

# Wie heeft er sikkelcelanemie?

leerlingenhandleiding.

Jouw naam	
Naam familielid	
Nummer familielid	



## 1. De familie Schmidt

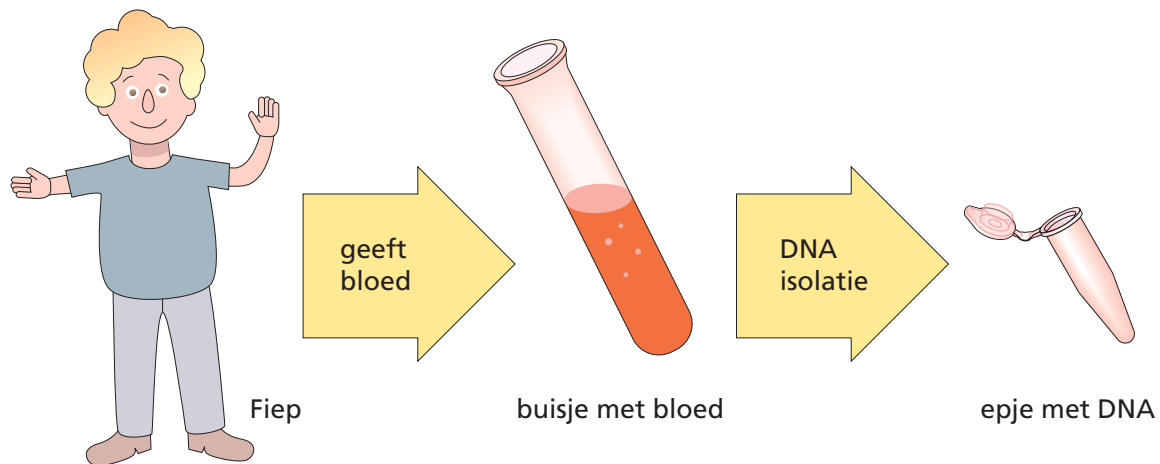
In de familie Schmidt komt sikkelcelanemie voor. Van de 24 familieleden die onderzocht worden lijden er 6 aan deze ziekte. Sikkelcelanemie is niet dodelijk, maar brengt wel een hoop narigheid met zich mee. Bij mensen die lijden aan sikkelcelanemie kunnen de rode bloedcellen een sikkelachtige vorm krijgen in plaats van rond en plat. Deze cellen kunnen dan geen zuurstof meer vervoeren door het lichaam. Als de rode bloedcellen deze sikkelachtige vorm krijgen kunnen heel uiteenlopende klachten ontstaan, zoals pijn, koorts, of een hartaanval. Deze ziekte kan zelfs uitlopen op verlamming, hersenbeschadiging of reuma.

Sikkelcelanemie is een erfelijke ziekte. Een mutatie in een gen zorgt ervoor dat het eiwit hemo-

globine kapot is en gemakkelijk neerslaat in de rode bloedcellen. Deze worden dan sikkelvormig met alle gevolgen van dien.

Zoals als gezegd zijn er dus 6 zieke familieleden. De vraag die we met deze proef gaan beantwoorden is: welke personen van de familie Schmidt zijn drager van sikkelcelanemie en kunnen de ziekte mogelijk doorgeven aan hun kinderen?

Om deze vraag te kunnen beantwoorden hebben alle 24 leden van de familie Schmidt bloed afgeestaan. Uit het bloed is het DNA geïsoleerd. Door bij alle familieleden de allelen voor hemoglobine te onderzoeken en te vergelijken kan bepaald worden wie in de familie drager is voor sikkelcelanemie.



*Schema van de verschillende stappen die vooraf zijn gegaan aan de proef die jij nu gaat doen.*

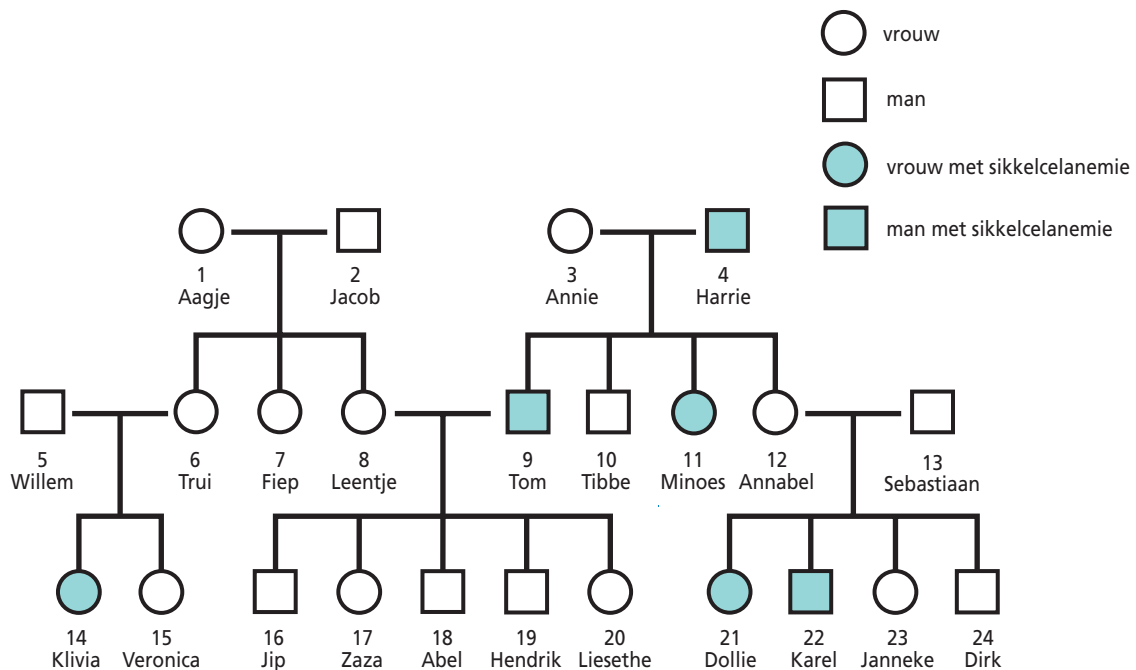
## De proef in het kort

Je werkt bij deze proef samen in een groep. Iedere groep krijgt een aantal epjes met DNA (een epje is een ander woord voor kleine afsluitbare plastic buisjes genoemd naar het bedrijf dat ze maakt: "Eppendorf"). In ieder epje zit DNA van één persoon uit de familie. Jullie gaan bepalen welke allelen van sikkelcelanemie aanwezig zijn bij de verschillende familieleden.

Je gaat tijdens de proef het DNA van de familieleden in stukken knippen. Daarna ga je de ontstane DNA-fragmenten van de familieleden met elkaar vergelijken.

Dit doe je met een techniek die DNA-gelelektroforese wordt genoemd. Uit die vergelijkingen kun je vervolgens bepalen welke allelen de door jullie onderzochte familieleden bezitten voor sikkelcelanemie.

Wanneer alle resultaten van alle groepen in de klas bij elkaar worden genomen kan de stamboom van de familie worden bekeken en kan de manier van overerven van sikkelcelanemie worden bepaald. De stamboom zal een geheim onthullen dat één van de familieleden liever niet in de openbaarheid brengt.



*Stamboom van de familie Schmidt. Vrouwen worden weergegeven door rondjes, mannen door vierkantjes. De grijze rondjes en vierkantjes stellen mensen voor die de ziekte hebben.*

## Vragen

- Hoeveel kinderen hebben Leentje en Tom?
- Wat zijn Trui en Tibbe van elkaar?
- Wat is Abel van Jacob in de stamboom?
- De mensen uit de familie hebben allemaal een beetje bloed afgeestaan waaruit hun DNA geïsoleerd is. Had men hiervoor ook wangslimvliescellen kunnen gebruiken? Leg je antwoord uit.
- Van het gen voor sikkelcelanemie bestaan twee allelen: A (het gangbare allel) en a (het afwijkende allel). Wat zijn de mogelijke uitkomsten uit de test van jouw DNA-monster?

## Oefenen met de micro-injectiespuit

Je werkt tijdens het experiment met een micro-injectiespuit, waarop puntjes passen, om 2 of 10  $\mu\text{l}$  op te zuigen (zie figuur 1). Met behulp van de micro-injectiespuit kunnen kleine hoeveelheden vloeistof heel nauwkeurig worden toegevoegd aan reactiemengsels. Voordat je gaat werken met de micro-injectiespuit en de plastic puntjes die erop passen, moet je het volgende in de gaten houden:

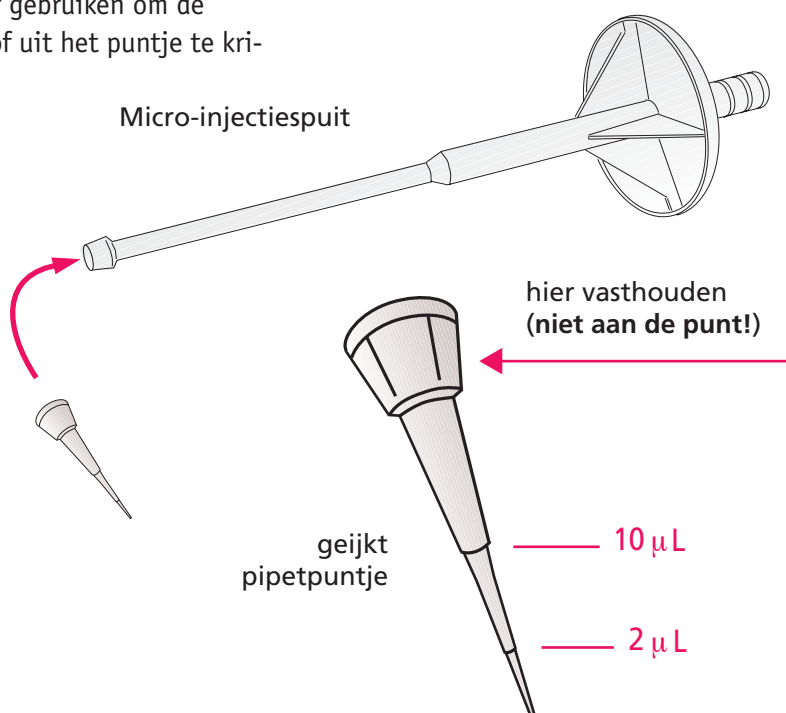
- A Bij iedere nieuwe actie met de micro-injectiespuit gebruik je een schoon puntje. Zo voorkom je besmetting van je epjes met DNA uit andere epjes.
- B De puntjes hou je vast aan het brede stuk, niet aan de punt.
- C Raak **NOOIT** het uiteinde van de micro-injectiespuit aan met blote vingers. Je kunt daarmee de reacties vervuilen
- D Trek **NOOIT** de zuiger helemaal uit de micro-injectiespuit. Hiermee kun je de spuit onherstelbaar beschadigen.
- E Trek de zuiger een heel klein stukje omhoog voordat je vloeistof opzuigt met de micro-injectiespuit. Het kleine beetje lucht dat je nu opzuigt, kun je later gebruiken om de laatste druppel vloeistof uit het puntje te krijgen.

- F Houd, bij het toevoegen van vloeistof, de injectiespuit zo verticaal mogelijk en op ooghoogte. Zo kun je goed zien wat je aan het doen bent.
- G De laatste druppel blijft vaak aan het puntje zitten. Om die ook in het epje te krijgen, kun je heel voorzichtig met het uiteinde van het puntje de binnenkant van het epje aanraken, dan blijft de vloeistof daarop achter.
- H De gebruikte puntjes gooi je weg in een afval-bekerglas.

Als je de bovenstaande voorzorgsmaatregelen hebt gelezen, kun je oefenen met de micro-injectiespuit.

### DOEN

1. Pipetteer 2  $\mu\text{l}$  gekleurd water in een leeg roze epje.
2. Doe hetzelfde voor 10  $\mu\text{l}$ .
3. Laat de anderen uit je groepje ook oefenen met 2 en 10  $\mu\text{l}$ . Je kunt hiervoor steeds hetzelfde puntje en epje gebruiken. Je gevulde epje gooi je telkens weer leeg in het beker-glas.



Figuur 1.

## 2. Knippen van het DNA

Van alle familieleden is het gen voor hemoglobine geïsoleerd. Zoals je weet bestaan van dit gen twee allelen. Deze allelen verschillen maar weinig, maar wel op een heel belangrijk punt. Allel A levert een goed werkend eiwit: hemoglobine. Allel a levert een niet-goed werkend eiwit: veroorzaakt sikkelcelanemie.

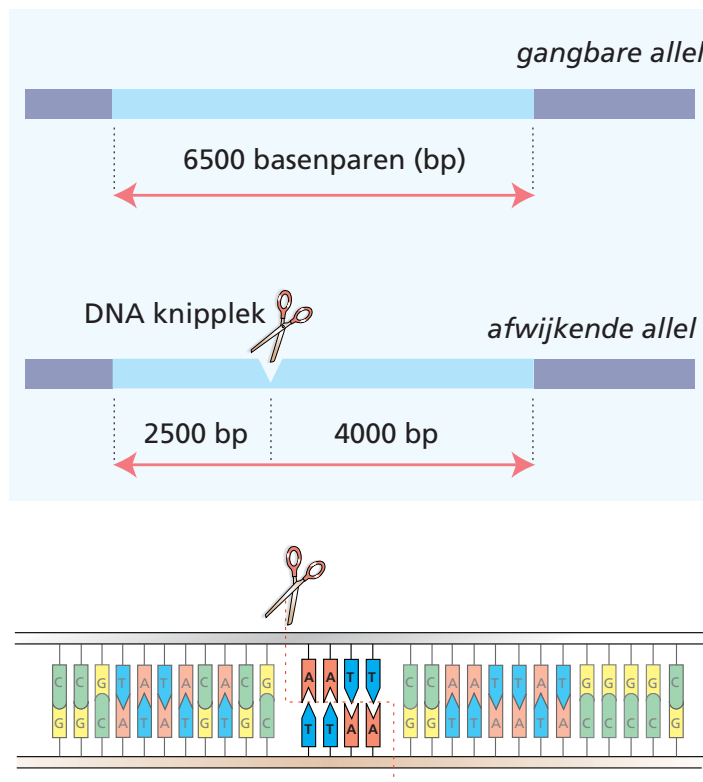
De twee allelen hebben een verschillende DNA-volgorde. Dit verschil maakt dat we ze kunnen vergelijken. We hoeven niet de hele volgorde van de nucleotiden te bepalen; dat zou teveel tijd kosten. Het verschil in DNA-volgorde kan op een andere manier worden geanalyseerd. In de natuur komen enzymen voor die DNA kunnen knippen. Deze zogenaamde restrictie-enzymen knippen het DNA op vaste plekken. Zo'n chemische knipreactie wordt een digestie genoemd. Bij het gen dat

sikkelcelanemie veroorzaakt is de DNA-volgorde zo veranderd dat een restrictie-enzym wel kan knippen in het afwijkende allel (a), maar niet in het gangbare (A). Dit maakt het mogelijk om de allelen te onderscheiden (zie figuur 2).

### Vragen

Gebruik bij vraag 6 en 7 figuur 2.

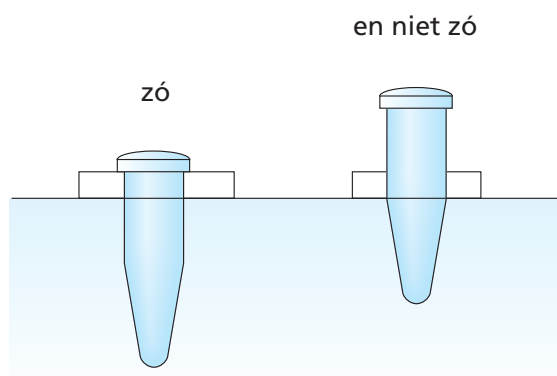
6. Hoe lang is het DNA-fragment of zijn de DNA-fragmenten die je krijgt als je allel a knipt?
7. Hoe lang is het DNA-fragment of zijn de DNA-fragmenten die je krijgt als je allel A knipt?
8. Iemand is heterozygoot (genotype Aa) voor het gen. Hoeveel DNA -fragmenten van verschillende lengte krijg je na knippen met een restrictie-enzym?



Figuur 2. De twee allelen van het gen voor hemoglobine. Het bovenste is het 'gangbare' allel. Het onderste is afwijkend. Het onderste plaatje laat precies zien op welke plek het DNA geknipt wordt; namelijk tussen de G en de A van de basenvolgorde G A T T C.

## DOEN

1. Neem één van de roze epjes met het DNA van een familielid. Noteer naam en nummer van het familielid op de voorkant van deze handleiding
2. Schrijf het nummer van het familielid op een blauw epje met restrictie-enzym.
3. Zet een schoon puntje aan de micro-injectiespuit
4. Voeg 20 µl van de DNA oplossing toe aan het epje met restrictie-enzym (dit doe je door twee keer 10 µl te pipetteren)
5. Roer met het puntje een beetje in het mengsel zodat het DNA en het restrictie-enzym goed mengen.
6. Sluit het epje met het DNA en het restrictie-enzym goed af met een dekseltje.
7. Meng de vloeistof in het epje goed door elkaar (schudden, tikken) en tik het dan af (niet te wild) tegen de tafel zodat alle vloeistof op de bodem van het epje ligt.
8. Herhaal stap 1 tot en met 7 voor andere familieleden. Let op dat je steeds een schoon puntje gebruikt.
9. Markeer een drijvertje met je naam, zet je epjes erin en leg het in het 37°C-waterbad. Noteer de tijd.
10. Haal na 30 minuten de epjes weer uit het waterbad.



Figuur 4: De epjes moeten in het warme water hangen, let daarom op dat ze helemaal door het drijvertje heen gaan.



Figuur 3: Zo wordt het DNA en restrictie-enzym gemengd

### 3. Analyseren van de DNA-fragmenten

Het DNA-monster dat je aan het begin van de les hebt gekregen heb je nu behandeld met een restrictie-enzym. Je hebt als het goed is al nagedacht over de verschillende uitkomsten van deze knipreacties. Aan het aantal fragmenten kan je bepalen of het familielid homozygoot is voor het gangbare allel (genotype AA), homozygoot voor het afwijkende allel (genotype aa) of heterozygoot (genotype Aa).

De lengte van de DNA-fragmenten wordt bepaald met een techniek die DNA-gelelektroforese heet.

#### Gelelektroforese

DNA-elektroforese is een techniek die is gebaseerd op de elektrische lading van DNA en de eigenschappen van de agarosegel. Agarose is zuivere agar, een stof die uit zeewier wordt gewonnen en in Japan als ingrediënt van voedsel wordt gebruikt. De structuur van de agarosegel zorgt ervoor dat grote DNA fragmenten langzamer door de gel kunnen bewegen dan kleinere fragmenten. Hierdoor kun je uiteindelijk de grotere fragmenten van de kleinere onderscheiden. DNA is negatief elektrisch geladen. Breng je nu een spanningsverschil aan tussen beide zijden

van de gel, en zorg je dat het DNA in de gel zit, dan zorgen de negatief geladen fosfaatgroepen ervoor dat het DNA richting de positieve pool loopt.

Om te voorkomen dat het DNA bij de positieve pool van de gel afloopt wordt een gekleurde 'laadvloeistof' aan de monsters toegevoegd die sneller dan het DNA naar de positieve pool beweegt. Zolang je deze laadvloeistof nog op de gel ziet, is je DNA ook nog in de gel aanwezig.

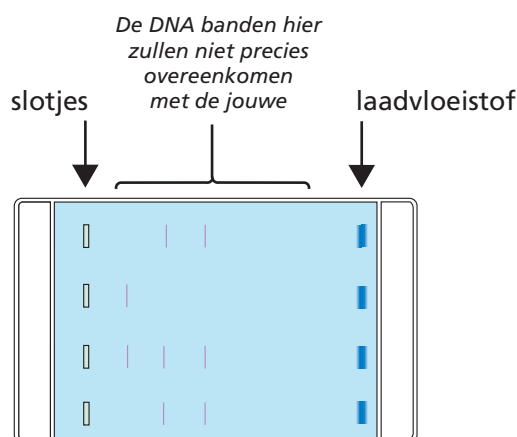
#### Vragen

9. Op bladzijde 15 staat een bijna leeg schema met de koppen van de verschillende onderdelen van de proef.

Maak het schema onder de eerste kop ('Knippen van het DNA') af.

10. Bekijk het schema van de elektroforesegel met DNA-fragmenten (figuur 5).

Geef aan waar de + en de - pool van de spanningsbron aangesloten zijn geweest. Geef aan wat het grootste en wat het kleinste DNA-fragment is op deze gel.

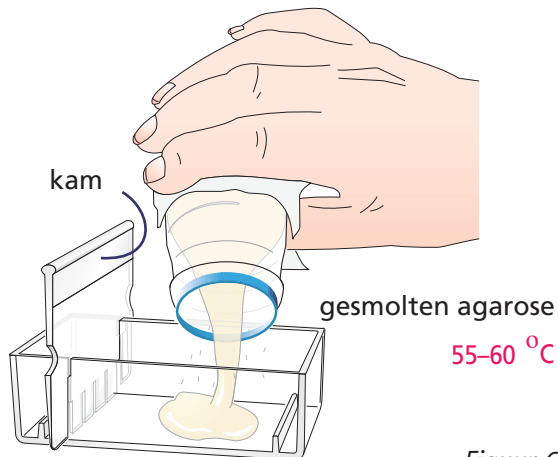


Figuur 5: schematische weergave van een elektroforesegel



### 3a. Voorbereiden elektroforese

**LET OP:** in stap 1 tot en met 3 wordt door één groep in één keer genoeg materiaal gemaakt voor alle groepen. Vraag je docent welke groep deze stappen uit gaat voeren.



Figuur 6

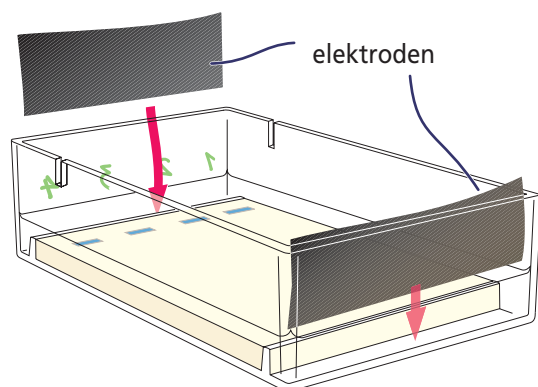
#### DOEN

1. Weeg 0,8 gram agarose af in de erlenmeyer.
2. Vul de erlenmeyer aan met elektroforesebuffer tot 100 ml.
3. Verwarm het mengsel. Schud de erlenmeyer met een ovenwant af en toe heen en weer tot alle agarose is opgelost. Verwarm je het mengsel in een magnetron, wees dan zeer voorzichtig met het schudden van de erlenmeyer: bij te wild schudden kan de kokend hete vloeistof ineens uit de erlenmeyer spuiten.  
**LET OP:** er mogen echt geen klontjes meer in de oplossing zitten. Alle agarose moet opgelost zijn.
4. Zet het elektroforesebakje op een horizontaal oppervlak (bij de spanningsbron voor de elektroforese), waar het ongestoord kan staan.
5. Plaats de gelkam in het bakje. Als je straks de kam verwijdert, heb je mooie kuiltjes ("slotjes") in je gel waar je het geknipte DNA in gaat pipetteren.
6. Laat de erlenmeyer onder af en toe schudden

afkoelen tot handwarm en giet 10-12 ml in het elektroforesebakje, zodat het middengedeelte van het bakje volloopt en de agarose-oplossing onder en tussen de tanden van de gelkam loopt ( figuur 6).

**LET OP:** zorg dat er geen gel aan de beide uiteinden van het middengedeelte over de rand stroomt!

7. Laat het geheel afkoelen zodat de agarose stolt tot een gel. Dit duurt ongeveer 15-20 minuten. Een gestolde gel is troebel. Zet het elektroforesebakje daarna op het zwarte vel papier. Dit vergemakkelijkt later de handelingen.
8. Schenk iets meer dan 10 ml van de elektroforesebuffer op de gel. De vloeistof moet slechts enkele millimeters boven de gel staan.
9. Til voorzichtig de kam verticaal uit de gel. Als je dit schuin of te ruw doet kan de gel scheuren.
10. Knip twee stroken elektrodemateriaal (koolstofvezel) van 42 bij 22 mm.
11. Plaats de stroken aan beide zijden tegen de rand in het elektroforesebakje (zie figuur 7). Gebruik eventueel handschoenen. Deze stroken geleiden de stroom als er een spanningsverschil over de gel wordt gezet.

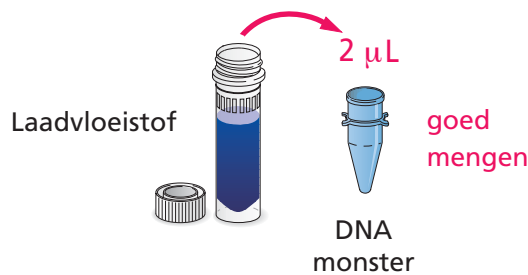


Figuur 7

### 3b. Uitvoeren elektroforese

#### DOEN

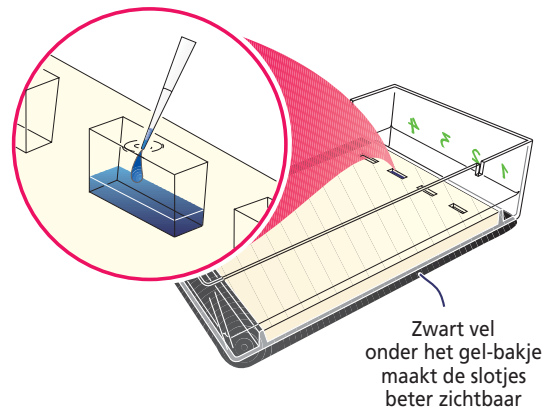
1. Voeg aan alle epjes met geknipt DNA 2  $\mu\text{L}$  laadvloeistof toe. Gebruik telkens een schoon puntje.
2. Meng goed (schudden, tikken) en tik het mengsel daarna terug naar de bodem van het epje



Figuur 8: Je pipetteert 2  $\mu\text{L}$  laadvloeistof in het epje met geknipt DNA

3. Plak kleine etiketjes op het elektroforesebakje en schrijf daarop welk DNA-monster je in welk slotje gaat doen.
4. Neem een blauw epje met het DNA-monster en de laadvloeistof.
5. Zet een schoon puntje aan de micro-injectiespuit.
6. Zuig de inhoud van het epje op en spuit het heel voorzichtig in een slotje. Houd het uiteinde van het puntje hierbij onder de vloeistof, maar boven het slotje.

**LET OP: steek het puntje niet te diep in het slotje want dan kan je de gel lek prikken!**



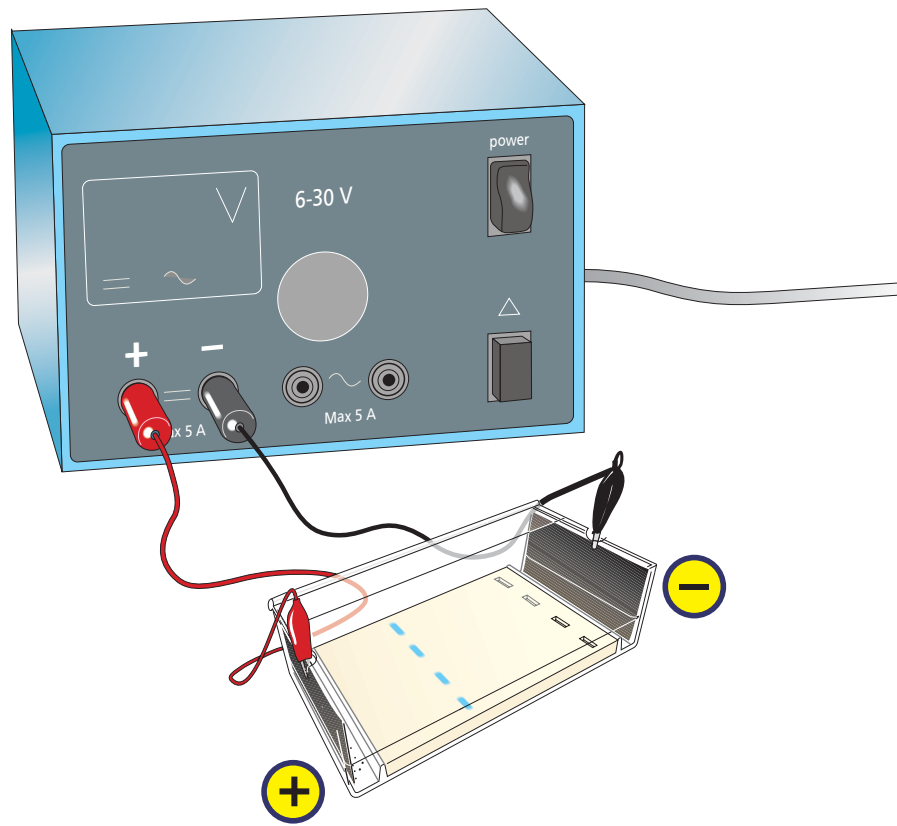
Figuur 9: Een slotje is een "kuiltje" in de gel waarin je het DNA gaat pipetteren

7. Doe dit voor al je DNA-monsters. Gebruik telkens een schoon puntje.
8. Bevestig met de rode krokodillenklem de pluspool van je spanningsbron met het elektrodemateriaal aan de 'onderkant' van de gel - de kant die het verst van de slotjes zit.
9. Bevestig met de zwarte krokodillenklem de minpool van je spanningsbron aan het elektrodemateriaal aan de bovenkant van de gel - de kant die het dichtst bij de slotjes zit.

**LET OP: als de plus en de min omgedraaid zitten dan kan het DNA de verkeerde kant oplopen!**

Het geknipte DNA wordt nu gescheiden op grootte. Als er spanning over de gel staat, zal het negatief geladen DNA zich naar de positieve pool bewegen.

Figuur 10



Zo moet de gel-elektroforese opstelling eruit zien.

### DOEN

**11.** Verbreek de stroomkring als de laadvloeistof het einde van de gel heeft bereikt.

### Vragen

**11.** Pak het handelingenschema op bladzijde 15 er weer bij. Vul nu de handelingen bij het tweede en derde kopje in. Let op de volgorde!

## 4. Kleuring

DNA heeft geen kleur, dus op je gel kun je niet zien waar het DNA is. Daarom wordt (nadat de spanning van de gel is gehaald) het DNA gekleurd met een kleurstof zodat de fragmenten zichtbaar worden. Deze kleurstof hecht aan het DNA (en een beetje aan de gel). Na de kleuring worden de DNA stukjes diep paars/roze en de gel blauw. Na de kleuring kunnen de fragmenten met elkaar worden vergeleken.

### DOEN

1. Verwijder het elektrodemateriaal en gooi het weg.
2. Giet de elektroforesebuffer in een daarvoor bestemd afvalbekerglas. Let op dat de gel niet los komt en uit het bakje valt.
3. Doe handschoenen aan zodat bij de volgende stappen de kleurstof niet in contact komt met je huid.
4. Giet ongeveer 10 ml van de blauwe kleuroplossing op de gel en zorg dat de oplossing zich gelijkmatig over de gel verspreidt.
5. Laat het geheel 4 minuten staan.
6. Giet de kleuroplossing terug in een daarvoor bestemd afvalbekerglas. Let weer op dat de gel niet uit het bakje valt.
7. Giet een beetje water op de gel en laat het 5 seconden intrekken.
8. Giet het water daarna door de gootsteen of in een afvalbakje.
9. Herhaal stap 7 en 8 nog een keer
10. De kleuroplossing zal geleidelijk in de gel trekken en het DNA kleuren. Na 10 minuten worden de eerste vage bandjes zichtbaar. De gel wordt het mooist als je hem een nacht laat staan. Verpak de gel in een plastic zakje of huishoudfolie; zo voorkom je dat hij uitdroogt.
11. Na een half uur zijn de gekleurde DNA-fragmenten zichtbaar. Terwijl je wacht kun je vast verder met vraag 12 op de volgende bladzijde.

## 5. Analyse van de resultaten

### DOEN

1. Leg de gekleurde gel op een wit vel papier en bekijk de resultaten van je arbeid.
2. Analyseer de resultaten aan de hand van de onderstaande vragen.

### Vragen

12. Op bladzijde 15 staat het deels ingevulde schema waar je al eerder de verschillende delen van de proef op volgorde had gezet. Maak het schema af.
13. Teken de gel met de gekleurde DNA-fragmenten over en geef het grootste en kleinste fragment aan. Teken ook waar de + pool en - pool waren aangesloten en welke richting het DNA heeft gelopen.
14. Wat is het genotype van de familieleden waarvan je de DNA-monsters hebt geanalyseerd?
15. Wissel de gegevens over de genotypen van de andere familieleden uit met andere groepjes (door het schema en de stamboom op het bord in te vullen). Vul deze gegevens in, in de grote stamboom op de volgende pagina. Maak daarbij genotype aa zwart, Aa grijs en laat AA wit.
16. Kan het gen dat sikkelcelanemie veroorzaakt op een van de geslachtschromosomen liggen? Leg je antwoord uit.

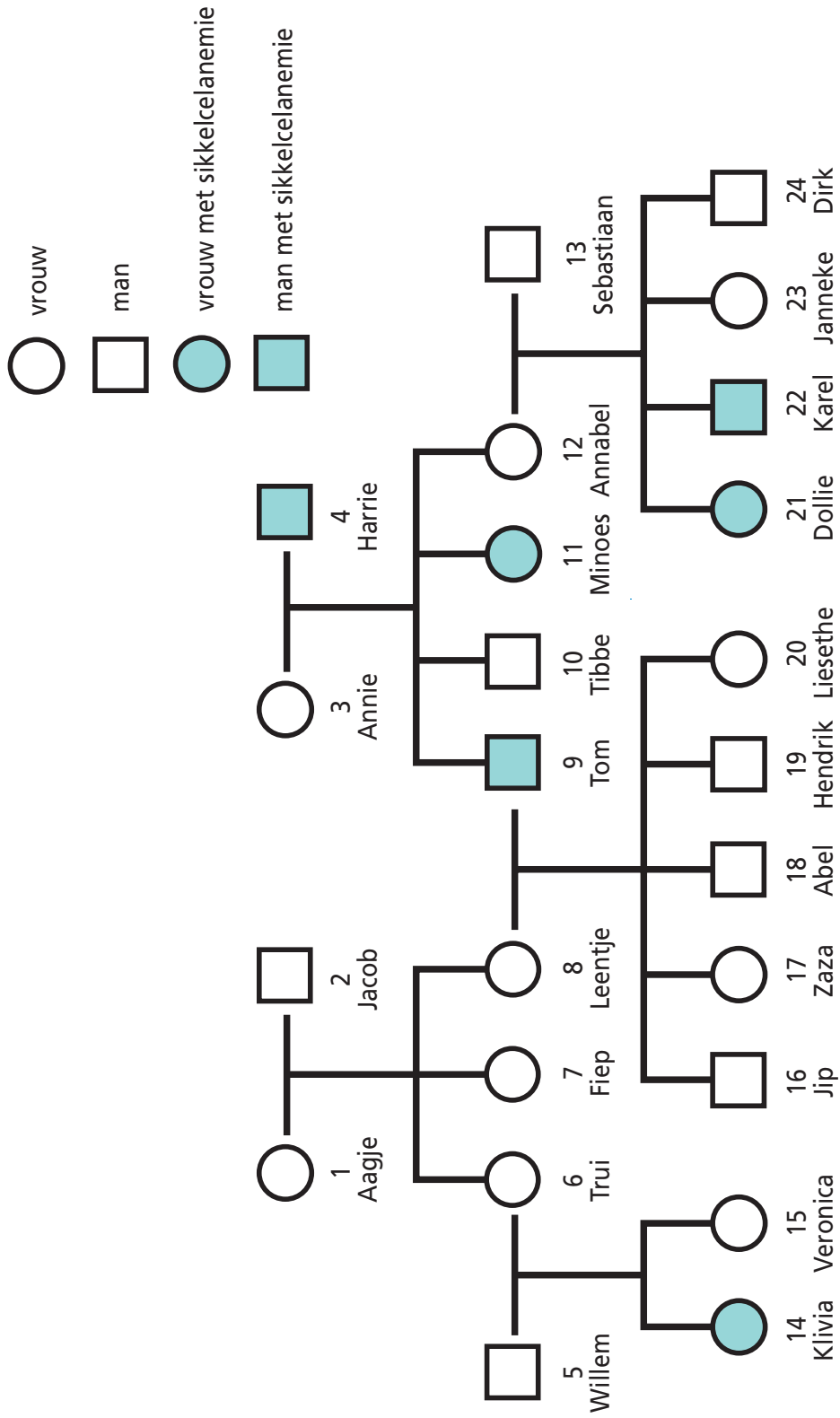
17. Kun je in de stamboom onmogelijke resultaten vinden? Zo ja, wat kan hiervoor een verklaring zijn.
18. Twee gezonde individuen (geen sikkelcelanemie) kunnen een kind krijgen met sikkelcelanemie. Komt dat voor in de stamboom? Bij wie?

Iemand die het genotype Aa heeft wordt drager genoemd. Hij of zij is zelf niet ziek, maar draagt wel het allel voor sikkelcelanemie. Hij of zij kan dat allel doorgeven aan zijn of haar kinderen.

### Vragen

19. Kan iemand die sikkelcelanemie heeft kinderen krijgen die geen drager zijn? Leg je antwoord uit.
20. Annabel en Sebastiaan zijn allebei drager voor sikkelcelanemie. Hoe groot is de kans dat ze een gezond kind krijgen dat geen drager is? Leg je antwoord uit.
21. Alle kinderen van Leentje en Tom hebben hetzelfde genotype. Is dat toevallig? Leg je antwoord uit.

# Lege stamboom



## **Knippen van het DNA**

Oefenen micro-injectiespuit, DNA en restrictie-enzym bij elkaar voegen, .....

## **Vorbereiden elektroforese**

....

## **Uitvoeren elektroforese**

....

## **Kleuring**

....

## **Analyse van de resultaten**

....

