

TOA-tips

In de module komen een aantal experimenten voor. De benodigdheden staan in dit onderdeel.

Les 1: opkweken van bacteriën

Doel van de proef: effect van antibiotica op bacteriegroei nagaan.

Benodigdheden:

- per tweetal drie petrischalen met gesteriliseerde Agar-Agar. Gebruik nutriënt-Agar d.w.z. met bouillon bereid
- viltstift
- öse; dat is een klein metalen oogje waarmee je makkelijk vloeistoffen op de voedingsbodem kunt aanbrengen.
- antibioticum-oplossing
- reageerbuizen
- verschillende soorten water: zwembadwater; sloot- of aquariumwater; kraanwater. Evt. regenwater.
- kleine, ronde filtreerpapierjes. Deze zijn makkelijk te maken met behulp van een perforator.

Veilig werken is bij deze proef belangrijk. Naast de normale regels als draag een labjas en lang haar in een staart moet er nadrukkelijk aandacht zijn voor besmetting door bacteriën. Besmetting moet voorkomen worden. Dus beslist niet eten en drinken. Goed handen wassen: vooraf en na afloop. Evt. labtafel ontsmetten met alcohol. Houd de petrischalen met bacteriën zoveel mogelijk gesloten. Er is een eenvoudig filmpje beschikbaar. Dat filmpje is op te vragen via info@scheikundeinbedrijf.nl. Het filmpje komt ook op de website. Check: <http://www.scheikundeinbedrijf.nl>.

Agar-Agar en een antibiotica-oplossing zijn meestal wel te krijgen via een biologie-collega. Wij haalden de antibiotica-oplossing bij een apotheek. Tijdens de test is gebruik gemaakt van een amoxicilline-oplossing. Voor de verdiepingsopdracht is het handig om een aantal bacteriedodende vloeistoffen klaar te zetten waaruit de leerlingen kunnen kiezen. Te denken valt aan: wasbenzine, een zoutzuuroplossing e.d. Goede bacteriebronnen: onderkant van schoenen; toetsenbord pc; toilet;

Les 5: omzetting van penicilline in amoxicilline

Doel van de proef: amoxicilline maken uit HPGM en 6-APA

Benodigdheden:

- Afsluitbare reageerbuis van ca. 50 mL
- 0,74 gram 6-APA
- 0,69 gram HPGM
- Demi water
- Enzymoplossing

Methode:

- **Zorg voor een blanco: iemand - liefst natuurlijk iedereen(!) - in de klas voert de proef twee keer uit. Eén keer mét enzymoplossing en één keer zonder.**
1. Weeg nauwkeurig 0,74 g 6-APA en 0,69 g HPGM af en breng ze samen in een de reageerbuis. (voor een lesuur van 50 minuten raden we aan om het afwegen een les van tevoren te doen). Dit zijn twee witte poeders. De massa's die afgewogen moeten worden zijn klein. Om die af te wegen is een vrij nauwkeurige weegschaal nodig, waar de meeste scholen er niet meer dan één bezitten. Het afwegen door een hele klas kost dan veel tijd. Het verdient dus de voorkeur om de stoffen een les eerder of centraal van tevoren af te wegen.
 2. Voeg 20 mL demi water toe en suspendeer de twee stoffen door ca. 1 minuut goed te schudden. Het geheel wordt troebel en wit. De losse stoffen 6-APA en HPGM lossen niet goed op in water en leveren een witte suspensie.
 3. Voeg nu 4 mL enzymoplossing toe. Dit brengt de reactie op gang.
 4. Houd je hand om de reageerbuis (om licht te verwarmen) en schud regelmatig tot je de oplossing helder ziet worden. Dit duurt 5-15 minuten. Je weet nu dat de reactie gaande is. Amoxicilline lost beter op dan de beginstoffen. Tijdens het verloop van de reactie reageert genoeg van de beginstoffen weg, zodat een oplossing ontstaat. Dit proces duurt even. De temperatuurverhoging door het omsluiten van de reageerbuis met de hand levert zeker 10 minuten tijdswinst. In de tussentijd kunnen de leerlingen naar een stukje theorie luisteren.

5. Blijf daarna verder schudden tot de inhoud van de reageerbuis melkachtig wit wordt. Dit duurt 10-20 minuten.
Tip: zodra de inhoud van je buis troebel is geworden kun je met een pipetje 1 mL van de inhoud bij klasgenoten in de buis spuiten. Daarmee versnel je de troebeling.
 Als er genoeg amoxicilline is gevormd, ontstaat er weer een verzadigde oplossing en uiteindelijk een suspensie van amoxicilline. Dit proces duurt langer dan het oplossen (ook hier versnelt de verwarming met de hand het proces) en kan dus weer een moment zijn om tussendoor iets anders te bespreken of om wat opgaven te maken/bespreken. Het ontstaan van de troebeling is vrij plotseling en vrij dramatisch en zal dus weer voor afleiding zorgen. Het overbrengen van een beetje suspensie naar een buis die nog troebel moet worden versnelt de troebeling omdat de suspensie kristallisatiekernen levert.
6. De witte stof die nu is ontstaan is amoxicilline.
 De omzetting is niet 100% maar voldoende voor het komende experiment.
 Zowel de beginstoffen als de gesynthetiseerde amoxicilline zijn in principe veilig om door de kraan te spoelen. Het is niet de bedoeling dat de suspensie ingedampt wordt: in poedervorm kunnen de stoffen een schadelijke werking op de longen hebben.
 Vanuit milieuoogpunt verdient het de aanbeveling om de inhoud van de synthesebuis in te zamelen en bij het organisch afval te voegen. Het gaat maar om relatief heel kleine hoeveelheden, maar het is ons inziens een slecht voorbeeld voor de leerlingen om antibiotica zomaar op het riool te lozen.

Experiment: Antibacteriële werking van je product

Doel(en) van de proef:

1. uitzoeken of je syntheseproduct (= amoxicilline) daadwerkelijk bacteriegroei kan remmen.
2. Eventueel: uitzoeken of 6-APA en HPGM bacteriegroei kunnen remmen.

Benodigdheden:

- De zelfgemaakte suspensie van amoxicilline uit de voorgaande proef
- Per tweetal één (of drie) petrischalen met gesteriliseerde Agar-Agar
- Viltstift
- Yakult
 Dit is een mooie bron van melkzuur bacteriën (die kwetsbaar zijn voor amoxicilline).
- Kleine, ronde filtreerpapierjes (vergelijkbaar met de proef uit les 1)
 (Suspensie van 6-APA in water)
 De TOA maakt van tevoren een oplossing van 0,74 g 6-APA in 20 mL demiwater (eventueel meer voor een grote klas). Goed schudden voor gebruik.
- (Suspensie van HPGM in water)
 De TOA maakt van tevoren een oplossing van 0,69g 6-APA in 20 mL demiwater (eventueel meer voor een grote klas). Goed schudden voor gebruik.

Methode:

- Het verdient de aanbeveling om deze proef van tevoren uit te testen. Uit onze tests is gebleken dat Yakult uitstrijken op agar niet zoveel zin heeft. Wat beter werkt is om de agar na het steriliseren af te laten koelen en om, voordat het stolt, een scheut Yakult door de agar te mengen (het is ook mogelijk om na het stollen de agar weer op te smelten en dan de Yakult er doorheen te mengen).
 Wat dit proces lastig maakt is de smalle temperatuursmarge voor toevoegen van de Yakult. De Yakult moet toegevoegd worden als de agar tussen de 48-50°C. Boven die temperatuur overleven de bacteriën niet, eronder stolt de agar.
- Voor het effect van de proef kan het aardig zijn om het synthese mengsel van de vorige proef 10x te verdunnen alvorens het op de plaat aan te brengen. Dit zorgt voor een mooi 'halo' effect. Als de onverdunde oplossing op de Yakult-agar wordt aangebracht, groeit er niets op.
 Referentie monsters van 6-APA/HPGM en enzym+water geven veel minder remming van bacteriegroei. Een referentie zonder remming is natuurlijk ook een mooie controle.
- Schrijf met een viltstift de naam van jou en je partner onder op de petrischaal met agar-agar. En vermeld welke stof je erop gaat aanbrengen als je ook de proef met 6-APA en HPGM doet.
- Zet de brander aan. Open de petrischaal naast de brander. Zorg dus dat de Agar-Agar niet boven de brander komt. De warme luchtstroom voorkomt besmetting vanuit de lucht.
- Giet over iedere petrischaal met Agar-Agar een scheutje Yakult uit zodat er een heel dun laagje vloeistof over de Agar ligt. Zorg dat je niet teveel op de open plaat ademt en sluit de schaal tot je een gedrenkt filtreerpapierje erop kunt aanbrengen.
- Drenk een filtreerpapierje in de amoxicilline suspensie en leg dit in het midden van een petrischaal met Yakult
 (Doe hetzelfde voor 6-APA en HPGM)
- Leg de petrischaal (petrischalen) in een stoof bij 37°C
- **Bekijk het resultaat tijdens de volgende les.**

Les 7 t/m 9: de speurtocht naar enzymen

Het onderzoek vergt een heldere organisatie.

- Hoeveel tijd mogen de leerlingen aan het onderzoek besteden? Drie lessen? Of meer?
- Er is tijd te winnen door leerlingen informatiebron(nen) aan te reiken in plaats van leerlingen zelf te laten zoeken.
- Er is tijd te winnen door materialen - zoals bufferoplossingen - voor leerlingen klaar te zetten.

Het onderzoek valt uiteen in een aantal onderdelen:

- A. Het bepalen van een geschikte bron voor het enzym fosfatase.
- B. Het winnen van het enzym uit de gekozen bron
- C. Het uitvoeren van een testreactie om na te gaan of de bron het enzym fosfatase bevat
- D. (Eventueel: een verdiepingsonderzoek. Hoe snel werkt het enzym fosfatase?)

A. Bron bepalen

Het artikel dat is gebruikt voor het ontwerpen van het experiment is te vinden op de site:

<http://www.jbc.org/cgi/reprint/167/1/57.pdf>

Een andere optie is om 'phosphatase' en 'citrus' in een zoekmachine in te voeren. De bovenstaande link was bij ons de eerste hit (JBC, 1946, Citrus Fruit Phosphatase, Bernard Axelrod).

Bronnen die wij gevonden hebben zijn: vruchten als grapefruit, sinaasappel. Maar ook tarwe.

Bij het zoeken van een geschikte bron moet verder gedacht worden aan:

1. Beschikbaarheid van de bron
2. Prijs van de bron
3. Houdbaarheid van de bron
4. Kun je het enzym makkelijk uit de bron halen? En: Bevat de bron veel van het enzym?

B. Enzym uit de bron halen

Een goede blender in het lokaal is voorwaarde. Staafmixers voldoen natuurlijk ook.

Verder zijn de volgende aandachtspunten van belang:

1. Enzymen zijn kwetsbaar. Bewaar ze dus het liefst zo kort mogelijk. Elke dag dat je langer wacht gaat een deel van de activiteit verloren.
2. Enzymen kunnen slecht tegen temperatuur en een afwijkende zuurgraad. Bewaar het enzym dus gekoeld. Over de pH waarbij jullie de testreactie gaan uitvoeren lezen jullie verderop.
3. Enzymen werken normaal gesproken in de cel van een levend wezen. Dat betekent dus dat ze meestal in oplossing werken. Een 'sap' is dus meestal een goede bron van enzymen. Als er te weinig 'sap' in de bron aanwezig is dan kan verdund worden met gedestilleerd water.

C. De testreactie

Als alles goed gegaan is hebben dan beschikken de leerlingen nu over een gekoelde 'sap' met daarin hopelijk het enzym fosfatase. Een klein beetje van het sap gaat gebruikt worden voor de testreactie.

Tijdens de testreactie verwijdert het enzym fosfatase de fosfaatgroep van het kleurloze dinatrium-p-nitrofenylfosfaat. Daarbij ontstaat p-nitrofenol. Deze stof is geel. Als het enzym fosfatase aanwezig is dan is de kleurverandering heel duidelijk zichtbaar. Informatie over de beschikbaarheid van dinatrium-p-nitrofenylfosfaat is te verkrijgen via info@scheikundeinbedrijf.nl.

De testreactie wordt uitgevoerd bij 37 °C. Daarvoor is een warmwaterbad met die temperatuur nodig. Om tijd te winnen is het te overwegen om dit warmwaterbad klaar te zetten. Dat geldt ook voor de bufferoplossingen die nodig zijn. We raden dit ten eerste aan.

Materiaal voor de testreactie

stoffen

natriumacetaattrihydraat ($\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	ca. 8,1 gram
ijszijn (zuiver azijnzuur = CH_3COOH)	ca. 1,9 mL
demi-water	
dinatrium-p-nitrofenylfosfaat	ca. 73 mg
(te koop bij Sigma Aldrich: 45 euro voor 1 g, and voor 177.50 euro voor 5 g. De oplossing die gebruikt wordt is 1.0 g/l, en van die oplossing voor elke proef 5 ml. Dus voor 40 stockoplossingen is 0.2 g nodig.	
natriumcarbonaatdecahydraat ($\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	ca. 9,7 gram
natriumwaterstofcarbonaat (NaHCO_3)	ca. 6 gram
pH indicatorpapier	

andere materialen (o.a. glaswerk)

waterbad (37°C)

maatkolf 1L, 100 mL en 200 mL

voldoende reageerbuisen en erlenmeyers/bekerglazen

pipet waarmee 0,5 tot 2,5 mL (of 5 mL) is af te meten

(Evt. UV-VIS spectrofotometer (filter 440 nm) + cuvetten)

Methode voor de testreactie

Denk aan de normale veiligheidsmaatregelen! Witte jas, bril enz.!

1. Zet het waterbad op 37°C en laat het op temperatuur komen. (Waarschijnlijk staat dit al klaar in het lokaal).
2. Maak een acetaat buffer van pH 5,0. Waarschijnlijk staat deze bufferoplossing voor jullie klaar. (een buffer is een oplossing waarvan de zuurgraad vrij constant blijft. Dit is belangrijk om het enzym actief te houden). Doe dit als volgt:
 - Weeg 8,1 g natriumacetaattrihydraat af
 - Breng dit over in een maatkolf van 1L
 - Meet 1,9 mL ijsazijn af en voeg dit toe aan de maatkolf. Doe dit samen met de TOA of docent. Ijsazijn is gevaarlijk.
 - Vul de maatkolf met demi-water aan tot 1L
 - Meet met een pH papiertje de zuurgraad. Deze zou pH 5 moeten zijn.
 - Dit is ruim voldoende voor het experiment. Je kunt dit ook met een ander groepje delen. Met meer verdund azijnzuur kun je ook een kleinere hoeveelheid buffer maken. Je hebt voor een normaal experiment ca. 125 mL buffer nodig.
3. Maak een carbonaat buffer van pH 10,0. Waarschijnlijk staat deze bufferoplossing al klaar. (bij hoge pH wordt het enzym uitgezet en krijgt p-nitrofenol zijn gele kleur)
 - Weeg 9,7 g natriumcarbonaatdecahydraat (kristalsoda) af
 - Breng dit over in een maatkolf van 200 mL
 - Weeg 6 g natriumwaterstofcarbonaat (zuiveringszout) af en doe dit ook in de maatkolf
 - Vul de maatkolf met demi-water aan tot 200 mL
 - Meet met een pH papiertje de zuurgraad. Deze zou pH 10 moeten zijn.
 - Dit is genoeg buffer voor 10 metingen. Heb je meer nodig, dan zul je meer buffer moeten maken.
4. Maak een standaardoplossing van het dinatrium-p-nitrofenylfosfaat
 - Weeg op een nauwkeurige balans 73 mg dinatrium-p-nitrofenylfosfaat af
 - Breng dit over in een maatkolf van 100 mL
 - Vul de maatkolf aan tot 100 mL met demi-water
 - De oplossing zou kleurloos moeten zijn!
5. Maak een algemene blanco
 - Meng in een reageerbuis 5 mL standaardoplossing met 2 mL acetaatbuffer
6. Maak enzymoplossing(en)
 - Meng per bron in een reageerbuis 5 mL standaardopl. met 2 mL van je enzym 'sap'
7. Maak 'sap' blanco
 - Meng per bron in een reageerbuis 5 mL acetaatbuffer met 2 mL van je enzym 'sap'

Zorg dat je je reageerbuizen voorzien hebt van een sticker of dat je met viltstift duidelijk hebt aangegeven wat er in zit!

8. Zet de reageerbuizen in het waterbad van 37°C. Start de stopwatch.
9. Zet kleine erlenmeyers (of bekersglasjes) klaar met 20 mL carbonaatbuffer
10. Neem na 15 minuten per reageerbuis een monster van 0,5 mL en voeg dat toe aan een erlenmeyer met carbonaat. Als er fosfataseactiviteit is geweest dan is het monster geel geworden.
11. Vergelijk de 'sap' monsters met de blanco's.
12. (In overleg met je leraar: meet de absorptie van ieder monster in een UV-VIS spectrofotometer bij 440 nm. Gebruik de acetaatbuffer als referentie. Dit geeft een maat voor de geelkleuring en dus voor de enzymactiviteit.)
13. Vergelijken van resultaten.

D. Verdieping

- Voer de proef uit zoals hierboven beschreven maar zorg dat er meteen voldoende erlenmeyers met carbonaat-buffer klaar staan om snel metingen te kunnen verwerken. Zorg ook voor een stopwatch.

- Start de tijdmeting zodra de enzymoplossing toegevoegd is aan de standaardoplossing met p-nitrofenylfosfaat.
- Neem om de twee minuten een sample van 0,5 mL van het enzym/standaardoplossing mengsel en voeg die zo snel mogelijk toe aan een erlenmeyer met 20 mL carbonaatbuffer. Dit stopt de reactie.
De hoge pH van de carbonaat buffer inactiveert het enzym en zorgt dat p-nitrofenol goed geel wordt. De geteste oplossingen die gemaakt zijn met oa. grapefruitschil gaven na 15 minuten al een duidelijk meetbaar resultaat. Voor minder actieve oplossingen kan het beter zijn om de tijd tussen de samples langer te maken.
- Na 16 minuten zijn er 8 monsters genomen.
- Meet van elke erlenmeyer de absorptie in een UV-VIS meter met een filter van 440 nm. Noteer van alle monsters de absorptie. Breng hiervoor steeds 1 mL oplossing over naar een schone cuvet.
Een filter in de buurt van 440 nm laat de grootste absorptie zien.
- Verwerk de gegevens in een grafiek en trek een vloeiende lijn door de punten.
- Het tweetal waarbij de toename van absorptie het snelste is (de meest steile lijn in de grafiek) heeft de meest actieve fosfatase oplossing te pakken.

Desgewenst kan van tevoren een ijklijn van p-nitrofenol in carbonaatbuffer gemaakt worden. Het verdient de voorkeur om dit door de TOA te laten doen omdat het maken van een ijklijn veel tijd kost. p-Nitrofenol is ook een irriterende stof (<http://www.cdc.gov/niosh/ipcsndut/ndut0066.html>). Het voordeel is wel dat een ijklijn in de jaren daarna gewoon opnieuw gebruikt kan worden. Zo kan werkelijk kwantitatief bepaald worden hoe snel de fosfatase oplossing werkt. Er zou desgewenst ook een uitstap naar de wet van Lambert-Beer gemaakt kunnen worden. Het 'meest actieve fosfatase' kan twee dingen betekenen: de oplossing bevat het snelste/meest effectieve fosfatase en/of de oplossing bevat de meest fosfatase.

Antwoorden op de vragen

In de leerlingentekst staat een hele serie vragen. De antwoorden op de vragen staan ook in de leerlingentekst. U kunt de leerlingentekst in dit document namelijk op twee manieren zichtbaar maken.

1. Met antwoorden.
 U moet dan het icoontje ¶ aanzetten. U vindt dit teken in de werkbalk bovenaan in Word. Vlakbij het icoontje om iets *vet* of *cursief* te maken. Met het teken ¶ maakt u verborgen tekst zichtbaar.
2. Zonder antwoorden.
 Zet het icoontje ¶ uit. De antwoorden zijn niet langer zichtbaar.

Als u de leerlingenteksten MET antwoorden wilt printen ga dan naar het menu 'afdrukken'. Kies 'opties' (links onderaan). Zet een vinkje bij 'inclusief: verborgen tekst'.

Wellicht ten overvloede. Wilt u de tekst zonder antwoorden printen zorg dan dat er geen vinkje staat bij: 'inclusief: verborgen tekst'.