen met elk één chromatide van ieder paar homologe chromosomen.

## **LEVENS CYCLI**

Bij de meiose wordt in principe uitgegaan van een diploïde kern. Dierlijke organismen zijn diploïd, alleen voor de seksuele voortplanting worden haploïde cellen gevormd, de gameten, die na versmelting weer diploïde cellen vormen. Deze diploïde cellen groeien door mitotische delingen uit tot een organisme. De gameten kunnen zichzelf niet mitotisch vermeerderen. De haploïde fase blijft dus beperkt tot de gameten. Is een organisme echter haploïd, zoals de meeste schimmels en enkele algensoorten, dan moet eerst versmelting van twee haploïde kernen plaatsvinden om een diploïde kern te vormen. Deze diploïde kernen ondergaan geen mitotische delingen maar gaan de meiose in en vormen zo weer haploïde kernen. Deze delen zich vervolgens mitotisch om tot een organisme uit te groeien. Hier duurt de diploïde fase dus erg kort.

Planten en enkele algen hebben een levenscyclus die van de beide bovenstaande afwijkt. Hier kunnen zowel haploïde als diploïde cellen mitose ondergaan. Het diploïde deel van de levenscyclus heet de **sporofyt**. Meiose resulteert in de haploïde sporen. Door mitotische delingen ontstaat hieruit de **gametofyt**. Deze vormt door

mitotische delingen gameten. Versmelting van twee gameten leidt tot een diploïde cel waaruit mitotisch weer een sporofyt ontstaat. Bij deze organismen bestaat dus een afwisseling van de diploïde sporofyt en de haploïde gametofyt.

Deze drie typen van seksuele levenscycli verschillen weliswaar wat betreft tijdstip van meiose en bevruchting, het fundamentele resultaat blijft echter hetzelfde: elke chromosoomcyclus van halvering en verdubbeling leidt tot genetische variatie bij de nakomelingen.

In dit practicum (het Basispracticum) wordt de meiose bestudeerd van een diploid organisme (de sprinkhaan). In het practicum Biodiversiteit van Planten worden organismen met andere levenscycli nader bekeken.

## GENETISCHE VARIABILITEIT

Meiose resulteert in genetische variatie bij de nakomelingen. Elke nakomeling erft een bepaalde combinatie van de genen van de twee ouders: er zijn zoveel combinaties mogelijk dat elke nakomeling genetisch uniek is. Drie processen dragen hieraan bij:

- **random segregatie**, ofwel toevallige verdeling van de homologe chromosomen bij de Meiose-I over de twee dochterkernen.
- **crossing – over** tussen de homologe chromosomen in de profase van de Meiose-I.
- **random bevruchting**, d.w.z. vorming van toevallige paren van gameten die door versmelting een diploïde cel opleveren.

## INTERFASE

Net zoals de mitose wordt ook de meiose voorafgegaan door een interfase. In de S-fase hiervan vindt replicatie plaats van de chromosomen en van de centrosomen, als voorbereiding op de meiose. Elk chromosoom bestaat nu uit twee identieke zusterchromatiden die bij de centromeren verbonden zijn.

## De MEIOSE wordt onderverdeeld in Meiose I en II

De verschillende fasen hiervan worden aangegeven met I of II achter hun naam.

In de Meiose-I worden de homologe chromosomen van elkaar gescheiden. Het resultaat is twee haploïde cellen. De Meiose-II is in feite een mitotische kerndeling, waarbij de chromatiden van elk chromosoom uit elkaar gaan. Het resultaat van Meiose-I en II: 4 haploïde cellen (waarbij elk chromosoom uit 1 chromatide bestaat).

**Profase-I:** duurt relatief lang en is complexer dan de profase van de mitose. De chromosomen beginnen te spiraliseren en worden zichtbaar als lange dunne draden. De chromosomen spiraliseren verder. De homologe chromosomen rangschikken zich paarsgewijs. Dit is een geleidelijk verlopend proces waarbij de paring begint op bepaalde punten, vaak eerst in de nabijheid van het centromeer. Langzamerhand paren ze over hun gehele lengte. Dit proces wordt **synapsis** genoemd. Tijdens de synapsis is de paring van de homologen erg precies: corresponderende basen en dus ook de overeenkomende genen liggen naast elkaar. De gepaarde homologen worden **bivalenten** genoemd omdat ze uit twee homologen bestaan of **tetraden** omdat ze uit vier chromatiden bestaan. Het aantal bivalenten is gelijk aan het haploïde aantal chromosomen van het organisme! De spiralisering gaat nog verder, de bivalenten zijn goed herkenbaar. Onder een goede microscoop is vaak zelfs te zien dat ze bestaan uit twee gepaarde chromosomen.

De homologe chromosomen liggen over hun gehele lengte gepaard, de chromatiden liggen op een of meerdere plaatsen over elkaar heen gekruist. Deze plaatsen heten **chiasmata** (enkelvoud chiasma). Deze overkruisingen helpen om de homologen bij elkaar te houden. Dit zijn ook de plaatsen van crossing-over: twee niet-zuster chromatiden wisselen gedeeltes uit van hun DNA door breuk en hereniging. Hierdoor ontstaat genetische variatie, omdat de beide homologe chromosomen door deze uitwisseling nu verschillen van de oorspronkelijke homologe chromosomen. Aan het einde van de profase-I zijn de bivalenten maximaal gespiraliseerd. De chiasmata die niet resulteerden in een crossing-over zijn weggeschoven naar de uiteinden van de bivalenten.

Tijdens de profase-I valt het kernmembraan uiteen en de nucleoli verdwijnen. De centrosomen schuiven op naar de polen, de spoeldraden hechten aan de kinetochoren en zorgen ervoor dat de chromosomen in het equatorvlak gaan liggen. De profase-I beslaat vaak zo'n 90% van de totale duur van de meiotische kerndeling.

**Metafase-I:** de bivalenten liggen in het equatorvlak van de cel. De beide homologen liggen, evenwijdig aan elkaar, elk aan één kant van het equatorvlak.

**Anafase-I:** de homologen van een bivalent gaan elk naar een andere pool, ze worden dus van elkaar gescheiden. Welke homoloog echter naar welke pool gaat is arbitrair: dit is random segregatie van de chromosomen en draagt bij aan de genetische variatie van de nakomelingen. De twee zusterchromatiden van elk chromosoom blijven nog aan elkaar vastzitten bij de centromeren, dit in tegenstelling tot de anafase van de mitose, waar de chromatiden uit elkaar gaan.

**Telofase-I:** aan elke pool bevindt zich nu het haploïde aantal chromosomen, maar elk chromosoom bestaat nog uit twee chromatiden. Er vindt cytokinese plaats, resulterend in twee dochtercellen. Bij sommige organismen despiraliseren de chromosomen en het kernmembraan en de nucleoli worden weer gevormd. Er is een interfase, maar er vindt geen replicatie plaats van de chromosomen. Vervolgens begint de Meiose-II met een profase. Bij veel organismen echter despiraliseren de chromosomen nauwelijks, maar gaat de anafase-I bijna onmiddellijk over in de metafase-II zonder of met een heel korte telofase-I, interfase-II en profase-II.

**Profase-II:** de spoelfiguur wordt weer gevormd en de chromosomen gaan in de richting van de equator.

**Metafase-II:** de chromosomen rangschikken zich in het equatorvlak. De chromatiden van elk chromosoom liggen, parallel aan elkaar, ieder aan een kant van de equator.

**Anafase-II:** de beide chromatiden van elk chromosoom gaan ieder naar een andere pool, net als bij de mitose. De zusterchromatiden van elk chromosoom vormen nu individuele chromosomen.

**Telofase-II:** de chromosomen despiraliseren. Er worden een nieuw kernmembraan en een nucleolus gevormd. De meiotische kerndelingen zijn voltooid. Nu volgt weer een cytokinese. Het eindresultaat van de meiotische celdeling zijn vier haploïde cellen die genetisch van elkaar verschillen door crossing-over en door random segregatie van de homologe chromosomen.



## **SNIJPREPARAAT TESTIS SPRINKHAAN**

We kijken naar de **MEIOSE** in **snijpreparaten** van de testis van de sprinkhaan *Locusta migratoria*. De sprinkhaan heeft 8 paar gewone chromosomen (**autosomen**): 1 paar metacentrisch, de rest acrocentrisch, plus de **geslachtschromosomen**. Het vrouwtje heeft twee X-chromosomen en het mannetje heeft het zogenaamde **X-0-mechanisme**. D.w.z. het mannetje heeft één X-chromosoom en geen Y-chromosoom, waardoor  $2n = 17$ .

De testis is in dunne coupes gesneden van 10 - 15  $\mu\text{m}$  en hierop is een specifieke DNA-kleuring toegepast. De coupes zijn vervolgens afgedekt met een harsachtige stof en een dekglas. In snijpreparaten is het meestal niet mogelijk om het juiste aantal chromosomen per kern en hun juiste vorm waar te nemen omdat vaak een deel van de kern en van de chromosomen is weggesneden. Houd hiermee rekening als je de verschillende stadia van de meiotische kerndelingen gaat bekijken.

Meiose speelt zich af in cellen die dienen voor de voortplanting. Deze zijn bij het mannetje te vinden in de testis. In de testis zijn duidelijk herkenbare groepen van cellen steeds in hetzelfde delingsstadium. Ook is het mogelijk dat al enkele cellen van een groep in het volgende of nog in het vorige stadium verkeren. In dicht bij elkaar gelegen groepen vind je meestal stadia die in de meiose vlak na elkaar volgen. Dit vergemakkelijkt het zoeken in deze soms wat moeilijk te interpreteren preparaten.

Aan de rand van de langwerpige testisbuis zijn groepjes cellen te zien met een heel donkere, dichte chromosoominhoud. Deze zijn altijd gelegen naast cellen die nog net in de interfase of al net in de vroege profase-I verkeren. Deze groepjes van **spermatogoniale** cellen leveren door mitotische delingen de cellen die vervolgens de meiose zullen ingaan.

Aan het dunner wordende uiteinde van de testisbuis zijn lange draden te zien. Dit zijn de staarten van de rijpe geslachtscellen, de **spermacellen**. Ze bestaan verder uit een kop en een middenstuk.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN**

**Op Blackboard vind je een powerpoint-presentatie van de MEIOSE. Deze mag je ter ondersteuning bij de practicumopdrachten gebruiken.**

### **Opdracht 3 (thuisopdracht)**

### **Opdracht 4 t/m 7**

Zoek in het preparaat alle gevraagde stadia (deze zijn **vet** gedrukt).

Individueel: Noteer per gevonden stadium de coördinaten. **Hiervoor is 60 min. beschikbaar.** Laat de gegevens door de assistent controleren.

Per paar praktikanten worden de opdrachten 4 t/m 7 gemaakt waarbij één van de opdrachten dezelfde fase(s) betreft, als eerder bij opdracht 2 (mitose) is getekend. Overleg je keuze met de assistent.

Maak van de in deze opdrachten genoemde stadia een **duidelijke** tekening.

Aanwijzingen voor het tekenen staan op blz. 60. **Per tekening is maximaal 20 min. practicumtijd beschikbaar.**

Voor de weer te geven details per stadium, zie de opdrachten hieronder.

#### Opdracht 4

Bekijk in de preparaten de opbouw van de testisbuizen en zoek naar groepen van cellen waarvan de kernen in hetzelfde delingsstadium verkeren. Teken de **interfase-I** en de **telofase-II** en een **spermacel**.

- Vermeld bij elk getekend stadium **alle relevante** kenmerken die hieronder genoemd worden:

kernmembraan, chromatine, chromosoom, bivalent, chromatide, plaats centromeer, equatorvlak, chiasma, kernspoel, kop, staart, tussenstuk

Vermeld bij elke tekening hoeveel chromosomen/bivalenten er theoretisch aanwezig zijn en uit hoeveel chromatiden ze bestaan.

#### Opdracht 5

Bekijk in de preparaten de opbouw van de testisbuizen en zoek naar groepen van cellen waarvan de kernen in hetzelfde delingsstadium verkeren. Teken een **vroege profase-I** en een **late profase-I** waarin duidelijk chiasmata te zien zijn.

- Vermeld bij elk getekend stadium **alle relevante** kenmerken die hieronder genoemd worden:

kernmembraan, chromosoom, bivalent, chromatide, plaats centromeer, equatorvlak, chiasma, X-chromosoom.

Vermeld bij elke tekening hoeveel chromosomen/bivalenten er theoretisch aanwezig zijn en uit hoeveel chromatiden ze bestaan.

#### Opdracht 6

Bekijk in de preparaten de opbouw van de testisbuizen en zoek naar groepen van cellen waarvan de kernen in hetzelfde delingsstadium verkeren. Teken de **metafase-I** en de **metafase-II**.

- Vermeld bij elk getekend stadium **alle relevante** kenmerken die hieronder genoemd worden:

chromosoom, bivalent, chromatide, plaats centromeer, equatorvlak, chiasma.

Vermeld bij elke tekening hoeveel chromosomen/bivalenten er theoretisch aanwezig zijn en uit hoeveel chromatiden ze bestaan.

Kenmerk meiose van de sprinkhaan: In de metafase-I liggen de homologen in het equatorvlak en de centromeren steken uit in de richting van de polen. In de metafase-II liggen de centromeren in het equatorvlak en liggen de chromatiden evenwijdig aan elkaar aan weerszijden van het equatorvlak. De chromosomen zijn al duidelijk begonnen met despiraliseren, ze zijn langer en dunner dan in de metafase-I.

#### Opdracht 7

Bekijk in de preparaten de opbouw van de testisbuizen en zoek naar groepen van cellen waarvan de kernen in hetzelfde delingsstadium verkeren. Teken de **anafase-I** en de **anafase-II**.

- Vermeld bij elk getekend stadium **alle relevante** kenmerken die hieronder genoemd worden:

chromosoom, bivalent, chromatide, plaats centromeer, equatorvlak, chiasma.

Vermeld bij elke tekening hoeveel chromosomen/bivalenten er theoretisch aanwezig zijn en uit hoeveel chromatiden ze bestaan. Geef ook het aantal per pool aan.

Kenmerk meiose van de sprinkhaan: in de anafase-I en de anafase-II stoten de chromatiden elkaar af. Er komen vnl. acrocentrische chromosomen voor. Deze leveren een typisch chromosoompatroon op. Geef aan waarom.

## Presentaties Mitose en Meiose

Per gang wordt een fase uit de mitose/meiose, mais of gekoppelde genen gepresenteerd. In de presentaties die over mitose en meiose gaan moet duidelijk naar voren komen wat de overeenkomsten en de verschillen zijn tussen mitose en meiose. Hiervoor worden duidelijke, **grote** tekeningen gemaakt op overheadvellen.

Er worden vragen gemaakt door medestudenten, die door de presenterende groep beantwoord worden.

Een dag van te voren wordt het presentatieschema en de opdrachten bekend gemaakt.

### AANWIJZINGEN VOOR HET TEKENEN

Verdeel een tekenvel volgens het schema hieronder. Teken alleen de omtrekken van de chromosomen en met een strakke lijn, dus niet inkleuren of schaduwen. Teken vooral niet te klein. “Zien” is nooit objectief, wat je denkt te zien is altijd afhankelijk van kennis en ervaring. Gebruik bij de interpretatie van wat je ziet je kennis van de mitose en meiose en laat dit in je tekening tot uitdrukking komen. Probeer d.m.v. focussen het verloop van de chromosomen in het preparaat te volgen. Een goede instelling van de microscoop is hierbij uiterst belangrijk. Geef met een rechte strakke lijn (liniaal!) aan hoe elk onderdeel van je tekening heet. Geef in het **rechtervak** een korte **beschrijving** van het getekende stadium. Vermeld bij elk stadium: hoeveel chromosomen (eventueel per pool) er theoretisch aanwezig zijn en uit hoeveel chromatiden ze bestaan.

<p><b>ONDERWERP:</b> Mitose</p> <p><b>ORGANISME:</b> <i>Vicia faba</i> (tuinboon)</p> <p><b>ONDERDEEL VAN HET ORGANISME:</b> WORTELTOP</p> <p><b>TYPE PREPARAAT:</b> kneuspreparaat/vast preparaat</p> <p><b>VERGROTING:</b> bv. 10 x 40</p> <p><b>TYPE TEKENING (zie blz 48)</b></p>	<p><b>NAAM:</b></p> <p><b>Tafelnummer:</b></p> <p><b>Naam practicumpartner:</b></p> <p><b>Tafelnummer:</b></p> <p><b>Beschrijving stadium</b></p>
<p><b>INTERFASE</b></p> <p>kernmembraan</p> <p>chromatine</p> <p>etc.</p>	<p>In de interfase vindt verdubbeling van de chromosomen .....etc.</p> <p>per pool<sup>x</sup> (zie onder)</p> <p>... chromosomen, elk bestaande uit ... chromatiden.</p> <p>Aantal polen<sup>x</sup> en totaal aantal chromosomen<sup>x</sup>.</p>
<p><b>PROFASE</b></p>	

<sup>x</sup> indien relevant

# MENDELGENETICA

## ONAFHANKELIJK OVERERVENDE EIGENSCHAPPEN

### VOORBEREIDING

- Campbell H. 14. t/m 14.3 en je college-aantekeningen.
- Test je kennis met de concept check en self quiz van deze hoofdstukken.
- Onderstaande inleiding.

Neem de tijd voor deze voorbereiding, dat is niet alleen nodig voor de practica, maar ook voor het tentamen. Tijdens de practica heb je voor deze voorbereidingen geen tijd!

De moderne genetica begint bij de experimenten van Gregor Mendel (1822-1884). Door kruisingen uit te voeren tussen erwtenplanten met verschillende eigenschappen (groene of gele erwten die glad of gerimpeld waren, paarse of witte bloemen, etc.) en de uitkomsten hiervan kwalitatief en kwantitatief nauwkeurig te analyseren, ontdekte Mendel enkele basisprincipes van de genetica. Hij had het geluk dat de eigenschappen die hij onderzocht bepaald werden door genen die op verschillende chromosomen liggen, zoals later kon worden aangetoond. Dit noemen we **onafhankelijk overervende of niet-gekoppelde eigenschappen**. Zonder dat geluk (of was het een briljant inzicht?) had hij nooit tot zijn ontdekkingen kunnen komen.

Mendel selecteerde voor zijn studies zeven kenmerken die elk in twee verschillende vormen konden voorkomen. Hiermee voerde hij allereerst **monohybride kruisingen** uit. Dit zijn kruisingen tussen planten die slechts in één kenmerk van elkaar verschillen. Bijv. een plant met paarse bloemen en een met witte bloemen. Ook voerde hij kruisingen uit tussen planten met combinaties van twee kenmerken: **dihybride kruisingen**. Bijv. een plant met paarse bloemen en groene erwten en een plant met witte bloemen en gele erwten.

Deze planten zijn de **ouder- of P-generatie** (parents). De ene ouder (parent) is per definitie homozygoot dominant en de andere homozygoot recessief (zie voor de verklaring van deze termen verderop in de tekst). De nakomelingen hiervan zijn de **F1-generatie** (first filial generation). Deze F1-generatie bleek steeds te bestaan uit planten die er voor de gebruikte kenmerken hetzelfde uitzagen: de F1 was **uniform**. Als hij vervolgens kruisingen uitvoerde tussen de planten van de F1-generatie onderling, dan traden er in de nakomelingen daarvan, de **F2-generatie**, wel verschillen op tussen de planten.

Mendel noemde de kenmerken die in de F1 weer te voorschijn kwamen **dominant**, de kenmerken die niet meer waren te zien noemde hij **recessief**. Bijv. groene erwten x gele erwten: de F1 heeft alleen gele erwten, geel is dus dominant en groen recessief.

In de F2 echter bleken niet alle planten gele erwten te hebben, een deel had weer groene erwten en wel in de verhouding geel : groen = 3 : 1. Bij een kruising met twee kenmerken trad hetzelfde verschijnsel op: de F1 was weer uniform, de F2 daarentegen vertoonde weer een uitsplitsing van de kenmerken die in de diverse mogelijke combinaties voorkwamen in de verhouding van 9 : 3 : 3 : 1. Bijv. groene erwt, paarse bloem (wt) x gele erwt, witte bloem (mutant). De F1 heeft dan gele erwten en paarse bloemen, de F2 splitst als volgt uit:

gele erwt, paarse bloem : gele erwt, witte bloem : groene erwt, paarse bloem : groene erwt, witte bloem = 9 : 3 : 3 : 1.

Deze getalsverhoudingen bleken steeds weer terug te keren. Mendel ontdekte dat deze vaste getalsverhoudingen alleen verklaard konden worden als er van werd uitgegaan dat elk kenmerk, dus bloemkleur, kleur van de erwt, vorm van de erwt etc. werd bepaald door twee factoren, waarvan elke ouder er één levert. Voor elk kenmerk erft een nakomeling dus twee **allelen** (definitie allel=alternatieve versie van gen dat onderscheidende fenotypische effecten heeft). Een erfelijk kenmerk noemen we nu een **gen**, de allelen zijn alternatieve vormen van een gen. Zo kan bijv. het gen voor bloemkleur in verschillende vormen of allelen voorkomen, zoals wit of paars. In bovenstaande kruising is het allel voor paars dominant, het allel voor wit is recessief.

Uit deze experimenten kunnen de drie **Wetten van Mendel** worden afgeleid.

- **De eerste Mendelwet** is de **Uniformiteitswet**: als je bij een kruising uitgaat van twee soortechte ouders die in één of enkele kenmerken van elkaar verschillen, dan vertonen alle leden van de F1 slechts één van de twee vormen van elk kenmerk, de andere vorm is niet terug te vinden. Hieruit volgt dat alle leden van de F1 er hetzelfde uitzien, dus uniform zijn.
- **De tweede Mendelwet** is het principe van de **segregatie (uiteengaan) van de allelen**. Dat wil zeggen dat bij de vorming van de gameten of geslachtscellen van een organisme, de allelen van een gen in verschillende gameten terechtkomen. Dit proces wordt duidelijk gemaakt bij de bestudering van de meiose. In de tijd van Mendel echter was dit proces nog onbekend, hij heeft nooit van zijn leven een chromosoom gezien.
- **De derde Mendelwet** is de wet van de **onafhankelijk segregerende genen**. Dat wil zeggen dat de allelen van niet-gekoppelde kenmerken onafhankelijk van elkaar over de gameten worden verdeeld. Al de mogelijke combinaties van allelen blijken in de gameten voor te komen.

Voordat je zelf een paar kruisingen kunt gaan uitwerken, moeten nog een paar begrippen duidelijk gemaakt worden :

Genen worden weergegeven met symbolen die verwijzen naar het kenmerk dat ze bepalen en waarin ze afwijken van de standaardkenmerken van een organisme. Bijv. een standaard of **wildtype** erwt is groen, een afwijkende of **mutante** kleur is geel. Dit kenmerk wordt weergegeven met Y (yellow). Y staat voor het dominante allel dat de gele (mutante) kleur veroorzaakt, y voor het recessieve allel dat de groene (wildtype) kleur veroorzaakt.

Een wildtype erwt is glad, een mutante vorm is gerimpeld. R (rough) staat voor het dominante allel dat een gerimpelde (mutante) erwt veroorzaakt, r voor het recessieve allel dat een gladde (wildtype) erwt veroorzaakt. Zo is P het symbool voor het allel voor een paarse bloemkleur en p voor wit.

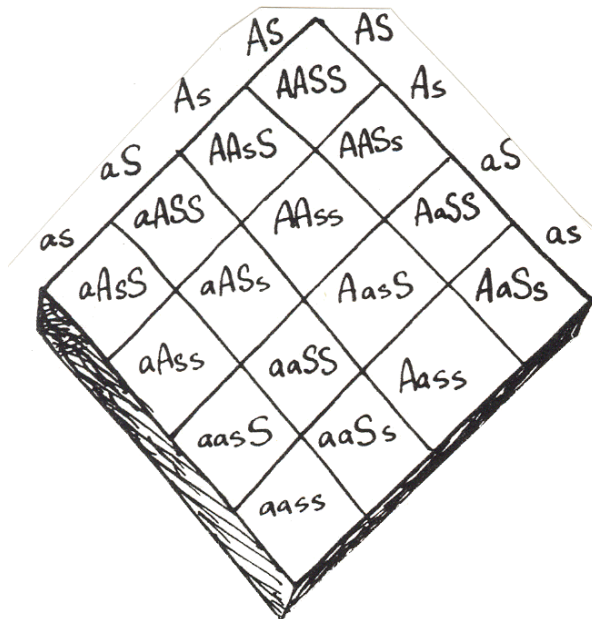
Een mutatie kan dus dominant zijn, het wildtype is dan recessief. Maar een mutatie kan ook recessief zijn, het wildtype is dan dominant.

Y, y, R, r, P en p zijn symbolen die het **genotype**, dus de erfelijke aanleg, van de plant weergeven. De kenmerken die hieruit voortvloeien, zoals kleur en vorm van de erwt en kleur van de bloem, noemen we het **fenotype** van de plant.

De erwt is een diploide plant. Dat betekent dat elk chromosoom tweemaal voorkomt. We noemen dit **homologe** (=gelijke) chromosomen. Elk kenmerk wordt vertegenwoordigd door twee allelen: elk op één van de twee homologe chromosomen. Komen beide allelen in dezelfde vorm voor, bijv. allebei dominant of allebei recessief, dan noemen we de plant voor dit kenmerk **homozygoot**. Is één allel in de dominante vorm en de andere in de recessieve vorm aanwezig, dan noemen we de plant voor dit kenmerk **heterozygoot**.

Als organismen zich voortplanten, dan vormen ze gameten. Dit zijn geslachtscellen die van elk paar homologe chromosomen slechts één exemplaar bevatten. Van elk kenmerk of gen, bevatten ze dus ook maar één allel. De verdeling van de allelen over de gameten is willekeurig, met dien verstande dat als bijv. allel y van het ene homologe chromosoom in de ene gameet terecht komt, het tweede allel, bijv. Y, van het andere homologe chromosoom dan in de andere gameet terecht komt. Er gaan geen allelen verloren: de **frequentie van de allelen** blijft in de nieuwe generatie hetzelfde als in de oudergeneratie.

De combinaties van de gameten van de ene ouder met die van de andere ouder wordt weergegeven in een schaakbordpatroon. Dit noemen we een **kruisingsschema**.



### **ZEAMAYS: INTERACTIE VAN ONAFHANKELIJK OVERERVENDE GENEN**

Maïs is een genetisch goed onderzocht cultuurgewas. Veel mutaties zijn bekend van stengel, bladeren, kolf en korrels. Zo zijn er kleurmutanten waarvan de stengels en de bladeren rood zijn, er zijn minivormen van de kolf en de korrels kunnen verschillende kleuren hebben en glad zijn of gerimpeld. Tijdens dit practicum zullen we uitsluitend kruisingen bekijken met kenmerken die de korrels betreffen.

De voortplanting van maïs verloopt als bij de meeste zaadplanten. Het is een diploïd organisme ( $2n = 20$ ). Elke plant heeft zowel vrouwelijke als mannelijke bloemen. De mannelijke bloeiwijze zit als een pluim bovenaan de plant, de vrouwelijke bloem is lager geplaatst. Wordt deze bevrucht, dan ontstaat hieruit de maïskolf. Kijken we bij een kruising alleen naar de korrels van de kolf, dan zijn de korrels van de kolf,

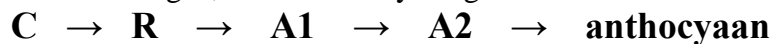
ontstaan na de bevruchting, de leden van de volgende generatie. Uit deze korrels immers kunnen weer nieuwe maïsplanten groeien.

De maïskorrel is opgebouwd uit een **embryo** in aanleg en het **endosperm** dat het reservevoedsel bevat voor de ontwikkeling van de kiemplant uit het embryo na kieming. De buitenste laag van het endosperm heet de **aleuronlaag**. De korrel is geheel omgeven door een hard beschermend huidje, het **pericarp**.

De vorm van de maïskorrel kan door verschillende genen worden beïnvloed. De wildtype korrel is mooi glad van buiten. Het gen Su (sugary) zorgt in homozygoot recessieve vorm (susu) voor een korrel die na droging krimpt en rimpelig wordt. Dit komt doordat deze mutatie het zetmeel in de korrel omzet in suiker. Bij droging verliest deze maïskorrel zijn vorm. Eenzelfde effect heeft de mutatie Sh (shrunken).

#### **Su en Sh zijn echter twee verschillende genen!**

Het wildtype endosperm is wit. Er bestaat een gele kleurmutatie die dominant is. Da wordt als volgt voorgesteld: het allel voor geel is Y (yellow) en het allel voor wit is y. De aleuronlaag kan rood kleuren door de vorming van **anthocyanen**, dit zijn pigmenten. Hierbij zijn meerdere genen betrokken: C, R, A1 en A2. Deze vier genen zijn nodig voor de vorming van anthocyaan. We noemen dit **complementaire genen** (=elkaar aanvullende genen). Als van elk van deze vier genen tenminste één allel in dominante vorm aanwezig is, wordt anthocyaan gevormd:



Het aleuron is dan rood, de korrel ziet er rood uit. Zijn van één of meerdere van deze vier genen beide allelen in recessieve vorm aanwezig, dan blijft het aleuron kleurloos. De korrel is dan kleurloos als het endosperm yy is of geel als het endosperm Y is. Is het aleuron gekleurd, dan is de kleur van het endosperm niet te zien.

Het gen C, één van de complementaire genen, heeft naast C en c nog een derde allel: C-inhibitor. Dit allel is dominant over C en voorkomt (inhibeert) de werking van het dominante allel C. Daardoor kan C niet meedoen aan het maken van rood anthocyaan. Het aleuron blijft kleurloos.

**Als er sprake is van interactie tussen genen zoals bij complementaire genen of van bijzondere allelen zoals C-inhibitor, dan vind je van de Mendelwetten afwijkende getalsverhoudingen in de F2! Zoek op: Epistasie in Campbell p. 319.**

Herinneren we ons de wetten van Mendel, dan geldt voor een monohybride kruising in de F2 een verhouding tussen de fenotypen van 3 : 1. Bij een dihybride kruising is de verhouding 9 : 3 : 3 : 1. Dit geldt als we de uniforme F1 onderling kruisen. Er is echter ook een ander type kruising mogelijk, de **toetskruising** (**terugkruising**, **testcross**) genaamd. Bij zo'n kruising wordt de F1 teruggekruist met de homozygoot recessieve ouder. De verhouding tussen de fenotypen in de F2 van een monohybride kruising wordt dan 1 : 1. Bij een dihybride kruising is de verhouding 1 : 1 : 1 : 1. Dit type kruising wordt toegepast als je van een organisme wilt weten in welke vorm (dus als welke allelen) bepaalde genen voorkomen.

Bijv. Je hebt een plant met gele erwten en paarse bloemen en je wilt weten of de plant YYPP is of YYPp of YyPP of YyPp. Kruis je deze plant terug met yypp (toetskruising), dan kun je uit de onderlinge verhouding van de fenotypen bij de nakomelingen direct het genotype van de onbekende ouder afleiden.



## **PRACTICUMOPDRACHTEN**

### **KRUISINGEN ZEA MAIS**

We gaan kolven bekijken die het resultaat zijn van kruisingen met twee van de genen die hierboven genoemd zijn. De P-generatie bestaat uit een ouder die voor de betreffende genen homozygoot dominant is en de andere ouder die voor deze genen homozygoot recessief is. De F1-generatie is vervolgens gekruist. De kolf die je gaat bekijken is de F2. Van alle korrels moet het fenotype worden bepaald. Het is daarbij van belang dat je bij een dihybride kruising de twee kenmerken steeds tesamen bekijkt voor elke korrel.

De bedoeling is dat je van deze kolf te weten komt:

- of het een kruising is van de F1 onderling of een toetskruising
- of er sprake is van afwijkende getalsverhoudingen in de F2 en zo ja, wat daarvan de oorzaak is

Optioneel:

- of de getalsverhoudingen die je bij je kolf gevonden hebt in statistisch opzicht kloppen met de getalsverhoudingen die je volgens het kruisingsschema bij jouw type kolf verwacht te vinden; dit reken je uit met behulp van de Chi-square test. Zie volgende blz.

**Op het etiket van de kolf staat vermeld met welk(e) gen(en) er gekruist is. Ook de bijbehorende fenotypen staan erop.**

Alle andere genen die aan het fenotype kunnen bijdragen zijn homozygoot dominant aanwezig; deze laten we verder buiten beschouwing.

#### **Opdracht 1: (per paar, 45 min.)**

- a. Wat zijn de fenotypen van de korrels van de F2 en in welke aantallen komen ze voor? (Zet géén stippen op de korrels!).
- b. In welke verhouding komen de verschillende fenotypen voor? Is het een kruising van de F1 onderling of een toetskruising?
- c. Wat waren de genotypen van de beide ouders van de F2 (dus van de F1)?
- d. Geef de gameten van de F1 en de genotypen van de F2 in een kruisingsschema weer.
- e. Hoe zien de verschillende genotypen van de F2 er fenotypisch uit?
- f. Komt de verhouding tussen de verschillende fenotypen van de F2 overeen met de standaardverhouding volgens Mendel?
- g. Zo nee, hoe kun je dit verklaren?
- h. Pas de Chi-square test toe op je eigen resultaten. Formuleer eerst de hypothese die je hiermee gaat toetsen. Wordt de hypothese verworpen of aangenomen?
- i. Wat is de conclusie, m.a.w. uit wat voor type kruising is de kolf ontstaan?

## CHI – SQUARE TEST

De Chi-square test is een statistische test die gebruikt wordt om gevonden getallen te vergelijken met getallen die je verwacht volgens een specifieke wetenschappelijke hypothese. Bijv. als je bij een kruising volgens de Wetten van Mendel een getalsverhouding verwacht van 3 : 1, dan kun je met de Chi-square toetsen of de verhouding die je gevonden hebt tussen de fenotypen in de kruising statistisch met de verwachte verhouding overeenkomt. De uitkomst van deze Chi-square test vertelt dan iets over het al of niet juist zijn van de theoretische verwachting, dus over de hypothese of over de kwaliteit van de uitgevoerde kruising.

Bij de Chi-square test hoort per definitie een nulhypothese: deze gaat ervan uit dat de gevonden en de verwachte verhouding tussen de getallen overeenkomen.

De Chi-square is de som van de kwadraten van de verschillen tussen de gevonden (observed) en de verwachte (expected) aantallen, oftewel de deviatie (d), gedeeld door de verwachte aantallen per klasse (bijv. per fenotype) : **X-SQUARE** =  $\Sigma (o-e)^2 / e$

N.B. Bij de Chi-square mogen alleen getallen worden gebruikt, geen percentages of ratio's !

Stel dat een maiskolf (monohybride) 336 rode en 104 gele korrels heeft, in totaal 440 korrels.

Je wilt een uitspraak doen over de genotypen van de ouders van deze kolf. De hypothese is dat deze kolf is ontstaan door een kruising van ouders die allebei heterozygoot waren voor een kleurgene dat in dominante vorm een rode korrel geeft en in recessieve vorm een gele korrel. De verhouding tussen de beide fenotypen moet volgens Mendel dan 3 : 1 zijn. De nulhypothese is dat de gevonden verhouding ook 3 : 1 is. Om te bepalen of deze nulhypothese al dan niet moet worden verworpen, rekenen we de Chi-square test uit.

Hiertoe moeten we eerst het verwachte aantal per fenotype bepalen. Als de ratio 3 : 1 is en het totale aantal is 440, dan zijn de verwachte aantallen per fenotype  $\frac{3}{4} \times 440 = 330$  rode korrels en  $\frac{1}{4} \times 440 = 110$  gele korrels. Bereken nu de Chi-square volgens de gegeven tabel.

	rode korrels	gele korrels
Observed (o)	336	104
Expected (e)	$\frac{3}{4} \times 440 = 330$	$\frac{1}{4} \times 440 = 110$
Deviation (o-e)	$336 - 330 = 6$	$104 - 110 = -6$
Deviation <sup>2</sup> (d <sup>2</sup> )	$6 \times 6 = 36$	$-6 \times -6 = 36$
d <sup>2</sup> / e	$36/330 = 0,109$	$36/110 = 0,327$
Chi-square = $\Sigma d^2 / e$	$= 0,109 + 0,327 = 0,436$	

N.B. Schrijf de berekeningen helemaal uit !

Maar wat betekent nu dit getal? Om dit te weten, moeten we eerst het volgende vaststellen:

- Stel het aantal vrijheidsgraden vast (df = degrees of freedom). Dit is het aantal klassen (fenotypen) minus 1. In bovenstaand voorbeeld dus  $2 - 1 = 1$ .  
Het aantal vrijheidsgraden geeft aan waar je in de tabel met waarden voor de Chi-square moet zoeken om een uitspraak te kunnen doen.
- Stel de grens vast van de waarden van de Chi-square waarbinnen je mag concluderen dat de nulhypothese juist is. Deze grens is bij biologische proeven vastgesteld op  $p = 0.05$ . De p-waarde is de probability of waarschijnlijkheid dat we de nulhypothese ten onrechte verwerpen. Als we uitgaan van  $p = 0.05$ , dan is er ten hoogste 5% kans dat we concluderen dat er een verschil is tussen de gevonden en de verwachte verhouding tussen de klassen (fenotypen), terwijl dat in feite niet zo is.

Kijk nu in de onderstaande Chi-square-tabel bij het juiste aantal vrijheidsgraden en zoek de Chi-square waarde op. Is de bijbehorende p groter of kleiner dan 0.05? Trek hieruit je conclusie ten aanzien van de nulhypothese.

df	probability (p)										
	0.95	0.90	0.80	0.70	0.50	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001
1	0.004	0.02	0.06	0.15	0.46	1.07	1.64	2.71	3.84	6.64	10.83
2	0.10	0.21	0.45	0.71	1.39	2.41	3.22	4.60	5.99	9.21	13.82
3	0.35	0.58	1.01	1.42	2.37	3.66	4.64	6.25	7.82	11.34	16.27
4	0.71	1.06	1.65	2.20	3.36	4.88	5.99	7.78	9.49	13.28	18.47
5	1.14	1.61	2.34	3.00	4.35	6.06	7.29	9.24	11.07	15.09	20.52
6	1.63	2.20	3.07	3.83	5.35	7.23	8.56	10.64	12.59	16.81	22.46
7	2.17	2.83	3.82	4.67	6.35	8.38	9.80	12.02	14.07	18.48	24.32
8	2.73	3.49	4.59	5.53	7.34	9.52	11.03	13.36	15.51	20.09	26.12
9	3.32	4.17	5.38	6.39	8.34	10.66	12.24	14.68	16.92	21.67	27.88
10	3.94	4.86	6.18	7.27	9.34	11.78	13.44	15.99	18.31	23.21	29.59

hypothese : niet verworpen

↑  
 verworpen



# GEKOPPELDE GENEN EN GESLACHTS- GEKOPPELDE OVERERVING

## VOORBEREIDING

- Campbell: H. 15. t/m 15.3 en je college-aantekeningen.
- Test je kennis met de concept check en self quiz van deze hoofdstukken.

Neem de tijd voor deze voorbereiding, dat is niet alleen nodig voor de practica, maar ook voor het tentamen. Tijdens de practica is er voor deze voorbereidingen geen tijd!

Bijna een eeuw geleden was Thomas Hunt Morgan als eerste in staat om aan te tonen dat een specifiek gen gelegen was op een specifiek chromosoom. Hij deed dit bij het in de genetica tot op de draad toe onderzochte fruitvliegje, *Drosophila melanogaster*. De fruitvlieg beschikt over eigenschappen die het bijzonder geschikt maken om er erfelijkheidsproeven mee uit te voeren. De levenscyclus van dit gemakkelijk te kweken vliegje duurt slechts 10 dagen en een paartje brengt 100-200 nakomelingen voort. Ook heeft het slechts vier paar chromosomen waardoor genetische analyse eenvoudig is. Tenslotte zijn er vele morfologische mutanten bekend.

Het wildtype vliegje heeft roodbruine ogen. Een jaar lang kweekte Morgan fruitvliegjes in de hoop een mutant te vinden en de eerste die hij vond was een mannetje met witte ogen. Deze kruiste hij met een wildtype vrouwtje, met als resultaat nakomelingen met roodbruine ogen. Kruiste hij deze nakomelingen weer met elkaar, dan kwam er voor de totale nakomelingschap de klassieke 3 : 1 verhouding uit van roodbruin : wit. Echter, alleen mannelijke nakomelingen hadden óf witte óf roodbruine ogen; de vrouwelijke nakomelingen hadden allemaal roodbruine ogen. Dus op de één of andere manier was de mutatie voor witte ogen gekoppeld aan het geslacht. Later onderzoek leerde dat deze mutatie en daarmee dus het gen voor de oogkleur inderdaad is gelegen op het X-chromosoom.

De mutatie voor witte ogen is recessief. Het mannetje heeft één X-chromosoom en dus maar één allel: de witte mutatie komt tot uiting. Het vrouwtje heeft twee X-chromosomen waarvan in bovengenoemde kruising in elk geval één allel wildtype is. Hierdoor hebben alle vrouwelijke nakomelingen roodbruine ogen. De ongewone uitkomst was hiermee verklaard. Voer je de **reciproke** (omgekeerde) kruising uit, d.w.z. een wildtype mannetje met een vrouwtje met witte ogen, dan vind je alleen vrouwtjes met roodbruine ogen en mannetjes met witte ogen terug. Bij geslachtsgekoppelde overerving leveren de reciproke kruisingen een verschillend resultaat op!

Morgan vond nog meer mutanten, zoals één met gekrulde vleugels en één met een zwarte lichaamskleur. Als hij met deze twee mutaties kruisingen uitvoerde, dan vond hij nooit de klassieke mendelverhoudingen terug. Hij ontdekte dat deze twee kenmerken in de kruisingen de neiging hadden om weer tesamen in een nakomeling terug te keren i.p.v. onafhankelijk van elkaar over te erven zoals de Derde wet van Mendel voorschrijft. Ze worden dus vaak als ‘eenheid’ overgebracht van ouders naar nakomelingen. Dit kan alleen verklaard worden als ze allebei op hetzelfde chromosoom liggen. We spreken dan van **gekoppelde genen**.

Logischerwijs zou deze gezamenlijke overerving in alle gevallen zo moeten verlopen, ware het niet dat er **recombinatie van genen** plaatsvindt. Denk aan de crossing-overs die in de meiose plaatsvinden (zie “De meiotische kerndeling”).

Sturtevant, een leerling van Morgan, postuleerde dat als crossing-over **ad random**, dus volgens toeval gebeurt, de waarschijnlijkheid van het optreden van crossing-over tussen twee genen recht evenredig is met de afstand tussen die twee genen op het chromosoom.

Het is gemakkelijk in te zien dat hoe dicht twee genen op één chromosoom bij elkaar liggen, hoe kleiner de kans is dat er precies tussen die twee genen crossing-over optreedt. We zien dan ook dat hoe dicht twee genen bij elkaar liggen, hoe vaker deze twee genen tesamen overerven. En dus ook hoe verder ze van elkaar weg liggen, hoe vaker er crossing-over plaatsvindt en daarmee recombinatie van genen. De frequentie van dit laatste drukken we uit in **Recombinatiepercentage**:

$$Rc = \frac{\text{aantal recombinanten}}{\text{aantal nakomelingen}} \times 100\% .$$

Dit is een maat voor de relatieve afstand tussen twee genen op een chromosoom. Als hommage aan Thomas H. Morgan drukken we het Rec.% uit in **MorganEenheden**. Andere benamingen hiervoor zijn **Map Units** en **Centimorgans**. Eén mapunit (eenheid van afstand) wordt gedefinieerd door 1% recombinatiefrequentie (=1 Centimorgan).

Gegevens over recombinatiefrequenties tussen genen worden gebruikt om de volgorde van genen op een chromosoom te bepalen. Dit gaat als volgt:

Nemen we als voorbeeld drie genen bij *Drosophila*: b=brown (bruine lichaamskleur), vg=vestigial (gekrulde haren) en cn=cinnabar (helderrode ogen). Ze liggen alle drie op het X-chromosoom. Er is dus sprake van geslachtsgekoppelde overerving.

Bij *Drosophila* vindt er bij de mannetjes géén recombinatie plaats tussen het X- en het Y-chromosoom. Het Y-chromosoom is nl. “genetisch leeg”. Er liggen geen genen op.

Bij het opzetten van een kruising gaan we altijd uit van een homozygoot dominante en een homozygoot recessieve ouder (zie “Mendelgenetica”).

Vrouwtje: b/b vg/vg cn/cn x mannetje: b<sup>+</sup>/Y vg<sup>+</sup>/Y cn<sup>+</sup>/Y (Y=Y-chromosoom)

Voor we een kruising met *Drosophila* gaan uitwerken, nog een paar opmerkingen over de notatie van genen. Bij mais hebben we gezien dat dominante allelen werden weergegeven met een hoofdletter en recessieve allelen met een kleine letter. Door alle genetici werden en worden recessieve allelen met een kleine letter weergegeven, dat is dus geen probleem. De notatie van dominante allelen echter verschilt en is afhankelijk van het organisme.

De manier van noteren hing af van degenen die als eersten genetica bedreven met een bepaald organisme. Ook is de geschiedenis van dat organisme van belang. Mais bijv. is al zolang in cultuur dat nauwelijks nog te achterhalen was hoe de oorspronkelijke mais eruit zag. Hier was voor veel allelen niet meer te bepalen of ze “wildtype” waren of gemuteerd. Alleen dominant en recessief zijn te herkennen, aangegeven met hoofd- of kleine letter.

Bij *Drosophila* ligt dat heel anders. Het wildtype is nauwkeurig bekend en de eerste onderzoekers, zoals Morgan en Sturtevant, hebben deze allelen aangegeven met een

“+” van wildtype. Deze notatie is nog steeds gangbaar en die zullen wij dan ook gebruiken. Een mutatie kan recessief zijn (aangegeven met een kleine letter) of dominant (aangegeven met een hoofdletter). Oorspronkelijke of wildtype-allelen worden dus aangegeven met een “+”, vaak met de lettercode van het betreffende gen erbij, zoals  $b^+$ . Deze notatie geeft aan dat de mutatie recessief is (want aangegeven met een kleine letter) en het wildtype dus dominant. Zie je daarentegen bijv. de notatie  $N^+$ , dan weet je dat de mutatie dominant is en het wildtype dus recessief.

In onderstaande kruising staat bijv. ook  $vg/+$ . Dit betekent dat één allel wildtype is en dat het andere allel een recessieve mutatie heeft. Alle drie mutaties waarmee we in deze kruising werken zijn recessief, het wildtype is dus steeds dominant.



De F1 ziet er als volgt uit:

Vrouwtjes:  $b/+ \quad vg/+ \quad cn/+$  De vrouwtjes zijn fenotypisch wildtype.

Mannetjes:  $b/Y \quad vg/Y \quad cn/Y$  De mannetjes zijn fenotypisch mutant.

Vervolgens kruisen we de F1 onderling:  $b/+ \quad vg/+ \quad cn/+ \times b/Y \quad vg/Y \quad cn/Y$ .

### Kruisingsschema

Gameten vrouw 	$b \quad vg \quad cn$	$+$ $+$ $+$	$b \quad + \quad +$	$b \quad vg \quad +$	$b \quad + \quad cn$	$+$ $vg \quad cn$	$+$ $vg \quad +$	$+$ $+$ $cn$
Gameten man 	$b \quad vg \quad cn$	$+$ $+$ $+$	$b \quad + \quad +$	$b \quad vg \quad +$	$b \quad + \quad cn$	$+$ $vg \quad cn$	$+$ $vg \quad +$	$+$ $+$ $cn$
$b \quad vg \quad cn$	$b \quad vg \quad cn$ (319)	$b \quad vg \quad cn$ (322)	$b \quad vg \quad cn$ (113)	$b \quad vg \quad cn$ (78)	$b \quad vg \quad cn$ (17)	$b \quad vg \quad cn$ (121)	$b \quad vg \quad cn$ (14)	$b \quad vg \quad cn$ (69)
$Y$	$Y$ (334)	$Y$ (319)	$Y$ (109)	$Y$ (73)	$Y$ (16)	$Y$ (119)	$Y$ (15)	$Y$ (72)
Fenotypen	“ $b \quad vg \quad cn$ ”	“+”	“ $b$ ”	“ $b \quad vg$ ”	“ $b \quad cn$ ”	“ $vg \quad cn$ ”	“ $vg$ ”	“ $cn$ ”
Totaal:	(653)	(641)	(222)	(151)	(33)	(240)	(29)	(141)

( “ ” is een korte manier om het fenotype aan te geven, dus voor welke kenmerken het fenotype afwijkt van het wildtype).

Het totaal aantal nakomelingen is 2110, waarvan 1053 vrouwtjes en 1057 mannetjes.

Om de recombinatiefrequenties tussen de verschillende genen te kunnen berekenen moet eerst de beslissing worden genomen of de vrouwtjes en mannetjes bij elkaar mogen worden opgeteld. Kijken we naar het kruisingsschema, dan zien we, dat dezelfde fenotypen bij zowel de mannetjes als de vrouwtjes voorkomen. Ze mogen dus inderdaad bij elkaar worden opgeteld. Voer je bijv. echter een kruising uit waarbij van de nakomelingen alle mannetjes fenotypisch wildtype zijn, terwijl bij de vrouwtjes wel alle fenotypen voorkomen, dan kun je de recombinatiefrequenties alleen berekenen aan de hand van de vrouwtjes! Heb je niet te maken met geslachtsgekoppelde overerving dan mag je uiteraard altijd de vrouwtjes en mannetjes

bij elkaar optellen omdat er dan nooit verschil is in de fenotypen tussen mannetjes en vrouwtjes.

De volgorde van de genen b, vg en cn op het X-chromosoom kunnen we bepalen door de recombinatiefrequentie tussen de verschillende genen te bepalen.

Dit gaat als volgt:

Recombinatie% tussen b en vg:

Het oudertype voor deze twee genen was b-vg en  $b^+vg^+$ . De recombinanten zijn dus  $b-vg^+$  en  $b^+-vg$ . Het aantal recombinanten is  $222 + 33 + 240 + 29 = 524$ .

Het recombinatie% is  $524/2110 \times 100\% = 24,8\%$

Recombinatie% tussen b en cn:

Het oudertype voor deze twee genen was b-cn en  $b^+cn^+$ . De recombinanten zijn dus  $b-cn^+$  en  $b^+-cn$ . Het aantal recombinanten is  $222 + 151 + 240 + 141 = 754$ .

Het recombinatie% is  $754/2110 \times 100\% = 35,7\%$ .

Recombinatie% tussen vg en cn:

Het oudertype voor deze twee genen was vg-cn en  $vg^+cn^+$ . De recombinanten zijn dus  $vg-cn^+$  en  $vg^+-cn$ . Het aantal recombinanten is  $151 + 33 + 29 + 141 = 354$ .

Het recombinatie% is  $354/2110 \times 100\% = 16,8\%$ .

Uit deze berekeningen blijkt dat b en cn het verst uit elkaar liggen; vg ligt dus tussen deze genen in. De volgorde is dus: b – vg – cn.

Maar kloppen de afstanden onderling? De afstand tussen b en cn zou moeten zijn de optelsom van de afstanden tussen b en vg en tussen vg en cn:  $24,8 + 16,8 = 41,6\%$ . De berekende afstand is echter 35,7%.

Dit verschil ontstaat doordat er tussen b en cn ook **dubbel-cross-overs** ontstaan. Deze zijn fenotypisch niet te herkennen als we alleen kijken naar de recombinaties tussen b en cn. We mogen ze echter in de berekeningen niet vergeten!

Nu we de volgorde van de genen weten, kunnen we afleiden wat de dubbel-crossovers zijn. De oudertypen voor de drie genen waren b-vg-cn en  $b^+vg^+cn^+$ . De dubbel-crossovers zien er dan als volgt uit:  $b-vg^+cn$  en  $b^+-vg-cn^+$ . In aantallen is dat  $33 + 29 = 62$ . Deze dubbel-crossovers moeten opgeteld worden bij de recombinanten tussen b en cn. Ze moeten zelfs twee maal worden meegeteld, omdat ze elk ontstaan zijn uit twee recombinatiegebeurtenissen.

De gecorrigeerde recombinatiefrequentie tussen b en cn wordt dan:

$754 + 2(62)/2110 \times 100\% = 878/2110 \times 100\% = 41,6\%$ .

De genenkaart klopt nu!

Genen die gekoppeld zijn horen tot dezelfde **koppelingsgroep** en liggen dus op hetzelfde chromosoom. Bij *Drosophila melanogaster* zijn alle genen in te delen in vier koppelingsgroepen, er zijn dan ook vier verschillende chromosomen.

Als de recombinatiefrequentie tussen twee genen hoger is dan 50% zijn de genen per definitie niet gekoppeld maar liggen ze op verschillende chromosomen. Omdat de gameten van de beide ouders per toeval in de nakomelingen combineren en je ervan uit gaat dat twee genen op verschillende chromosomen liggen, vertoont de helft van de nakomelingen de ouderlijke combinatie van de beide genen en de helft vertoont de recombinante combinatie.



Een **genetische map** (de positie van de genen op de verschillende chromosomen) die gebaseerd is op de recombinatiefrequenties tussen de genen geeft wel de exacte volgorde, maar slechts de relatieve afstanden weer. Dit komt omdat crossing-over niet op elke plaats op het chromosoom even frequent voorkomt. Ook beïnvloedt het optreden van crossing-overs in het ene gebied het optreden ervan in een naastgelegen gebied. Dit noemen we **interferentie**.

## **PRACTICUMOPDRACHT**

### **Opdracht: (90 min.)**

Een vrouwtjesvlieg  $w^+/w \quad sn^+/sn \quad cv^+/cv$  [ $w = white$  (witte ogen),  $sn = singed$  (gekrulde haren) en  $cv = cross-veinless$  (geen dwarsaders in de vleugels)] wordt gekruist met een mannetjesvlieg  $w/Y \quad sn/Y \quad cv/Y$ . ( $Y$  betekent Y-chromosoom, dit is genetisch leeg).

1. Op welk chromosoom liggen de genoemde genen?
2. Hoe zien de oudervliegen van de kruising er fenotypisch uit?
3. Hoe ziet de F1 eruit? Geef de genotypen en de bijbehorende fenotypen weer in een overzichtelijk kruisingsschema zoals op blz. 339 Campbell. Zet erbij welke nakomelingen van het oudertype zijn (dus fenotypisch gelijkend op één van de ouders, ongeacht het geslacht) en welke nakomelingen ontstaan zijn door recombinatie.
4. Op het practicum krijg je een lijstje uitgereikt van de fenotypen en de aantallen waarin deze voorkomen. Vermeld bij de berekeningen welk lijstje (A,B etc.) je gekregen hebt. Bereken de recombinatiefrequenties tussen w en sn, w en cv, en tussen sn en cv.
5. Welke genen zijn gekoppeld? En waarom?
6. Wat is de volgorde van de genen op het chromosoom? Kloppen de afstanden tussen de genen onderling? Zo nee, voer dan de benodigde correctie uit.
7. Hoe groot is het % dubbel-cross-overs? Hoe groot is het aantal dubbel-cross-overs? Hoe groot is het % verwachte aantal dubbel-cross-overs?



# CONJUGATIE

## VOORBEREIDING

**Campbell: H.27.2 en je college-aantekeningen.**

Belangrijke toepassingen van het conjugatiemechanisme voor de moleculaire biologie zijn:

- De overdracht van plasmiden naar bacteriestammen die niet of moeilijk transformeerbaar zijn. Dit is van groot belang voor de biotechnologie.
- Het in kaart brengen van de chromosomale organisatie van bacteriegenomen.
- De overdracht van het Ti-plasmide van *Agrobacterium* naar plantencellen, waarop de hele tegenwoordige plantenbiotechnologie gebaseerd is.

In dit practicum gaan we een conjugatie uitvoeren met een donor - en een acceptor *E.coli* bacteriestam die verschillende eigenschappen bezitten:

Donorstam:	$F^+ \text{ pro}^+ \text{ str}^s$
Acceptorstam:	$F^- \text{ pro}^- \text{ thi}^- \text{ str}^r$

De F-factor van de donorstam bezit de proline genen van het bacterële chromosoom.

Het doel van deze conjugatieproef is om de overdracht van het F-plasmide aan te tonen. Ook de algemene principes van kruisingen, zoals selectie en contra-selectie komen in dit experiment aan bod. Bij de kruising wordt geselecteerd op de overdracht van de F-factor en dus van het prolinegen. Bij een succesvolle overdracht van het F-plasmide wordt de proline-behoefte van de ontvanger opgeheven. De selectie is gericht op de proline-behoefte van de acceptorstam. De contra-selectie is gericht tegen de donor. De selectiemarker hiervoor is streptomycine-resistentie. De selectieplaten bevatten geen proline maar wel streptomycine.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN**

**Van beide stammen staat een cultuur klaar. De bacteriën bevinden zich in de logaritmische groeifase.  $OD_{600\text{ nm}}$  tussen 0,2 en 0,8**

Donorstam  $F^+ \text{ pro}^+ \text{ str}^s = \text{CSH 22}$

Acceptorstam  $F^- \text{ pro}^- \text{ thi}^- \text{ str}^r = \text{pp 1573}$

### **Selectieplaten:**

Synthetisch medium (SM) met glucose, thiamine en streptomycine + 1,8 % agar.

### **Opdracht dag 1 (per paar, 60 min.)**

Noteer de  $OD_{600\text{ nm}}$ . Deze waarde heb je nodig om op dag 2 enkele vragen te beantwoorden. Een cultuur met  $OD_{600\text{ nm}}=1,0$  bevat  $0,5 \cdot 10^9$  bacteriën/ml.

Meng 50  $\mu\text{l}$  van de donorstam met 50  $\mu\text{l}$  van de acceptorstam in een epje en incubeer 20-30 min bij  $37^\circ\text{C}$  (noteer de tijd!).

1. Maak van deze conjugatiemix een  $10^{-2}$  en een  $10^{-4}$  verdunning in fysiologisch zout-oplossing. Maak ook van de **beide ouderstammen** elk een  $10^{-4}$  verdunning in fysiologisch zout-oplossing. Schrijf eerst uit hoe je deze verdunningen maakt en laat dit aan een assistent zien voordat je gaat pipetteren.
2. Spatel uit 50  $\mu\text{l}$  van de beide verdunningen van de conjugatiemix en 50  $\mu\text{l}$  van de verdunning van elk van de beide ouderstammen op de selectieplaten. Spatel de suspensies goed uit over de platen, anders zijn de kolonies na groei niet goed afzonderlijk te zien.
3. Zet de platen bij  $37^\circ\text{C}$  gedurende 1 of 2 dagen.
4. Schrijf in je labjournaal doel van de proef en het verwachte resultaat. De onderstaande opdrachten 1 t/m 3 kan je alvast beantwoorden.

### **Opdracht dag 2 (per paar, 30 min.)**

De kruisingsplaten staan op de raamtafel:

1. Hoeveel bacteriën heb je gemengd van de donorstam en de acceptorstam?
2. Hoeveel bacteriën heb je uitgeplaat ( $10^{-2}$  en  $10^{-4}$ ) op de selectieplaten?
3. Hoeveel bacteriën heb je van elke ouderstammen uitgeplaat ( $10^{-4}$ )?
4. Wat zijn de resultaten van de uitgeplate ouderstammen? Klopt het resultaat met het verwachte resultaat en beredeneer kort je antwoord?
5. Zijn er kolonies te zien op de platen met het conjugatiemengsel? Wat is je conclusie? Bereken het percentage bacteriën dat het proline-gen heeft gekregen.
6. Waarom plaat je het conjugatiemengsel uit op medium met minimale voedingsbehoeften (zie blz 134)?
7. Waarom voeg je aan het selectie medium thiamine toe?
8. Zijn de ouderstammen a. prototroof?<sup>©</sup>  
b. auxotroof?<sup>©</sup>

Verklaar je antwoord.

<sup>©</sup>Zoek de term op.

# RECOMBINANT-DNA

## VOORBEREIDING

- **Campbell: H.5.5, H.16, H.18.4, H.20.1 en 2 en je college-aantekeningen.**
- **Onderstaande inleiding. Blackboard: powerpoint**

Een belangrijke methode in de moleculaire biologie is het kloneren en vermenigvuldigen van DNA-fragmenten in bacteriële plasmiden. Onder kloneren wordt in dit verband verstaan: het inbrengen van een bepaald stukje DNA op een bacterieel plasmide. De opzienbarende wetenschappelijke vooruitgang in de moleculaire biologie van de afgelopen decennia is voor een belangrijk deel mogelijk gemaakt door deze recombinant-DNA-technieken. De handleiding geeft een beknopt overzicht gevolgd door praktische tips. Je stelt zelf een werkplan op!

## Kunstmatig recombineren: KLONEREN in PLASMIDEN

Een **plasmide** is een extrachromosomaal, autonoom replicerend, niet essentieel, circulair DNA-molecuul, dat gemakkelijk uit de bacteriële gastheer kan worden geïsoleerd. Plasmiden komen van nature voor in bacteriën en omdat ze veelal overdraagbaar zijn en een antibioticumresistentie-gen dragen, zijn ze onder andere verantwoordelijk voor de snelle verspreiding van antibioticumresistenties in ziekteverwekkers. Een plasmide wordt ook wel **vector** genoemd. Het woord vector heeft niet specifiek betrekking op plasmiden, maar wordt gebruikt voor elk circulair DNA-molecuul dat vermenigvuldigd kan worden in een cel en dat als drager dient voor een te bestuderen stuk DNA dat met behulp van recombinant-DNA technieken is ingebracht. Dit ingebrachte stuk DNA wordt **insert** genoemd.

In 1977 werd het plasmide pBR322 geïntroduceerd. Dit was het eerste kunstmatige plasmide dat op grote schaal werd gebruikt voor het kloneren van DNA. Het bevat een "origin of replication" ook wel genoemd ori (voor de replicatie van het plasmide in een bacteriecel), twee genen voor antibiotica-resistentie (ampicilline en tetracycline) en een aantal unieke restrictiesites waarin DNA-fragmenten kunnen worden gekloneerd.

De laatste decennia zijn er vele typen plasmiden geconstrueerd voor klonerwerk in verschillende typen organismen, zoals gist, planten en dierlijke cellen. Dit practicum gebruiken we het plasmide pUC19 dat is afgeleid van pBR322.

Met behulp van enzymen (**restrictie-endonucleasen** en **DNA-ligase**) kunnen stukjes DNA in plasmiden worden geïntroduceerd en vervolgens in een gastheer worden vermenigvuldigd. Als gastheer wordt een voor dit doeleind geschikte stam van de darmbacterie *Escherichia coli* gebruikt. Stammen waarmee in het laboratorium gewerkt wordt bevatten doorgaans vele mutaties die het organisme veiliger en tevens meer geschikt maken voor recombinant-DNA werk. Neem de veiligheidsregels in acht.

De meeste plasmiden bevatten een antibioticumresistentie-gen dat selectie van plasmide-bevattende *E.coli* cellen mogelijk maakt. Verder komen deze plasmiden in een zeer hoog aantal kopieën (honderden) per cel voor. Ze bezitten een zogenaamde "**polycloning site**" (of **multiple cloning site, MCS**), die een flink aantal unieke restrictie-enzymknipplaatsen bevat.

In het plasmide pUC-19 is de polycloning site gelegen in het coderende gebied van het **lac-Z gen**, dat codeert voor het enzym  $\beta$ -galactosidase. Dit enzym kan lactose en een aantal verwante suikerderivaten splitsen. In het geval van het kleurloze Xgal (5-

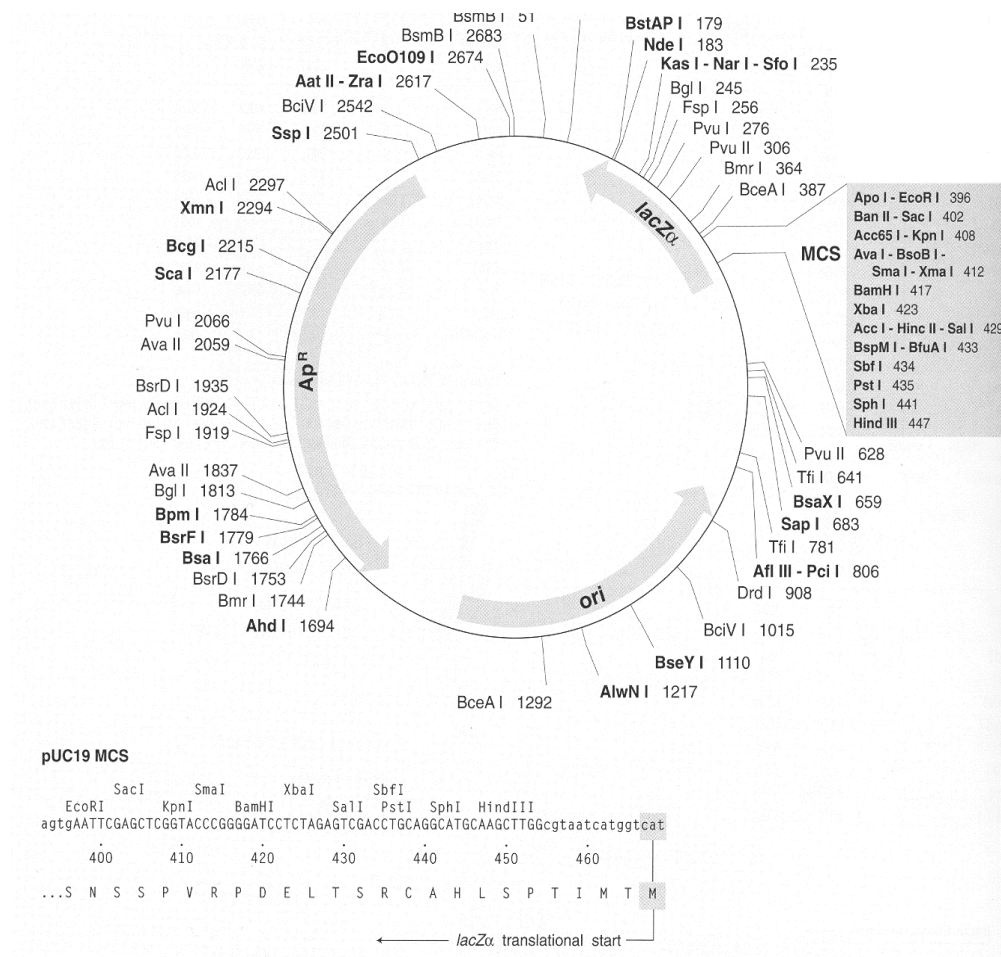
bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) levert dat galactose en het blauw gekleurde X (bromochloro-indol) op:

### $\beta$ -galactosidase

**X-gal (kleurloos)  $\rightarrow$   $\beta$ -galactose + X (blauw)**

Het lac-Z gen staat onder controle van de lac-operator, waaraan **lac-I-repressor** kan binden en daardoor stil ('silent') wordt gehouden. De lac-I-repressor heeft zelf een bindingsplaats voor de van lactose afgeleide metaboliet allolactose en wordt door binding inactief, waardoor het lac-Z gen tot expressie komt. Een nog betere inducer is het niet door  $\beta$ -galactosidase hydrolyseerbare IPTG, dat ook aan de lacI-repressor bindt. Op een plaat met Xgal en IPTG zijn deze kolonies blauw. Wordt er nu een DNA fragment in de MCS gekloneerd, dan wordt het leesraam van **lac-Z** onderbroken, waardoor de cellen niet in staat zijn om  $\beta$ -galactosidase aan te maken en Xgal te hydrolyseren. Cellen die een plasmide bevatten met een insert in de MCS zijn daarom in de regel wit. Transformanten met het gewenste insert kunnen hiermee eenvoudig worden voorgeselecteerd.

### pUC19 (2,69 kb)



## **Specifiek knippen van DNA: RESTRICTIE-ENDONUCLEASE**

Een restrictie-endonuclease is een enzym dat een bepaalde DNA-sequentie in dubbelstrengs DNA herkent en daar een dubbelstrengs breuk aanbrengt. Alle organismen bevatten meerdere van dergelijke sequentiespecifieke DNA-knippers. Er zijn nu honderden verschillende restrictie-enzymen commercieel verkrijgbaar. De naamgeving berust op het organisme, veelal een micro-organisme, waaruit het enzym is geïsoleerd, met een code voor het specifieke enzym uit dat organisme. Bijvoorbeeld **EcoRI** en **EcoRV** voor enzymen uit de darmbacterie *Escherichia coli*.

EcoRI (spreek uit: Eco-R-éen) herkent de sequentie 5'---GAATTC---3'

3'---CTTAAG---5'

en dit geeft na knippen: 5'---G<sub>OH</sub> en 5'-pAATTC---3'  
3'---CTTAAp-5' OHG --5'

terwijl **HindIII** (spreek uit: Hin-d-drie) de sequentie 5'---AAGCTT---3'  
3'---TTCGAA---5'

herkent, wat na knippen oplevert: 5'---A<sub>OH</sub> en 5'-pAGCTT---3'  
3'---TTCGAp-5' OH A---5'

waarbij de p en OH aangeven waar precies tussen twee nucleotiden (NpN) de hydrolyse door het restrictie-enzym plaatsvindt en --- de rest van de DNA-streng weergeeft. Wat opvalt is, dat enerzijds veel restrictie-enzymherkenningsplaatsen, waaronder die voor EcoRI en HindIII, een palindroom vormen, wat betekent dat de bovenstreng en de onderstreng dezelfde sequentie hebben en dat anderzijds veel enzymen niet in het midden van zo'n palindroom knippen maar een versprongen breuk opleveren. De uiteinden van beide strengen zijn complementair en kunnen basenparen. Deze uiteinden worden “**sticky ends**” genoemd.

Er bestaan ook enzymen die precies in het midden knippen, deze leveren zogenaamde “**blunt ends**” (stompe uiteinden) op. Het voordeel hiervan is dat elk stuk DNA dat blunt is geknipt, ongeacht met welk enzym, in een blunt geknipt plasmide kan worden geligeerd. Het grote nadeel is echter dat zo'n stuk DNA ook “verkeerd om”, d.w.z. in de verkeerde transcriptierichting in de plasmide kan worden geligeerd. De efficiëntie van een blunt ligering is erg laag.

Bij de herkenning van DNA door eiwitten zoals restrictie-enzymen is de polariteit van het DNA heel belangrijk. Bijv. het enzym **SacI** herkent 5'-GAGCTC-3', maar niet 5'-CTCGAG-3'. Deze laatste sequentie wordt geknipt door het enzym **XhoI**.

De activiteit van restrictie-enzymen wordt in **Units** (afkorting: U) uitgedrukt. Eén Unit komt overeen met die hoeveelheid enzym die onder ideale omstandigheden en bij de juiste temperatuur (door de fabrikant bepaald) 1 µg DNA van de *E.coli* faag lambda volledig knipt in één uur.

Het enzym **DNA-ligase** kan de DNA-uiteinden weer covalent aan elkaar verbinden in een ATP-afhankelijke reactie. Sticky ends zijn hierbij een veel beter substraat dan blunt ends, omdat ze kunnen basenparen.

Onderstaand lijstje geeft de sequenties en de knipplaats aan van een aantal gangbare restrictie-enzymen en de buffer waarin het betreffende enzym het beste knipt.

Elk restrictie-enzym heeft zijn eigen knipcondities, waarbij de concentraties Tris/NaCl,  $Mg^{2+}$  en de pH een belangrijke rol spelen. Indien nodig zit in de knipbuffer Bovine Serum Albumine BSA. Dit eiwitpreparaat stabiliseert sommige restrictie-enzymen.

BamHI	G'GATCC	NEB-2 (buffer 1 of 4 kan ook)
BglII	A'GATCT	NEB-3 (buffer 2 kan ook)
ClaI	AT'CGAT	NEB-4 + BSA (buffer 2 of 3 kan ook)
<b>EcoRI</b>	<b>G'AATTC</b>	<b>NEB-1, -2, -3, -4 of speciale EcoRI-buffer</b>
<b>HindIII</b>	<b>A'AGCTT</b>	<b>NEB-2 (buffer 1 of 4 kan ook)</b>
KpnI	GGTAC'C	NEB-1 + BSA (buffer 2 of 4 kan ook)
PstI	CTGCA'G	NEB-3 (buffer 1, 2 of 4 kan ook)
SacI	GAGCT'C	NEB-1 + BSA (buffer 4 of 2 kan ook)
SacII	CCGC'GG	NEB-4 (buffer 2 kan ook)
SalI	G'TCGAC	U + BSA
SmaI	CCC'GGG	NEB-4
SpeI	A'CTAGT	NEB-2 + BSA (buffer 2 of 4 kan ook)
SphI	GCATG'C	NEB-2 (buffer 1, 4 en 3 kan ook)
XbaI	T'CTAGA	NEB-2 + BSA (buffer 3 of 4 kan ook)
XhoI	C'TCGAG	NEB-2 + BSA (buffer 3, 4 of 1 kan ook)
XmaI	C'CCGGG	NEB-1 (buffer 2 of 4 kan ook)

### **Praktische tips: knippen met restrictie-enzym**

Maak vóór je gaat knippen in je labjournaal een pipetteerschema. De volgorde van pipetteren en de precieze volumina. Het eindvolume waarin geknipt wordt is 20 µl. Als **eerste** pipetteer je het juiste volume water en als **laatste** het restrictie-enzym !

**De ingrediënten die je nodig hebt om een restrictie-enzym reactie uit te voeren zijn:**

- **Steriel water (of in ieder geval DN'ase vrij water)**
- **Knipbuffer eindconc. 1x**, de stockoplossing is **10x** geconcentreerd
- **DNA eindconc. 10 ng/µl** (conc. DNA preparaat wordt bekend gemaakt)
- **Evt. RN'ase eindconc. 25 ng/µl** (nodig als het DNA prep. nog RNA bevat)
- **Restrictie-enzym eindconc. 1 U/µl**, de stockoplossing is 10 U/µl.

Noot 1:

Maak, bij het uitvoeren van meerdere knipjes met hetzelfde enzym of dezelfde enzymen, één buffermengsel dat ruim voldoende is voor al deze knipjes en verdeel dit over de epjes. Voeg daarna de juiste hoeveelheid DNA toe. Dit is sneller en nauwkeuriger dan alles in elk epje apart pipetteren.

Noot 2:

Als je met meerdere enzymen knipt mag het totale volume hiervan niet meer zijn dan 10% van het eindvolume van het incubatiemengsel. Restrictie-enzymen worden bewaard bij -20° C. Om vries-dooi schade aan het enzym te voorkomen is glycerol toegevoegd. Bestaat meer dan 10 % van je knipmengsel uit restrictie-enzym, dan kan dat leiden tot vreemde resultaten (vb bij Eco RI "staractivity" = te vaak knippen)

Meng alle ingrediënten goed en centrifugeer 1 minuut bij 13.000 rpm. Zet het incubatiemengsel te knippen in een waterbad of in een temperatuurblok gedurende 1 uur. Voor de meeste restrictie-enzymen is de optimale incubatietemperatuur 37°C, voor sommige enzymen is een lagere of hogere temperatuur vereist. Na de incubatieperiode wordt nogmaals gecentrifugeerd. Het restrictie-enzym moet



geïnactiveerd worden. Dit gebeurt meestal door verhitting, voor sommige enzymen is een andere methode nodig. Raadpleeg voor de juiste methode een Biolabs catalogus. Breng na het knippen 5 µl van het geknipte DNA op een agarosegel (zie "Agarosegel-elektroforese"). Bewaar de rest bij 4 °C.

Bedenk hoeveel bandjes je verwacht en welke grootte elk bandje heeft. Ga nauwkeurig na of het resultaat klopt met je verwachting en leg de resultaten vast in je labjournaal.

### **Scheiden van DNA-fragmenten: ELEKTROFORESE**

Het principe van DNA-elektroforese is gebaseerd op de elektrische lading en op de grootte van DNA-moleculen. In de licht basische buffers die bij DNA-elektroforese worden gebruikt, is DNA negatief geladen. In een elektrisch veld beweegt DNA naar de anode, de positief geladen pool. Bij scheiding van DNA-fragmenten d.m.v. elektroforese worden agarosegels (voor grote DNA-fragmenten van 0,5 kb tot 20 kb en groter) of polyacrylamidegels (voor kleine DNA-fragmenten van 10 bp tot 1000 bp) gebruikt. De gel heeft een bepaalde poriegrootte, afhankelijk van de agarose- of polyacrylamide-concentratie, welke het scheidende vermogen bepaalt. Zeer gangbaar voor agarosegels is een 0,7-1 % agarose-concentratie.

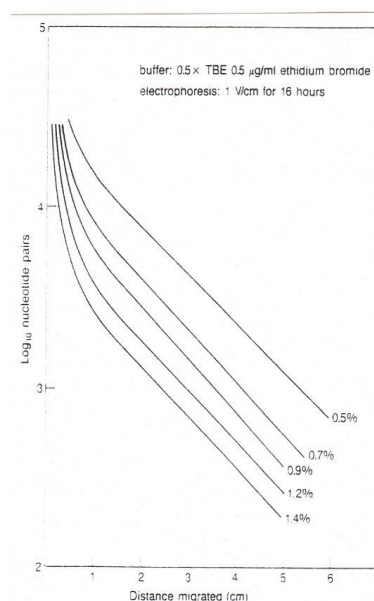
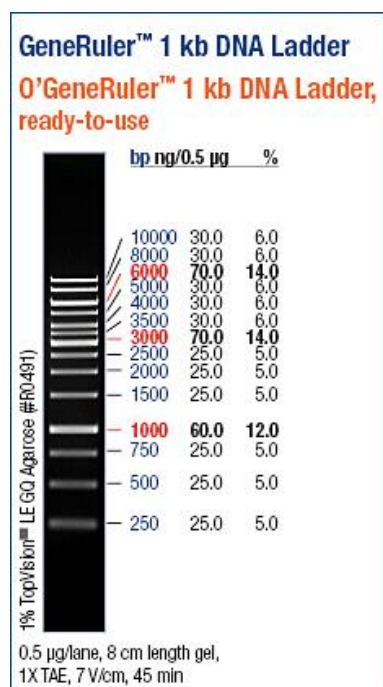
Agarose % (w/v)	Scheidingstraject lineair DNA (kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

De poriën in de gel vormen een zeef waar kleine DNA-moleculen sneller door heen bewegen dan grote. De scheiding van dubbelstrengs DNA-fragmenten vindt alleen op basis van lengteverschillen plaats. De verklaring hiervoor is dat voor DNA de lading per lengte-eenheid altijd gelijk is, deze wordt bepaald door de fosfaatgroepen. Geknipt dubbelstrengs-DNA (= lineair DNA) heeft een vrijwel rigide staafstructuur.

Plasmide-DNA dat geïsoleerd wordt uit *E.coli* heeft in de regel een "supercoiled structuur". Om dit voor te stellen pak je een elastiekje. Deze heeft een cirkelvorm, dit noemen we "relaxed". Je rekt het elastiekje uit en draait het ene uiteinde een flink aantal malen t.o.v. het andere uiteinde en laat het in elkaar kringelen. Resultaat: een "supercoiled" elastiekje. Een intact plasmide is hiermee te vergelijken. Breng je in een supercoiled plasmide in één van beide strengen een breuk aan (of in beide strengen, maar op verschillende plaatsen), dan ontstaat een cirkel die "relaxed" is. Breuken kunnen in een plasmide DNA preparaat ontstaan wanneer je er te ruw mee omspringt. Breng je een dubbelstrengsbreuk aan, met een restrictie-enzym, dan ontstaat een lineair molecuul.

De verschillende vormen van het plasmide-DNA hebben een verschillend migratiegedrag tijdens elektroforese, voornamelijk door de verschillen in de structuur. Het snelst loopt supercoiled DNA, dan volgt lineair DNA, terwijl de gesloten relaxte vorm het langzaamst loopt. Hieruit blijkt dat de loopsnelheid van DNA-moleculen niet alleen afhankelijk is van de grootte! Dit is alleen het geval bij lineair DNA (dus geknipt DNA).

Gelijktijdig met de te scheiden geknipte DNA-monsters wordt een grootte-marker (1kb-ladder of ook wel O'GeneRuler-1 kb ladder genoemd) mee geëlektroforeerd. Deze dient allereerst ter bevestiging dat de elektroforetische scheiding succesvol is verlopen. Verder bestaat deze marker uit een mengsel van DNA-fragmenten van bekende hoeveelheid en grootte (zie onderstaande foto). De marker die we tijdens het practicum gebruiken bestaat uit pBR322-DNA geknipt met HinfII en multimeren van het 1,018 kb-fragment van het 2 $\mu$ -plasmide. Tussen migratie-afstand en molecuulgewicht zit een logaritmisch verband. Door de migratie-afstand lineair uit te zetten tegen de logaritme van de fragmentgrootte wordt, in een beperkt traject, een rechte lijn verkregen. Binnen dit gebied kan de onbekende grootte van een DNA-fragment worden bepaald. Van de marker wordt 5  $\mu$ l gebruikt.



Het DNA elektroforese-apparaat bestaat uit een elektrische voedingsbron die gelijkstroom levert en een elektroforese-kamer die de gel en een gebufferde elektrolytoplossing bevat. Agarosegels liggen meestal geheel onder de bufferoplossing, volgens het zg. submariene systeem. De twee bufferreservoirs zijn verbonden met respectievelijk de kathode (negatieve elektrode) en de anode (positieve elektrode) van de spanningsbron.

Voordat de DNA-monsters op de gel worden geladen, wordt eerst de zogenaamde opbrengbuffer toegevoegd. De opbrengbuffer (loading buffer) heeft de volgende bestanddelen: ficoll, broomfenolblauw (bpb) en xyleencyanol (xc). Ficoll dient om het monster zwaarder te maken, zodat het naar de bodem van het slotje (putje) in de gel zakt. Broomfenolblauw en xyleencyanol zijn geladen kleurstoffen waarmee de elektroforese gemakkelijk visueel kan worden gevolgd. Xyleencyanol loopt in een 0,7% TAE-agarosegel op gelijke hoogte als een DNA-fragment van ca. 5 kb, broomfenolblauw als een DNA-fragment van ca. 1 kb. Deze waarden zijn afhankelijk van het type gebruikte scheidingsbuffer.

Na afloop van de elektroforese wordt de gel in een verdunde ethidiumbromide-oplossing gelegd. Ethidiumbromide intercaleert tussen de basen van het DNA (gaat er tussen zitten) en vertoont dan oranje fluorescentie bij bestraling met UV licht met een golflengte van 300 nm. Ethidiumbromide-kleuring is een vrij gevoelige kleuring; 10 ng DNA is nog zichtbaar te maken.

### **Praktische tips: Elektroforeren DNA in 0,7% agarose opgelost 1x TAE buffer**

- De uitvoering van deze opdracht wordt door de assistent uitgelegd.
- **Bereken** hoeveel agarose je zou moeten afwegen om één gel te gieten van 25 ml met een concentratie van 0,7 % agarose. De assistent heeft de agarose al opgesmolten in de magnetron (vanwege de kookvertraging is dit een gevaarlijke handeling). De opgesmolten agarose staat in de 60°C stoof.
- Plak een gelbakje af met schilderstape, zet een kam erin. Let op de positie! Laat de opstelling door de assistent controleren en giet de tot 50-60°C afgekoelde agarose erin. Laat gedurende 30 min. stollen, verwijder voorzichtig het schilderstape, vul het gelbakje met ongeveer 0,75 liter 0,25x TAE-buffer, zodanig dat de gel net onderstaat. Trek de kam er heel erg voorzichtig uit. De nu ontstane holtes in de gel heten slotjes.
- Voeg aan 5 µl restrictiemengsel 1 µl opbrengbuffer toe en breng elk restrictiemengsel apart in een slotje van de gel. Zet in een slotje ernaast 5 µl DNA-marker (1 kb-ladder).
- Breng ook een sample van het ongeknipte DNA (5 µl + 1 µl opbrengbuffer) in een slotje. Dit is nodig om eventueel niet-geknipte DNA-moleculen in het restrictiemengsel te herkennen. Dit sample krijg je.
- Laat het DNA naar de positieve elektrode lopen bij een constant voltage van 100 V gedurende 1 uur.
- Electroforeer zolang tot de band van bpb op ca. 1 - 1,5 cm van het einde van de gel zit, schakel de stroom uit en breng de gel voorzichtig (handschoen aan!) in een kleurbak met ethidiumbromide gedurende 5 min. Ontkleur de gel vervolgens in een bak met water, minimaal 10 - 20 min.
- Leg de gel op de UV-bak van de DigiDoc-foto-opstelling en maak een fotoprint.
- Plak deze in de labjournaal en nummer de de slots en geef aan in de baan waar de molecuulmarker is opgebracht hoe groot de banden zijn
- Ook geef je van het geknipte DNA de grootte van de banden aan.
- Geef een schatting van de hoeveelheid DNA.

Geef in je labjournaal aan welke bandjes overeenkomen met wat je verwacht en welke eventueel niet. Probeer voor elk bandje een verklaring te vinden en noteer deze verklaringen.

## **Combineren van DNA-fragmenten: LIGATIE**

DNA-ligases zijn enzymen die in staat zijn om twee dubbelstrengs DNA restrictiefragmenten met complementaire uiteinden aan elkaar te verbinden. Het meest gebruikte ligase is T4-DNA-ligase. Dit wordt geproduceerd door de *E.coli* faag T4 van *E.coli*. Cofactoren van dit enzym zijn  $Mg^{2+}$  en ATP. Dit enzym heeft in vivo de functie van het repareren van breuken in dubbelstrengs DNA. Het enzym vormt een fosfo-di-esterbinding tussen het 3'OH- en het 5'P-uiteinde van het DNA. De optimale werkingstemperatuur van T4-DNA-ligase is 37°C. Bij deze temperatuur bewegen de uiteinden van de DNA-fragmenten te sterk om stabiele complexen te vormen tussen de overhangende uiteinden. De incubatie wordt doorgaans uitgevoerd bij 14°C.

Een belangrijke variabele bij ligatiereacties is de DNA-concentratie. Bij een lage DNA-concentratie (5 µg/ml) zal voornamelijk circulair DNA ontstaan door ligatie van de einden van één restrictiefragment (ringsluiting); bij een hoge DNA-concentratie (100 µg/ml) vindt vooral ligatie plaats van verschillende restrictiefragmenten. Ruimtelijk gezien hebben de fragmenten dan meer kans om “elkaar tegen te komen”; in een te grote dichtheid kunnen er meer dan twee DNA-fragmenten aan elkaar ligeren.

Ligases worden niet geremd door de aanwezigheid van ionen afkomstig uit het incubatiemengsel van het restrictie-enzym.

Voor het kloneren van een restrictiefragment in een plasmide worden relatief hoge DNA-concentraties gebruikt van tenminste 20 µg/ml, waarbij wordt gestreefd naar een molaire verhouding tussen **insert-DNA en plasmide-DNA van 6:1**. Slechts 10-20% van de plasmidemoleculen worden omgezet in de gewenste recombinant-DNA-moleculen.

Vooral als het plasmide-DNA met slechts één restrictie-enzym is opengeknippt zullen veel plasmide-moleculen ringsluiten (dus zonder insert-DNA) en het oorspronkelijke circulaire plasmide vormen. Het is daarom nodig om een goede selectieprocedure te hebben om het plasmide-DNA in handen te krijgen dat wel het gewenste insert-DNA heeft opgenomen (zie: transformatie).

### **Praktische tips: Ligeren DNA met ligase**

Voor ligeren moet het nog aanwezige restrictie-enzym geïnactiveerd worden. Dit kan door bv. verhitting. Zoek de juiste inactivatie voor EcoRI op in een Biolabs catalogus. Maak een pipetteerschema. **Het volume waarin de ligatie plaats vindt is: 10 µl.** Zet alles klaar op ijs.

Elke student zet één ligatie<sup>x</sup> in:

**Om een ligering uit te voeren heb je nodig:**

- **Steriel water (of in ieder geval DN'ase vrij water)**
- **Ligatiebuffer eindconc. 1x**, de stockoplossing is **10x** geconcentreerd
- **Insert DNA=km<sup>r</sup> fragment**, bereken zelf hoeveel DNA je nodig hebt. De **molaire** verhouding **insert-DNA en plasmide-DNA = 6:1**. De concentratie van het **km<sup>r</sup>** fragment DNA wordt bekend gemaakt.
- **1 µl geknipt plasmide DNA**. De concentratie van het plasmide DNA is af te leiden uit de DNA concentratie die gebruikt is in de knipreactie met EcoRI.
- **T4-DNA-ligase eindconc. 0,1 U/µl**, de stockoplossing is 1 U/µl.

<sup>x</sup> Moet je meerdere ligaties doen, maak dan een incubatiemengsel met H<sub>2</sub>O, buffer en ligase dat je vervolgens bij de epjes doet waar het DNA al in zit.

Goed mengen bv. d.m.v. vortexen, gevolgd door 1 minuut centrifugeren 13.000 rpm. Ligeren overnacht (o/n) bij 14°C.

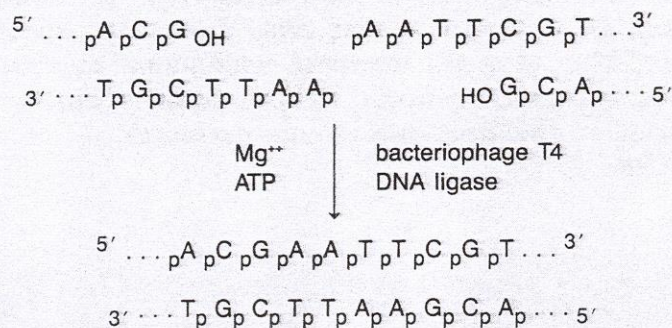
Een deel van het ligatiemengsel wordt gebruikt om *E.coli* te transformeren. In *E.coli* worden de recombinant-DNA-moleculen selectief vermenigvuldigd.

## Bacteriophage T4 DNA Ligase

**Activity:** Ligation of cohesive DNA termini or nicks

**Substrate:** Active on double-stranded DNA with complementary cohesive termini that base pair to bring together 3'-hydroxyl and 5'-phosphate termini. In addition, the enzyme is active on nicked DNA and active, albeit far less efficiently, on RNA substrates. (For a more complete description of substrates, see Engler and Richardson 1982.)

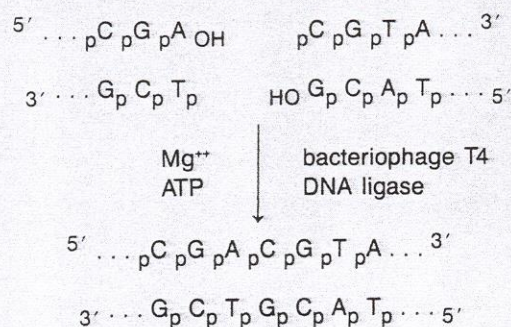
**Reaction:**



**Activity:** Ligation of blunt ends

**Substrate:** High concentrations of blunt-ended, double-stranded DNA containing 5'-phosphate and 3'-hydroxyl termini.

**Reaction:**



## **Selecteren en Vermenigvuldigen van rec.-DNA: TRANSFORMATIE**

Bacteriën kunnen DNA uit hun omgeving opnemen, dit proces heet transformatie. Van deze eigenschap maken we gebruik als we het reeds gevormde recombinant-plasmide DNA willen vermenigvuldigen.

Om te kunnen transformeren moeten de ontvangende cellen eerst competent worden gemaakt, d.w.z. dat ze in een fysiologische toestand (spheroplast) moeten worden gebracht waarin ze gemakkelijk DNA opnemen. Bij *E.coli* maakt calcium de bacteriewand permeabel, waardoor bij een hittesthock het plasmide-DNA de bacterie kan binnendringen. Bovendien beschermen de calciumionen het plasmide-DNA tegen nucleasewerking.

Om de recombinant-DNA-moleculen te kunnen vermenigvuldigen in de bacteriecel, maken we gebruik van een bacterie die gevoelig is voor het antibioticum, waarvoor het vector-plasmide een resistentie-gen bevat. Brengen we de getransformeerde bacteriën in een medium dat dit antibioticum bevat, dan zullen alleen die bacteriën kunnen groeien die het plasmide hebben opgenomen. Het plasmide-DNA wordt op deze manier selectief in de bacteriën vermenigvuldigd. Omdat deze selectie ook geldt voor vector-DNA dat geen insert-DNA bevat, is verdere selectie op het insert-DNA noodzakelijk.

Het recombinant-DNA-molecuul bevat in ons geval twee genen voor een antibioticumresistentie: ampicilline ( $\text{Amp}^r$ ) en kanamycine ( $\text{Km}^r$ ). Het  $\text{Amp}^r$ -gen is afkomstig uit de vector pUC-19, het  $\text{Km}^r$ -gen is afkomstig uit het insert-DNA. Ampicilline remt de bacteriële celwandsynthese door inhibitie van peptidoglycaan-crosslinking. Het  $\text{Amp}^r$  gen codeert voor het enzym  $\beta$ -lactamase dat ampicilline kan afbreken. Kanamycine remt de eiwitsynthese door binding aan ribosomale componenten. Het  $\text{Km}^r$  gen codeert voor een fosfotransferase dat het transport van kanamycine in de cel voorkomt.

We kunnen op twee manieren selecteren op de aanwezigheid van insert-DNA. Ten eerste door selectie in medium met kanamycine, ten tweede door blauw-wit-screening, zie boven bij de inleiding Kloneren: lac-Z gen. Het kloneren is een weinig efficiënt proces: er worden veel blauwe en weinig witte kolonies verkregen. De blauwe kolonies bevatten ongeknipt vector-DNA en ringsluiters, de witte kolonies het plasmide met insert-DNA.

### **Praktische tips: Competent maken bacteriecellen (*E.coli* stam: JM101\*)**

De stam *Escherichia coli* JM101\* heeft alleen chromosomaal DNA en bevat geen enkele antibiotica resistentie. Van een vers geënte plaat wordt een vloeibare voorkweek gemaakt. 1/100 tot 1/1000 doorverdunnen in 10 ml LC in een 100 ml kolf (zorgen voor voldoende zuurstof: volumeverhouding lucht/vloeistof = 10:1). Cultuur schuddend laten groeien tot  $\text{OD}_{600} = 0,5$  bij  $37^\circ\text{C}$ .

- **De kweek wordt door de assistent aangeleverd en staat op ijs.**

Per transformatie wordt 1 ml cultuur gebruikt.

Voeg 100  $\mu\text{l}$  ijskoude 1 M  $\text{CaCl}_2$  (niet op pH gesteld) toe. Meng met pipetpunt.

Zet de buis met cellen 30 min. op ijs zodat de cellen competent worden voor transformatie met DNA.

### **Praktische tips: Transformeren *E.coli* cellen**

**Elke student heeft een eigen ligatie ingezet. Per paar zijn er 2 ligatiemengsels: 1 ligatiemengsel wordt gebruikt voor 2 transformaties (noem deze a en b), het andere ligatiemengsel is reserve! Elke student voert een eigen transformatie uit! Werk zoveel mogelijk op ijs.**



- a. Draai eerst kort het epje met ligatiemengsel af, zodat dit op de bodem van het epje komt.
- b. Voeg 4 µl ligatiemengsel toe aan het epje met de competente bacteriecellen. Meng voorzichtig door de vloeistof op en neer te pipetteren
- c. Laat 30 min. op ijs staan zodat het DNA kan aanhechten aan de spheroplast
- d. Geef de cellen een hitteshock van 90 sec. precies!! bij 42°C (waterbad/heatblock))
- e. Zet 15 min. op ijs, dit verhoogt de transformatiefrequentie
- f. Kort afdraaien (3 min., 8000 rpm), supernatant weghalen met P200.
- g. Voeg 1 ml LC toe aan de pellet en suspendeer voorzichtig
- h. Incubeer 60 min. in 37°C stoof (herstel van bacteriewand en expressie van antibiotica)
- i. Plaat uit zoals hieronder beschreven

### **Praktische tips: Uitplaten van getransformeerde *E.coli*-cellen**

**Selectieplaten** ( een plaat bevat 25 ml) (zie voor conc. stocks blz 90)

1. **LC plus Xgal** 20 µg/ml , **IPTG** 40 µg/ml, **ampicilline<sup>x</sup>** 60 µg/ml
2. LC agar waaraan is toegevoegd: **kanamycine** 40 µg/ml.

### **Uitplaten:**

**Elke student heeft een eigen transformatie uitgevoerd (per paar zijn er dus 2 transformaties gedaan, a en b beide afkomstig uit 1 ligatiemengsel.**

**Transformatie a** wordt als volgt uitgeplaat:

Maak van de **onverdunde transformatie a** een verdunningsreeks in stappen van 10. Maak van elke verdunning 1 ml en plaat van de 10<sup>-6</sup> en 10<sup>-7</sup> verdunning 100 µl uit op een LC-plaat. Laat het verdunningsschema eerst zien aan de assistent.

Pipetteer 100 µl van de **onverdunde transformatie a** in 100 µl LC, goed mengen.

- Pipetteer 100 µl van dit verdunde transformatiemengsel op **selectieplaat 1**. Spatel goed uit met drychalskispatel.
- Draai vervolgens het restant van de **onverdunde transformatie a** (= ca. 900 µl) af 3 min. bij 7000 rpm, haal het supernatant eraf en resuspendeer de pellet heel voorzichtig in 100 µl LC-medium. Plaat alles uit op **selectieplaat 1**.

**Transformatie b** wordt op dezelfde manier uitgeplaat als **transformatie a** met dien verstande dat er uitgeplaat wordt op **selectieplaat 2**.

**Er hoeft van transformatie b geen verdunningsreeks te worden gemaakt.**

<sup>x</sup> Ampicilline (afkorting Amp of Ap)=carbenicilline (afkorting cb)

### **Controleren van Transformanten: ISOLATIE PLASMIDE-DNA**

De plasmiden zijn selectief vermenigvuldigd in de groeiende bacteriekolonie. Om te kunnen controleren of de bacteriekolonie het gewenste recombinant-DNA-molecuul bevat, dus een goede insert hebben, moeten we DNA uit de bacteriën isoleren. Hiervoor kies je **2 witte** kolonies van selectieplaat 1 en **2** kolonies van selectieplaat 2. Je kweekt deze kolonies ieder afzonderlijk op in een vloeibaar medium met antibiotica tot een groot aantal bacteriën. Uit deze cultures gaan we het plasmide-DNA isoleren. Hier zijn verschillende methodes voor. Je gebruikt tijdens dit practicum een methode die bij zorgvuldige uitvoering veel en knipbaar DNA oplevert.

#### **Praktische tips : Opkweken transformanten** (2 transformanten per student)

Vul **4** cultuurbuizen met 2 ml medium+antibiotica. Nummer de buizen en zet je plaatsnummer er ook op. Zoek mooie losliggende kolonies. Maak in je labjournaal een tabel en noteer precies welke kolonie je in welke buis laat groeien. Prik de kolonie aan met een steriele cocktailprikker. Zet eerst een dun streepje op een **nieuwe** selectieplaat 2 en doe de cocktailprikker daarna in de cultuurbuis. Herhaal de procedure voor alle geselecteerde kolonies. Laat de cultuur overnacht groeien in een schudstoof bij 37°C.

Elke student streept 10 kolonies van **beide** selectieplaten op selectieplaat 2! De selectieplaat 2 met streepjes incuberen bij 37°C. Deze plaat bevat de originele bacteriestam (er staan 24 genummerde streepjes op).

#### **Praktische tips: Isoleren plasmide-DNA**

De gegroeide cultuur wordt eerst goed geschud in de buis (bacteriën zakken snel uit).

- Giet de culturen in overeenkomstig genummerde 2,2 ml epjes.
- Centrifugeer 5 min. 9.000 rpm. Verwijder het supernatant volledig (afgieten, rest met een P200 wegzuigen).
- Resuspendeer de pellet in 200 µl lysisbuffer en incubeer 5 min bij kamertemp.
- Voeg 400 µl vers (maak zelf een pipetteerschema) gemaakte NaOH/SDS-oplossing (KT!) toe, meng door 10x omdraaien en incubeer 5 min. bij 0°C (mengsel van ijs en water).
- Voeg 300 µl ijskoud 3M natriumacetaat pH 4.8 toe, meng door omdraaien en incubeer 5 min bij 0°C.
- Centrifugeer 5 min. 13.000 rpm en breng het supernatant over in 2 schone 1,5 ml epjes (voorzichtig, met een P200). Voorkom dat je iets van het vliesje en de pellet meeneemt. Hierin zitten eiwitten die later het knippen van het geïsoleerde plasmide-DNA hinderen.
- Voeg aan het supernatant in beide epjes zoveel mogelijk ijskoude 100% ethanol (tot aan de rand van het epje), **meng goed!** Vries de epjes kort in in vloeibare stikstof (dit doet de assistent!!)
- Centrifugeer 10 min. 13.000 rpm. Zet de epjes met het lipje van de deksel naar de buitenkant wijzend, je weet dan straks waar het DNA in het epje zit! Verwijder zorgvuldig het supernatant.
- Spoel de binnenwand van het epje en de pellet (kort vortexen) met 300 µl ijskoude 70% ethanol.
- Centrifugeer 10 min. 13.000 rpm. Verwijder zorgvuldig het supernatant.
- Droog de pellet 10 min. in een roterende vacuümstoof=speedvac.
- Los de pellet op in 30 µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-buffer en voeg 1 µl RNase toe.
- Incubeer 15 min. bij 37°C.
- Bewaar deze geïsoleerde plasmiden bij 4°C of op ijs tot gebruik.

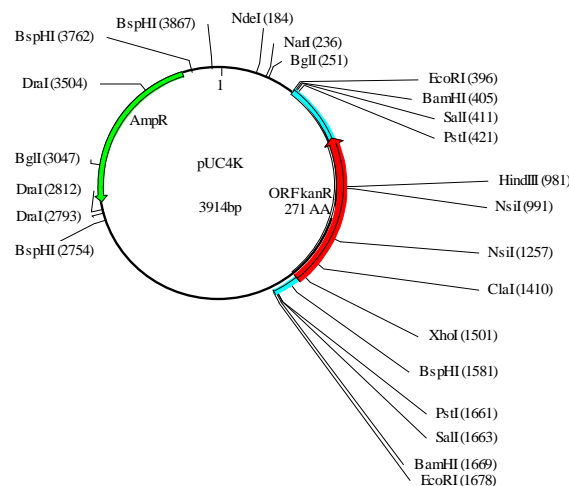


### Opmerkingen:

1. Lysisbuffer: glucose voorkomt osmotische shock, lysozyme breekt de celwand af.
2. Bij de miniprep-methode met alkalische lysis lyseren de bacteriën door het detergens sodium-dodecyl-sulfaat (SDS). Dit denatureert tevens bacteriële eiwitten. NaOH denatureert chromosomaal- en plasmide-DNA (dwz. smelt de dubbele DNA-helix uit door hoge pH, waardoor enkelstrengs-DNA ontstaat).
3. Doordat het plasmide-DNA veel kleiner is dan het chromosomaal DNA kan het na toevoegen van 3 M natriumacetaat pH 4.8 weer renatureren (vormen de complementaire strengen weer dubbelstrengs-DNA) en blijft het in oplossing. Door toevoegen van zuur natriumacetaat aan NaOH/SDS wordt de pH tussen 6 en 7. Tegelijk precipiteren bacteriële eiwitten met daaraan gebonden chromosomaal DNA en het meeste SDS (wit precipitaat). Dit witte precipitaat wordt verwijderd.
4. Nucleinezuren zijn **onoplosbaar in zeer koude 70% ethanol** en slaan neer. De ethanolprecipitatie is dus een eenvoudige zuiveringsstap. Dit neerslaan lukt alleen als er éénwaardige tegenionen, zoals  $\text{Na}^+$  of  $\text{NH}_4^+$  in de oplossing aanwezig zijn. Het plasmide-DNA bevindt zich in de pellet. Restjes ethanol moeten worden verwijderd.
5. Bacterieel RNA wordt ook neergeslagen met ethanol en vormt dan het hoofdbestanddeel van de pellet. Dit RNA wordt afgebroken door het enzym RNase-A toe te voegen.
6. De EDTA in de  $\text{T}_{10}\text{E}_1$ -buffer vangt  $\text{Mg}^{2+}$ -ionen weg. Deze zijn nodig voor de katalytische werking van DNase. DNase mag natuurlijk niet werkzaam zijn!

### Plasmide pUC4K

Op deze kaart is aangegeven welke restrictie-sites op het  $\text{Km}^r$  gen liggen.



## **OPLOSSINGEN**

### **KNIPPEN DNA MET RESTRICTIE-ENZYM**

RNase: 500 µg/ml RNase-A in demiwater. Kook 10 min. (om DNase-I verontreiniging te inactiveren) en bewaar bij -20°C.

### **ELEKTROFOREREN DNA IN AGAROSE**

50x TAE: 242 g Tris, 57,1 ml ijsazijn, 100 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH=8) per liter demiwater. Deze stockoplossing wordt voor gebruik 100x verdund.

0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (TitriplexIII): 186,12 g/liter demiwater. Stel de pH van de EDTA-suspensie met 5 M NaOH op 8. EDTA lost bij deze concentratie niet op voordat de pH dichtbij 8 is.

5x Opbrengbuffer: broomfenolblauw 0,25%, xyleencyanol 0,25%, glycerol 30% of Ficoll in demiwater. Bewaren bij 4°C.

Ethidium-bromide: stockoplossing 1 mg/ml in demiwater. Bewaren in het donker bij 4°C. Per kleurbakje met 100 ml demiwater 100 µl stockoplossing toevoegen.

Zeer giftig, handschoenen aandoen!

### **COMPETENTE CELLEN, TRANSFORMEREN EN UITPLATEN VAN *E. COLI***

LC medium: 10 g trypton, 5 g gistextract, 10 g NaCl per liter demiwater. Voeg voor vast LC medium 1,8% agar toe. 20 min. autoclaveren bij 120°C.

1M CaCl<sub>2</sub>: 54 g/liter in demiwater. 20 min. autoclaveren bij 120°C.

Xgal: 40 mg/ml in dimethylformamide (DMF is zeer giftig!). Bewaren bij -20°C.

IPTG: 40 mg/ml in demiwater. Filtersteriliseren en bewaren bij -20°C.

Ampicilline: 60 mg/ml in demiwater. Filtersteriliseren en bewaren bij -20°C.

Kanamycine: 40 mg/ml in demiwater. Filtersteriliseren en bewaren bij -20°C.

### **ISOLEREN PLASMIDE-DNA**

Lysisbuffer: 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH=8), 10 mM EDTA (pH=8), en 5 mg/ml lysozyme in demiwater. Samenstellen uit steriele vloeistoffen!

NaOH/SDS: eindconc. 0,2 M NaOH/1% SDS.

Concentratie stockopl.: 4 M NaOH en 10% SDS. Aan steriel water de juiste hoeveelheid NaOH toevoegen, goed mengen en dan de juiste hoeveelheid SDS toevoegen en weer goed mengen! **Niet op ijs zetten.**

1 M Tris-HCl: 121,1 g Tris in 800 ml demiwater. Voor pH 7,4 70 ml geconcentreerd HCl toevoegen; voor pH 7,6 60 ml gec. HCl toevoegen, voor pH 8,0 42 ml gec. HCl toevoegen. Aanvullen met demiwater tot 1 liter. Autoclaveren 20 min. 120°C.

0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (TitriplexIII): 186,12 g/liter demiwater. Stel de pH van de EDTA-suspensie met 5 M NaOH op 8. EDTA lost bij deze concentratie niet op voordat de pH dichtbij 8 is. Autoclaveren 20 min. 120°C.

T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-buffer (pH=8): 10 mM Tris en 1 mM EDTA (vanuit steriele stockoplossingen, in steriel demiwater).

3 M natriumacetaat pH=4,8: 408,1 g natriumacetaat.3H<sub>2</sub>O in 800 ml demiwater oplossen. pH stellen met ijsazijn. Aanvullen tot 1 liter met demiwater. Autoclaveren 20 min. 120°C.

70% ethanol: 70 ml steriel demiwater met 96% ethanol aanvullen tot 96 ml.

## **WAT GAAN WE DOEN en WANNEER?**

Tijdens de verschillende practicumdagen ga je een DNA-fragment dat het gen bevat voor kanamycine-resistentie in het plasmide pUC19 kloneren. Het Km<sup>r</sup> gen is met het restrictie-enzym EcoRI uit het plasmide pUC4K geknipt. Het DNA fragment is uit agarosegel geïsoleerd. Dit fragment en de conc. van het DNA krijg je.

- Het **plasmide pUC19 knippen** we met hetzelfde restrictie-enzym als waarmee het Km<sup>r</sup>-gen is geknipt.
- Het geknipte DNA analyseer je m.b.v. **gel-elektroforese**.
- Het Km<sup>r</sup>-gen **ligeer** je in het geknipte pUC19 DNA.
- Dit nieuwe plasmide breng je in *E.coli*-bacteriecellen (**transformatie**)

Deze bacteriecellen laat je groeien op een vaste voedingsbodem dat een herkenbaar voordeel geeft aan de bacteriecellen die het pUC19::Km<sup>r</sup> plasmide in zich hebben opgenomen. Dit doen we op twee manieren. De eerste manier is de blauw-wit screening (lac-Z gen). De andere manier is om de bacteriecellen te laten groeien op platen met kanamycine: hierop kunnen alleen de bacteriën groeien die het plasmide met het Km<sup>r</sup> gen hebben gekregen. Een witte bacteriekolonie of een Km<sup>r</sup> kolonie wordt opgekweekt in selectief vloeibaar medium.

- Hieruit **isoleer** je **plasmide-DNA**.
- **Controleer** m.b.v. restrictie-enzymanalyse (zie kaart pUC4K) de klonering.

### **Voor de hele procedure hebben we meerdere practica nodig.**

#### **Je werkt volgens onderstaand schema:**

do	24/9:	inleiding Recombinant-DNA/nuclease-vrij werken <b>knippen</b> van pUC 19: <u>1 knipreactie</u> inzetten (individueel) uitleg over en beginnen met je labjournaal bijhouden
vr	25/9:	agarosegel gieten: <u>1 gel per 3 paar</u> geknipt pUC19 <b>elektroforeren</b> om het knippen te controleren <b>ligeren</b> van het Km <sup>r</sup> -gen in het geknipte pUC19: <u>1 ligatie per knipje, d.w.z. 2 ligaties per paar</u> labjournaal bijwerken
ma	28/9:	DNA overbrengen in <i>E.coli</i> ( <b>transformeren</b> ): <u>2 transformaties per ligatie</u> , (1 ligatie is reserve): 1 transformatie uitplaten op selectieplaat 1 en de andere op selectieplaat 2. Overleg samen wie wat doet en neem de resultaten van elkaar over en vergelijk labjournaal bijwerken.
di	29/9:	transformanten aanzetten om overnacht te laten groeien <b>Kweek</b> 4 transformanten (per paar) op voor plamide DNA-isolatie, schrijf op van welke transformatieplaten deze transformanten afkomstig zijn!
vr	2/10:	<b>Donderdag 1/10: alle opdrachten uit de handleiding en labjournaal maken</b> <b>plasmide DNA-isolatie:</b> isoleer DNA uit <u>1 transformant (individueel)</u> <b><u>Je voert de isolatie zelf uit!</u></b>
ma	5/10:	maak zelf een <b>voorstel</b> welke restrictie-enzym(en) je kunt gebruiken voor de <b>DNA analyse</b> , zet de knipreactie in (zie do 24/9)
woe	7/10:	<b>gelelektroforese:</b> <u>2 gels nodig per rij, onderling afspraken maken over</u> <u>het laden van de gel!</u> analyse resultaten en labjournaal bijwerken
ma	12/10:	starten met het maken de presentatie en vragen opstellen <b>Labjournaal helemaal afmaken en inleveren</b>
di	13/10:	<b>Presentatie</b> (presentatie/discussie max.15 min/groep)

## LABJOURNAAL

Maak het **labjournaal** volgens het uitgereikte **protocol**.

Hier onder staan **enkele voorbeelden van schema's**<sup>x)</sup> die in het labjournaal horen.

Vul zelf de ontbrekende gegevens in de schema's aan.

**Bij elk onderdeel staan vragen. Beantwoord deze kort en bondig.**

Laat het labjournaal regelmatig aan je assistent zien en vraag commentaar.

Er wordt duidelijk aangegeven wanneer de labjournaals ingeleverd moeten worden!

**1. Voorbeeld van een knipschema inclusief volgorde van pipetteren**

$H_2O$	$\mu l$
knipbuffer conc?	$\mu l$ eindconc?
pUC19 [ $\mu g/\mu l$ ]	$\mu l$ eindconc. $\mu g/\mu l$ ?
restrictie-enzym [ $U/\mu l$ ]	$\mu l$ eindconc. $\mu g/\mu l$ ?
Totaal:	20 $\mu l$ .

Knippen .....uur bij ...<sup>o</sup>C.

Inactiveren restrictie-enzym ...min. bij ...<sup>o</sup>C

**Beantwoord de volgende vragen en schrijf deze op de linkerpagina.**

- Je gebruikt voor deze klonering 2 plasmiden. **Beschrijf** de kenmerken waarom je deze plasmiden wilt gebruiken.
- Teken beide plasmiden** lineair en op schaal op mm-papier.  
Geef van beide plasmiden aan: de resistentiegenen, lac Z gen en ori.  
Geef de leesrichting van de genen aan.  
Geef in de MCS de sites (= positie) van de restrictie-enzymen (RE) aan: PvuI, HindIII en EcoRI (geef de laatste een kleur).
- Geef aan welk van de 2 plasmiden de vector is.
- Beschrijf hoe het lac Z gen kan werken als positieve selectie bij een klonering.
- Leg de keuze uit voor de site waarin je gaat kloneren.
- Wat is het verwachte bandenpatroon als je beide plasmiden gaat knippen met je gekozen RE?
- Maak een lineaire tekening van 2 mogelijke recombinant DNA moleculen.  
Geef de leesrichting aan van de resistentiegenen, lac Z gen en ori.  
Geef beide oriëntaties van het fragment aan.  
Geef de restrictiesites aan in de MCS, begin bij HindIII richting EcoRI.  
Geef de juiste basepaar notatie aan van PvuI, EcoRI en HindIII.
- Welke restrictie-enzym(en) zou je gebruiken om uit te zoeken in welke oriëntatie het km-fragment gekloneerd is in de vector?
- Welke fragmenten verwacht je als de 2 mogelijke recombinant DNA moleculen knipt met het door jou gekozen restrictie-enzym?

**2. Elektroforeren van DNA (voorbeeld schema)**

Er zijn 8 laantjes beschikbaar per gel. In welk laantje heb jij je sample opgebracht?

- $\mu l$  +  $\mu l$  loadingbuffer Plak de foto van er gel erbij.
  - $\mu l$  +  $\mu l$  loadingbuffer Geef van de molecuulmarker en
  - $\mu l$  +  $\mu l$  loadingbuffer de grootte van de banden aan.
- Enz.enz.

<sup>x)</sup> alles wat cursief gedrukt is hoort vermeld te worden in het labjournaal op de rechterpagina.

- Welk % agarose heb je gebruikt? Leg kort uit waarom dat percentage is gebruikt?
- De stock runningbuffer = 50x. Hoeveel is hiervan nodig om 1 gel te runnen?
- Hoe lang en op welk voltage is de gel gerund?

### 3. Resultaten van de elektroforese

Hoe heb je de gel gekleurd/ontkleurd/bekeken?

- Komt het bandenpatroon overeen met de verwachting (zie 1b)?
- Zo nee, kun je de gevonden bandjes verklaren? (denk bv. aan: de knipreactie)  
Geef voor elk bandje apart een verklaring!
- Geef aan op de foto waar het  $Km^r$  fragment zou moeten zitten.

### 4. Ligeren van $Km^r$ in het geknipte pUC19

$H_2O$	$\mu l$	
ligatiebuffer [conc. ?]	$\mu l$	[eindconc. ?]
pUC19 [conc. per $\mu l$ ?]	$\mu l$	[eindconc. ng/ $\mu l$ ?]
$Km^r$ -DNA [conc. per $\mu l$ ?]	$\mu l$	[eindconc. ng/ $\mu l$ ?]
T4-DNA-ligase (1U/ $\mu l$ )	$\mu l$	
Totaal :	10 $\mu l$	

Ligeren ..... uur bij ..... $^{\circ}C$ .

- Waarom is de optimale ratio (aantal moleculen) vector : insert = 1 :6?
- Bereken hoeveel  $\mu l$  je moet gebruiken van de geknipte vector en van het  $Km^r$ -fragment DNA om de juiste verhouding tussen het aantal moleculen pUC 19 en het aantal moleculen  $Km^r$ -DNA in je ligatiemengsel te krijgen? Schrijf de berekening helemaal uit.
- Wijkt de door jou gebruikte verhouding hier van af? Zo ja, waarom?

### 5. Competente cellen maken

- Welke bacteriestam wordt hiervoor gebruikt? Welke voor dit doel gunstige eigenschappen heeft deze stam?
- Schrijf kort de procedure op zoals je die hebt uitgevoerd.
- Welke OD had de bacterieculture?
- Met hoeveel bacteriën per ml komt deze OD overeen?
- Hoeveel bacteriën gebruik je voor je transformatie?
- Wat doet  $CaCl_2$ ?
- Waarom maak je spheroplasten van de bacteriecellen?

### 6. Transformeren van *E.coli* (beantwoord de vragen per transformatie!)

- Schrijf kort de procedure op zoals je die hebt uitgevoerd.
- Beschrijf bij elk punt het waarom.
- Hoeveel ng vector DNA heb je getransformeerd?
- Welke selectieplaten gebruik je en waarom?
- Maak een tabel met de conc. antibiotica + ..  $\mu l$  stock per plaat aanwezig (p87)
- Hoeveel bacteriën plaat je uit per plaat?
- Wat verwacht je dat er op de platen groeit? Klopt dat met wat je vindt? Zo nee, verklaar het verschil.
- Wat zou een goede blanco zijn en waarom?
- Bereken de vitaliteit van de bacteriën.
- Bereken voor elke selectie het aantal transformanten per  $\mu g$  vector DNA per  $1.10^6$  bacteriën.

- k. Geef in **tabelvorm** de resultaten van de transformaties uitgeplaat op de 2 selectieplaten. Let op dat je de getallen zo weergeeft dat ze direct met elkaar kunnen worden vergeleken.
- l. Vergelijk de resultaten en trek hieruit goed onderbouwde conclusies.

### 7. Isoleren van plasmide-DNA uit de transformanten

- a. Welke selectiemedia gebruik je en waarom?
- b. Welke bacteriekolonies gebruik je om transformanten uit te isoleren?  
Leg uit waarom?
- c. Beschrijf kort hoe je de plasmiden hebt geïsoleerd. Geef per isolatiestap aan welke reactie(s) er plaatsvinden.

### 8. Knippen van recombinant plasmide-DNA

- a. Met welk restrictie-enzym/welke restrictie-enzymen ga je knippen?
- b. Welk/e bandje/s verwacht je en waarom?

Knipschema: $H_2O$	$\mu l$
knipbuffer conc?	$\mu l$ eindconc?
pUC19::Km <sup>r</sup> [ $\mu g/\mu l$ ]	$\mu l$ eindconc. $\mu g/\mu l$ ?
RNase conc.?	$\mu l$ eindconc.?
restrictie-enzym [ $U/\mu l$ ]	$\mu l$ eindconc. $\mu g/\mu l$ ?
Totaal:	<b>20 <math>\mu l</math>.</b>

Knippen.....uur bij ....<sup>o</sup>C.

**Opmerkingen:** beschrijf hier eventuele afwijkingen van de procedure.

### 9. Elektroforeren DNA

Er zijn 8 laantjes beschikbaar per gel. Wat heb je in welk laantje opgebracht?

- |   |   |
|---|---|
| 1. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer | 5. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer |
| 2. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer | 6. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer |
| 3. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer | 7. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer |
| 4. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer | 8. .. $\mu l$ DNA+ .. $\mu l$ loadingbuffer |
- a. Welk % agarose heb je gebruikt? Waarom dat %?
  - b. Welke runningbuffer heb je gebruikt?
  - c. Hoe lang en op welk voltage is de gel gerund?

### 10. Resultaten van de elektroforese

Plak de foto van de gel in je labjournaal en geef van de DNA-ladder de molecuulgewichten aan.

- a. Per geknipt plasmide: komt het gevonden bandje/de gevonden bandjes overeen met het bandje/de bandjes die je verwacht (zie 8b)?
- b. Zo niet, geef een verklaring?

**TREK JE CONCLUSIE: HEB JE EEN pUC19::Km<sup>r</sup> PLASMIDE GEMAAKT?**

# DE BACTERIELE GROEICURVE

## VOORBEREIDING

Het programma staat op Blackboard in course documents. Download de file volgens de instructies. Via blackboard wordt bekend gemaakt of je voor deze opdracht gebruik kunt maken van computers in de computerzaal 1.5.07 in het Sylvius. Dit is een zelfstandige opdracht die je per paar mag maken. Je levert samen de opdracht in op de aangegeven datum voorzien van namen/plaatsnr.

**LET OP: Je kunt tussendoor je data NIET saven. Reken op ca. 2 uur!**

Voordat je het programma start (programs Scotcall), moet je eerst controleren of in **Windows** de punt en de komma als scheidingsteken in de getallen goed staan. Hiervoor ga je via **start** en **settings** naar het **control panel**. Kies **regionale settings** en dan **number**. Als het *decimale scheidingsteken* een komma is, verander dat dan in een **punt**. Als het *digit grouping symbol* een punt is, verander dat dan in een komma. Via **apply** en **ok** save je deze configuratie. **Deze configuratie wordt niet bewaard en moet dus bij opnieuw inloggen elke keer opnieuw worden ingesteld.**

## THE SECTIONS OF THE PROGRAM

The program is divided into a number of sections and, in general, you should work through these sections in the given order. However, you should look ahead to the questions in the *Report section* when you are planning your experiments in the *Laboratory section*, since these questions are based on these results.

**Introduction:** This contains details of the structure of the program and information that will help you if you have never used a similar program before. For example, it will tell you about *hotwords* and *dialog boxes*. If you are not familiar with these and similar terms, do spend some time in this section to get more out of the program.

**Aims:** This section explains the aims and objectives of the tutorial.

**Library:** As its name suggests, this section contains the background information that you will need to complete the practice successfully. Spend some time browsing through it for information you are not familiar with. On one page, there is a time-lapse video of dividing bacteria.

**Laboratory:** When you enter the Laboratory, you will be greeted by your supervisor who will explain you about the ways you can get help. Your supervisor is chosen at random each time you run the program. If you want, you can change to another supervisor by selecting *Preferences + Supervisor...* on the Menu bar. However, the actual identity of the supervisor is not important and does not affect the rest of the program in any way.

## Experiment 1: Determine the total of cell count of a cell suspension.

The method used for this experiment is explained on page 2 of the Laboratory while the experiment itself can be run on page 3. When you want to run an experiment, work through the different steps by clicking the four buttons on the right side of the screen. When you plan your experiment by clicking on the *Plan experiment* button, the changes you make will appear on the left side of the screen in boxes that flash for a few seconds after they have been changed. The results of your experiment will appear at the center of the screen. Once you have collected all the necessary data to answer Questions 1 and 3 in the *Report section*, click on the *Copy results into lab book section*.

**Experiment 2: Determine the viable cell count of a cell suspension.**

The method used for this experiment is explained on page 4 of the Laboratory while the experiment itself can be run on page 5. The procedure here is similar to that described for experiment 1. Click on the buttons on the right side of the screen to plan your experiment, run it and examine the results. Once you have collected all the necessary data to answer Questions 2 and 3 in the *Report section*, click on the *Copy results into lab book* button.

**Experiment 3: Prepare a calibration curve.**

The method used for this experiment is explained on page 6 of the Laboratory while the experiment itself can be run on page 7. Your results will be plotted automatically in the *Result box* at the center of the screen. Once you have collected all the necessary data to answer Questions 4 and 5 in the *Report section*, click on the *Copy results into lab book* button.

**Experiment 4: The growth experiment.**

The method used for this experiment is explained on page 8 of the *Laboratory* while the experiment itself can be run on page 9. At this stage, you will be able to select a broad range of growth conditions when you plan each experiment. So, check out the questions you have been set in the *Report section* and try to design appropriate experiments that will allow you to answer these questions. Your results will be plotted automatically in the *Result box* at the center of the screen. If you are happy with the results of a particular experiment, click on the *Copy results into lab book* button to save these in your lab book. Remember that, if you do not save these results, they will be lost when you run another experiment.

**N.B.** In dit gedeelte zit een storende fout. Tijdens de logaritmische groeifase is het totaal aantal cellen (total cell account) gelijk aan het totaal aantal levende cellen (viable cell account). Het is dus zinloos om de groeicurves te bekijken met grafieken voor Biomass concentration, Total cell count en Viable cell count. **De Biomass concentration alleen is meer dan voldoende.**

**LAB BOOK**

When you click on the *Copy results into lab book* button in the *Laboratory section*, your results are stored in your lab book. You can view these at any time by going to the *Lab book section*. The buttons on the right side of the screen allow you to: (1) set the name and date that will appear; (2) run the Windows calculator; (3) print out pages with interesting results for incorporation into your report; (4) view the results as a table.

**Only print out pages when you feel this is essential** as this can be a slow process depending on the computer and printer you are using. With some printers, you may find that the print-out has characters misplaced. If this is a problem, select *Screen resolution* in the *Print page dialog box* that appears when you click on the *Print page* button.

To navigate through the pages of this section more quickly, keep the mouse button pressed down. There is a table headed *Summary of growth experiment results* at the end of the *Report section* of this document. You can use this to note down the results of your experiments as you perform them.



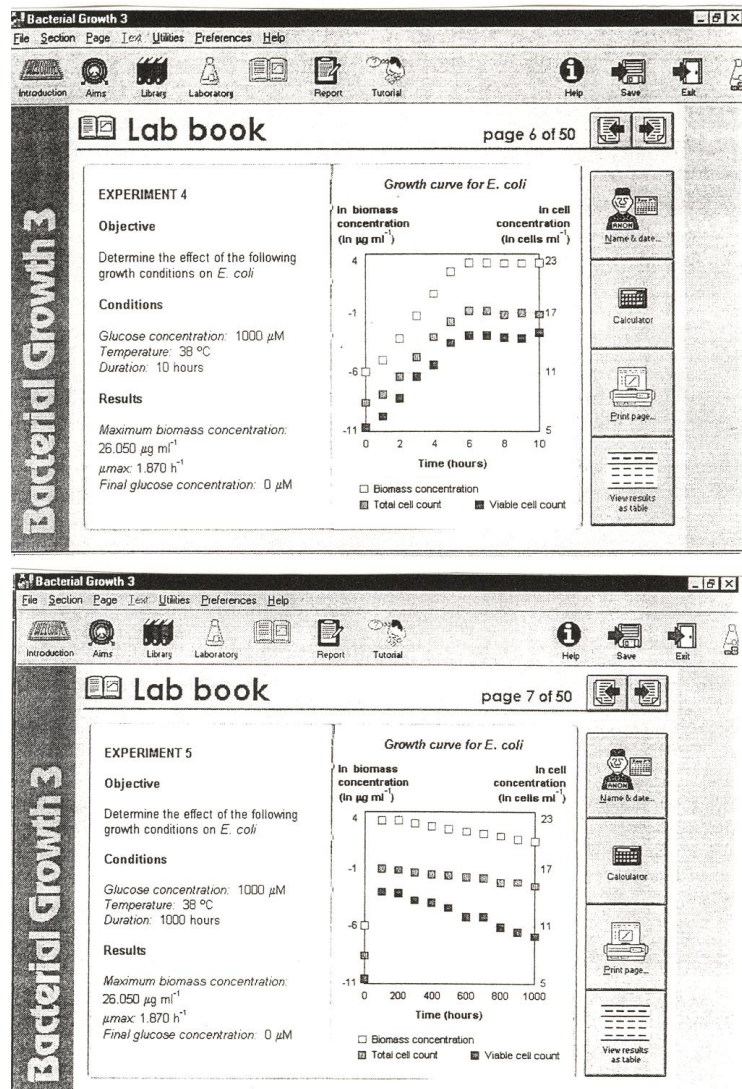
## Opmerkingen

In de Library (pag 10) staat een **verkeerde definitie van de Ym**.  
De Ym (molar yield coëfficiënt) is:

**Final biomass concentration minus Initial biomass concentration**

**Initial glucose concentration minus Final glucose concentration**

waarbij de Final glucose concentration bij deze proeven altijd 0 is.



De grafieken voor viable cell count en voor total cell count worden niet altijd goed weergegeven. Vergeet deze dus en werk alleen met biomass concentration.

**VRAGENFORMULIER compleet invullen en alleen dit formulier gebruiken!****1. Wat is het totaal aantal cellen per ml in de oorspronkelijke suspensie?**

Biomass concentration in original cell suspension: 12 mg/ml  
 Total volume above each large square:  $5 \times 10^{-8}$  ml  
 Dilution of original cell suspension used:  
 Average number of cells per large square:  
 Total number of cells per ml in diluted suspension:  
 Total number of cells per ml in original suspension:

**2. Wat is het aantal levende cellen per ml in de oorspronkelijk suspensie?**

Biomass concentration in original cell suspension: 12 mg/ml  
 Volume inoculated onto each plate: 0.1 ml  
 Dilution of original cell suspension used:  
 Average number of colonies per plate:  
 Number of viable cells per ml in diluted suspension:  
 Number of viable cells per ml in original suspension:

**3a. Wat is de massa van een enkele *Escherichia coli* bacterie in grammen?****3b. Hoeveel *E.coli* bacteriën zitten er in één gram?****4. Bij welke optische dichtheid is het verband tussen OD en biomassa niet meer lineair?****5. Hoe kun je de ijklijn toch gebruiken om de biomassa te bepalen van een zeer dichte *E.coli* cultuur?****6a. Door welke cycli gaat de bacteriële groeicurve? (Bibliotheek blz. 9)****6b. Waarom is er verschil tussen het totale aantal en het aantal levende bacteriën in de verschillende groeistadia? Bereken het verschil voor jouw experiment.****7a. Wat is de minimum temperatuur waarbij *E.coli* (nog) kan groeien?****7b. Wat is de optimum temperatuur voor groei van *E.coli*?**

- 7c. Wat is de maximum temperatuur waarbij *E.coli* (nog) kan groeien?
8. Waarom denk je dat *E.coli* dit temperatuur-optimum heeft?
9. Beschrijf zo exact en beknopt mogelijk het effect van de beginconcentratie glucose op de maximale specifieke groeisnelheid ( $\mu_{max}$ ). Maak eerst een grafiek en teken deze hieronder!
10. Hoe wordt de molaire opbrengst-coëfficiënt ( $Y_m$ ) beïnvloed door de startconcentratie glucose bij 38°C? Maak hiervoor een grafiek met de  $Y_m$  op de Y-as en de glucoseconcentratie op de X-as. De beginhoeveelheid biomassa was in ieder experiment 0.003  $\mu\text{g}$  per ml. Bij de gebruikte temperatuur is de uiteindelijke glucoseconcentratie altijd 0.
- 11a. Welke groeicondities geven de grootste hoeveelheid biomassa en welke parameter is hierbij onbelangrijk?
- 11b. Welke groeicondities geven de grootste specifieke groei?
- 12a. Hoe verandert de maximum concentratie van de biomassa als je de hoeveelheid biomassa van het inoculum (de hoeveelheid biomassa waarmee je begint) verviervoudigt?
- 12b. Hoe verandert de tijd om de maximum hoeveelheid biomassa te bereiken bij een verviervoudiging van de hoeveelheid biomassa in het inoculum?

**SUMMARY OF GROWTH EXPERIMENT RESULTS** (noteer ook handmatig)

Experiment Number	Initial glucose concentration $\mu\text{M}$	Temperature $^{\circ}\text{C}$	Duration H	Maximum biomass concentration $\mu\text{g/ml}$	$\mu_{\text{max}}$ $\text{h}^{-1}$	$Y_m$ g/mol
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						

## **HET MAKEN VAN DIVERSE TYPE PREPARATEN VOOR MICROSCOPIE**

Veel onderdelen van biologische systemen, zoals cellen en weefsels, zijn te klein om nog met het blote oog waar te nemen. We zullen daarom op dit practicum gebruik maken van de microscoop.

Om een voorwerp te kunnen bestuderen met de microscoop moet aan een aantal voorwaarden worden voldaan.

- ❖ Er moet een lichtbundel door het voorwerp geleid worden om door de oculairen van de microscoop het voorwerp te kunnen waarnemen.
- ❖ Het voorwerp moet voldoende dun zijn om het licht door te laten.
- ❖ Een microscoop heeft een geringe scherptediepte, daarom moet het voorwerp in een zo plat mogelijk vlak aangebracht worden.

Aan de voorwaarden kan worden voldaan door een preparaat te maken van het voorwerp.

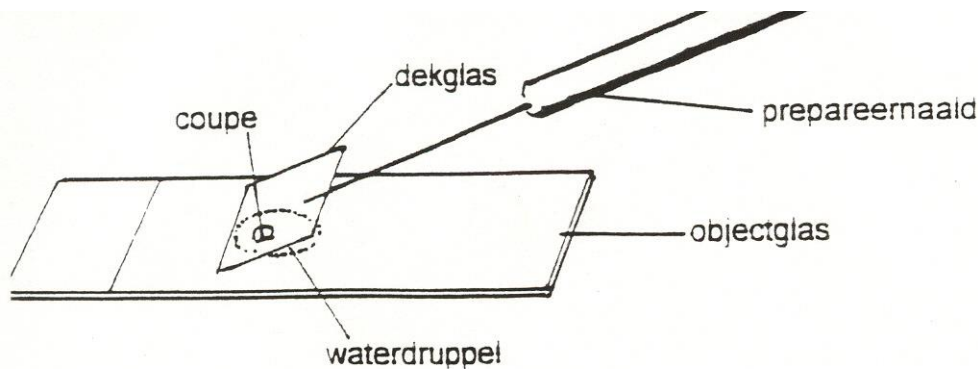
### **HET MAKEN VAN EEN NAT PREPARAAT**

Neem een schoon objectglas en leg daarop een druppel water. Breng hierin een coupe (dun plakje van een weefsel), een dun blaadje, een paar draden van een schimmel, een klein beetje van een kolonie van een bacterie, gist of schimmel of een klein stukje van een ander object. Doe dit met een steriele entnaald of prepareernaald (afflamberen en afkoelen in agar of in water). Hierna de naald meteen weer afflamberen om infectie van de omgeving te voorkomen. Als je micro-organismen in een oplossing wilt bekijken, doe dan met een steriele (pasteur)pipet een druppel hiervan op het objectglas. Neem vervolgens een dekglas en breng dit onder een hoek van 45° in contact met de rand van de druppel op het objectglas. Laat het dekglas langzaam zakken met behulp van een prepareernaald. Haal het teveel aan water weg met een filtreerpapiertje. Dreigt het preparaat tijdens het bekijken uit de drogen, breng dan een druppeltje water aan tegen de rand van het dekglas. Door capillaire werking zal het onder het dekglas worden gezogen.

Je kunt het preparaat wat langer goed houden door het dekglas te omranden met nagellak. Laat dit goed drogen alvorens het preparaat onder de microscoop te leggen, want nagellak is natuurlijk desastreus voor de objectieven. Een andere manier is om het water te vervangen door een druppel glycerine. Dit kun je doen door een druppel tegen één kant van het dekglas te leggen en tegen de tegenovergestelde kant een filtreerpapiertje te houden. De glycerine wordt dan onder het dekglas gezogen.

### **HET MAKEN VAN EEN DROOG PREPARAAT VAN BACTERIËN**

Levende bacteriën zijn kleurloos en contrasteren niet genoeg met water om scherp zichtbaar te zijn. In chemisch opzicht zijn ze natuurlijk wel anders. Hiervan maken we gebruik door met verschillende kleurstoffen de bacteriën of onderdelen daarvan te kleuren. Om deze kleuringen uit te kunnen voeren wordt een droog preparaat gemaakt.



Breng met een steriele (pasteur)pipet een druppeltje bacteriesuspensie op een schoon en vetvrij objectglas. Strijk dit druppeltje uit over het objectglas met de rechte kant van een steriele entnaald en droog het aan de lucht (wapperen). Markeer de kant van het objectglas waarop de bacteriën zitten met een viltstift of glaspen. Haal vervolgens het objectglas met de bacteriën aan de bovenzijde 3x snel hoog door de grote (blauwe) vlam van de bunsenbrander. Hierdoor worden de bacteriën aan het objectglas gefixeerd. De polysacchariden denatureren en hechten daardoor aan het objectglas.

Voer nu de kleurprocedure uit volgens voorschrift. Wacht na de kleurprocedure tot het preparaat droog is (niet verhitten, wel wapperen) en breng een druppel immersieolie aan meteen op het droge preparaat (dus géén dekglas aanbrengen!) en bekijk het preparaat. **Let op:** bij het maken van een droog preparaat worden de bacteriën kleiner.

### HET MAKEN VAN EEN VAST PREPARAAT

Het maken van een vast preparaat vereist een serie van handelingen, zoals fixeren, door een alcoholreeks voeren om te ontwateren, inbedden, eventueel snijden, kleuren enz. Dit is gespecialiseerd werk dat veel tijd eist, met als resultaat een preparaat dat jaren bruikbaar blijft. Op dit practicum zullen we dit echter niet doen.

### KLEURSTOFFEN

Kleurstoffen zijn over het algemeen zouten waarvan één der ionen gekleurd is. Bijv. methyleenblauw, dat als volgt dissocieert:



Het positieve ion is gekleurd. Bacteriecellen hebben een zwak negatieve lading wanneer de pH van hun omgeving neutraal is. De negatief geladen bacteriecel bindt het positief geladen methyleenblauw-ion en wordt dus gekleurd. Dit is een voorbeeld van **positieve of directe kleuring**.

In het geval van de kleurstof nigrosine geeft het negatief geladen ion de kleur. Nu blijft de bacterie ongekleurd en rond de cel ontstaat een neerslag van de kleurstof. Dit is **indirecte of negatieve kleuring**.

De Gramkleuring is een zogenaamde **differentiële kleuring** die, als gevolg van een verschil in opbouw van de celwand, de bacteriën in twee groepen verdeelt. Gram-positieve bacteriën kleuren violet/purper (kristalviolet), Gram-negatieve bacteriën kleuren rood/rose (saffranine).

## **KLEURINGEN**

**Denk bij het uitvoeren van kleuringen altijd goed aan de volgende punten:**

- Voer de kleuringen uit op de kleurtafels, dus **niet** op je eigen plaats.
- Markeer het objectglas zodanig dat je altijd weet wat de bovenkant is.
- Zet, bij het wassen van de kleuring onder de kraan, de waterstraal nooit direct op de bacteriën.
- Drogen aan de lucht gaat sneller wanneer je met het objectglas wappert.

### **Methyleenblauwkleuring:**

1. Druppel wat methyleenblauw op het droge preparaat en laat de kleurstof 2 min. inwerken.
2. Spoel in een bekersglas met leidingwater.
3. Droog het preparaat aan de lucht en microscopiseer.

**Resultaat:** bacteriecelwanden blauw, endosporen niet gekleurd.

### **Gramkleuring:** Campbell blz. 603

1. Kleur het droge preparaat 1 min. met ammoniumoxalaat/kristalviolet.
2. Spoel met leidingwater boven een bekersglas (vang de kleurstof op).
3. Dompel het preparaat 2 min. in gramiodineoplossing (ook wel genoemd: Lugol's JKJ-oplossing (vorming intracellulaire kristalvioletjodiumverbinding).
4. Spoel het preparaat boven een bekersglas met leidingwater en dep voorzichtig droog met een filtreerpapiertje.
5. Ontkleur 25 sec. het preparaat in 96% alcohol door het preparaat langzaam te kantelen, tot er geen kleur meer van de cellen af komt)
6. Tegenkleuring: 1 min. met saffranine (2,5% in 96% alcohol).
7. Spoel boven een bekersglas met leidingwater.
8. Verwijder het water met een filtreerpapiertje of tissue door capillaire werking
9. Droog het preparaat aan de lucht en microscopiseer.

**Resultaat:** Gram-positieve bacteriën blauwpaars.  
Gram-negatieve bacteriën rozerood.

De interpretatie van deze kleuring is niet altijd eenvoudig. Voer daarom de kleuring meerdere keren uit, liefst met bacteriën uit cultures van verschillende ouderdom.

De grambepaling kan ook met de KOH methode worden uitgevoerd.

**Opmerking:** Na sporenvorming is de celwand van Gram-positieve bacteriën veranderd, zij kleuren dan als Gram-negatieve. De ethanolconcentratie is van groot belang voor de mate van ontkleuring; bij concentraties lager dan 96% worden ook Gram-positieve bacteriën ontkleurd.

### **Gram-bepaling met KOH-methode:**

Geschikt voor verse cultures. Probeer deze methode uit met de gram<sup>-</sup> *E.coli*

1. Druppel 3% KOH op een glasplaatje
2. Resuspendeer met een cocktailprikker een kluitje bacteriecellen in KOH
3. Trek de cocktailprikker uit de druppel

**Resultaat:** Kun je een draad trekken: Gram<sup>-</sup>  
Kun je geen draad trekken: Gram<sup>+</sup>

**Nigrosinekleuring:**

Bij deze kleuring maak je een **nat** preparaat.

1. Meng op een objectglas een druppel nigrosine met een druppel bacteriesuspensie.
2. Trek met een tweede objectglas de gemengde druppel als een film over het eerste objectglas.
3. Droog het preparaat aan de lucht en microscopiseer.

**Resultaat:** ongekleurde cellen in een donker veld. Eventueel aanwezige slijmkapsels zijn nu zichtbaar als witte dotjes. Bekijk de preparaten met de olie-immersie bij een vergroting van 10x100.



# DE ORGANISATIE VAN CELLEN

## VOORBEREIDING

- **Campbell: H.6.1 en 6.2 en de CD-ROM**
- **Onderstaande inleiding en experimenten**

Let op de overeenkomsten en de verschillen tussen de planten- en dierencellen. Realiseer je dat je hier cellen op transmissie-elektronenmicroscopisch niveau bekijkt: biologische structuren van ongeveer 2 nm groot zijn te onderscheiden. Met een lichtmicroscop (aanwezig tijdens practicum) zijn structuren van ca. 2  $\mu\text{m}$  nog te onderscheiden.

Elk organisme is opgebouwd uit één of meer cellen. De grootte van deze cellen ligt globaal tussen de 1 en 100  $\mu\text{m}$ . Eéncellige organismen, zoals **prokaryoten** (bacteriën) en lagere **eukaryoten** (protisten), verenigen alle levensfuncties in één cel. Voorbeelden van protisten zijn protozoën en algen. Er zijn ook ééncelligen die tijdelijk kleine groepen (aggregaten of clusters) vormen, maar alle cellen daarbinnen blijven in wezen onafhankelijk van elkaar. Andere ééncelligen vormen kleine of grotere kolonies. Hierin vinden vormen plaats van fysiologische interactie en een begin van specialisatie als basis van weefselvorming. Hogere eukaryoten zijn meercellige organismen die bestaan uit grote aantallen cellen met een gespecialiseerde structuur en functie. Hun cellen kunnen echter niet op zichzelf functioneren en voortbestaan.

Het principiële verschil tussen pro- en eukaryoten zit al besloten in de naam. “Karyos” is het Griekse woord voor “kern”. Een prokaryoot heeft een “**nucleoid**”, een voorstadium van een echte kern zoals aanwezig bij eukaryoten. “Eu” is het Griekse woord voor “echt”.

Een prokaryoot heeft een “nucleoid region” dat niet door een membraan van de rest van het cytoplasma is afgescheiden. Hierin ligt het DNA als een **cirkelvormig chromosoem**. Een eukaryoot heeft een kern die door een enveloppe (dubbel membraan) van de rest van het cytoplasma is afgescheiden: de “**nucleus**”. Hierin ligt het DNA in **draadvormige chromosomen**.

Wij zijn het meest vertrouwd met meercellige organismen zoals dieren en hogere planten. Planten en dieren zijn opgebouwd uit weefsels die bestaan uit cellen met zeer gespecialiseerde functies en met nauwe onderlinge contacten. Maar de basisbouw van hun cellen is altijd terug te voeren naar een typische planten- of dierencel. Onderling vertonen planten- en dierencellen echter duidelijke verschillen. Dat is het hoofdonderwerp van dit practicum.

## PRACTICUMOPDRACHTEN

In dit practicum moeten tekeningen worden gemaakt. Maak ze op glad karton met een 2H-potlood. Vermeld rechts bovenaan je eigen naam. Vermeld links bovenaan de opdracht zoals vermeld in je handleiding, de latijnse naam van het organisme en welk onderdeel van het organisme dat je tekent, welke type preparaat je bekijkt, de gebruikte vergroting en welk type tekening te zien is (zie pg 48 en 60).

Schrijf de gevraagde namen van de onderdelen met een verbindingslijn naast de tekening.

Teken niet te klein: hooguit 2 tekeningen op een vel. Let op: in de opdrachten staat vermeld met hoeveel lijnen je de celwand moet aangeven.

### **Opdracht 1: hoe groot is een ééncellige? (10 min.)**

Maak een nat preparaat van een mengsel van een bacteriesuspensie (prokaryoot) en een gistsuspensie (eukaryoot). Dit preparaat moet met het olie-immersie objectief worden bekeken. Het mag daarom niet te nat zijn, haal overtollig water weg met een filtreerpapiertje. Het preparaat is contrastarm, doe daarom het apertuurdiafragma helemaal dicht. Vergelijk de groottes van deze twee ééncellige organismen.

Hoeveel groter is het volume van een gistcel dan het volume van een bacteriecel? Stel de diameter van een gistcel op 10  $\mu\text{m}$ .

### **Opdracht 2: vergelijking van plantaardige en dierlijke epidermiscel (60 min., zie voor tekenaanwijzingen blz. 48)**

- Maak een nat preparaat van binnenepidermis-cellen van de bolrok van een ui (*Allium cepa*). Doe dit op je eigen plaats. Neem per paar mee van de raamtafel: een bolrok van de ui, contrasttegel, porseleinen schaalpje gevuld met kraanwater, pincet, prepareernaald, paar filtreerpapiertjes, object- en dekglas. Snij met een scheermesje een vierkant stukje uit de binnenzijde van een bolrok en trek het bovenste laagje, de epidermis, voorzichtig los met een pincet. Maak van dit stukje een preparaat in kraanwater. Bekijk het preparaat onder de microscoop. Het oplossend vermogen van een lichtmicroscoop is ca. 2  $\mu\text{m}$ . Dat betekent dat kleine celorganellen zoals mitochondriën als stipjes te zien zijn.
- Teken de onderlinge ligging van ten minste tien aan elkaar grenzende cellen van de ui-epidermis (weefselverband). Geef de celwand met een enkele lijn aan.
- Teken één cel gedetailleerd in weefselverband, waarbij de celwand met twee lijnen wordt aangegeven. Geef in de tekening de volgende onderdelen aan: kern, nucleolus, wandstandig cytoplasma, cytoplasmadraad, vacuole, celorganellen (mitochondriën en plastiden), plaats van plasmamembraan, plaats van tonoplast, celwand.
- Maak ook een preparaat van epidermiscellen van je eigen wangslimvlies. Schrap met een tandenstoker wat cellen los van de binnenzijde van je wang. Rol de tandenstoker **droog** over een objectglas, breng daarna een druppel water aan op de plaats waar je de cellen ziet. Breng een dekglas aan. Bekijk het preparaat onder de microscoop.
- Teken gedetailleerd één cel van je wangslimvlies en geef de volgende onderdelen aan: plasmamembraan, kern, cytoplasma, celorganellen bv. mitochondriën.
- Waar bevinden zich de meeste celorganellen in deze cel?
- Wat zijn de twee meest kenmerkende verschillen tussen deze planten- en dierencel?

### **Opdracht 3: vergelijking bouw plantaardige en dierlijke cel (30 min.)**

- Ga na hoe een kippenlever aanvoelt en hoe een plantenwortel of -stengel aanvoelt. Op welke ceileigenschap is het verschil tussen deze twee organen terug te voeren?

- b. Bekijk een vast preparaat van een coupe van een stuk lever en een vast preparaat van een lengtedoorsnede van de top van een plantenwortel.

De coupe van de lever is 10  $\mu\text{m}$  dik, gekleurd met haematoxyline (kern blauw) en eosine (cytoplasma roze). Bij een lage vergroting (objectief 4x) zien we dat lever is opgebouwd uit lobuli of lobjes, in het centrum van een lobulus is afhankelijk van de wijze van doorsnijden een ader in dwarsdoorsnede te zien. Bij grotere vergroting (objectief 40x) zijn details van de levercellen (klierepitheelcellen) te zien.

Zoek een plaats waar de celbegrenzings (plasmamembraan) van de levercellen goed te zien zijn.

De coupe van de plantenwortel is 15  $\mu\text{m}$  dik, gekleurd met astrablauw (onverhoute celwanden blauw) en Schiff (kern-DNA rood). Bij een lage vergroting zien we de wortelmuts, die de top van de wortel bedekt en het worteltopmeristeem (gebied met delende cellen) direct boven de wortelmuts. Bekijk bij grotere vergroting cellen in een gebied verder van de top afgelegen, waar de cellen langer zijn geworden.

- c. Wat zijn de twee meest opvallende verschillen tussen levercellen en cellen van de wortel?

#### **Opdracht 4: kenmerken van plantencellen (50 min.)**

- a. De belangrijkste kenmerken van een plantencel zijn goed te zien aan de cellen van een jong blaadje van de waterplant *Elodea canadensis* (waterpest). Neem een zo jong mogelijk blaadje (dus van de stengeltop) van *Elodea canadensis* en maak hiervan een nat preparaat.  
Uit hoeveel cellagen bestaat het blaadje?  
Zijn deze cellagen hetzelfde of verschillend gebouwd?
- b. Teken de onderlinge ligging van ten minste tien cellen van elk van de bovenste twee cellagen (geef de celwanden van de bovenste cellaag met een enkele lijn aan en de celwanden van de onderste cellaag van de twee met een stippellijn).
- c. Teken één cel gedetailleerd in weefselverband (celwand met twee lijnen aangeven) en geef de volgende onderdelen in de tekening aan: celwand, wandstandig cytoplasma, kern, chloroplasten, vacuole.
- d. Welke drie van deze onderdelen zijn uniek voor plantencellen?
- e. Wat is de vorm van een chloroplast?
- f. Waarom zijn er geen chloroplasten aanwezig in de binnenepidermis van een bolrok van een ui?
- g. Welke plastiden zijn aanwezig in de binnenepidermis-cellen van een bolrok van een ui?

**Tekeningen inleveren in een map voorzien van naam + zitplaatsnummer.  
De vragen maak je in je labjournaal.**



# PROTOPLASTEN / MEMBRAANTRANSPORT

## VOORBEREIDING

- Syllabus Celfysiologie en neem deze mee!
- Lees de onderstaande inleiding en experiment goed door.

**Protoplasten** worden verkregen door in stukjes plantenweefsel of in celsuspensies de celwand af te breken met behulp van enzymen uit schimmels (die op plantenafval groeien). Eerst moet de turgordruk van de cellen worden opgeheven omdat de cellen anders opzwellen en barsten. Daartoe worden de cellen geplasmolyseerd door ze in een suiker- of zoutoplossing met een hoge osmotische potentiaal te brengen.

'Protoplastering' is bij uitstek de methode om losse cellen te verkrijgen en maakt het dus mogelijk met één individuele cel als uitgangsmateriaal te werken. Protoplasten kunnen op verschillende manieren worden getransformeerd:

- a) door ze te kweken samen met naakt DNA in het medium,
- b) door ze met een particle gun te beschieten met wolframkogeltjes met een diameter van ca. 1 µm gecoat met DNA,
- c) door elektroporatie, waarbij door spanningspulsen de plasmamembraan even wordt geopend en DNA naar binnen kan, enz. Wanneer regeneratie slaagt, d.w.z. een protoplast vormt een celwand en gaat delen, kan uit één getransformeerde cel een complete plant worden opgekweekt.

In dit practicum ga je protoplasten gebruiken om enkele osmotische verschijnselen w.o het 'ion-trap' mechanisme te bestuderen. Hiervoor wordt de pH-indicator neutraalrood gebruikt. De ongeladen base is geel en het geprotoneerde ion is paarsrood. Door opname van neutraalrood in de protoplasten te bekijken kan de pH van de vacuole geschat worden voor en na het opname proces.

## BENODIGDHEDEN

### **Per paar:**

- 2 petrischaaltjes (Ø 35 mm)
- filtreerpapierjes
- plastic pasteurpipetjes met maatverdeling

### **Algemeen op de raamtafels**

- Neutraalrood-oplossing: 5 mg/ml in 0,4 M mannitol. Is een pH-indicator: de ongeladen base is geel, het geprotoneerde ion paars-rood.
- Een reeks ijkoplossingen van neutraalrood in 50 mM fosfaat-citraatbuffer, pH 4,0 - 5,0 - 6,0 - 7,0 en 8,0. Na gebruik meteen terugbrengen.
- Celsuspensie van tabak (*Nicotiana tabacum*)
- Protoplasten van tabak. Deze zijn uit een ca. 5 dagen oude en in het donker gekweekte celsuspensie van tabak als volgt bereid: plasmolysen met 0,4 M mannitol, afbreken celwanden met 0,2 % pectolyase + 1 % cellulase (pH 5,7) gedurende enkele uren bij 28°C. Dit is de protoplastensuspensie.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN**

**De onderstaande opdrachten (tekeningen en vragen) maak je per paar en je levert alle opdrachten in, in je eigen labjournaal (90 min.). Vergeet niet jullie namen te vermelden.**

1. Maak een preparaat van de **celsuspensie** van tabak. Breng met een plastic pasteurpipet een druppel celsuspensie op een objectglas aan. Op je eigen plaats maak je er een preparaat van. Bekijk het preparaat en teken gedetailleerd enkele cellen of celgroepen (zie blz 48). Vermeld bij de tekening: celwand, kern, plastiden, vacuole, wandstandig cytoplasma, cytoplasmadraad, plaats van het plasmamembraan en plaats van tonoplast.
  
- 1a. Wat doen de twee enzymen in de protoplasteringscocktail precies (zie benodigheden; let op de namen) en waarom is deze combinatie enzymen zinvol?
  
- 1b. Wat is de functie van de mannitol in de verschillende oplossingen ?
  
2. Om preparaten van **protoplasten** te maken moeten we voorzichtiger te werk gaan. Protoplasten zijn erg fragiel. De twee kleine petrischaaltjes die op je labtafel staan neem je mee naar de tafel aan de bordzijde waar de protoplastensuspensie staat. Zwenk **voorzichtig** het kolfje met de protoplasten (ze liggen op de bodem) en breng met een plastic pasteurpipet met maatverdeling ca. 0,5 ml protoplastensuspensie over in elk van de petrischaaltjes. Zet het dekseltje weer op het petrischaaltje om uitdroging van het materiaal te voorkomen. Op je eigen plaats maak je er een preparaat van op de volgende manier: breng met een plastic pipetje **voorzichtig** een druppel protoplastensuspensie op een objectglas en laat er m.b.v. een prepareernaald een dekglasje op zakken. Let op, want het objectglas mag niet te **strak** tegen het objectglas zitten, anders worden de protoplasten **geplet**. Het moet ook niet “zwemmen”, want dan loopt de vloeistof op de kruistafel. Bekijk het preparaat en teken enkele representatieve protoplast(en). Vermeld bij je gedetailleerde tekening: plasmamembraan, kern, vacuole, cytoplasma tegen plasmamembraan, cytoplasmadraad en plastiden.
  
3. Noteer 3 verschillen tussen de cellen in de celsuspensie en de protoplasten. Geef de **verschillen** weer in **tabelvorm** in je labjournaal.
  
4. Voeg aan 1 van de 2 petrischaaltjes met een pasteurpipet 1 dikke druppel neutraalrood-oplossing toe (=ca. 40 microliter). Voorzichtig mengen, noteer het tijdstip. Houd de deksel steeds dicht (dit voorkomt uitdroging).
  
- 4a. Maak direct een preparaat en **noteer** in je labjournaal waar het neutraalrood zich bevindt: in het medium, in de vacuole of in de rest van het cytoplasma. Noteer het tijdstip. Herhaal deze opdracht na 2 en 5 minuten. Maak hiervoor een **tabel**. Genoemde tijden zijn afhankelijk van de kwaliteit van de protoplasten. Eventuele wijzigingen van deze tijden zullen worden meegedeeld.
  
- 4b. Is er verschil in de intensiteit van kleur van neutraalrood tussen de **eerste** en de **laatste** waarneming. Zo ja: geef het verschil aan.

- 4c.** Schat de pH van vacuole van de protoplasten van de **laatste** waarneming. Gebruik hiervoor de reeks ijkoplossingen van neutraalrood. Houd rekening met het feit dat microscooplicht warmer / geler / roder is dan het TL-licht in de zaal (bij gebruik NIKON microscoop).
- 4d.** Wat denk je van de uiteindelijke verdeling van de kleurstof over protoplasten en medium? Bekijk je petrischaaltje. (Dus waar zit veel, waar zit weinig kleurstof?).
- 4e.** Probeer je waarnemingen over de opname van neutraalrood te verklaren. Gebruik hiervoor je kennis van het membraantransport van opgeloste stoffen in het algemeen, die van membraantransport in plantencellen in het bijzonder (zie Syllabus Celfysiologie) en je kennis van neutraalrood (zie inleiding bij dit practicum).
- 5.** Maak een nieuw preparaat van de protoplasten uit de petrischaal met neutraalrood om het effect van vervanging van het medium door water op de protoplasten te bestuderen. Ga als volgt te werk: leg voorzichtig een stukje filtreerpapier tegen één zijde van het preparaat, zodanig dat de vloeistof onder het dekglas wordt weggezogen. Zoek dan -ongeveer midden in het preparaat- een mooi groepje van ca. 5 protoplasten die niet wegstromen. Leg dicht tegen de andere zijde van het dekglas met een pasteurpipet een kleine druppel water op het objectglas en laat deze juist contact maken met het preparaat. Als het goed gaat zuigt het filtreerpapier aan de andere kant geleidelijk dit water onder het dekglas door. Kijk snel door de microscoop naar het gekozen groepje protoplasten en blijf aandachtig volgen wat er gebeurt. Zodra er niets meer verandert kun je nog snel stroomafwaarts kijken of daar nog iets gebeurt.
- 5a.** Beschrijf wat er met de meeste protoplasten gebeurt wanneer het medium door water wordt vervangen ten aanzien van gedrag plasmamembraan, tonoplast / vacuole, rest van cytoplasma en eventueel andere organellen.
- 5b.** Is er iets te zeggen over verschillen tussen plasmamembraan en tonoplast?
- 6.** Deponeer de kleurstofoplossing in chemisch afvalvat met de zwarte band.

## PLASMOLYSE

Ter voorbereiding op het osmose-experiment worden alvast een aantal onderdelen van deze proef uitgevoerd. Deze staan op pag 115 en 116 van de handleiding.  
 Voer opdracht 3 , 4 en 5 uit.  
 Lever deze opdrachten in je zichtmap in.





# OSMOSE in knolweefsel van *Solanum tuberosum* en in epidermiscellen van *Allium cepa*

## VOORBEREIDING

- Campbell H. 7.3 en 36.1. Syllabus CF en je college-aantekeningen
- Onderstaande inleiding en experiment

Plantencellen verliezen water of nemen water op d.m.v. **osmose**, de passieve diffusie van water door een membraan. De netto richting van de diffusie van watermoleculen wordt bepaald door de **waterpotentiaal**,  $\psi_w$ .

Wanneer een plantencel in een vloeistof (med.) wordt gelegd met een bepaalde waterpotentiaal ( $\psi_{w,med}$ ), zal de waterpotentiaal van de plantencel ( $\psi_{w,cel}$ ) in principe gelijk worden aan de waterpotentiaal van die vloeistof. Dus  $\psi_{w,cel}$  wordt gelijk aan  $\psi_{w,med}$ , ofwel

$$\psi_{w,med} = \psi_{w,cel} = \psi_{p,cel} + \psi_{s,cel} + \psi_{m,cel}$$

$\psi_p$  = drukpotentiaal.  $\psi_s$  = osmotische potentiaal.  $\psi_m$  = matrixpotentiaal.

Wanneer we deze plantencel vervolgens in een medium leggen met een andere waterpotentiaal veranderen al deze parameters en ook het celvolume. Dit gaat volgens het **diagram van Höfler** waarin het verband tussen de waterpotentiaal en zijn deelpotentialen enerzijds en het protoplastvolume anderzijds wordt weergegeven.

In dit practicum gaan we het verloop van de parameters  $\psi_w$ ,  $\psi_p$  en  $\psi_s$  van de cellen van een aardappel bepalen bij verschillende waarden van  $\psi_{w,med}$ . Bedenk dat  $\psi_{w,med}$  in dit experiment in feite wordt bepaald door  $\psi_{s,med}$  ( $\psi_{p,med}$  en  $\psi_{m,med}$  zijn beide nul).

De aardappel is bij benadering isotroop. Dat wil zeggen dat de meeste cellen ongeveer gelijk van grootte en samenstelling zijn. Hierdoor krimpen en strekken ze in alle richtingen ongeveer gelijk. Wanneer we de verandering in de lengte meten, weten we dus ook de volumeverandering.

Een aardappel wordt in staafjes (= frietjes) gesneden met gelijke doorsnede en van dezelfde lengte. Door het meten van de lengteveranderingen van deze staafjes wanneer ze in verschillende suikeroplossingen worden gebracht, kun je het diagram van Höfler voor deze aardappel construeren.

Beneden 4 °C zetten de cellen hun zetmeel om in oplosbare suikers die als antivries fungeren (vriespuntsdaling) en eiwitten en membranen stabiliseren. Dit is van invloed op de waarnemingen. De aardappelen worden tijdig bij kamertemperatuur gelegd.

## PRACTICUMOPDRACHTEN

Lees de proef eerst goed door, dat voorkomt verrassingen.

Op de hoge bruine tafel (aan het eind van de gang) staan:

- snijplanken
- weefselkweekbakjes
- aardappels (ten minste 10 cm lang)
- petrishalen
- viltstiften (watervast, zwart)
- schuifmaten met nonius
- per paar een contrasttegel om preparaten op te maken
- per paar een porseleinen schaaltje (vullen met kraanwater om ui in mee te nemen en op eigen plaats een nat preparaat te kunnen maken)

- uien
- serumflesjes met 1 M saccharose en plastic pasteurpipet erin
- bakjes met filtreerpapier

**Op de hoge tafels staan:**

- saccharose-oplossingen (0,1 t/m 0,5, 0,7, 0,9, 1,4 M)
- maatcilinders 100 ml
- snijplanken ('dienblad' voor petrischalen)

**Op de tafels 8 en 9 staan de frietsnijders en de frietguillotines met toebehoren.**

**Opdracht 1: (per paar, 20 min.)**

Vul steeds twee petrischalen (= duplo-petrischalen) met 35 ml (maatcilinder) van elk van de 8 suikeroplossingen en ook twee met kraanwater (= suikeroplossing 0). Schrijf van tevoren de concentraties op de bodem. Zet de gevulde petrischalen op een snijplank op je plaats.

**Spoel gebruikt glaswerk om en ruim gemorste vloeistof direct op. Na indrogen zijn de suikeroplossingen lastig te verwijderen!**

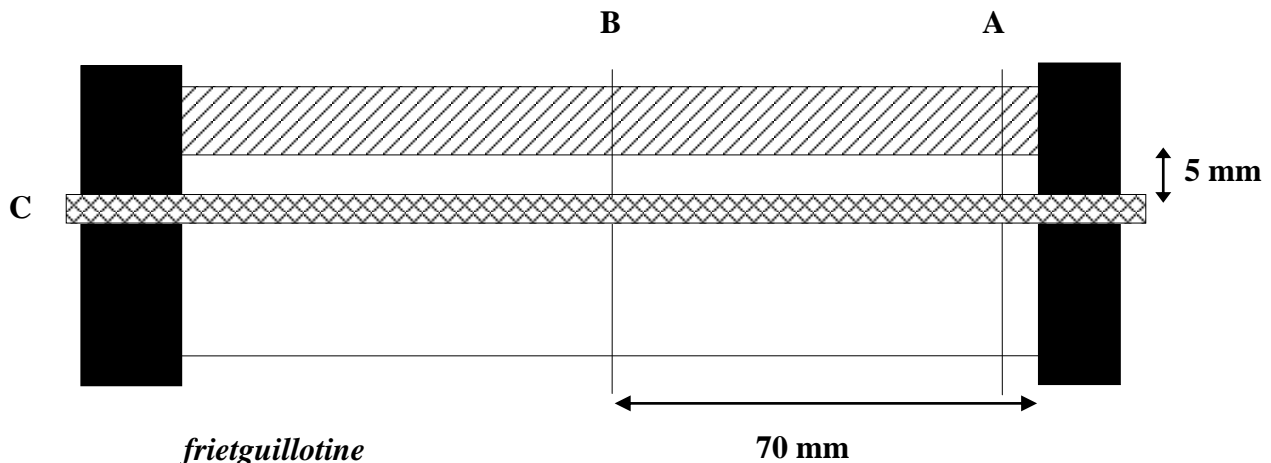
**Opdracht 2: (per paar, 45 min.)**

- a. Neem een aardappel. Snij een zo groot mogelijk blok uit de aardappel van ten minste 8 x 5 x 5 cm.

Leg het blok recht in de frietsnijder en snij het blok in één beweging tot frieten. Zoek alle frieten uit die 1x1 cm breed zijn over een lengte van ten minste 9 cm. Je hebt minimaal 8 volledig gave frieten nodig. (Zijn uw frieten te kort: overleg met assistent over aangepaste guillotine, zie b.) Bewaar de frieten tegen uitdrogen in een weefselkweekbakje. (Heb je 16 of meer goede frieten, bewaar dan een set voor noodgevallen, evt. voor anderen. Meld dit aan uw assistent).

**Gooi alle resten in de afvalbak.**

- b. Ga naar een frietguillotine en snij de frieten ÉÉN VOOR ÉÉN op lengte: eerst met het mes in positie A een haaks snijvlak maken. Dan de friet DOOR SCHUIVEN tot hij rechts stuit en ten slotte met het mes in positie B de friet afsnijden op precies 70 mm. Zorg dat het mes niet buigt (bij scheve snijvlakken is de lengte van de frieten niet correct).
- c. Snij de frieten met het mes in positie C overlangs in vieren, druk daarbij de frieten aan de lange kant goed met het aandrukblokje aan. Controleer of alle vier frietjes



ongeveer even dik zijn, gooi anders de dikste weg (Waarom? Zie Vraag 1d). Controleer regelmatig of de lengte 70,0 mm is. Snij door totdat je (per paar) ca.32

precies gelijke frietjes hebt (5x5x70 mm). Bewaar de frieten tegen uitdrogen in het weefselkweekbakje.

Als je niet genoeg frieten hebt: nooit van de burens lenen! (Waarom niet? Zie Vraag 1b). Raadpleeg dan de assistent.

- d. Neem het bakje met frietjes mee naar je plaats. Leg steeds drie frietjes in één van de twee duplo-petrischalen. Noteer de tijd en vul in boven Tabel A.
- e. Breng ze na ca. een half uur over naar de 2<sup>e</sup> petrischaal (Waarom? Zie Vraag 2). Vul het tijdstip van overbrengen in boven Tabel A.
- f. Laat de frietjes minstens 3 à 4 uur (noteer de tijd en vul in boven Tabel A) in de oplossingen liggen en meet met een schuifmaat de lengte van alle frietjes op 0,1 mm nauwkeurig (daar hebben we de nonius op schuifmaat voor nodig). Noteer de tijd van de laatste meting en vul in boven Tabel A.

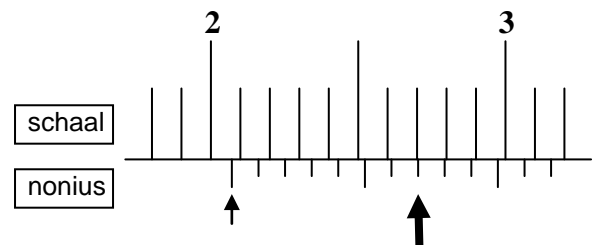
**Petrischalen en frietjes weggooien. Weefselkweekbakje en maatcilinder in verzamelbak op raamtafel. Snijplank na afspoelen bij de wasbakken laten staan.**

### Gebruik van de schuifmaat

Het vaste deel van de schuifmaat heeft een schaalverdeling van 16 cm, onderverdeeld in millimeters. Voor het meten van tienden van millimeters dient de nonius, die zich op het beweegbare deel bevindt: een schaal van ca. 2 cm lang waarvan de verdeling 10% afwijkt van die van de hoofdschaal.

Het beweegbare deel kan met een wieltje heen en weer worden gereden, zodanig dat de friet precies tussen de 'meetvingers' past. De klemmschroef van dat deel (loopt achter het vaste deel langs) moet vrij strak aangedraaid zijn, om speling op de 'meetvinger' te voorkomen. Zorg wel dat je tijdens het aandraaien de friet niet indrukt.

De tienden van een mm worden als volgt afgelezen (zie nevenstaand voorbeeld: ruim 20 mm tussen de 'meetvingers'): het 'nulde' streepje van de nonius (dunne pijl) geeft op de schaal tussen 2,0 en 2,1 cm aan. We volgen nu de nonius naar rechts tot de maatstreep die zo precies mogelijk gelijk valt met een maatstreep van de schaal. Deze geeft de laatste decimaal: hier dus de 7<sup>e</sup> streep van de nonius (dikke pijl). De aflezing wordt dus 2.07 cm. Vul de lengtes in in tabel A, kolom 3.



### **Opdracht 3: (20 min).**

Snij met een scheermesje een zo dun mogelijke coupe van de aardappel. Maak een preparaat in kraanwater. Maak een halfschematische tekening van knolweefsel van *Solanum tuberosum*. Teken half-schematisch enkele cellen in weefselverband + vaatbundel. De celwanden aangeven met een enkele lijn zie p. 48.

Geef aan: celwand, amyloplast.

- a. Welke weefsels zie je?
- b. Is het weefsel isotroop en verklaar je antwoord?

### **Opdracht 4: plasmolyse (45 min.)**

Maak een nat preparaat van de binnenepidermis van de bolrok van een ui (*Allium cepa*) in kraanwater. Doe dit op je eigen plaats. Neem per paar mee van de raamtafel: een bolrok van de ui, contrasttegel, porseleinen schaaltje gevuld met kraanwater en enkele filtreerpapiertjes. Snij met een scheermesje een vierkant stukje uit de binnenzijde van een bolrok en trek het bovenste laagje, de epidermis, voorzichtig los

met een pincet. Maak van dit stukje een preparaat in kraanwater. Bekijk het preparaat onder de microscoop. Haal het dekglas voorzichtig van het preparaat. Verwijder het water met een filtreerpapiertje en breng 1 druppel 1 M saccharose aan.

Kijk na 5 min. of er al een begin van plasmolyse te zien is. Zo niet, kijk dan na 10 min. **Laat het preparaat niet op de warme lamp van de microscoop liggen!!**

Teken half-schematisch het begin van plasmolyse (één geplasmolyseerde cel in weefselverband, na uiterlijk 15 min.) en een vergevorderde plasmolyse (één geplasmolyseerde cel in weefselverband, na uiterlijk 30 minuten). Teken celwanden met een enkele lijn, evenals de omtrek van de protoplast. Geef in de tekening de volgende onderdelen aan: celwand en plaats van plasmamembraan.

### **Opdracht 5: (20 min.)**

- Wat gebeurt er met  $\psi_w$ ,  $\psi_s$  en  $\psi_p$  in de cel kort nadat de suikeroplossing is toegevoegd?
- Hoe groot zijn  $\psi_w$ ,  $\psi_s$  en  $\psi_p$  aan het eind van de proef (evenwicht)?
- Wat zit er tussen celwand en plasmamembraan?

**De tekeningen van de opdrachten 3 en 4 en de antwoorden van de opdrachten 3 en 5 apart inleveren in je zichtmap.**

### **Uitwerking van opdracht 2**

Antwoorden van 1 en 2 in je zichtmap inleveren, de rest in je labjournaal maken.

- Waarom moeten de frietjes uit één aardappel komen?
  - Waarom is het belangrijk om uit te gaan van isotroop weefsel?
  - Waarom moeten de frietjes dun zijn?
- Waarom moeten de frietjes na ca. een half uur naar de tweede petrischaal worden gebracht (= verversen van het medium)?
- Plak tabel A in je labjournaal** en vul kolom 3 van Tabel A in.
  - Zet in grafiek I de lengte van de frietjes uit tegen  $\psi_{s,med.}$ . Geef bij de assen duidelijk de parameters en hun dimensies aan. Meer informatie over het maken van de grafiek staat onder de grafiek (blz. 115). Geef elke waarneming aan met een stip en het gemiddelde met een x. Wacht nog even met het trekken van een lijn door de punten (zie punt 4b).
  - Verklaar in exacte termen (d.w.z. met parameters uit de ‘formule’ uit de inleiding) waardoor de frietjes langer of korter zijn geworden.
  - Bepaal uit grafiek I bij welke  $\psi_{s,med.}$  de lengte van de frietjes precies 70,0 mm blijft. Geef aan met  $\otimes$ .
  - Welke parameter van de aardappelcellen is hiermee bepaald?  
Lees de waarde van deze parameter af in grafiek I. Welke andere parameters hebben dus ook deze waarde? Licht dit kort toe.
  - Vul dan nu kolom 5 van tabel A in (behalve het onderste vak). Zie bij 3e.

**TABEL A:**

Ingezet: .....u. Overgezet: .....u. Laatste meting: .....u. Totale incubatie: ..... u.

1 SUIKER (M)	2 $\Psi_{s,med}$ (MPa)	3 LENGTE FRIETEN (mm) 1      2      3      gemidd				4 'V <sub>rel</sub> ' (Relatief volume, t.o.v. V <sub>grensplasmol</sub> , zie onderaan) 1      2      3      gemidd				5 $\Psi_{w,cel}$ (MPa)	6 $\Psi_{s, cel}$ (MPa)	7 $\Psi_{p, cel}$ (MPa)
0	0											
0,1	-0,26											
0,2	-0,54											
0,3	-0,83											
0,4	-1,14											
0,5	-1,48											
0,7	-2,23											
0,9	-3,10											
1,4	-6,16											
<b>Grens- plasmolyse</b>	$\Psi_{s,med}$ (grens- plasmolyse) =	$L_{grensplasmolyse} =$				$'V_{rel, grensplasmolyse}' = 1$				$\Psi_{w,cel, grensplasmolyse} =$	$\Psi_{s,cel grensplasmolyse} =$	$\Psi_{p, cel grensplasmolyse} =$

4a. Hoe kunnen we (in principe) uit grafiek I bepalen bij welke  $\Psi_{s,med}$  *grensplasmolyse* optreedt? (Hint: wat doet de lengte van een frietje na plasmolyse? In de cellen van de binnenepidermis van de ui na 30 min in 1 M saccharose kun je zien wat er aan de hand is in geplasmolyseerde cellen. Zie Opdracht 4).

4b. Geef met  $\oplus$  in grafiek I het geschatte grensplasmolysepunt aan; teken met potlood de grafiek. Laat deze grafiek zien aan de assistent voor je verder gaat.

4c. Vul nu de onderste rij van tabel A in (alle hokjes, we hebben deze waarden straks nodig bij het invullen van de rest van de tabel).  $\Psi_{p,cel}$  weten we van 4a en verder kunnen we alles uit grafiek I aflezen.

5a. Bereken de nieuwe  $\psi_s$ .

Uit de lengte van de frietjes ( $L$ ) is het relatieve celvolume ( $V_{rel}$ ) te bepalen. Wij geven je de berekening:

$$V_{rel} = L^3 / L_{\text{grensplasmolyse}}^3 = (L / L_{\text{grensplasmolyse}})^3$$

$L^3$  = maat voor volume. Houd er rekening mee dat  $\psi_s$  omgekeerd evenredig is met volumeverandering (die heb je zelf gemeten).

Gebruik de formule om kolom 4 in Tabel A in te vullen. Laat de vakjes waarbij  $V_{rel}$  (nog) niet kan worden bepaald (zie vraag 4a) open. We stellen  $V_{rel}$  bij grensplasmolyse = 1 (zie onderste hokje kolom 4).

Verklaar de berekening van  $V_{rel}$ .

5b. Kolom 6 van Tabel A moet nog worden ingevuld. Hoe bepalen we  $\psi_s$  van de cellen uit de tot nu toe gevonden waarden? Wij geven je de oplossing en vragen je uit te leggen waarom dat zo is.  $\psi_s = 1 / V_{rel} \times \psi_{s \text{ grensplasmolyse}} = \psi_{s \text{ grensplasmolyse}} / V_{rel}$ . Verklaar in exacte termen waardoor de frieten langer of korter zijn geworden.

6a. Hoe bepaal je nu de  $\psi_p$  van de cellen?

6b. Vul het resultaat van 6a in in kolom 7 van tabel A.

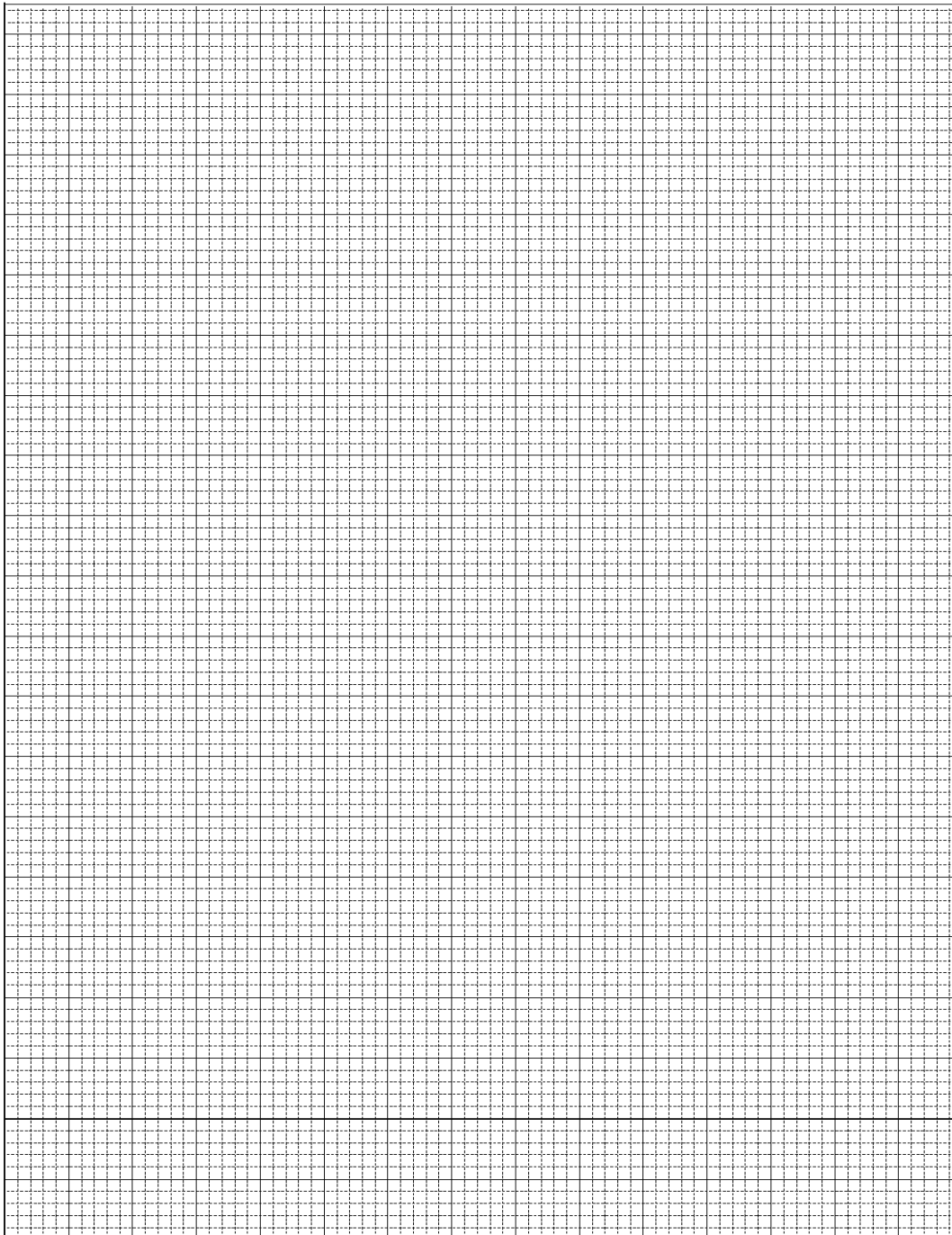
7. Vul nu de laatste open vakjes in kolommen 4-7 in. Geef hieronder aan hoe je dat doet (berekeningen) en waarom. Betrek vraag 4a in het antwoord.

8. Teken met de verkregen waarden het Höfler-diagram van de aardappel (grafiek II). Geef de berekende punten en de punten  $\otimes$  en  $\oplus$  duidelijk in elk van de grafieken aan. Geef bij de assen duidelijk de parameters en hun dimensies aan. Meer informatie over het maken van de grafiek staat onder grafiek II.

9. Geef ten slotte de waarden van  $V_{rel}$  en de osmotische parameters van de oorspronkelijke aardappel:

	$V_{rel} =$	$\psi_w =$	$\psi_s =$	$\psi_p =$
Hoe berekend / afgeleid?				

GRAFIEK I

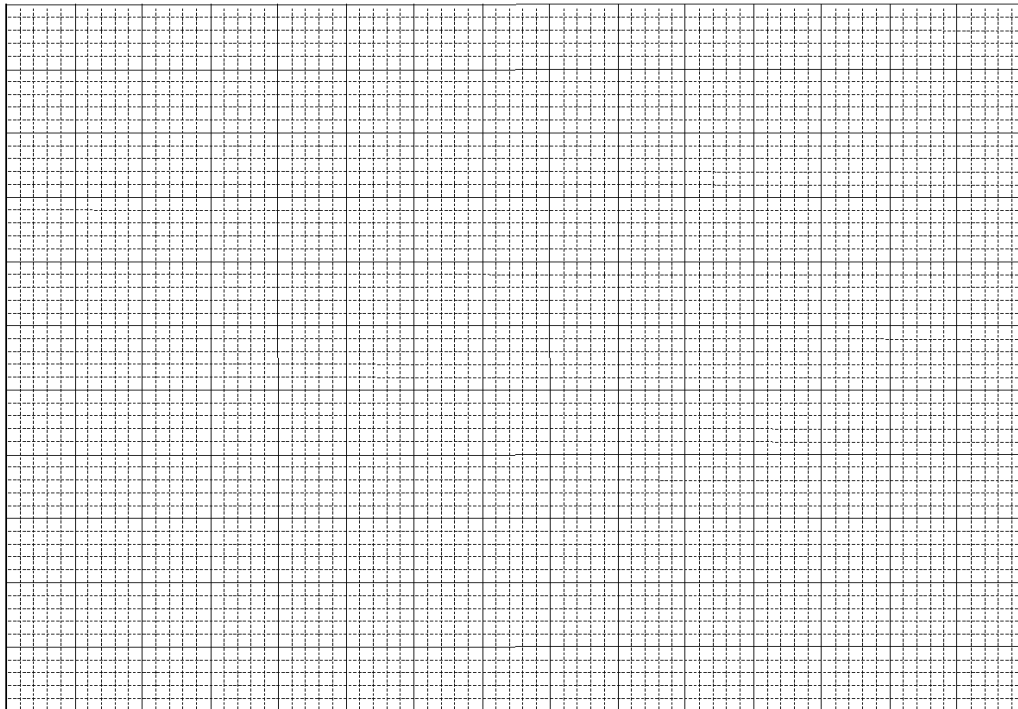


Informatie: X-as:  $\psi_{s,med}$  in MPa (b.v. van -2,8 naar 0 MPa)

Y-as: lengte van de frietjes in mm (b.v. van 67 naar 72 mm).

**Höfler-diagram**

GRAFIEK II



Informatie:

X-as:  $V_{\text{rel}}$  (b.v. 0,6 naar 1,4)

Y-as: 3 lijnen n.l.  $\psi_p$ ,  $\psi_w$  en  $\psi_s$  in MPa (b.v. van +2,0 naar -2,5).



# FOTOSYNTHESE

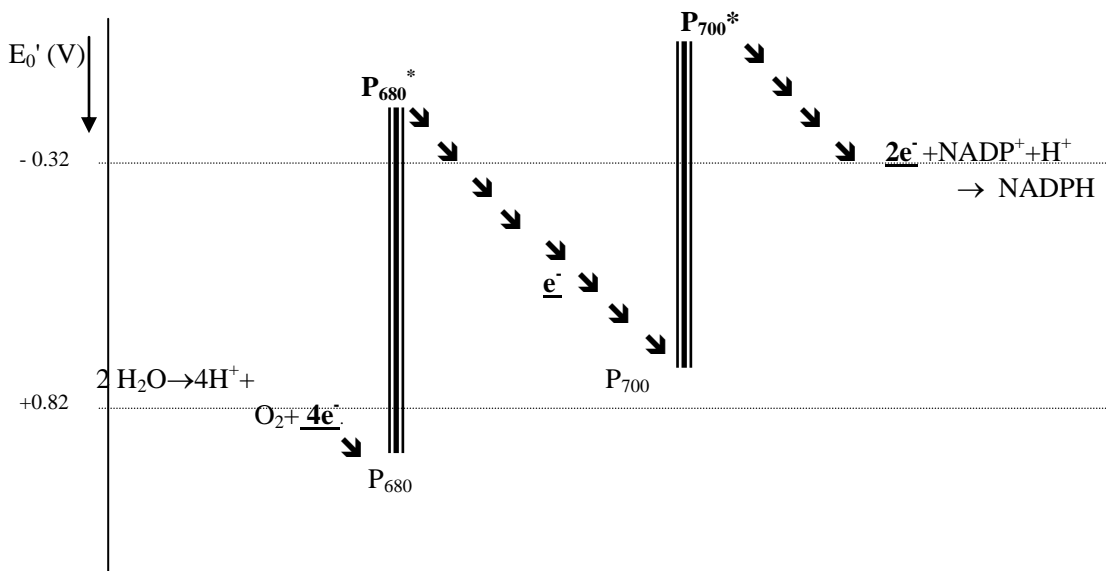
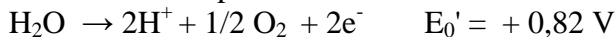
## VOORBEREIDING

- H.10 uit Campbell en bijbehorend deel Syllabus Celfysiologie.
- Principes van redoxreacties: begin van Chapter 9 (Campbell) en in de Syllabus Celfysiologie (met name de fotoreductie).
- Lees de onderstaande tekst goed door en probeer van tevoren de opzet van de experimenten te begrijpen. **Iedereen maakt Opdracht 1 op de dag voorafgaand aan het practicum! Laat zien aan assistent.**

## LICHTREACTIES IN GEÏSOLEERDE CHLOROPLASTEN

In de chloroplasten van hogere planten bevindt zich een tweetal in serie geschakelde fotosystemen, die samen zorgen voor het elektronentransport van  $\text{H}_2\text{O}$  naar  $\text{NADP}^+$  m.b.v. licht. De twee fotosystemen zijn gelokaliseerd in de thylakoïd-membraan. Thylakoïden hebben de vorm van een gesloten afgeplatte zak en zijn gedeeltelijk gestapeld tot *grana*, structuren die met de lichtmicroscop nog juist zichtbaar zijn (= zwarte stipjes in de chloroplasten). De bij de lichtreacties geproduceerde  $\text{NADPH}$  en ATP zijn de bron van reducerend vermogen en van energie voor diverse biosynthesereacties, met name voor de Calvin-cyclus.

Standaard redoxpotentialia voor:



Op de Y-as staat de standaard-redoxpotentialia (in Volt ).

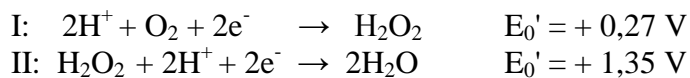
De pijlen  $\searrow$  staan voor elektronenoverdracht.

$\parallel\parallel\parallel$  = excitatie van een reactiecentrum-molecuul

Het zgn. Z-schema van de elektronentransportketen van de fotosynthese.

## GEÏSOLEERDE CHLOROPLASTEN: HET SYSTEEM

Bij de meeste isolatieprocedures raakt zowel de binnen- als de buitenmembraan lek of breekt de chloroplast. Dit overkomt uw chloroplasten ook. Alle laagmoleculaire verbindingen en niet-membraangebonden enzymen verdwijnen uit het stroma. ADP, NADP<sup>+</sup>, alle intermediären van de Calvincyclus en zelfs de niet-membraangebonden Calvincyclus-enzymen zijn weggespoeld. Dat heeft nogal wat consequenties. Al 50 jaar geleden vond men dat zulke lekke chloroplasten geen enkele fotosyntheseactiviteit meer leken te vertonen; in elk geval geen O<sub>2</sub>-ontwikkeling of CO<sub>2</sub>-fixatie. Dit wil natuurlijk nog niet zeggen dat de sterk membraangebonden elektronentransportketens en fotosystemen ook verdwenen zijn. Immers, bij gebrek aan een geschikte elektronenacceptor in de lekke chloroplasten is het logisch dat het normale lineaire elektronentransport vanuit water niet zal kunnen optreden: alle componenten van de redoxketen raken snel maximaal gereduceerd en de keten kan daardoor geen elektronen meer opnemen. Toch is er meestal nog wel wat elektronentransport in een chloroplastensuspensie mogelijk. Er kunnen bijvoorbeeld elektronen via de **Mehlerreactie** uit de redoxketen worden opgenomen. In eerste instantie (I) wordt daarbij peroxide gevormd, wat later (II) gereduceerd wordt tot water:



### **Opdracht 1:** (maken op de dag voor het practicum!)

- Laat in een simpel Z-schema (zoals hiervoor) de gebieden zien waar reactie I van de Mehlerreactie in principe zou kunnen plaatsvinden.
- Zal deze reactie ook in het donker kunnen plaatsvinden? Waarom wel/niet?
- Wat voor gevolgen heeft de Mehlerreactie voor de netto O<sub>2</sub>-ontwikkeling in een chloroplastensuspensie?
- Leg uit waarom de Mehlerreactie ook wel de water-water cyclus wordt genoemd.

De zeergeleerde heer **Robin Hill** zag kans de O<sub>2</sub>-productie weer flink op gang te krijgen door enkele slim gekozen onnatuurlijke elektronenacceptoren/ donoren ("Hill reagentia") toe te voegen. Afhankelijk van hun redoxpotentiaal kunnen dergelijke Hill reagentia elektronen op verschillende plaatsen aan de keten onttrekken of toevoegen. Door een geschikte keuze van acceptoren en/of donoren, al of niet in combinatie met verschillende remstoffen kan inzicht in het verloop van de keten worden verkregen. Om de reacties te kunnen waarnemen neemt men bij voorkeur een Hill-reagens dat tevens een redoxindicator is, d.w.z. van kleur verandert bij reductie/oxydatie. Het proces is dan fotometrisch te volgen. Een veel gebruikt Hill-reagens is DCPIP: geoxideerd blauw, gereduceerd kleurloos. Via dit soort proeven werd duidelijk dat in de lekke chloroplasten de componenten van de elektronentransportketen (inclusief de fotosystemen) intact aanwezig zijn. Wanneer we dit soort reagentia toevoegen kunnen we ook op het practicum in een simpele proefopzet deelprocessen van de lichtreacties analyseren. Daarbij zijn de lekke envelop-membranen een uitkomst: alle reagentia kunnen prima bij de thylakoid-membranen komen!

### **DOEL VAN DE PROEF**

Praktische kennismaking met redox reacties en experimentele bewijsvoering rondom elektronentransport bij fotosyntheseprocessen. We verplaatsen ons bij deze proef naar de situatie in het jaar 1960 toen Robin Hill een bijzondere ontdekking deed waardoor watersplitsende fotosynthese veel beter werd begrepen. Om deze ontdekking mee te beleven, vergeten we *na opdracht 1* het nu wel bekende Z-schema en gaan we **vanaf nu alleen redeneren met de feiten zoals Hill die ook kende:**

- (1) er bestaat een (nogal raadselachtig) fotosysteem in chloroplasten wat elektronen uit water kan halen waarbij zuurstof vrijkomt
- (2) toegevoegde stoffen kunnen deelnemen aan (lichtafhankelijke) reacties in een suspensie van (lekke) chloroplasten,
- (3) de eigenschappen en redoxpotentialen van de gebruikte stoffen (zie BENODIGDE GEGEVENS).

Het is echt de bedoeling dat u stapsgewijs **zelf afleidt** wat er in de chloroplasten gebeurt. Aan de hand van de bij de opdrachten gestelde vragen wordt een verslag gemaakt met daarin een model te komen waarmee alle data te verklaren zijn. Voor alle redeneringen is het is cruciaal om te begrijpen wat het betekent als redoxreacties wel of niet verlopen.

### **BENODIGDE GEGEVENS**

Standaard redoxpotentialen zijn de “biochemische” waarden ( $E_0'$ ; dus bij pH 7).

**DCPIP** (dichlorofenolindofenol). Het Hill-reagens DCPIP verandert van kleur bij opname en afgifte van elektronen, zodat de reductie van DCPIP door chloroplasten met de spectrofotometer kan worden gevolgd. DCPIP heeft een standaard-redoxpotentiaal van +0,22 V. Het is in geoxideerde vorm blauw (absorptiemaximum 600 nm) en in gereduceerde vorm ( $+2e^- + 2H^+$ ) kleurloos.

Molaire extinctiecoëfficiënt DCPIPox bij 600 nm en 1 cm cuvetdiameter ( $E_{600}$ ) is 14000.

**MV** (methylviologeen) is een kleurloos Hill-reagens. Wordt in geoxideerde vorm toegediend. Standaard-redoxpotentiaal -0,44 V.

**DCMU** (3-[3,4 dichlorofenyl]1,1 dimethylureum). Een al lang bekende remmer van de zuurstofproductie; blokkeert waarschijnlijk elektronentransport na vrijmaking uit water.

**Let op:** de **boven genoemde reagentia (met name MV en DCMU)** zijn schadelijk voor milieu en gezondheid! Dus alle reactiemengsels verzamelen in chemisch afvalpot en na afloop in **afvalvat (zwarte band)**.

**Ascorbinezuur** is een veel gebruikt en niet specifiek anti-oxidant (vitamine C; ook toegepast in voedingsindustrie). Het wordt in gereduceerde vorm toegediend (als vaste stof). De standaard redoxpotentiaal is niet helemaal duidelijk (ongeveer -0,1 V). De stof is in alle vormen kleurloos.

## **MATERIALEN**

In een groot deel van de zaal is het licht gedimd. Hier vinden de gecontroleerde belichtingen voor de verschillende reacties plaats. Er wordt gewerkt in groepjes van 4 personen. **Goede voorbereiding is essentieel om in het halfdonker te weten wat er gedaan moet worden.** Verdeel ook wat taken binnen het groepje (bijhouden tijd, organiseren reactiecurven, snel maken van grafieken, etc.) om vlot te kunnen werken.

Er zijn centrale plaatsen/ijsbakken met oplossingen. **Let op: DCPIP stockoplossing nooit op ijs zetten** (kristalliseert uit bij lage temperatuur). Let op aanwijzingen voor verwerking chemisch afval.

Elk groepje heeft de beschikking over een spectrofotometer en over:

- 1 ijsbak en een klein bakje om wat ijs in te doen (voor nabij de belichtingslamp)
- 1 bekersglas van 250 ml
- 5 kunststof puntbuizen met deksel en 50 ml maatverdeling (=centrifugebuis) + rekje.
- Buizen lichtdicht maken met alu-folie.**
- trechttertje met papieren filtertje
- viltstift
- nylon sjaaltje
- doos kleenex
- pipetman P200 en P1000 met doos gele en blauwe pipetpunten en geel afvalemmertje
- 14-16 cuvetten (4 ml inhoud) met dop. Ribbels ter oriëntatie van cuvet in spectrofotometer.
- flesje demiwater
- flesje met 100 ml isolatiebuffer (staat in een centrale ijsbak)
- flesje met 60-100 ml bewaarbuffer (= sucrose-fosfaatbuffer; staat in een centrale ijsbak)
- aceton, 10 ml
- 10 ml pipet en pipetteerballon
- aluminiumfolie
- circa 4 ml DCPIP-oplossing in plastic buis (**nooit op ijs zetten**)
- ascorbinezuur; per groepje enkele korrels vaste stof in epje
- bak verse spinazie
- plastic bakje om in af te wegen
- maalbeker op ijs met mixer (staat op de tafel t.o. de spectrofotometer)
- tafelcentrifuge op de hoge labtafels + kleenex +geel afvalemmertje
- jampot (=afvalvatje) voor opvangen van het supernatant en reactiemengsels
- mobieltje met secondewijzer kan dienst doen als stopwatch

Centrifugebuizen worden ook gebruikt voor het bewaren van chloroplasten stock- en werkoplossing. Houd deze oplossingen echt koud (= in het ijs) en donker (= aluminiumfolie erom heen).

**NB: Controleer of bovengenoemde spullen aanwezig zijn, maak potjes zelf lichtdicht voordat u aan de proef begint.**

## **PRACTICUMOPDRACHTEN**

De groepjes beginnen gelijktijdig. De assistent houdt de voortgang strak in de gaten en geeft per onderdeel aanwijzingen. **Bij een goede voorbereiding kan het experimentele deel binnen 3 - 4 uur worden gedaan.** Zorg ervoor dat er een mobieltje oid aanwezig is dat dienst doet als stopwatch.

### **Opdracht 2: bladeren malen (15 min)**

**Let op: na het malen van blad, zijn de chloroplasten zeer gevoelig voor warmte en licht. Houd suspensie/chloroplasten daarom zoveel mogelijk op ijs en in het donker!**

- Schenk 50 ml isolatiebuffer in de gekoelde maalbeker op ijs.
- Verwijder grote stelen van de spinaziebladeren en weeg 25 gram blad af in een plastic bakje. Voeg daarna de bladeren toe aan de isolatiebuffer in de maalbeker.
- Zet de deksel op de maalbeker, houd de deksel goed vast en homogeniseer **precies 30** seconden.
- Vouw het nyloonsjaaltje in vieren en hang het bovenop het bekglas. Pak de maalbeker met het homogenaat uit de ijsbak en zet het bekglas met het sjaaltje in de ijsbak. Het sjaaltje doet dienst als filter.
- Filtreer het homogenaat door het sjaaltje voorzichtig uit te knijpen uit boven het bekglas.
- Giet het filtraat in een 50 ml centrifugebuis. Vul deze tot de maatstreep van 45 ml en doe de deksel erop. Laat de buis in het ijs staan en scherm hem af van het licht (dus deksel op ijsbak of stuk aluminiumfolie over de buis leggen).
- Doe het sjaaltje voorlopig in het vuile bekglas.

**Ga meteen door met**

### **Opdracht 3: chloroplasten isoleren (10 min)**

- Regel dat u met twee of vier groepjes een centrifuge gaat gebruiken.
- Droog de centrifugebuis (2f) aan de buitenkant goed af. Draai 3 minuten af bij 2250 rpm (= 900 g).
- Pak de centrifugebuis **zeer voorzichtig** uit de centrifuge **want het pellet zit niet goed vast!**
- Giet op de eigen werkplek het supernatans **langzaam en voorzichtig** in de jampot die dienst doet als afvalvat.
- Pipetteer nu 15 ml sucrose-fosfaatbuffer ("bewaarbuffer") in de centrifugebuis. Resuspendeer het pellet in de buffer door te zwenken (niet woest schudden) en door klontjes heen te pipetteren met de P1000. Zet "15" op deksel en bewaar deze chloroplastensuspensie in ijs in het donker (= buis afschermen met aluminiumfolie).

**Opdracht 4: preparaat maken (5 min)**

Maak van een beetje suspensie (3e) een preparaat (1x per groepje) en bekijk dit onder de microscoop. Maak een tekening in je labjournaal. Hoe zien de chloroplasten eruit, wat is hun vorm? Is het een zuiver preparaat? Zo nee, wat zit er verder nog in?

**Opdracht 5: chlorofylbepaling (15 min)**

- Neem een 50 ml kunststof puntbuis (centrifugebuis) en pipetteer daar 2,25 ml H<sub>2</sub>O en 10 ml aceton in. Voeg nu 0,25 ml grondig gezwenkte chloroplastensuspensie toe (vanuit buis “15”, zie 3e). Sluit buis “15” en zet terug op ijs. Sluit de nieuwe buis (met acetonmengsel) en schud deze grondig.
- Filtreer het acetonmengsel door klein gevouwen papierfiltertje (klein trechtertje) en vang het op in een schone buis. Het resultaat is een acetonextract dat volkomen helder en duidelijk groen moet zijn. Bedenk: Wat is er met de chloroplasten gebeurd? En met het chlorofyl?
- Neem eerst een cuvet met 3 ml water om de spectrofotometer **op nul** te stellen bij een golflengte van **652 nm** (referentiewaarde; 80% aceton is strikt genomen correcter, maar dat maakt bij 652 nm niet uit). Meet vervolgens de extinctie (“OD”) van 3 ml van het acetonextract bij 652 nm ( $E_{652}$ ). De gekozen golflengte ligt tussen de rode absorptiemaxima van chlorofyl a en b in. Indien de extinctie hoger is dan 1,0 dan is de meting te onnauwkeurig, dus dan verdunnen met 80% aceton totdat de extinctie beneden 0.8 ligt. **Werk vlot:** aceton tast de cuvet langzaam aan.
- Bereken eerst de chlorofylconcentratie in de cuvet met als gegeven dat de chlorofylconcentratie in de meetcuvet =  $(E_{652}/34,5) \text{ mg.ml}^{-1}$  en bereken daarna de chlorofylconcentratie in de chloroplastensuspensie “15” (zie 3e).  
Overleg met de assistent of de opbrengst voldoende is om de proef te kunnen uitvoeren en noteer de waarden, samen met de berekening in uw verslag.  
**Acetonaafval direct naar zuurkast brengen** (in daarvoor bestemde container zetten).
- Neem **een deel** van de chloroplastensuspensie “15” (dus niet alles!) en verdun die met sucrose-fosfaatbuffer in een schone 50 ml kunststof puntbuis totdat een eindconcentratie chlorofyl van **0,015 mg.ml<sup>-1</sup> (= 15 mg.l<sup>-1</sup>)** zou moeten zijn bereikt in een volume van **50 ml**. Bewaar deze **werkvoorraad** op ijs (in het donker: aluminiumfolie rond de buis).

In totaal zou **50 ml werkvoorraad** ruim voldoende moeten zijn om alle proeven uit kunnen voeren (= circa 14 cuvetten met 2,5 ml plus een paar ‘ongelukjes’)

**NB:** Wanneer de voorproef (opdracht 6) daar aanleiding toe geeft, kunt u de concentratie nog aanpassen (dus meer chloroplasten toevoegen of juist verder verdunnen met sucrose-fosfaatbuffer).

## Algemene procedure (goed doorlezen!)

**N.B.** Chloroplasten zakken in korte tijd al merkbaar uit. Daarom de oplossingen/ cuvetten voor gebruik en voor ieder meting steeds grondig mengen (= 10x zwenken, kantelen).

- a. Meetprotocol:** De spectrofotometer wordt op **600 nm** gezet **en wordt met behulp van de bij de proef behorende referentiecuvet op  $E = 0$  gesteld**. Laat het klepje open als er niet gemeten wordt (voorkomt condensvorming door koude cuvetten).
- Het reactiemengsel zelf wordt gemaakt en de meetcuvet wordt afgesloten met een dopje zodat steeds makkelijk gemengd kan worden bij herhaalde metingen. Houdt de **reactiemengsels koel en donker** (dus - in deels met ijs gevulde - op ijs staande, met alufolie afgeschermd weefselkweekpotjes) **tenzij** er bewust moet worden belicht.
  - Voor **gecontroleerde belichting** (denk aan starten tijdwaarneming!) wordt een cuvet op een vaste afstand (circa 30 cm) van een belichtingslamp een beetje schuin op een bakje met ijs gelegd. Zo wordt er veel licht ingevangen en blijft de cuvet koel! Zwenk af en toe tijdens de belichting, doe dit op een vaste manier bij alle belichtingen.
  - Na belichting (= 45 seconden) de cuvet afdrogen (condens weg), enkele malen zwenken en snel de absorptie meten (klepje daarbij sluiten). Leg de cuvet daarna weer op zijn positie op het ijs onder de lamp voor de volgende belichtingsperiode.
  - Deze belichtingsprocedure wordt herhaald tot geen merkbare verandering meer optreedt (maar zeker niet langer dan 20 minuten). Na afloop wordt met de (direct tevoren omgeschudde) referentie gecontroleerd of de meter niet (teveel) verlopen is.
  - **Zet de meetwaarden al tijdens de metingen in een voorlopige grafiek** (E waarden tegen tijd) zodat zo snel mogelijk duidelijk wordt of alles goed gaat en wanneer met meten kan worden gestopt. Beneden  $E = 0,1$  wordt de hoeveelheid DCPIP<sub>ox</sub> vaak beperkend voor de reactiesnelheid en heeft langer meten geen zin meer.
  - **NB:** Ook in de spectrofotometer wordt de cuvet belicht, dus niet te lang daarin laten staan. De eerste waarde die kan worden genoteerd is meestal de beste.
  - **NB:** De meeste **reagentia** zijn zeer schadelijk voor milieu en gezondheid! Dus alle reactiemengsels verzamelen in chemisch afvalpotje (jampot) en na afloop in **afvalvat (zwarte band)**.
- b. Referentiecuvet ("Blanco"):** Voordat een reactiemengsel wordt bereid, wordt een geschikte referentiecuvet gemaakt. In principe bevat deze alle componenten van het reactiemengsel (en in dezelfde concentraties) behalve de te meten stof (dus geen DCPIP<sub>ox</sub>). In de praktijk van onze proeven bevat een referentiecuvet 2,5 ml chloroplastensuspensie (uit werkvoorraad 0.015 mg.ml<sup>-1</sup> chlorofyl; zie 5e) en 0.5 ml water (demiwater). **In totaal 3 ml vloeistof**. Sluit af met dopje.
- NB:** Omdat DCMU, ethanol, en MV kleurloos zijn (d.w.z.: geen zichtbaar licht absorberen) hoeven deze stoffen zelf niet te worden toegevoegd en volstaat een toevoeging van water (spaart milieu).
- NB:** Referentiecuvet niet koelen. Dit voorkomt onnodige condensvorming in de spectrofotometer. **Eén goede referentiecuvet (via Opdracht 6a of 7A) zou voldoende moeten zijn voor alle proeven!**
- c. Reactiecuvet ("Reactiemengsel")** bevat bij elke proef **in totaal 3 ml vloeistof**:
- 2,5 ml chloroplastensuspensie (0,015 mg.ml<sup>-1</sup> chlorofyl, dus de werkvoorraad van 5e)
  - 0,3 ml DCPIP-oplossing, **TENZIJ** de assistentie anders aangeeft!

- afhankelijk van de uit te voeren deelproef: 0,2 ml water *of* 2° Hill-reagens (lees: MV).

Wanneer ook nog DCMU wordt toegevoegd (0,03 ml in ethanol) wordt het standaardvolume een klein beetje overschreden. Dit valt binnen de meetfout. Het effect van een spootje ethanol op reacties en metingen is te verwaarlozen.

### Opdracht 6: Voorproef (25 min)

- Om de gedachten te bepalen: neem een cuvet met 2,5 ml sucrose-fosfaatbuffer, voeg 0.3 ml DCPIP-oplossing toe, meng en check op het oog de kleur. Voeg nu enkele korrels ascorbinezuur toe (uit epje) en meng de cuvet zodat dit oplost. Wat gebeurt er met de kleur? Wat betekent dit chemisch gezien? U kunt het desgewenst testen; het ascorbinezuureffect is niet lichtafhankelijk.
- Maak nu met de werkvoorraad chloroplastensuspensie (zie 5 e) 2x een reactiecuvet met DCPIP en 1x een referentiecuvet **zoals bij de algemene procedure hierboven beschreven**. Laat één van de twee reactiemengsels in het donker staan. Gebruik de tweede cuvet en de referentie voor een serie metingen zoals boven aangegeven.

Bij goed geïsoleerde chloroplasten wordt onder onze omstandigheden in een belicht reactiemengsel een extinctie-afname bereikt van 0,06 à 0,10 per minuut. Dit is ook voor de verdere experimenten een goed hanteerbare snelheid. Ook de beginextinctie bij 600 nm moet kloppen (= niet sterk afwijken van 0,8 tot 0,9). Zo niet, wijzig dan de concentratie chloroplasten en/of DCPIP en herhaal de proef (opdracht 7A).

Valt het resultaat binnen de genoemde grenzen, dan bent u direct toe aan opdracht 7B. **Gooi het belichte reactiemengsel nog niet weg**, maar bewaar het ontkleurde mengsel op ijs **in het licht** voor 7C (in open potje in de algemene ijsbak in het licht/ bij het raam).

- Vraag:** Controleer of de reactie lichtafhankelijk is door het 1° reactiemengsel dat steeds in het donker is gebleven door te meten.

**Wanneer de voorproef ook volgens de assistent goed is geslaagd (die kijkt daarbij naar de snel gemaakte grafiek!), is Experiment 7A al gedaan en kunt u door met 7B.**

**NB:** De experimenten onder Opdracht 7 kunnen het beste in één vloeiende sessie worden uitgevoerd. Overweegt u een onderbreking van de experimenten na een goed geslaagde voorproef, dan moet er altijd weer begonnen worden met 7A.



**Opdracht 7: Experimenten** (6 x 15-20 min). Zie ook de **algemene procedure** (hierboven) voor de samenstelling van de reactiemengsels.

**Zet bij elk experiment de gemeten absorptiewaarden snel uit tegen de belichtingstijd en trek een lijn door de punten.** Het is de bedoeling dat er uiteindelijk één grafiek met meerdere lijnen ontstaat (A, B, C, D, en E, corresponderend met de serie experimenten hieronder). Later kunnen nettere versies worden gemaakt, maar i.v.m. de gedachtevorming en de beoordeling van de voortgang is een kladversie erg nuttig.

**A** Herhaal zonodig de voorproef met aangepaste concentraties (ook voor referentiecuvet; bewaar die!) en zet snel grafiek A uit. Bewaar cuvet met vrijwel ontkleurd reactiemengsel (de steeds belichte cuvet) op ijs in het licht voor proef C.

**B** Maak een nieuw reactiemengsel. Pipetteer **achtereenvolgens** chloroplastensuspensie, **DCMU** (0,03 ml) en water (0,2 ml) in de cuvet en meng dit door elkaar (dopje er even op). **Voeg dan DCPIP** (0,3 ml) toe en meng opnieuw. **Meet ondertussen weer de referentiecuvet** om de spectrofotometer op nul te stellen. Als veel tijd verstreken is, kan het verstandig zijn om een verse referentiecuvet te maken. Belicht het reactiemengsel totdat duidelijk is waar de reactie eindigt.

**C** Maak een reactiemengsel volgens proef A, meet de aanvangsextinctie. Laat de **DCPIP** zo ver mogelijk ontkleuren door belichting in de kou (cuvet staat in bekerglas met ijs in het licht; dit kan dus de belichte cuvet van de voorproef of van 7A zijn) en voeg **DCMU** (0,03 ml) toe. Belicht en meet weer tot einde reactie.

**D** Als C, maar nu wordt **DCMU** (0,03 ml) + **MV** (0,2 ml) toegevoegd aan het ontkleurde mengsel. **Meng eerst de DCMU door het mengsel heen en voeg dan de MV toe** (weer mengen, zie B). Zie F voor een controle op lichtafhankelijkheid.

**E** Idem, maar nu alleen met **MV** (0,2 ml). Zie ook F.

**F Optie:** Maak cuvetten met ontkleurde mengsels zoals bij D en E, maar laat die 15 minuten in het donker op ijs staan. Meet dan de extinctie ("OD"). Is er weinig tijd, ga er dan van uit dat de extinctie in het er in het donker niet verandert.

**Let op:** Formeel gezien belangrijke controles, maar er kunnen wel eens vervelende artefacten optreden! Overleg dan met de assistentie hoe daar mee om te gaan.

**Ruim nu de werkplek netjes op.** Spoel het nylon sjaaltje uit en leg dit in een daartoe bestemde bak. Spoel glaswerk om en zet spullen de daartoe bestemde bakken. Denk aan correcte verwerking van chemisch afval.

**Opdracht 8: Maak per groepje een kort en bondig verslag vanaf opdracht 4.**

Doel van de proef = "zie pg 68". Materiaal en methoden = "zie handleiding" (tenzij er veranderingen zijn)

**Aanwijzingen voor het verslag**

Voor **opdracht 4** is een tekening niet nodig (wel antwoorden op de vragen). Geef bij

**opdracht 5** de gemeten opbrengst (met berekening).

Zet de resultaten van de proeven 7A t/m E **samen in één nette grafiek** voor een goede onderlinge vergelijking. Corrigeer desnoods een extra verdunningseffect via een berekening (is niet echt nodig). Zet bij de grafiek een simpel tabelletje de samenstelling van de reactiemengsels bij A t/m E en de referentie(s).

Wanneer dit is gedaan: geef als een punt in de grafiek de extinctiewaarde van de reactiemengsels bij 7F aan (= donkercontroles van D en E).

**NU KOMT HET ECHTE WERK:** Vergeet het bekende “Z schema” (en dus ook een groot deel van Opdracht 1) en beschouw uzelf als een onderzoeker die voor het eerst een aantal conclusies aangaande de elektronentransportketen en de (fotochemische) redoxprocessen probeert af te leiden. **Het gaat in dit verslag dus niet om het overschrijven van bekende theorie, maar om het opbouwen van een theorie aan de hand van gedane experimenten** (zie ook “Doel van de proef”, pg 68). Maak dus uitsluitend gebruik van de zelf gedane waarnemingen en de in deze proefhandleiding genoemde gegevens. Wel kunt u er van uit gaan dat de elektronen bij de “natuurlijke” lichtreactie uit water afkomstig zijn. Relevante redoxpotentialen en eigenschappen van stoffen zijn allemaal genoemd (pg 68). Voor  $\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow 2\text{H}^+ + 1/2 \text{O}_2 + 2\text{e}^-$   $E_0' = +0,82 \text{ V}$

Ga dus na welke **algemene fotochemische conclusies** u achtereenvolgens bij elk experiment (A t/m E, eventueel F) kunt trekken in de juiste (foto)chemische bewoordingen. Let daarbij vooral op lichtafhankelijkheid (dus ook op de controles die gedaan zijn). Om te beginnen bewijst u dat er bij de voorproef (of 7A) is aangetoond dat er een fotosysteem in de oplossing aanwezig moet zijn. Vervolgens gaat u na wat u via de experimenten nog meer te weten komt. **Steeds zijn de aandachtspunten: waar kunnen elektronen vandaan komen, waar kunnen ze heen, en is dit lichtafhankelijk?**

Geef vervolgens in **een model met op de Y-as de redoxpotentiaal** weer wat u naar aanleiding van de zelf gedane experimenten over het elektronentransport in chloroplasten kunt zeggen. Dit model moet alle waarnemingen, dus de al of niet optredende lichtafhankelijke elektronentransporten bij A t/m E (F) kunnen verklaren.

**De belangrijkste conclusie van Hill kan worden weergegeven in één zin, maar wordt gauw over het hoofd gezien...**

# STERIEL WERKEN

## VOORBEREIDING

- **Onderstaande inleiding en experimenten. College-aantekeningen.**
- **Blackboard: powerpoint**

Wie met micro-organismen omgaat, moet ervoor zorgen dat hij de werkruimte niet besmet en dat hij ongewenste micro-organismen uit de buurt houdt. Dit is **aseptisch** werken. Ook moet worden voorkomen dat de onderzoeker zelf besmet raakt. Deze manier van werken noemen we: “**Veilige Microbiologische technieken**”(VMT).

Om aseptisch te kunnen werken wordt al het materiaal waarmee wordt gewerkt vrijgemaakt van micro-organismen (=steriliseren). Nu werken wij gelukkig onder zgn. "minimal risk" omstandigheden: we maken geen gekke mutanten, we werken niet met pathogenen, we knoeien niet met gevaarlijk genetisch materiaal. Toch is voor elke microbioloog netheid en voorzichtigheid geboden.

In de praktijk duiden we aseptisch werken aan met “**steriel**” werken. In feite is dit onjuist, want als we echt steriel zouden werken zou er geen, dus ook geen gewenst, micro-organisme groeien.

## STERILISEREN VAN MATERIALEN

Bij sterilisatie wordt het materiaal zodanig behandeld dat er na afloop van het sterilisatieproces geen levende micro-organismen meer kunnen worden aangetoond.

Manieren van steriliseren zijn verhitting (uitgloeien, droge of natte verhitting, pasteurisatie), fysische sterilisatie (UV-straling, Röntgenstraling,  $\gamma$ -straling), chemische sterilisatie (gassen, vloeistoffen), filtreren, desinfectie. Desinfectie hoeft niet tot volledige steriliteit te leiden. Wel wordt het besmettingsniveau verlaagd, waarbij ziektekiemen worden gedood en virussen geïnactiveerd.

Sterilisatie door natte verhitting gebeurt in een autoclaaf: 20 min. stoomverhitting bij 120°C (verzadigde stoom bij 1 atmosfeer overdruk geeft een temperatuur van 121°C). Hiermee kunnen we voedingsmedia, oplossingen en materialen steriliseren. Voor suikers e.d. is deze temperatuur te hoog, deze worden gesteriliseerd gedurende 40 min. bij 110°C (overdruk  $\pm 0,5$  atmosfeer).

Hittebestendige materialen zoals glaswerk (met watten gepropt of met aluminiumfolie afgedekt) en glazen pipetten worden droog gesteriliseerd in een oven, 2 tot 4 uur bij 180°C. Oplossingen die geen verhitting kunnen verdragen worden gesteriliseerd door filtratie met behulp van een bacteriefilter waarvan de poriën kleiner zijn dan de afmetingen van de bacteriën. Veel gebruikte filters zijn membraanfilters met een poriegrootte van 0,2  $\mu\text{m}$ . Ook gammastraling, meestal verkregen met een kobalt-60-isotoop, heeft een dodende werking op micro-organismen. Deze ioniserende straling wordt door het bedrijfsleven gebruikt om plastic materialen zoals petrischalen en pipetpuntjes te steriliseren. In de laboratoriumpraktijk steriliseren we pipetpuntjes en epjes, ingepakt in aluminiumfolie, in de autoclaaf (20 min. 120°C). Daarna volgt droging in een 65°C stoof.

**Proppen**

Voor nat steriliseren (in een snelkookpan of autoclaaf 40 minuten bij 110°C of 20 minuten bij 120°C) en voor droog steriliseren (2 uur in een sterilisatiestoof bij 180°C) moet het glaswerk eerst worden gepropt. Neem een niet te groot vierkant stuk watten, vouw de punten samen, modelleer de watten met duim en vingers tot een cilinder en duw de ronde top in de opening van de buis (of erlenmeyer enz). Breng de prop met een draaiende beweging voor 2/3 tot 3/4 gedeelte in de opening van de buis/erlenmeyer. De prop is goed van grootte als hij er net in past en dus niet te los zit.

**Steriele glazen pipetten**

Pipetten worden in een metalen koker gedaan met de punt naar binnen. De koker wordt gesloten met bijbehorend deksel en droog gesteriliseerd.

Tegenwoordig worden bijna altijd plastic wegwerppipetten gebruikt die afzonderlijk zijn verpakt en steriel worden aangeleverd.

**STERIEL WERKEN IN DE PRAKTIJK**

**Voor elke proef was je goed je handen daarna maak je de werktafel met een prop papier bevochtigd met 70% alcohol schoon. Laat de tafel goed drogen en doe de bunsenbrander aan en zet deze tot gebruik op een laag pitje. Leg alleen de materialen op tafel die strikt nodig zijn.**

**Gebruik van pipetten**

Leg de koker met steriele pipetten op tafel (niet rechtop zetten). Haal de deksel van de koker en schud voorzichtig zodat de pipetten ca. 1 cm uitsteken. Bij het pakken van een pipet mag alleen het bovenste gedeelte van de pipet worden aangeraakt. Een eenmaal gepakte pipet mag je voor gebruik niet neerleggen. Dit dient om infectie te voorkomen. Vlak voor het gebruik haal je de pipet even **kort** door de vlam, zodanig dat het glas niet heet wordt. Na gebruik gaat de vuile pipet in de met zeep gevulde plastic kokers op tafel. Let erop dat de koker of buis met pipetten blijft liggen op tafel, dus niet rechtop zetten, want dan blijven de pipetten niet steriel.

**Platen gieten en enten**

Vast medium in serumflessen of kolfjes kun je opsmelten in de autoclaaf (grote hoeveelheden) of in de magnetron (paar flessen). Zwenk de fles tijdens het opsmelten in de magnetron een paar maal zodat de agar gelijkmatig smelt. Laat de fles afkoelen tot 60°C. door hem in de stoof te zetten of zwenk hem om hem af te koelen. Koel geen hete flessen af onder de kraan! Een fles die implodeert of explodeert, kan nare verwondingen geven.

Bij het gieten van platen uit een serumfles moet de fles, voor gebruik, eerst voorzichtig worden gezwenkt om de agar in de fles homogeen te verdelen. Draai de dop eraf en flambeer de flesrand af. Giet hierna snel zoveel medium in de petrischaal dat het gehele bodemoppervlak net bedekt is. Laat de agar in de plaat ten minste 15 min. stollen.

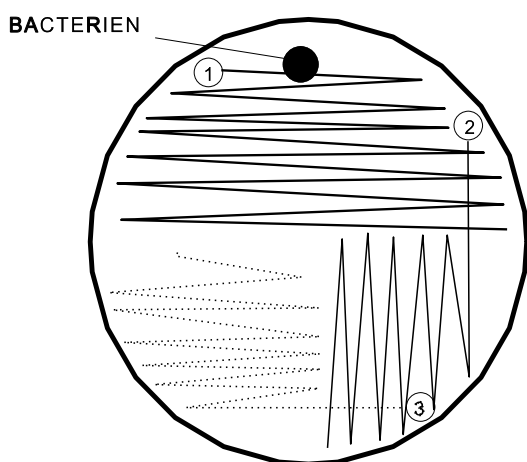
Vergeet niet de platen vóór gebruik met viltstift te merken en van je initialen en plaatsnummer te voorzien. Doe dit altijd op de buitenzijde van de bodem van de petrischaal, aan de rand, klein geschreven. Met een **Drigalskispatel** (driehoekige glazen of metalen spatel) wordt een druppel bacteriesuspensie egaal over de hele plaat verspreid. De spatel wordt daartoe in de alcohol gedoopt, vervolgens kort in de vlam van de bunsenbrander gehouden en pas gebruikt als de vlam is gedoofd. De spatel moet eerst worden afgekoeld op het agaroppervlak, daar waar geen micro-organismen zijn. Daarna de druppel egaal verdelen door rond te spatelen.

Een Drigalskispatel mag **NOOIT HEET** in de alcohol worden gedoopt om te voorkomen dat de alcohol gaat branden. Wanneer de alcohol toch in brand staat, laat dan de alcohol rustig uitbranden (ga niet knoeien met brandblussers en ga zeker niet met de brandende alcohol naar de gootsteen). De beënte platen worden **omgekeerd** geïncubeerd in de stoof.

### Heilige buis (HB) maken

Giet uit een serumfles medium in een steriele cultuurbuis, ongeveer 2 vingers hoog en laat het stollen door de buis onder een hoek van  $10^\circ$  -  $20^\circ$  neer te leggen. Dit om een groter oppervlak te verkrijgen en het beënten makkelijker te maken.

### Reincultuur maken



Uit een vloeibaar medium met een mengsel van micro-organismen, bijv. bacteriën, wordt een druppel afgestreken (evt. na verdunnen met steriel water) op een geschikte vaste voedingsbodem, met als doel losse kolonies te verkrijgen. Dit afstrijken voor losse kolonies gebeurt zoals hieronder beschreven:

Breng bovenaan de plaat met de oogjesnaald een klein druppeltje van de suspensie (1). Strijk vervolgens de naald van links naar rechts heen en weer en houd de plaat zoveel mogelijk gesloten met het deksel. Doe dit zeer voorzichtig om beschadiging van de agarbodem te voorkomen. Strijk zo af tot ongeveer halverwege de plaat.

Draai de plaat een kwartslag, verhit de naald kort, doof, strijk eenmaal door het laatste geënte deel en strijk een kwart plaat (2). Herhaal deze procedure voor het laatste kwart deel van de plaat (3).

Wanneer de bacteriën goed gegroeid zijn, is op de plaat te zien dat de eerste ent-strepen volgegroeid zijn. Bij de volgende strepen wordt het aantal kolonies steeds minder, zodat bij de laatste streep (strepen) alleen maar losse kolonies zichtbaar zijn. Van zo'n losse kolonie mag worden aangenomen dat deze ontstaan is door vermenigvuldiging van één bacterie, m.a.w. deze losse kolonie is een **reincultuur**. Na groei wordt een klein gedeelte van een losliggende kolonie gesuspenderd in een buis met  $\pm 2$  ml steriel water en opnieuw afgestreken (zoals hierboven beschreven) op een nieuwe plaat. Deze procedure wordt herhaald totdat op de plaat **uitsluitend** kolonies van het gezochte micro-organisme voorkomen.

Is men er absoluut zeker van dat geen andere bacteriën meer aanwezig zijn, dan wordt materiaal van één kolonie onverdund afgestreken in een cultuurbuis met een schuingestolde agarbodem (HB). Deze reincultuur kan nu worden gebruikt als uitgangsmateriaal voor allerlei proeven.

### Overenten

Het overbrengen van micro-organismen van het ene medium naar het andere dient te geschieden zonder dat er verontreiniging met ongewenste micro-organismen optreedt (**infectie**). Meestal gebruik je hiervoor een oogjesnaald of een steriele pipet.

Beschik je over een reïncultuur (bijv. een HB), dan wordt vanuit de HB een kolfje met vloeibaar medium beënt. Er wordt als volgt gehandeld:

Je neemt de buis met het te enten materiaal in de ene hand en de oogjesnaald in de andere. Eerst wordt de oogjesnaald uitgegloeid. Met de gekromde pink wordt de wattenprop van de buis af genomen (de wattenprop dien je steeds vast te houden: nooit neerleggen). De rand van de buis wordt even door de vlam gehaald (geflambeerd), waardoor eventueel aanwezige micro-organismen die nabij de rand aan de binnenkant zitten worden vernietigd. De oogjesnaald wordt vervolgens afgekoeld door de naald tussen de agar en de buis te steken. Met de steriele oogjesnaald neem je wat celmateriaal uit de buis. Je flambeert de rand van de buis weer en sluit deze snel af met de wattenprop. Het te beënten kolfje wordt geopend, geflambeerd en geënt (het celmateriaal wordt ingebracht). Flambeer weer snel de rand van het kolfje en sluit het met de wattenprop af. De oogjesnaald wordt onmiddellijk na gebruik uitgegloeid om de tafel niet onnodig te besmetten met micro-organismen.

De oogjesnaald **niet** gloeiend heet op tafel leggen.

### GROEIMEDIA VOOR MICRO-ORGANISMEN

Platen kunnen verschillende voedingsbodems bevatten. Een **voedingsbodem** is een oplossing van stoffen waarvan micro-organismen kunnen leven. In een zgn. vaste voedingsbodem is een middel aanwezig om die vloeistof vast te maken bij fysiologische temperaturen. In de door ons gebruikte voedingsbodems zit **agar-agar**, dit is een polysaccharide uit roodwieren dat door vrijwel geen enkel micro-organisme kan worden aangetast. Het smelt goed bij  $\pm 90^{\circ}\text{C}$  en hoger, terwijl het stolt bij  $\pm 40^{\circ}\text{C}$ . Na stolling is het in de hele temperatuur-range van  $0 - 70^{\circ}\text{C}$  te gebruiken als vaste voedingsbodem. Om een vaste voedingsbodem te krijgen voeg je 1,8 - 2% w/v (weight/volume) agar aan de voedingsoplossing toe.

Je kunt micro-organismen ook in vloeibaar medium kweken, dit bevat dan geen agar-agar. Het vloeibare medium (maximaal 10% van het kolfvolume) wordt meestal in een kolfje gedaan. Het opkweken gebeurt onder voorzichtig bewegen op een zogenaamd schudapparaat. Dit is **aëroob** kweken. Het ophopen onder **anaërobe** condities gebeurt in stopflesjes die tot in de hals kunnen worden gevuld, waarna men de stop in de hals laat zakken. Zorg ervoor dat er **geen** luchtbel overblijft. De stop echter **niet** vastdrukken, omdat dit bij gasontwikkeling tot ontploffing aanleiding kan geven. Plaats in de stoof steeds een van de twee delen van een petrischaal onder de flesjes om eventueel overbruisend vocht op te vangen (toepassing blz.141).

Veelgebruikte voedingsbodems en hun voornaamste bestanddelen zijn;

**pepton**, een product verkregen door zure of enzymatische hydrolyse van eiwit en bevat dus vnl. peptiden en polypeptiden.

**mout**, een product dat wordt gebruikt bij de bierbereiding. Het wordt verkregen door extractie van gekiemde gerst en bevat veel suikers, vooral maltose (een disaccharide van twee glucose-moleculen). Verder bevat mout aminozuren en vitaminen.

**bouillon**, een product van vleesextract

**synthetisch medium (SM)**, dit bevat naast een geschikt zoutmengsel alleen glucose en agar-agar.

Deze verschillende voedingsbodems bevoordelen verschillende typen micro-organismen in hun groei. Daarnaast is er een groot aantal specialistische groeimedia. Een aantal daarvan zullen we bij de verschillende proeven tegenkomen.

### **Wat groeit bij voorkeur op welke voedingsbodem?**

Er kunnen drie typen organismen op de platen groeien:

- bacteriën (bolletjes en staafjes)
- gisten (losse ovale cellen, vele malen groter dan bacteriën)
- schimmels (draderige kolonies)

Gisten en schimmels worden voornamelijk aangetroffen op de moutagarplaat. Met name de schimmelkolonies bevatten vaak sporen, die onder de microscoop als losse rondjes zichtbaar zijn. Een schimmelkolonie in zijn geheel kun je het beste bekijken onder de prepareermicroscoop. Leg de petriskaal (met de deksel gewoon naar boven) op de microscopetafel, zodanig dat de rand van de kolonie in het gezichtsveld ligt. Kijk met het 4x of 10x-objectief en stel scherp. Bij een goede instelling moeten de hyfen (de schimmeldraden) van de schimmelkolonie duidelijk zichtbaar zijn.

Bacteriën groeien op alle vier de genoemde voedingsbodems. Bacteriekolonies kunnen een verschillend uiterlijk hebben: bol of plat; puntvormig, circulair of onregelmatig; glad (smooth) of ruw (rough). Dit laatste kenmerk hangt af van celwandeigenschappen van het organisme en van de eventuele aanwezigheid van een kapsel. Kapsels bestaan uit slijmachtige substanties, afgescheiden buiten de celwand, die de kolonie een glad, glinsterend oppervlak geven.

Bacteriën kunnen verschillende vormen hebben:

- **coccen**: losse bolletjes
- **diplococcen**: bolletjes twee aan twee
- **streptococcen**: slingers van bolletjes
- **staphylococcen**: klonten van bolletjes
- **sarcina's**: kubusvormige pakketjes van bolletjes
- **staafjes**
- **spirillen**: gedraaide staafjes
- **vibrionen**: gekromde staafjes (komma's)

### **Praktische tips**

Om proeven te kunnen uitvoeren zijn er steriele materialen en media nodig, zoals hierboven beschreven. Glaswerk zoals kolfjes, serumflessen, buizen en pipetten zijn steriel aanwezig.

Je moet zelf zorgdragen voor de voorraad steriele pipetten. Is de koker meer dan half leeg, vul hem dan aan en leg de koker neer op de tafel naast de sterilisatiestoof. Zet er géén naam op! Voor het volgende practicum worden ze gesteriliseerd.

Moeten er platen worden gegoten, dan vind je de media in serumflessen in de 60<sup>0</sup> stoof. Gebruik de witte doekjes om de hete flessen te pakken. Zet de flessen na het gieten direct terug in de stoof, anders stolt de agar.

Beënte platen worden omgekeerd in de stoof gezet. Er zijn stoven van 30<sup>0</sup> C en van 37<sup>0</sup> C. Let goed op in welke stoof de platen moeten worden gezet!

Aan het eind van de zaal zijn gootstenen ingericht met kleurgoten om kleuringen uit te voeren. Houd de omgeving van de kleurgoten netjes, ruim gebruikte filtreerpapierjes e.d. meteen op. Gekleurde preparaten leg je in een petrischaaldeksel, zodat er geen kleurstof op de werktafels komt.

### **Opruimen van vuile materialen**

Suspensies van micro-organismen worden in de daartoe bestemde flessen in de zuurkast gegoten. Het glaswerk wordt daarna omgespoeld en in de daartoe bestemde witte bakken gedaan (let op de opschriften op de bakken). Haal viltstiftopschriften eraf met een tissue bevochtigd met alcohol.

Leg buizen zodanig weg dat de openingen naar dezelfde kant gericht zijn.

Zet gebruikte pipetten direct in de koker met zeepsop, dus niet op de tafel leggen.

Platen met micro-organismen worden in gele afvalbakken gedaan met opschrift “vuile platen”. De afvalbakken zijn voorzien van een autoclaveerbare plastic zak.

Scherp afval (bv. glas) wordt verzameld in gele ronde bakjes met plasticzak. Deze staan op de laboratoriumtafel.

Lege petrischalen en ander afval gaan in de gewone afvalbakken bij de gootstenen.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN DAG 1**

**Bedenk voor je een opdracht uitvoert welke en hoeveel platen je nodig hebt en giet ze. Bekijk daarvoor het onderdeel “wat groeit bij voorkeur op welke voedingsbodem” uit de inleiding.**

**De opdrachten hoeven niet altijd op volgorde te worden uitgevoerd, dat voorkomt elkaar in de weg lopen of wachten.**

### **Steriel werken**

Bij het doen van proeven werk je zo steriel mogelijk. Om te testen of je dit goed doet, ga je met een steriele zoutoplossing een aantal handelingen verzinnen en uitvoeren bijv. overschenken, pipetteren, verdunnen e.d. Gebruik hiervoor steriel glaswerk! Schrijf eerst precies op wat je gaat doen. Hoe meer handelingen je bedenkt, hoe beter je jezelf test. Je mag max. 4 peptonplaten gebruiken voor deze test.

Incubeer de platen omgekeerd in de stoof bij 30°C.

### **”Sterilisatie” aarde**

Bij het doen van proeven moet je ook werken met zo steriel mogelijke materialen. Om dit te kunnen doen moet je weten op welke manieren materialen zo effectief mogelijk kunnen worden gesteriliseerd, dus vrijgemaakt van micro-organismen.

Je gaat dit onderzoeken aan de hand van tuingrond omdat je hierin een aantal verschillende micro-organismen kunt verwachten. Om te testen wat het effect is van steriliseren op de overlevingskansen van deze micro-organismen, ga je uitzoeken bij welke combinatie van temperatuur en tijd, waaraan je de tuingrond blootstelt, er nog enige overleving is. Verzin **vier** logische combinaties van temp/tijd en motiveer dit op papier. Oriënteer je op de mogelijkheden in de zaal: stoven, waterbaden, kookpan. Overal staan de temperaturen bij aangegeven.

Maak een tuingrondsuspensie (een **klein** schepje tuingrond in een plaatbuis voor een derde gevuld met demiwater). Vortex de buis een aantal malen zeer goed en laat de grond



uitzakken. Verdeel de suspensie gelijkelijk over vier lege reageerbuisen, doe een dop op deze buizen en nummer ze 1 t/m 4. **Schrijf niet op de doppen van de buizen. Het gaat er niet meer vanaf!**

Voer de temperatuur/tijdbehandelingen uit.

Breng vervolgens met steeds een steriele tip uit elke grondsuspensie-buis een druppel (= ca 100 µl) over op een peptonplaat. Spatel de druppel goed uit over de plaat. De beënte platen worden omgekeerd geïncubeerd in de 30°C-stoof.

### **Handflora**

Als we in het laboratorium proeven moeten uitvoeren, moet de omgeving zo schoon mogelijk zijn. Echter, aan onze handen zitten micro-organismen. We gaan uitzoeken op welke manier we onze handen het meest effectief van deze micro-organismen kunnen ontdoen.

Was de vingers van je rechterhand op verschillende manieren. Bedenk deze manieren zelf. **Schrijf deze op met motivatie.** Bij de wasbakken staan zeep, borstel, alcohol etc. klaar. Neem een peptonplaat en druk de verschillend behandelde vingers op de voedingsbodem. Geef goed aan welke vinger je op welke plaats drukt! Incubeer de plaat bij 30°C.

**Toelichting:** Op de huid komt een **autochtone flora** van voornamelijk coccen voor, behorende tot de geslachten *Staphylococcus* (o.a. *S.epidermidis*) en *Micrococcus*. Beide geslachten groeien aëroob. Kolonies van *Micrococcus* bevatten meestal losse coccen, terwijl *Staphylococcus* in druiventrosjes bij elkaar liggen. Deze bacteriën leven voornamelijk in groeven en poriën van de huid. Buiten op de droge hand zal men weinig van deze organismen (autochtone flora) aantreffen, maar wel van micro-organismen die afkomstig zijn van materiaal waarmee men kort geleden in aanraking is geweest (**transiënte flora**). Door handen wassen verwijder je de transiënte flora en werk je door de wasprocedure de autochtone flora uit de groeven en poriën los. Van de handen is dan eenvoudig een coc te isoleren. De micro-organismen in de huidporiën zijn lastig bereikbaar, borstel daarom geruime tijd (5 minuten) om je handen met een geschikt agens (zeep, desinfecterende zeep, alcohol) te desinfecteren.

**Vraag:** Waarom denk je dat we autochtone flora op onze huid hebben?

### **Luchtflora**

Ook de lucht is niet steriel. Lucht bevat niet de noodzakelijke hoeveelheden voedingsstoffen en vocht voor de groei en vermenigvuldiging van micro-organismen. Maar een aantal bacteriën, gisten en schimmels kunnen toch lange tijd in lucht overleven, soms in de vorm van sporen. We zullen nagaan waarmee de lucht in de keuken thuis verontreinigd is.

Bedenk op welke manier je kan nagaan welke (sporen van) micro-organismen in de lucht aanwezig zijn. Welk(e) voedingsbodem(s) gebruik je hiervoor en waarom?

Neem de platen in aluminiumfolie, mee naar huis en zet de platen 1 uur open in de keuken. Pak ze daarna weer in. Neem de platen de volgende dag mee en leg ze op de practicumzaal in mand die bij je gang hoort. De assistenten leggen de platen in de stoof bij 30°C.

**Schrijf precies op wat je doet en waarom.**

## **PRACTICUMOPDRACHTEN DAG 2**

**Giet eerst de nodige HB's met peptonagar. Maak een paar extra HB's voor het geval je later opnieuw moet enten. Bewaar ze in je kastje.**

**Bekijk voor de opdrachten van vandaag vooral het hoofdstuk “kleuringen” en het onderdeel “wat groeit bij voorkeur op welke voedingsbodem” uit de inleiding.**

### **Steriel werken**

Ga na of je steriel gewerkt hebt. Zijn er toch infecties opgetreden, probeer deze dan te verklaren aan de hand van je aantekeningen betreffende de uitvoering.

### **“Sterilisatie” aarde**

Voor dit gedeelte heb je peptonagarplaten beënt met grondsuspensies die bij 4 verschillende temperaturen/tijd behandeld zijn.

1. Bekijk deze platen en vergelijk ze onderling: zijn er verschillen in aantallen en typen van kolonies waar te nemen tussen de verschillende platen?
2. Wat is de invloed van de temperatuur/tijd geweest op de overleving van de micro-organismen?
3. Bekijk onder de microscoop (nat preparaat, ongekleurd) of je verschillende bacterievormen kunt waarnemen.

Bewaar deze platen voor opdracht luchtflora.

**4. Sporenvormende bacteriën** uit deze proef heb je later nodig voor de penicillineproef. Sporenvormende bacteriën zijn in staat om onaangename milieuomstandigheden te overleven door het vormen van sporen. Wanneer de omstandigheden beter worden kunnen de sporen weer “ontkiemen” en uitgroeien tot een kolonie. De behandeling van de tuingrondsuspensie bij 70°C tot 100°C doodt in de regel alle bacteriën, maar sporen kunnen overleven. De opgekomen kolonies op deze platen zullen dus voornamelijk bestaan uit sporenvormende bacteriën.

Test van de platen met sporenvormende bacteriën een paar verschillende kolonies op het vormen van sporen door het uitvoeren van een Gramkleuring. De sporen zijn te herkennen als ronde doorzichtige bolletjes in de bacterie, ze blijven ongekleurd i.t.t. de rest van de bacterie. De meest geschikte sporenvormers zijn de platte beige kolonies. Een heel vaak voorkomende sporenvormende kolonie wordt gevormd door *Bacillus cereus* var. *mycoides*, te herkennen aan de lange dunne beige uitlopers. Maak een HB van een sporenvormende kolonie: neem met een steriele oogjesnaald een beetje koloniemateriaal, breng de naald in de buis en beweeg hem zachtjes in een slangachtige beweging van de basis van het agaroppervlak naar de top. Ploeg niet door de agar. Incubeer de HB enkele dagen bij 30°C tot je duidelijke groei ziet en bewaar de HB dan in je kastje voor de penicillineproef.

Zie na de Gramkleuring nog geen zichtbare sporen, zet de plaat dan terug bij 30°C en doe de test nogmaals op het volgende practicum en maak dan een HB.

### **Handflora**

Na incubatie zijn verschillende kolonietypes op de platen zichtbaar. *Staphylococci* verschijnen als witte (*S. epidermidis*) of als gele (*S. aureus*) kolonies op de plaat. *Micrococci* zijn wit.

1. Tel en beschrijf de kolonies van de verschillende vingerafdrukken. Is er verschil tussen de kolonies van de verschillende vingerafdrukken? Geef een verklaring.

2. Welke kolonies zijn van de autochtone en welke van de transiënte flora?
3. Wat is de invloed van het wassen van je handen op de verschillende manieren?
4. Bekijk onder de microscoop een aantal verschillende kolonies gekleurd en ongekleurd. Zijn er onder de microscoop *Staphylococci* en *Micrococci* te zien?  
Maak in je labjournaal tekeningen van wat je ziet en benoem zo mogelijk de bacteriën.

4. Voer op **dag 3** de Gramkleuring uit. Volg hiervoor de aanwijzingen uit de powerpoint.
5. Maak van een willekeurige Gram-positieve coccenkolonie een HB. Incubeer de HB enkele dagen bij 30°C tot groei duidelijk zichtbaar is. Bewaar de HB in je kastje voor de penicillineproef.

### **Luchtflora**

Bekijk de luchtinfectieplaten en vergelijk ze onderling.

1. Maak een **tabel** in je labjournaal van welke typen kolonies op de verschillende voedingsbodems opgekomen zijn.
2. Maak van verschillend uitziende kolonies een ongekleurd en gekleurd preparaat. Bekijk door welke typen organismen ze gevormd zijn. Welke kleuringen pas je toe en waarom?
3. Kloppen je bevindingen met wat beschreven wordt in de inleiding “wat groeit er op welke voedingsbodem”?
4. Vergelijk de peptonplaten geïncubeerd met tuinaarde (van **elke** temperatuur) met de peptonplaat van deze proef.  
Geef de overeenkomsten/verschillen van de resultaten weer in een **tabel**.

# OPHOPINGEN

## HET MILIEU SELECTEERT

### VOORBEREIDING

- Lees de onderstaande inleiding door en je college-aantekeningen.

Er zijn erg uiteenlopende stofwisselingstypen te vinden bij de verschillende soorten bacteriën, die dan ook uiteenlopende eisen stellen aan hun milieu. Hiervan kunnen we gebruik maken bij het isoleren van bepaalde soorten. Dit heet **ophopen**. Van tuingrond en grachtwater kun je verwachten dat ze een verschillende populatie van micro-organismen bevatten. We gaan proberen twee micro-organismen uit de natuur te isoleren, één uit de tuingrond en één uit het grachtwater. Ophopingsmedia behoeven over het algemeen niet te worden gesteriliseerd, aangezien ze dikwijls zeer selectief zijn en het entmateriaal weinig specifiek is.

Na het ophopen volgt de tweede stap, **het reinkweken**, met als doel een agarplaat in handen te krijgen waarop uitsluitend kolonies aanwezig zijn van het micro-organisme dat we willen isoleren.

#### Isolatie *Escherichia coli* uit grachtwater

De bacterie *Escherichia coli* (familie van de *Enterobacteriaceae*= darmbacteriën) is het voornaamste bestanddeel van faeces van de mens. Komt *E.coli*, een **chemo-organo-heterotroof** organisme, in grote hoeveelheden voor in water, dan duidt dit op een recente faecale verontreiniging. De identificatie van *E.coli* is daarom een belangrijk facet van het bacteriologisch routineonderzoek van drinkwater. Zeer vele pathogene bacteriën worden verspreid door faecaliën. Het is echter buitengewoon moeilijk om al deze pathogene bacteriën individueel aan te tonen. Omdat deze bacteriën sneller afsterven dan *E.coli* is het echter voldoende om na te gaan of *E.coli* nog in belangrijke hoeveelheden voorkomt. Is dit laatste niet het geval, dan kan men veilig aannemen dat pathogene bacteriën niet meer aanwezig zijn.

#### Isolatie *Azotobacter* uit tuingrond

In tuingrond komt o.a. *Azotobacter chroococcum* voor. Het is een **obligaat aëroob, chemo-organo-heterotroof** organisme, dat in staat is om atmosferische stikstof vast te leggen in gebonden stikstof ( $N_2$  wordt  $NH_4^+$ ). Dus nuttig voor plantengroei!

## **PRACTICUMOPDRACHTEN DAG 1**

### **Grachtwater**

Je kunt *E.coli* gemakkelijk uit grachtwater isoleren met de volgende methode: Je vult een stopflesje (zie blz 134) geheel met een ophopingsmedium dat selectief is voor *E.coli* (staat klaar, samenstelling zie onder). Het flesje wordt geënt met een paar milliliter grachtwater en bij 37°C geïncubeerd. Zet het flesje in een halve petrischaal, want door de gemengd-zure gisting die optreedt kan het flesje overlopen.

Het ophopingsmedium is een oplossing bestaande uit: 1% lactose; 1% pepton; 0,5% NaCl en 0,5% Na-taurocholaat, pH 7.4. Het ontleent zijn **selectieve werking** aan de aanwezigheid van taurocholaat. Doordat *E.coli* voorkomt in de darm van zoogdieren moet *E.coli* aangepast zijn aan de oppervlaktespanning- verlagende werking van galbestanddelen. De aanwezigheid van **lactose** als koolstofbron beperkt bovendien sterk het aantal andere bacteriën dat zich kan ontwikkelen, omdat veel bacteriën niet in staat zijn om lactose te splitsen in glucose en galactose.

### **Tuingrond**

Breng in een erlenmeyer van 500 ml 100 ml van een goed gemengde oplossing (CaCO<sub>3</sub> zakt snel uit) bestaande uit: 2% glucose; 2% CaCO<sub>3</sub>; 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in demi- water; pH 7.0. Ent hierin een mespuntje tuingrond (waarom lukt bij meer tuingrond de ophoping niet?). Incubeer bij 30°C in de stoof.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN DAG 2**

### **Grachtwater**

Meestal is er binnen twee dagen al gisting opgetreden. Je strijkt dan af op een plaat met endo-agar voor losse kolonies, zoals beschreven aan het begin van dit onderdeel. De endo-agar bevat, behalve lactose en pepton, als kenmerkend bestanddeel door sulfiet ontkleurde fuchsine.

Giet een endo-agarplaat en strijk een draadoogje uit het gegiste stopflesje uit over de plaat zoals beschreven in de inleiding. De plaat incubeer je bij 37°C in de incubatiestoof. Na 24 uur incubatie kun je waarschijnlijk de aanwezigheid van rode *E.coli* kolonies met metaalglans zien.

### **Tuingrond**

Dikwijls vormt zich reeds na twee dagen een vliesje op het vloeistofoppervlak. Een deel van dit vliesje wordt onder de microscoop bekeken. Je kunt korte dikke staafjes zien (die kunnen lijken op dikke diplococci) van *Azotobacter* naast andere bacteriën, waaronder boterzuurbacteriën, *Aerobacter* en *Pseudomonas* soorten. Al deze bacteriën kunnen tot ontwikkeling komen doordat *Azotobacter* gebonden stikstof in het medium uitscheidt. Voor een goede isolatie is het daarom noodzakelijk dat je, zodra je cocci ziet, het vliesje afstrijkt op *Azotobacter*-agarplaten, bestaande uit wateragar met 2% glucose; 2% krijt en 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

Deze platen zijn al gegoten omdat i.v.m. het snel uitzakkende CaCO<sub>3</sub> het een lastige klus is. Wanneer je een dun vliesje hebt, kun je direct een draadoogje uitplaten. Heb je een dik vlies dan breng je eerst vier draadoogjes van het vlies in een buis met 1 ml steriel water. Na goed vortexen van deze buis kun je hiervan een druppeltje afstrijken om losse kolonies te krijgen. Incubeer bij 30°C.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN DAG 3**

### **Grachtwater**

De ophoping van *E.coli* is nu al zover gevorderd dat op de endo-agarplaat losse metaalkleurige kolonies zichtbaar moeten zijn. Als dit niet zo is, strijk dan een klein oogje uit het stopflesje opnieuw uit op een endo-agarplaat om losse kolonies te krijgen. Zijn er wel losliggende kolonies zichtbaar, maak dan van een gedeelte van een losliggende kolonie een licht troebele suspensie in  $\pm 1$  ml steriel water. Hiervan wordt een klein druppeltje aangebracht bovenaan een nieuwe endo-agarplaat en weer worden losse kolonies gestreken. Deze endo-agar plaat wordt vervolgens weer geïncubeerd bij 37°C.

Zijn er op de endo-agar plaat alleen kolonies aanwezig met een metaalglans dan heb je een reïncultuur. **Laat een assistent de plaat met losse *E.coli* kolonies controleren** voor je er een HB van maakt. Maak een HB (peptonagar) en incubeer enkele dagen bij 37°C. Als je duidelijke groei ziet, bewaar de HB dan in je kastje voor de penicillineproef.

**Vraag 1:** Waarom is het gebruikte **ophopingsmedium** geschikt om *E.coli* op te hopen? Geef van alle ingrediënten aan wat hun functie is om *E.coli* op te hopen.

**Vraag 2:** Geef van de ingrediënten in de **endoagarplaat** aan wat de functie is om juist *E.coli* te laten groeien en een metaalglans te geven.

### **Tuingrond**

Na enkele dagen vormen zich dikke, doorzichtige, slijmerige kolonies van *Azotobacter*, die na enige tijd bruin en na langere tijd zelfs bruin-zwart worden en geen zuur produceren (dus de kalk rond de kolonie niet oplossen). Wanneer je van een dergelijke kolonie een microscopisch preparaat maakt en dit behandelt met nigrosine, kun je onder de microscoop een duidelijk slijmkapsel herkennen. Dit kapsel is er de oorzaak van dat *Azotobacter* kolonies dikwijls hardnekkig verontreinigd blijven met andere bacteriën, die vaak wel zuur vormen. Dit is op de *Azotobacter*-agarplaten duidelijk te zien aan een heldere zone rond de kolonie waar het  $\text{CaCO}_3$  is opgelost. Bij het reïnkweken vermijd je deze zuurvormende kolonies.

Het reïnkweken gebeurt door van een geschikte kolonie een klein draadoogje te suspenderen in een buis met  $\pm 2$  ml steriel water, zeer goed te vortexen en vervolgens af te strijken (voor losse kolonies) op een plaat *Azotobacter*agar en op een plaat peptonagar.

## **PRACTICUMOPDRACHTEN DAG 4**

### **Grachtwater**

Mocht je nog geen losliggende kolonie op je plaat hebben, strijk dan nog een keer rein op een nieuwe endo-agarplaat en maak op de volgende practicumdag een HB. Incubeer enkele dagen bij 30°C. Als je duidelijke groei ziet, bewaar de HB dan in je kastje voor de penicillineproef.

### **Tuingrond**

Bekijk na enkele dagen de groei van *Azotobacter* op pepton-agar en op Azotobacter-agar. Vergelijk de typen kolonies. Bekijk de bacteriën van deze kolonies ook onder de microscoop, ongekleurd en na kleuring met nigrosine. Komen de resultaten overeen met het onderstaande?

Op pepton-agar groeit *Azotobacter* slecht (de kolonies blijven klein en plat), terwijl andere bacteriën zich op pepton-agar snel ontwikkelen en deze zijn dus makkelijk herkenbaar als verontreiniging. Microscopie van de op pepton-agar gegroeide *Azotobacter* (ongekleurd) laat weer de typische diplococcen zien, maar dikwijls ook zeer afwijkende celvormen. Op Azotobacter-agar vormt *Azotobacter* weer dikke slijmerige kolonies, die na enige dagen bruin worden.

**Vraag 1:** Is peptonagar geschikt als selectiemedium voor *Azotobacter*? Verklaar je antwoord.

**Vraag 2:** Verklaar de kolonievorm van *Azotobacter* op een Azotobacterplaat in vergelijking met de peptonagarplaat

**Vraag 3:** Geef van alle ingrediënten in het **ophopingsmedium voor *Azotobacter*** de functie om de ophoping te bewerkstelligen.

Mocht het reinkweken niet gelukt zijn, doe het dan nog een keer over en beantwoord deze vraag op het volgende practicum. Zet eventueel de platen terug in de stoof als het beeld nog niet duidelijk is en bekijk ze op de volgende practicumdag nog een keer.

## **β-GALACTOSIDASE-SYNTHESE**

### **VOORBEREIDING**

- **Campbell fig. H.18.4 en je college-aantekeningen.**
- **Lees onderstaande inleiding en experiment goed door.**

Als de bacterie *E.coli* kan kiezen om glucose of lactose (komt voor in melk) te gebruiken als C-bron, dan wordt gekozen voor glucose. Is de glucosespiegel laag dan beschikt *E.coli* over het induceerbare lac-operon, waarmee de bacterie een enzym maakt om lactose af te breken, om glucose weer aan te vullen.

Lactose is een disaccharide, dat voor afbraak via de glycolyse etc. eerst moet worden gesplitst in D-glucose en D-galactose. Het enzym dat deze splitsing bewerkstelligt heet β-galactosidase. Dit enzym wordt in de cel pas in flinke hoeveelheden aangemaakt als er in het medium lactose aanwezig is. Lactose bestaat een klein deel uit het isomeer **allolactose**. Allolactose bindt aan de actieve repressor van het lac-operon, waardoor de repressor geïnactiveerd wordt. Nu kan het enzym β-galactosidase worden gevormd. De stof allolactose noemen we een inducer. β-galactosidase is dus een induceerbaar enzym. Een stofje met vergelijkbare activiteit als allolactose is **IPTG**. In het hieronder beschreven experiment zullen we dit aantonen d.m.v. een directe enzymbepaling.

*E.coli* wordt opgekweekt in een synthetisch medium (SM) met glycerol als enige C-bron (**geen glucose aanwezig**). Hierdoor wordt een hoog niveau aan cAMP bereikt. Dit activeert de transcriptie van het lac-operon. Als inducer wordt IPTG gebruikt. Nadat de bacteriën overnacht gegroeid zijn, kan het enzym β-galactosidase worden geïsoleerd. De celwanden worden permeabel gemaakt door toevoegen van chloroform en SDS (een zeepachtige stof) aan de kweek. Vervolgens wordt ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) toegevoegd, een geschikt substraat voor β-galactosidase. ONPG kan in de permeabele cellen binnendringen. Door de enzymatische reactie wordt ortho-nitro-phenol (ONP) afgesplitst van het galactoside. Het gevormde ONP kleurt de oplossing geel. De snelheid van geelkleuring is afhankelijk van de hoeveelheid aanwezig enzym (=β-galactosidase) en van de temperatuur. De enzymreactie wordt gestopt door het toevoegen van Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Hierdoor stijgt de pH tot pH=> 9 en is het enzym β-galactosidase niet meer werkzaam.

### **PRACTICUMOPDRACHT DAG 1**

#### **Aanenten (per paar, 20 min.)**

Je hebt in een vorig experiment *E.coli* geïsoleerd uit grachtwater. Hiervan ga je bepalen of deze het enzym β-galactosidase produceert. Vandaag ga je een voorkweek inzetten. Je gebruikt vloeibaar synthetisch medium met glycerol als C-bron. Glycerol wordt als C-bron gebruikt om geen last te hebben van **kataboliet-repressie**. Als inducer wordt IPTG gebruikt.

Ieder paar maakt twee voorkweekjes. Eén voorkweekje wordt opgegroeid in een buis met 2 ml medium zonder inducer IPTG (blauwe streep) en één in 2 ml medium met de inducer IPTG (rode streep).

Maak deze voorkweekjes vanuit de heilige buis of endo-agarplaat van *E.coli*. Suspendeer daarvoor eerst een klein oogje bacteriën in een steriel 1,5 ml epje met 1 ml fysiologisch zout, vortex deze buis. De suspensie moet licht troebel zijn. Ent vervolgens 0,1 ml van deze suspensie in beide buizen. Zet de buizen in de klaarstaande rekjes. De assistent zorgt voor overnacht incubatie bij 37°C in een shaker.



## **PRACTICUMOPDRACHTEN DAG 2**

### **Bepaling van de inductie van $\beta$ -galactosidase**

Vandaag ga je kijken naar de synthese van  $\beta$ -galactosidase van de door jou geïsoleerde *E.coli* uit grachtwater en van een aantal *E.coli* stammen waarvan enkele een of meerdere mutaties in het *lac*-operon hebben. De volgende stammen worden getest:

- *E.coli* wt: wild type stam, normaal induceerbaar
- een *lacZ* mutant: deze mutant is niet in staat om  $\beta$ -galactosidase te maken
- een *lacI* mutant: deze mutant maakt geen repressoreiwit waardoor de synthese van  $\beta$ -galactosidase constitutief is, dus onafhankelijk van de aanwezigheid van de inducer(allolactose/IPTG)
- **een dubbel mutant:** deze mutant heeft een mutatie in de promotor van het *lac*-operon, waardoor er een verlaagde transcriptie van het operon plaats vindt en **een door jullie nader aan te duiden mutatie**

De bovengenoemde stammen zijn (door de assistenten) gekweekt (overnacht) in SM met glycerol als C-bron, zowel met als zonder IPTG.

De 4 stammen worden uitgedeeld als experiment **1, 2, 3 en 4**. Onbekend is welk nummer welke mutant vertegenwoordigt. De door jou zelf opgekweekte *E.coli* is experiment **5**.

**a-serie is zonder IPTG (met blauwe streep)**

**b-serie is met IPTG (met rode streep)**

De volgende materialen staan klaar (na gebruik de materialen direct terugzetten):

- 1 serumflesje fosfaatbuffer (P-buffer 10 mM, pH 7.0)
- 1 epje met SDS 0,1%
- 1 buis met chloroform
- 1 serumflesje ONPG ( $2,5 \times 10^{-3}$  M in 10 mM fosfaatbuffer)
- 1 serumflesje met  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,4 M)

**N.B.** Wees voorzichtig bij het pipetteren van SDS, chloroform en ONPG. Gebruik een pasteurpipet en een grijs piepje of een geschikte Pipetman!

Alle oplossingen met ONPG moeten worden afgevoerd in het **afvalvat** met de **zwarte band** (staat in de zuurkast).

### **Opdracht: (per paar, 75 min.)**

- Verzamel de voorkweken voor experiment 1 – 4 (van elk een buis met rode en blauwe streep). Nummer de buizen goed.
- Meng je **eigen** voorkweekjes goed! (= experiment nr 5a en 5b)  
Vergelijk de mate van groei met de andere kweekjes van exp. 1-4.  
Verdun je eigen kweekjes zonedig met P-buffer tot de troebelheid ongeveer gelijk is aan die van de andere kweekjes ( $\text{OD}_{660} = 0,3$ )  
Pipetteer dan van deze voorkweekjes 0,5 ml in een cultuurbuis.

### **Verdun alle cultures 1:1 met P-buffer.**

- Voeg nu aan alle buizen 2 druppels SDS en 2 druppels chloroform toe met behulp van een pasteurpipet met ballon of gebruik een Pipetman (1 druppel = 40  $\mu\text{l}$ )  
Incubeer de buizen 10 minuten op tafel bij ongeveer 37°C (tussen de naar elkaar

toe gebogen bureaulampjes of in de 37°C stoof). Schud de buizen om de paar minuten.

- Voeg aan alle buizen 2 ml ONPG en schud de buizen.
- Controleer geregeld of er al geelkleuring optreedt. Noteer de volgorde waarin de geelkleuring optreedt. Als er in enkele (3 of 4) buisjes geelkleuring opgetreden is, wordt aan alle buizen 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> toegevoegd om de reactie te stoppen. De reactietijd in alle buizen is dan ongeveer gelijk.

(Als de concentratie bacteriën van je zelfgekweekte *E.coli* in buis 5 erg afwijkend is bv. veel lager dan OD<sub>660</sub> = 0,3 overleg dan met je assistent over de incubatietijd).

- Noteer de geconstateerde kleurverschillen uitgedrukt in procenten in een **tabel**.

### UITWERKING: (per paar, 30 min.)

De resultaten van de proef kan je direct uitwerken:

- Welke *E.coli* mutant wordt door welk nummer vertegenwoordigd? Geef uitleg.
- Is de zelf opgehoopte *E.coli* in staat lactose als C-bron te gebruiken? Geef uitleg.
- Waarom gebruik je in dit experiment glycerol als C-bron?
- Wat is de C-bron voor *E.coli* in de darm en waarom levert deze bacterie zoveel nut op voor de gastheer? Geef een reactie vergelijking.
- Teken het *lac*-operon.
- Geef 3 opties aan waarom β-galactosidase niet geproduceerd zou kunnen worden
  - op het gebied van katabolietrepressie en geef uitleg
  - op het gebied van DNA mutatie en geef uitleg
  - op het gebied van repressie/derepressie en geef uitleg

# DE WERKING VAN PENICILLINE

## VOORBEREIDING

- Campbell H. 27 blz. 603-604 en H. 31 blz. 697 en je college-aantekeningen.
- Lees onderstaande inleiding en experiment goed door.

In 1929 nam Alexander Fleming waar dat de schimmel *Penicillium notatum* de groei van *Staphylococci* remde. De stof die hiervoor verantwoordelijk was, werd **penicilline** genoemd. Sindsdien zijn vele antibiotica geïsoleerd. Dit zijn stofwisselingsproducten van micro-organismen die, ook in sterke verdunning, andere organismen doden (-cide) of in hun groei remmen (-statisch).

Penicilline is een antibioticum dat bepaalde stappen in de opbouw van het peptidoglycaan(mucopeptide)-complex remt. Nieuwe dwarsverbindingen tussen peptideketens worden bij de vorming van peptidoglycaan als onderdeel van de celwand van bacteriën niet meer gevormd. Waardoor bij celwandgroei deze sterk verzwakt wordt.

De opbouw van de celwand bij Gram-positieve bacteriën en bij Gram-negatieve bacteriën is fundamenteel verschillend.

Gram-positieve bacteriën hebben een celenvolpde die bestaat uit een plasmamembraan met aan de buitenzijde vele (tot wel 50) lagen peptidoglycaan. Gram-negatieve bacteriën hebben aan de buitenzijde van de plasmamembraan slechts één of enkele lagen peptidoglycaan. Hieromheen zit weer een laag van lipopolysacchariden en proteïnen met een vergelijkbare structuur als die van de plasmamembraan. Deze laag beschermt de bacterie tegen de werking van penicilline. **Belangrijk** is dat alleen goed groeiende bacteriën door penicilline kunnen worden aangepakt. Bij actief delende cellen vindt celwandsynthese plaats. In een hypotonische voedingsoplossing zullen groeiende gevoelige bacteriën in de aanwezigheid van penicilline na enige tijd openbarsten door de hoge osmotische druk van het cytosol en de slechte structuur van de celwand. In een iso- of hypertotonische voedingsoplossing worden er in aanwezigheid van penicilline zgn. sferoplasten gevormd, bolle bacterievormen met celwandresten op de protoplast. Sommige bacteriën maken het enzym penicillinase ( $\beta$ -lactamase) en zijn daardoor ongevoelig voor penicilline.

Tijdens dit practicum gaan we van een aantal bacteriestammen bepalen of ze gevoelig zijn voor penicilline.

## **PRACTICUMOPDRACHT DAG 1**

### **Opdracht 1: (per paar, 60 min.)**

- a. Pak twee gereedliggende bouillonagarplaten van de hoge tafel.
- b. Neem 3 steriele buizen van de hoge tafel en pipetteer hierin ongeveer 0,5 ml steriel fysiologisch zout.  
Maak hierin suspensies van de volgende bacteriën (de suspensie moet licht troebel zijn en ten minste  $10^7$  bacteriën per ml bevatten):
  1. heilige buis van de Gram<sup>+</sup> coccen (van de Vingerflora).
  2. heilige buis van *E.coli* (van de Ophopingen).
  3. heilige buis van sporenvormende bacteriën (van Steriel werken).
  4. een suspensie van een veel op het laboratorium gebruikte *E.coli*- stam (staat klaar).
- c. Verdeel de platen in twee helften en pipetteer op iedere helft een klein druppeltje van één van de suspensies. Spatel deze met de Drychalski spatel gelijkmatig over de halve plaat.
- d. Laat de suspensie in de agar trekken totdat het oppervlak van de agar droog is.
- e. Petrischalen met kleine ponspapiertjes staan klaar. Iedere stam wordt nu als volgt getest voor 2 penicillineconcentraties (respectievelijk 10 mg/ml= blauwe kleurcode en 1 mg/ml=rode kleurcode). Dompel het ponsje met een (steriele metalen) pincet in de penicilline-oplossing en tik daarna de overtollige vloeistof eraf. Leg dit ponsje op de platen op de bacteriesuspensie. Per helft moeten er dus twee ponsjes worden neergelegd: één links en één rechts, vooral niet te dicht bij elkaar.
- f. Incubeer de platen (omgekeerd) bij 30°C.

## **PRACTICUMOPDRACHT DAG 2**

### **Opdracht 2: (per paar, 20 min.)**

Bekijk de groei van de opgebrachte bacteriesuspensies.

### **Beantwoord de volgende vragen:**

- a. Welke bacteriën groeien in de aanwezigheid van penicilline en welke niet? Geef de resultaten weer in tabelvorm.
- b. Geef aan of bouillonagar een hypo- iso- of hypertonische voedingsbodem is. Verklaar je antwoord.
- c. Zijn Gram<sup>+</sup> of Gram<sup>-</sup> bacteriën gevoeliger voor penicilline. Leg uit waarom?
- d. Hoe verklaar je de resultaten met de laboratorium-*E.coli* stam.