PRACTICUM GENETISCHE TRANSFORMATIE

In deze les(sen) ga je een procedure uitvoeren die gekend is als ***genetische transformatie***. Ter herinnering: een gen is een stukje DNA dat de instructie (de codes) bevat voor het maken van een eiwit. Dat eiwit doet bij een organisme een bepaald kenmerk optreden.

DNA → RNA → eiwit → kenmerk

Genetische transformatie betekent letterlijk 'verandering veroorzaakt door genen' en houdt in dat een vreemd gen in een organisme wordt ingebracht om de kenmerken van dat organisme te wijzigen.
Genetische transformatie wordt toegepast in verschillende domeinen van de biotechnologie. In de landbouw kunnen bij planten genen worden getransformeerd om eigenschappen te verkrijgen als weerstand tegen vorst, rotting of bederf. Bacteriën kunnen genetisch gewijzigd worden waardoor ze bv. (gemorste) olie kunnen verteren. In de geneeskunde kunnen afwijkingen, veroorzaakt door defecte genen, behandeld worden door gentherapie. Hierbij worden cellen van een zieke persoon genetisch gewijzigd door er gezonde kopieën van het defect gen in te brengen.

Kernvragen

Er zijn veel overwegingen te maken in het proces van de planning van een lab-onderzoek. Hieronder volgen enkele van die overwegingen.

Aangezien wetenschappelijk onderzoek erop gericht is om antwoorden op vragen te formuleren, is je eerste stap... het formuleren van de vragen voor dit onderzoek.

Kan ik een organisme genetisch wijzigen? Welk organisme?

1. Om een volledig organisme genetisch te transformeren, moet het nieuwe gen in àlle cellen van dat organisme ingebracht worden. Welk organisme is beter geschikt voor zo'n genetische transformatie: (a) een organisme dat bestaat uit vele cellen of (b) een dat bestaat uit slechts één cel?

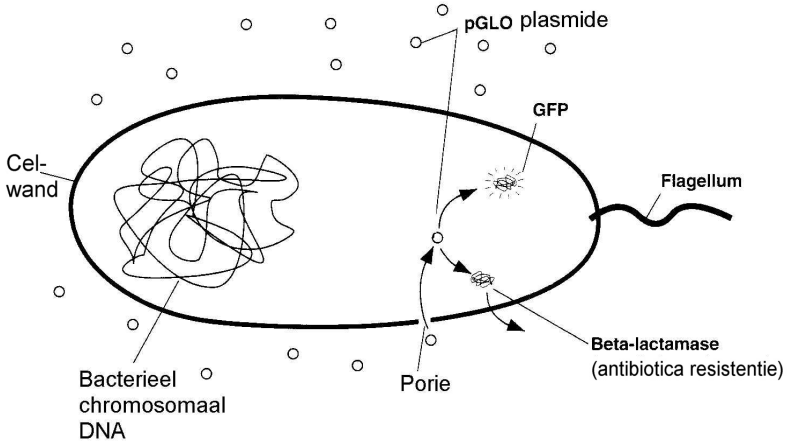
2. Wetenschappers zijn er doorgaans in geïnteresseerd om te zien of een genetisch gewijzigd organisme zijn nieuw kenmerk kan doorgeven aan zijn nageslacht. Wat zal een betere kandidaat zijn om die informatie te verkrijgen: (a) een organisme dat zich snel ontwikkelt en voortplant of (b) een dat zich traag voortplant?

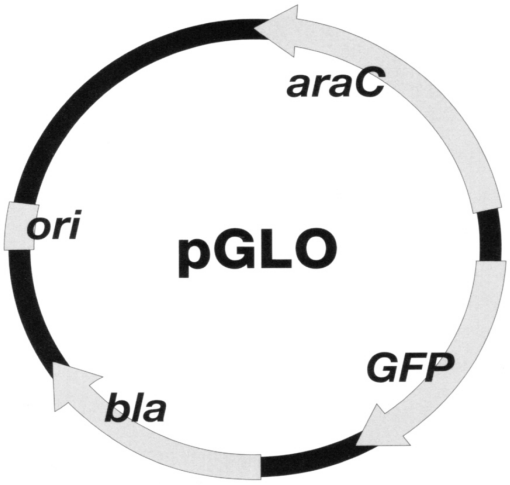
3. Veiligheid is een ander belangrijke overweging om een organisme te kiezen om mee te experimenteren. Welke kenmerken of karakteristieken moet een organisme hebben (of niet hebben) om er zeker van te zijn dat het niet schadelijk is voor jezelf of het leefmilieu?

4. Rekening houdend met bovenstaande overwegingen, welk organisme is de beste keuze voor een genetische wijziging: (a) een bacterie, (b) een regenworm, (c) een vis of (d) een muis? Verantwoord je stellingname.

De genen

Genetische wijziging veronderstelt het inbrengen van nieuw DNA in cellen. Wij gaan dat inbrengen in *E. coli*. Naast een lang chromosoom hebben bacteriën dikwijls één of meerdere kleine ringvormige stukjes DNA die ***plasmiden*** genoemd worden. Het DNA van zo'n plasmide bevat genen voor meer dan één of meerdere kenmerken die nuttig kunnen zijn om de bacterie te laten overleven. In de natuur kunnen bacteriën deze plasmiden aan elkaar doorgeven zodat ze samen de voordelen van die overlevingsgenen kunnen delen. Dit natuurlijke mechanisme maakt dat bacteriën zich kunnen aanpassen aan een nieuwe omgeving. De recent vastgestelde resistentie van bacteriën tegen antibiotica kan verklaard worden door het doorgeven van plasmiden.
Wetenschappers gebruiken een techniek die genetische manipulatie ('genetic engeneering') genoemd wordt om genen voor nieuwe kenmerken in dat plasmide te brengen.
Het genetisch gewijzigde plasmide kan gebruikt worden om bacteriën genetisch zodanig te wijzigen dat ze die nieuwe kenmerken gaan vertonen.





Het DNA van het pGLO-plasmide® waarmee je gaat werken, is op drie plaatsen gewijzigd. Het plasmide heeft (1) het **gen voor het Groen Fluorescerend Proteïne (GFP)**. De bron van dit gen is de lichtgevende kwal *Aequorea victoria*. GFP maakt dat de kwal in het donker een fluorescerende gloed heeft. Het draagt ook een (2) "marker-gen" **voor weerstand tegen het antibioticum ampicilline** (het *bla*-gen). Daarnaast bezit het plasmide een speciaal (3) **genetisch regelsysteem** (het *araC*-gen) dat kan gebruikt worden om het tot uiting komen van het fluorescerend eiwit in de gewijzigde cellen te controleren. Het gen voor GFP wordt in de gewijzigde bacteriën namelijk 'aangeschakeld' door toevoeging van de suiker arabinose aan het voedingsmedium. Het selecteren van bacteriën die het gewijzigde DNA hebben, kan dus op basis van de groei van bacteriën op een (normaal dodelijke!) antibiotica-plaat.
Genetisch gewijzigde bacteriën zullen er op een voedingsbodem zonder arabinose wit uitzien (hun normale fenotype, want het GFP-gen wordt niet 'aangeschakeld') maar ze zijn fluorescerend groen op een voedingsbodem met arabinose.

Hoe kan ik weten of een cel genetisch gewijzigd is?

Nog even stellen dat de bedoeling van een genetische transformatie is om de kenmerken (fenotype) van een organisme te wijzigen. Vooraleer een wijziging in het fenotype kan opgespoord worden, moet er een ernstig onderzoek worden gedaan naar het **natuurlijke (pre-transformatie) fenotype**. Bekijk daarom eerst de kolonies van *Escherichia coli* op je startplaten. Lijst alle observeerbare kenmerken of karakteristieken op die te beschrijven zijn.

De volgende pre-transformatie-kenmerken van *E. coli* kunnen als referentiebron dienen om na te gaan of er een genetische wijziging is gebeurd.

a) aantal kolonies:

b) grootte van 1) de grootste kolonie:
2) de kleinste kolonie:
3) de meerderheid van de kolonies:

c) kleur van de kolonies:

d) verdeling van de kolonies op de plaat:

e) zichtbaar uiterlijk van de kolonies onder UV-licht:

f) de mogelijkheid van bacteriën om te leven en voort te planten in de aanwezigheid van een antibioticum zoals ampicilline.
   1. Beschrijf hoe je gebruik makend van 2 LB-agar platen, wat *E. coli* en wat ampicilline zou kunnen nagaan hoe *E. coli*-cellen beïnvloed worden door ampicilline ("LB-agar" is een voedingsbodem waarop *E. coli* goed groeit; LB staat voor "Luria-Bertani").

   2. Welke resultaten verwacht je over het effect van ampicilline op de groei van *E. coli*?

PS. *We werken met de eencellige bacterie* Escherichia coli (E. coli)*, stam HB101;K-12, die zich elke 20 minuten verdubbelt, niet kan overleven buiten het lab en die geen mensen kan ziek maken.*

Het eigenlijke overbrengen van DNA

De transformatie-procedure omvat drie stappen. De bedoeling van die drie stappen is om het plasmide (met het vreemde DNA) over te brengen in *E. coli* en de bacteriën een milieu te bieden om hun nieuw verkregen eigenschappen tot expressie te brengen.

Om het pGLO-plasmide doorheen de celmembraan van de bacteriën te krijgen, zal je:
1. gebruik maken van een transformatie-vloeistof $CaCl_2$ (calciumchloride),
2. de bacteriën een hitte-shock geven.

Om de genetisch gewijzigde bacteriën te laten groeien in de aanwezigheid van ampicilline moet je:
3. ze van een voedingsbodem voorzien en ze een incubatietijd geven om hun nieuwe eigenschappen tot expressie te brengen.

Practicum

Je gaat bacteriën dus genetisch wijzigen door er een gen in te brengen dat codeert voor het groen fluorescerend proteïne (GFP). Na de transformatieprocedure zullen de bacteriën hun nieuw verworven kwal-eigenschap vertonen en produceren zij het fluorescerende eiwit, waardoor ze, onder UV-licht, een felgroene kleur vertonen.

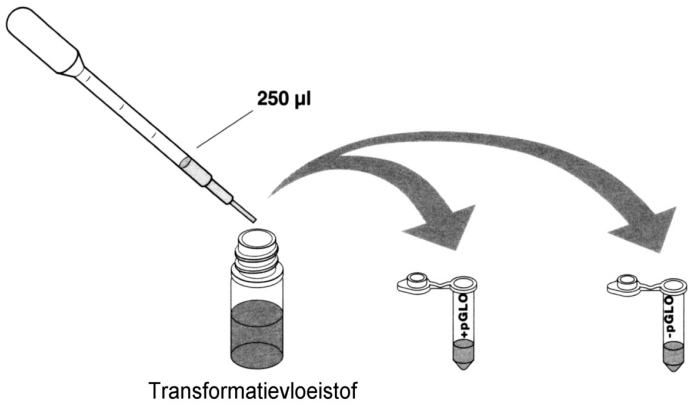
In deze activiteit maak je kennis met de manier om genen van het ene organisme naar het andere over te brengen met behulp van een plasmide.

Je zal dus kennis maken met de middelen en de methode om organismen genetisch te wijzigen.
Je taak bestaat er dan in om:
a. genetische wijzigingen door te voeren,
b. de mate van succes van je pogingen om een organisme genetisch te wijzigen te bepalen.

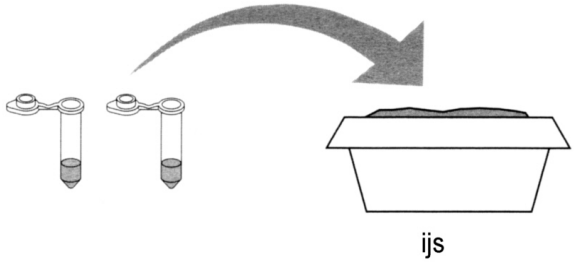
Transformatieprocedure

1. Merk een *gesloten* mini-proefbuisje met **+pGLO** en een tweede met **-pGLO**. Plaats ze in het schuimrubberen rekje.
   (Deze stap is al door je leerkracht gedaan.)

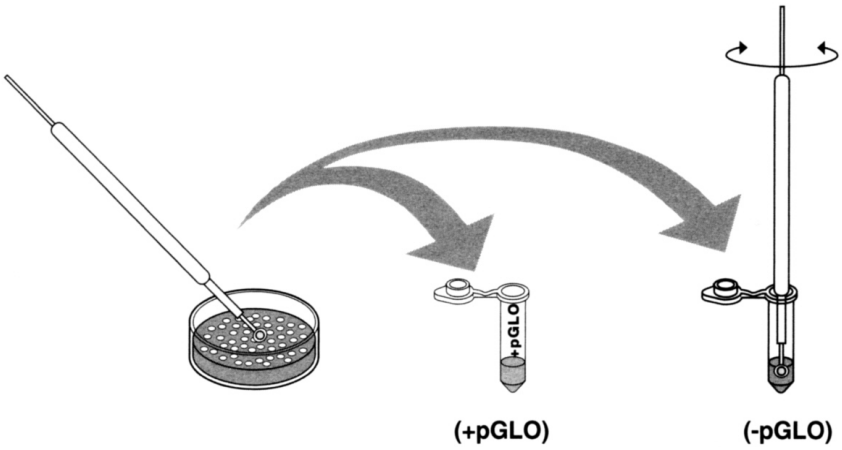
2. Open de buisjes en breng, gebruik maken van een steriele pipet, 250 µl *transformatievloeistof* ($CaCl_2$) in elk buisje.



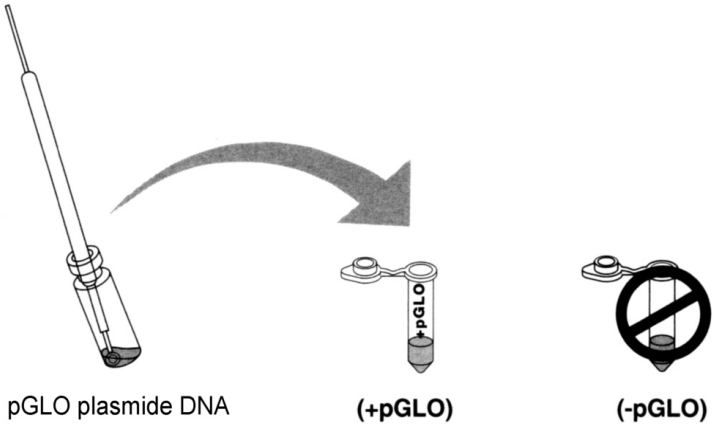
3. Plaats de buisjes in ijs.



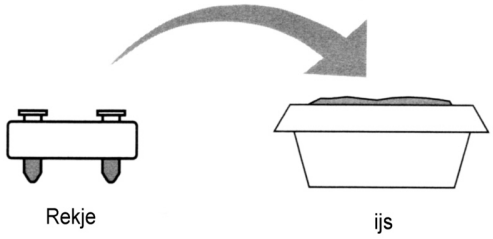
4. Gebruik een steriel ent-oog en neem één enkele kolonie bacteriën uit je startplaat. Neem het **+pGLO**-buisje en dompel het oogje onderaan in de transformatievloeistof van het buisje. Draai de entnaald tussen je duim en wijsvinger tot wanneer de volledige kolonie verspreid is over de transformatievloeistof (zonder brokjes dus). Zet het buisje terug in het ijs. Met een **nieuw, steriel ent-oog** doe je hetzelfde voor het **-pGLO**-buisje.



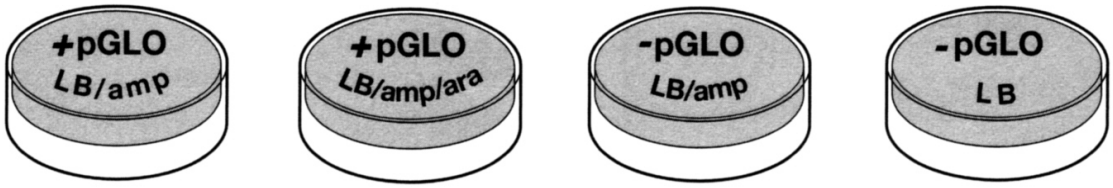
5. Onderzoek de pGLO DNA-oplossing met een UV-lamp. Noteer je observaties. Dompel een **nieuw, steriel ent-oog** in de het buisje met de voorraad pGLO-plasmide en neem er een beetje van in je ent-oog. Er moet nu een 'film' in de ring zitten (zoals bij het zeepbellen blazen). Meng de 'film' met de cel-suspensie van het **+pGLO-buisje**. Sluit het buisje en plaats het weer in het rekje op het ijs.
   Voeg geen plasmide toe aan het **-pGLO**-buisje. (Waarom niet?)



6. Incubeer de buisjes gedurende 10 minuten op het ijs. Zorg ervoor dat de buisjes volledig door het rekje steken en dat ze contact maken met het ijs.

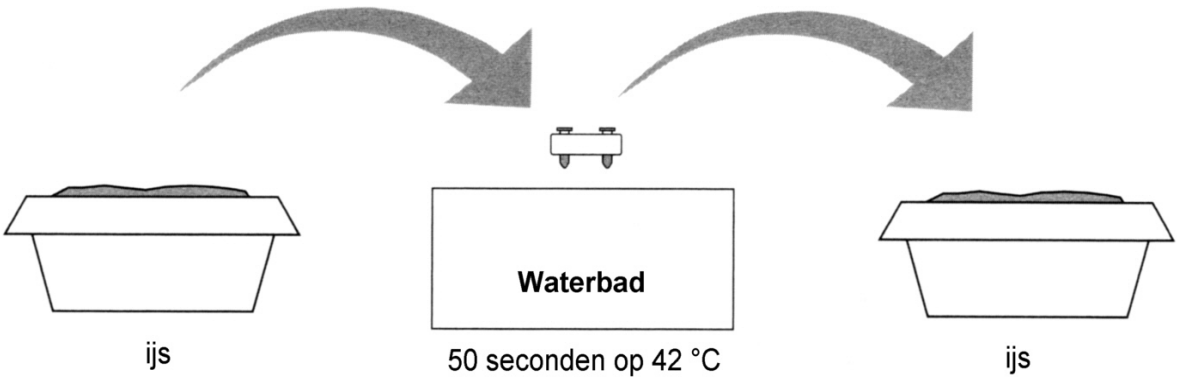


7. Terwijl de buisjes in het ijs staan, vul je de informatie op de *bodem* (niet op het deksel) van de 4 LB-agar-petrischalen aan op de volgende manier.

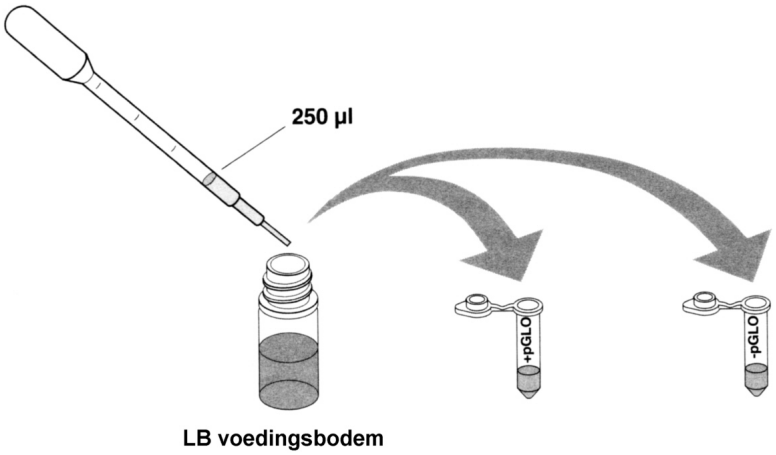


8. Temperatuur-shock. Plaats het schuimrubberen rekje met de 2 buisjes (+pGLO en -pGLO) in een warmwaterbad van 42 °C gedurende *exact 50 seconden*. Ga na of de buisjes wel contact maken met het warme water.

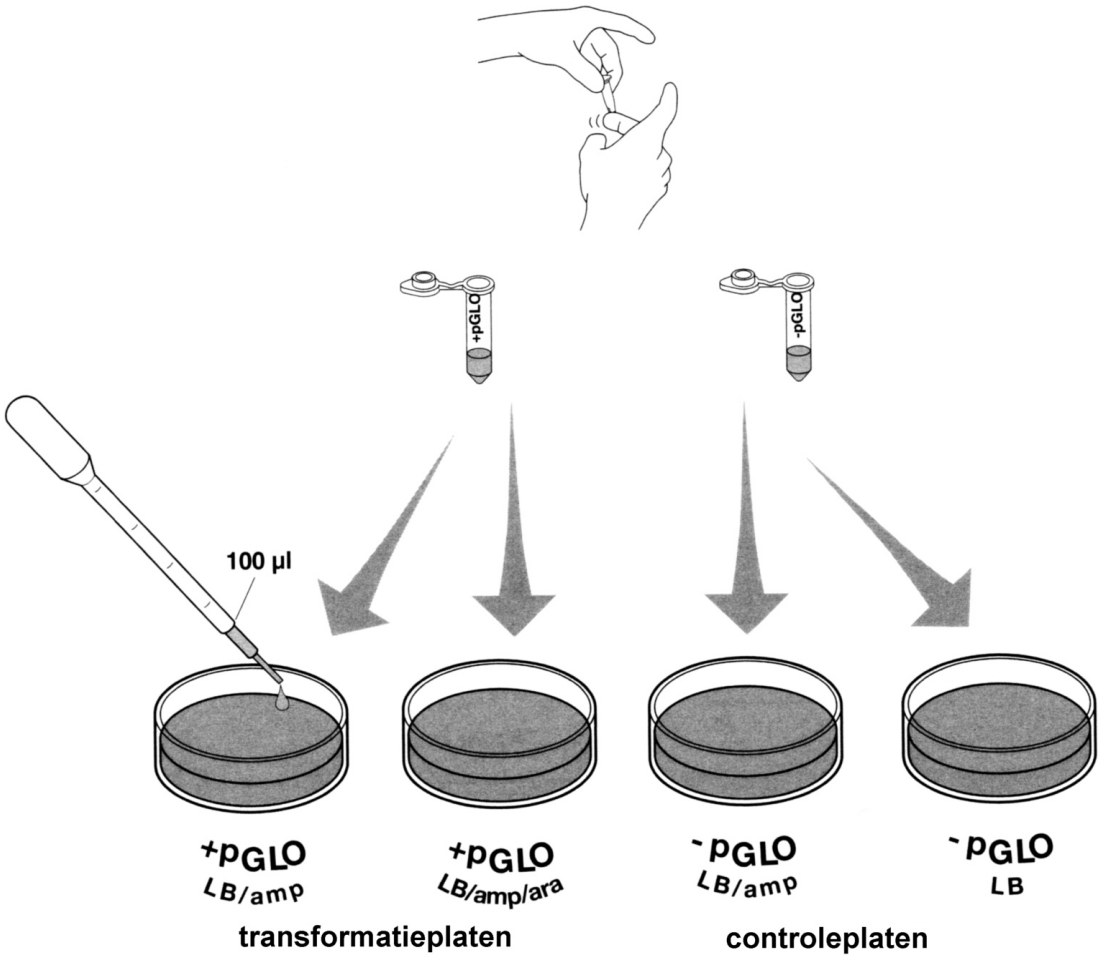
   Als de 50 seconden voorbij zijn, plaats je het rekje weer op het ijs. Voor de beste transformatie-resultaten moet de verplaatsing van ijs (0 °C) naar 42 °C en terug snel gebeuren. Incubeer de buisjes gedurende *2 minuten op het ijs*.



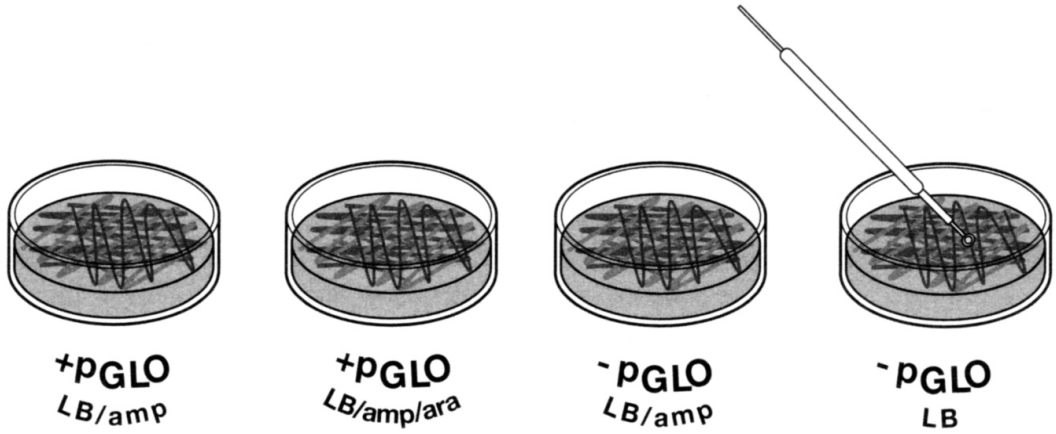
9. Verwijder het rekje van het ijs en plaats het op je werkblad. Open een buisje, breng met een nieuwe **steriele pipet** 250 µl LB-voedingsbodem in het buisje en sluit het weer. Herhaal me een **nieuwe steriele pipet** voor het andere buisje. Incubeer de buisjes gedurende 10 minuten op kamertemperatuur.



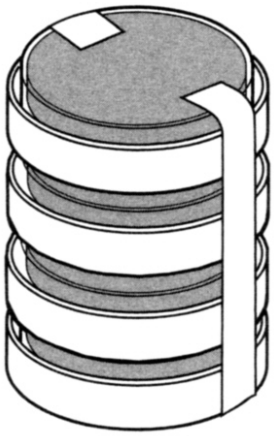
10. Tik met je vinger tegen de gesloten buisjes om de inhoud te mengen. Breng met een **nieuwe steriele pipet** 100 µl van de transformatie-suspensie en met een **andere steriele pipet** 100 µl van de controle-suspensie op de juiste platen.



11. **Gebruik nu een nieuw, steriel ent-oogje voor *elke* plaat**. Spreid de suspensie gelijkmatig uit over de oppervlakte van de LB-agar door snel met het oog over het oppervlak over en weer te schuiven. STEEK NIET IN DE AGAR.



12. Stapel je 4 platen op elkaar en plak ze met tape bijeen. Schijf je groepsnaam op de bodem van de stapel en plaats hem, **voedingsboden maar boven**, in de broedstoof bij 37 ℃ tot de volgende dag.



Verzamelen van gegevens en analyse ervan

A. Verzamelen van gegevens

Bekijk onder normaal licht de resultaten die je verkregen hebt van de genetische manipulatie. Breng dan de platen onder de UV-lamp.
Onderzoek de 4 platen nauwkeurig en **teken** wat je ziet. Noteer je antwoorden op de volgende **vragen** zodanig dat je vergelijkingen kan maken van de "**+pGLO**"-cellen met de niet genetisch gewijzigde *E. coli*-cellen.

1. Hoeveel bacteriegroei is er, relatief gezien, op elke plaat?
2. Wat is de kleur van de bacteriën?
3. Hoeveel bacteriekolonies tel je op elke plaat?

		Waarnemingen
Transformatieplaten	+pGLO LB/amp	
	+pGLO LB/amp/ara	

		Waarnemingen
Controleplaten	-pGLO LB/amp	
	-pGLO LB	

B. Analyse van de resultaten

Het doel van de gegevensanalyse is van na te gaan of er genetische transformatie is gebeurd.

1. Welke van de oorspronkelijk waargenomen kenmerken van *E. coli* blijkt **niet veranderd** te zijn? In de ruimte hieronder lijst je die kenmerken op en schrijf je neer waarop je je baseert om dat te stellen.

   Oorspronkelijk kenmerk **Analyse van de waarnemingen**

2. Welke van de oorspronkelijk waargenomen kenmerken van *E. coli* blijkt **wel veranderd** te zijn? In de ruimte hieronder lijst je die kenmerken op en schrijf je neer welke wijzigingen je vastgesteld hebt.

   Nieuw kenmerk **Waargenomen wijziging**

3. Als de genetisch getransformeerde cellen de mogelijkheid hebben om te leven in de aanwezigheid van het antibioticum ampicilline, welke **gen** van het plasmide is dan aanwezig in de bacteriën door je transformatieprocedure?

4. Hoe kan je uit de resultaten van je experiment bewijzen dat de wijzigingen te wijten zijn aan de procedure die je volgde?

Praktische informatie voor de leerkracht

Bestellen van de kit

Bio-Rad Laboratories n.v.
Begoniastraat 5
9810 Nazareth
Tel: 09-385 55 11
Fax: 09-385 65 54
Freephone (België): 0800-97032
e-mail: TechSupport.Belgium@Bio-Rad.com

Bestelnummer kit: Catalog nr. 166-0003EDU (pGLO Bacterial Transformation Kit)

Prijs (november 2008): 94,00 € (excl. BTW en transport) per kit.
Eén kit is ontworpen voor 8 groepen (van 3 à 4 lln.).

Klaarmaken van de voedingsbodems

Stap 1: petrischalen met voedingsbodems maken (3 tot 7 dagen voor het practicum)

1. *Voedingsbodem klaarmaken (autoclaaf-vrij!)*

   De platen moeten ten minste drie dagen voor het practicum klaargemaakt worden. Ze moeten dan twee dagen bij kamertemperatuur blijven staan en kunnen daarna in de koelkast bewaard worden tot ze gebruikt worden. De twee dagen op kamertemperatuur zijn nodig om de voedingsbodems voldoende uit te drogen om gemakkelijk de transformatievloeistof op te nemen tijdens het practicum.

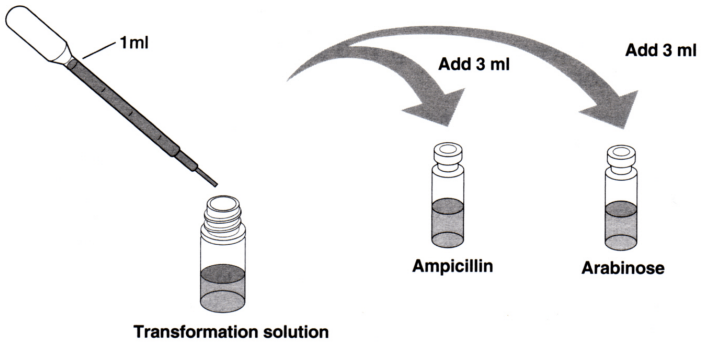
   Om de voedingsbodem klaar te maken giet je 500 ml water in een 1 l erlenmeyer. Voeg de volledige inhoud van het zakje LB-voedingsagar toe en roer om de agar op te lossen. Verwarm in een microgolf-oven. Herhaal opwarmen en roeren drie keer tot alle agar opgelost is. Laat de erlenmeyer afkoelen zodanig afkoelen dat de buitenkant van de fles comfortabel is om vast te nemen (50 °C). Terwijl de agar afkoelt, kan je de petrischalen markeren en de arabinose en ampiciline klaarmaken zoals hierna wordt beschreven. Let er op dat de agar niet zo sterk afkoelt dat hij begint te stollen!

2. *Arabinose en ampiciline oplossen*

   Hou er rekening mee dat arabinose ten minste 10 minuten nodig heeft om op te lossen. Geduld dus!

   Arabinose wordt geleverd in een klein flesje. Met een nieuwe steriele pipet voeg je 3 ml transformatievloeistof toe aan het flesje om de suiker te rehydrateren. Goed schudden. (Transformatievloeistof wordt hier gebruikt omdat het een handige steriele vloeistof is. Steriel water is uiteraard ook goed.)

   Ampiciline wordt geleverd in een klein flesje. Met een nieuwe steriele pipet voeg je 3 ml transformatievloeistof toe aan het flesje om het antibioticum te rehydrateren. Goed schudden. (Transformatievloeistof wordt hier gebruikt omdat het een handige steriele vloeistof is. Steriel water is uiteraard ook goed.)



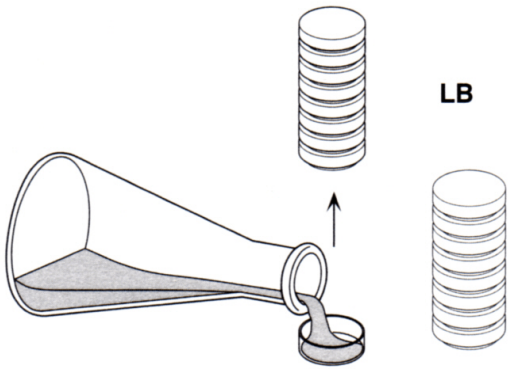
NB. Overmatige warmte (>50 °C) vernietigt arabinose en ampiciline, maar de voedingsbodem begint te stollen op 27 °C. De afkoeling moet bijgevolg goed in het oog worden gehouden en het gieten van de platen moet van start tot einde zonder onderbreking uitgevoerd worden. Luchtbelletjes kunnen na het gieten van de platen verwijderd worden door het agar-oppervlak even met de vlam van een bunsenbrander te bewerken. Laat de agar opstijven zonder de platen te bewegen. Gooi een eventueel overschot van agar in de vuilnisbak, niet in de gootsteen. Verwijder, indien nodig, gemorste agar-druppels van de zijkant van de voedingsbodems.

3. Markeren van de platen

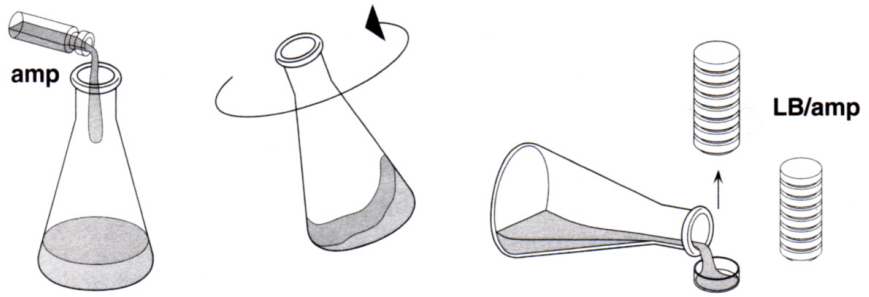
De 40 geleverde platen moeten met een 'permanente' viltstift gemarkeerd worden op de bodem, dichtbij de rand. Markeer 16 platen met **LB**, 16 platen met **LB/amp** en 8 platen met **LB/amp/ara**.

4. *Gieten van de LB-voedingsbodems (LB, LB/amp, LB/amp/ara)*

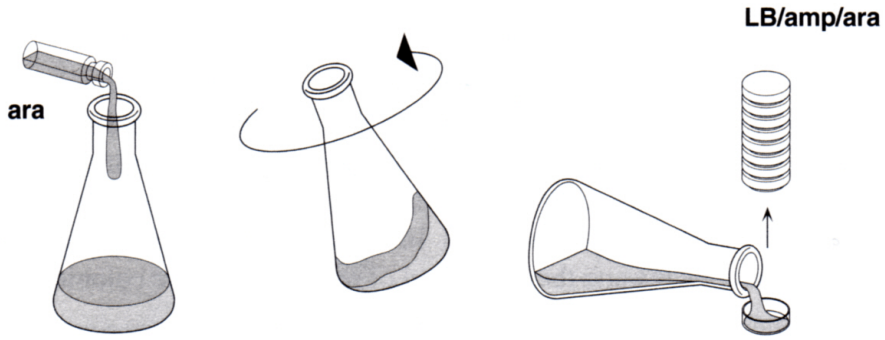
Giet eerst LB-voedingsbodem in de 16 daarvoor gemarkeerde platen. Stapel de lege platen 4 tot 8 hoog op en start met de onderste plaat. Til het deksel ervan (met daarop de overige lege platen) op met één hand en giet met de andere hand LB-voedingsbodem in de onderste bodem tot zowat 1/3 tot 1/2 van de hoogte (= ongeveer 12 ml). Zet het deksel weer op zijn plaats en ga op die manier hogerop de stapel. Laat de 16 platen afkoelen in deze gestapelde positie.



Vervolgens giet je de gerehydrateerde ampiciline in de overblijvende LB-voedingsbodem in de erlenmeyer. Even de erlenmeyer ronddraaien om te mengen. Giet de 16 platen, die gemerkt zijn met **LB/amp**, volgens de hoger vermelde techniek.



Voeg dan de gerehydrateerde arabinose in de overblijvende **LB-voedingsbodem, die ampiciline bevat, in de erlenmeyer**. Even de erlenmeyer ronddraaien om te mengen. Giet de 8 platen, gemerkt zijn met **LB/amp/ara**, volgens de hoger vermelde techniek.



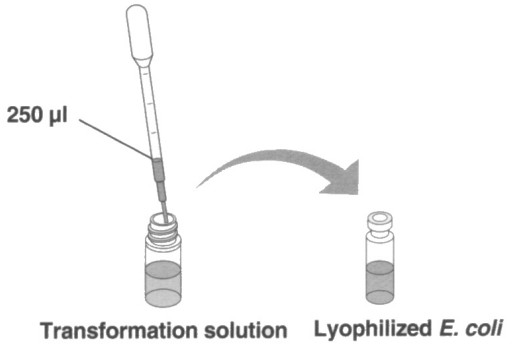
5. Platen bewaren

Nadat de platen gedurende **2 dagen bij kamertemperatuur** 'gerijpt' zijn kunnen ze, 20 hoog, gestockeerd worden in de plastic verpakking waarin ze geleverd werden. Kleef de verpakking dicht, draai de stapel om en bewaar de stapels onderste boven in de koelkast tot ze gebruikt worden.

Stap 2: startplaten enten (24 tot 36 u voor het practicum)

1. Rehydrateer bacteriën

Gebruik een nieuwe steriele pipet en rehydrateer de gedroogvriesde *E. coli* HB101 door 250 µl transformatievloeistof in het flesje bacteriën te brengen. Sluit het flesje weer en laat de suspensie gedurende 5 minuten op kamertemperatuur staan. Schud het flesje goed op alvorens te enten op de **LB** startplaten (zie hieronder bij 2.) (Transformatievloeistof wordt hier gebruikt omdat het een handige steriele vloeistof is. Steriel water is uiteraard ook goed.). Bewaar de gerehydrateerde bacteriën zo nodig in de koelkast tot ze gebruikt worden (binnen de 24 uur voor de beste resultaten, niet langer dan 3 dagen).



2. *Enten en uitsmeren van de startplaten* (om bacteriënkolonies te produceren die ontstaan zijn uit één bacterie = 'single cel' kolonies)

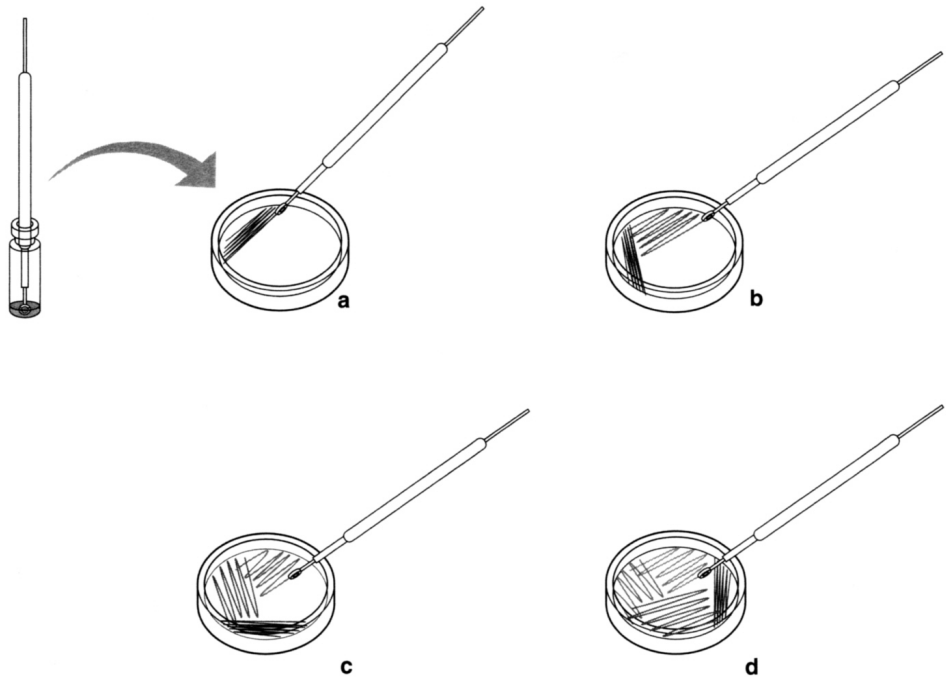
   Elk labteam heeft zijn eigen startplaat nodig als bron voor cellen voor transformatie. De kit bevat voldoende materiaal om 8 groepen leerlingen van het nodige materiaal te voorzien. De LB platen moeten uitgestreken worden om kolonies uit één bacterie te verkrijgen. Ze moeten gedurende 24-36 uur geïncubeerd worden op 37 °C voordat de transformatie-activiteit wordt gepland.
   Gebruik makend van de gerehydrateerde *E. coli*, klaargemaakt in de laatste stap en van de **LB**- voedingsbodems (klaargemaakt in stap 1, zie p. 11), ent je één startplaat voor elke groep leerlingen. De bedoeling van het uitstrijken is om kolonies, ontstaan uit één bacterie, te genereren uit een suspensie van bacteriën. Onder optimale omstandigheden kan één cel in 24 uur tijd uitgroeien tot miljoenen genetisch identieke cellen. Er zitten miljoenen bacteriën in een kolonie met een doormeter van 1 mm.

   a. Steek een steriel ent-oogje in de cultuur van gerehydrateerde bacteriën. Steek het oogje recht in het flesje zonder het flesje te kantelen. Haal het oogje uit het flesje en ent de platen zoals verder wordt geïllustreerd. Uitstrijken gebeurt in vier opeenvolgende kwadranten. De eerste uitstrijk dient enkel om de bacteriën een beetje te verspreiden. Ga met het ent-oogje een 12-tal keer heen en weer in elk deel van de plaat. In de opeenvolgende kwadranten worden de cellen steeds meer verdund, waardoor het ontstaan van 'single cell colonies' toeneemt (zie figuur op volgende bladzijde).

   b. Voor de volgende stappen is de doelstelling om zoveel mogelijk oppervlakte van de platen te benutten. Draai de plaat 45° (zodat de st rijkbeweging comfortabel kan gebeuren) en start met een tweede uitstrijk. Het ent-oogje niet opnieuw in de gerehydrateerde bacterie-suspensie dompelen! Raak met het ent-oogje een tweetal keer de vorige uitstrijk (uit a) en smeer dan een 10-tal keer heen en weer zoals op de tekening is weergegeven.

   c. Draai de plaat weer en herhaal de werkwijze van b.

   d. Draai de plaat een laatste keer en doe nog een laatste uitstrijk. Herhaal de ganse werkwijze a-d voor de overblijvende 7 **LB**-platen (of voor het aantal noodzakelijke groepen). Wanneer je klaar bent met een plaat moet je ze onmiddellijk afdekken om contaminatie te vermijden.

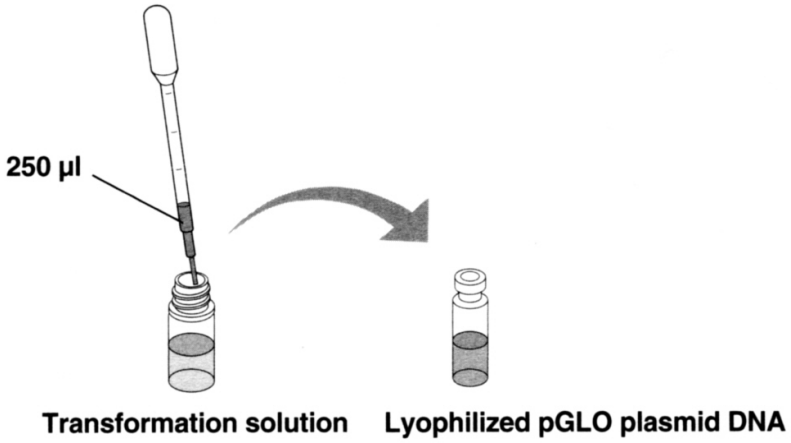


e. Zet de platen omgekeerd (bodem naar boven) in een broedstoof op 37 ℃ (of op kamertemperatuur) gedurende 2-3 dagen. Gebruik ze dan voor het practicum binnen de 24-36 uur. **NIET MEER IN DE KOELKAST PLAATSEN VOOR GEBRUIK.**

f. *E. coli* vormt witte, ronde kolonies met gladde randen. Vermijd het gebruik van platen die gecontamineerd zijn.

3. Klaarmaken van het pGLO-plasmide

Breng met een nieuwe, steriele pipet 250 µl transformatievloeistof in het flesje met gevriesdroogd pGLO-plasmide DNA. Hou er rekening mee dat de hoeveelheid DNA in het flesje zo weinig is dat het flesje leeg lijkt. Bewaar het gerehydrateerd plasmide (indien nodig) in de koelkast. (Transformatievloeistof wordt hier gebruikt omdat het een handige, steriele vloeistof en nuclease-vrije vloeistof is. Steriel water is uiteraard ook goed.)



Stap 3: Vlak voor het practicum

1. Oplossingen afmeten.
   Pipetteer voor elk studententeam 1 ml transformatievloeistof ($CaCl_2$) en 1 ml vloeibare LB-voedingsbodem in een afzonderlijk buisje (met kleurcode!), meegeleverd met de kit. Indien de voedingsbodem om één of andere reden 1 dag voor het practicum wordt afgepipetteerd moet het in de koelkast bewaard worden. Merk de buisjes (bv. "TV" en "LB").

2. Zet de leerlingenwerktafels klaar:

Werkstation van één team van leerlingen	Aantal nodig	(✔)
E. coli starterplaat (LB)	1	❑
Voedingsbodems (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara)	4	❑
Ent-oogjes	7 (pakje van 10)	❑
Steriele pipetten	5	❑
Piepschuim reageerbuisrekje/vlotje, met:	1	❑
• Transformatievloeistof, 1 ml (in proefbuisje)	1	❑
• LB-voedingsbodem (vloeibaar), 1 ml (in buisje)	1	❑
• Leeg proefbuisje (kleur; gemerkt met +pGLO)	1	❑
• Leeg proefbuisje (kleur; gemerkt met -pGLO)	1	❑
Bekertje, vol met gemalen ijs	1	❑
Viltstiftje	1	❑
Lerarentafel		
Gerehydrateerd plasmide DNA, flesje	1	❑
Waterbad 42 ℃	1	❑
Broedstoof	1	❑

Overzicht werkzaamheden voor leerkracht

Doel		Tijdsduur	Wanneer?
Stap 1	Klaarmaken van agar-platen	1 uur	3-7 dagen voor het practicum
Stap 2	Rehydrateren van *E. coli*	2 minuten	24-36 uur voor het practicum
	Uitstrijken starterplaten	15 minuten	
	Rehydrateren pGLO-plasmide DNA	2 minuten	
Stap 3	Oplossingen afmeten in buisjes	10 minuten	vlak voor het practicum
	Klaarzetten leerlingentafels	10 minuten	

Andere transformatiekits met vergelijkbare werking

Edvotek Europe

Post Office Box 280
Hertford, Hertfordshire
SG13 9DG, UK
Ukinfo@edvotek.com
Kit nummer: EDVO-Kit # 223
Prijs: £ 50 (GBP), omgerekend 63,24 EUR (nov. 2008; exclusief BTW en transportkosten)

Vergelijking met de Bio-Rad-kit

1. **Nog extra materiaal nodig!**
   In de catalogus staat (letterlijk):
   Kit includes*: instructions, cells, plasmid DNA, IPTG, ampicilin, transformation solution, ReadyPour agar, Luria broth, petri dishes, sterile pipettes, loops and microtubes.*
   All you need*: waterbath, 37 ℃ incubation oven, long wave UV lamp, autoclave or pressure cooker*.

   Maar in de handleiding staat (letterlijk):
   Requirements*:* automatic micropipet (5-50 µl) and tips*, two waterbaths (37 ℃ and 42 ℃) , thermometer, incubation oven (34 ℃ and 37 ℃), pipet pumps or bulbs,...*

   Alhoewel de kit goedkoper is dan de Bio-Rad-kit, moet er nog geïnvesteerd worden in micropipetten en tipjes of moet er in de vakhandel gezocht worden naar de plastic pipetjes waar Bio-Rad mee werkt. Een school die al micropipetten (en tipjes) in huis heeft, kan overwegen om deze kit aan te schaffen.

2. **Bewaren**
   Enkele producten uit de kit (ampiciline, plasmide en IPTG of Isopropyl-thio-beta-D-galactopyranoside) moeten in de diepvriezer bewaard worden. Edvotek heeft (nog) geen verdeler in België, vandaar dat ik de kit toegestuurd kreeg vanuit Amerika, weliswaar in een doos voorzien van piepschuim-wanden, maar uiteraard waren de producten al lang ontdooid bij aankomst. Omwille van ‘nadeel 1’ heb ik de kit niet verder uitgetest.
   De Bio-Rad-kit kan wel volledig op kamertemperatuur bewaard worden.

3. **Practicumtijd**
   De verschillende stappen in deze kit vergen wat meer tijd dan in de Bio-Rad-kit. In de praktijk bleek dat de opgegeven tijden van de Bio-Rad-kit net voldoende waren om het practicum binnen 1 lesuur uit te voeren.

National Centre for Biotechnology Education (NCBE)

Science and Technology Centre
University of Reading
Earley Gate
READING
RG6 6BZ
The United Kingdom

http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/MATERIALS/DNA/transformation.html
Prijs: £ 65 (GBP) (exclusief BTW en transportkosten).

Helaas... de kit mag alleen verzonden worden naar het Verenigd Koninkrijk en Zweden.