

TOP SECRET
ACCESS RESTRICTED
TO AUTHORIZED
C.S.I. BRUSSELS
OFFICERS

CRIME SCENE INVESTIGATION BRUSSELS

C.S.I. BRUSSELS SUPERVISORS:

LUC LEYNS

ROBERT FINSY

MARIJKE HENDRICKX

C.S.I. BRUSSELS SPECIAL ASSISTANTS:

TIM SIERENS

ANJA VAN GEERT

AMAIA MARCILLA

DIANE SORGeloos

Inleiding

Jullie zijn een team van wetenschappers die voor de speciale Crime Scene Investigation unit (CSI Brussels) werken. Jullie zijn gespecialiseerd in het opsporen van misdadigers en het zoeken van bewijsmateriaal om hun schuld aan te tonen. Tijd is een belangrijke factor in jullie werk aangezien de verdachte kan verdwijnen voordat er bewijsmateriaal wordt gevonden. Eetijdsschema, dat verderop in deze handleiding staat, dient strict gevolgd te worden. Jullie racen tegen de tijd om de misdaad te bestrijden!

Vandaag ligt er weer een onopgelost mysterie te wachten op jullie deskundigheid.

Doel van deze missie

De misdaad

Er werd ingebroken in een geautomatiseerde frisdrankfabriek zonder dat het elektronisch alarmsysteem in werking trad. Het gaat om een multinationalaal bedrijf dat net een nieuw soort frisdrank “Thai Mango” op de markt wilde lanceren. Uit het eerste onderzoek op de plaats van de misdaad blijkt dat de inbreker het nieuwe product wilde saboteren door enkele van de partijen te vergiftigen met extra fosforzuur. Hierdoor werd de frisdrank in enkele van de partijen te zuur voor consumptie, hetgeen natuurlijk een economische ramp betekent voor het bedrijf.

De inbreker kreeg echter niet de kans om alle partijen te vergiftigen, want hij werd op heterdaad betrapt door een bewaker van het bedrijf. Toen de inbreker wilde ontsnappen ontstond een gevecht waarin de bewaker om het leven kwam. Onder de nagels van de bewaker werd door een andere CSI agent een stukje weefsel van de inbreker gevonden. De politie heeft zes verdachten die mogelijk een relatie hebben met concurrerende bedrijven die er belang zouden kunnen bij hebben om de lancering van het nieuwe product te boycotten.

Missie 1: crime Scene Investigation: DNA fingerprinting

Uit het weefsel dat onder de nagels van de bewaker werd gevonden en dat naar alle waarschijnlijkheid van de moordenaar afkomstig is, werd DNA geëxtraheerd. Ook van de 6 verdachten werd door undercover agenten discreet een monster genomen waaruit DNA kon geëxtraheerd worden. Het is jullie opdracht een DNA fingerprint analyse uit te voeren. Als Moleculair Bioloog die werkt voor de CSI unit moet jij de verschillende DNA monsters analyseren om zo te bepalen wie van de 6 verdachten de moordenaar van de bewaker is.

Missie II: Crime Scene Investigation – Chemische analyse.

Een onbekende hoeveelheid fosforzuur werd aan verschillende partijen van de frisdrank toegevoegd. In de normale productie van de drank zit ook een zekere hoeveelheid fosforzuur (E338). Als chemisch analist van de CSI unit moet jij kwantitatief uitzoeken welke partij(en) teveel fosforzuur bevatten. Van 5 partijen is er een monster genomen en ten minste 1 ervan werd door de indringer vergiftigd.

Bijkomende vragen die je dient te beantwoorden, zijn:

1. Wat is de totale hoeveelheid van het teveel aan fosforzuur dat werd toegevoegd aan elk van de 5 partijen van elk 100 000 liter?
2. Hoe kan het teveel aan fosforzuur geneutraliseerd worden?
3. Hoeveel materiaal is er nodig voor de neutralisatie?

Waarschuwing: Drink in geen geval van de oplossingen.

Lijst van het materiaal dat door het hoofdkwartier van CSI Brussel ter beschikking wordt gesteld:

VOOR DNA FINGERPRINTING:

- 2 glazen micropipetten van 10 microliter (elk streepje is 1 microliter).
- 2 glazen plaatjes
- 1 kam voor de gel electroforese
- 2 klemmetjes
- 3 papieren kaartjes
- 2 plastic pasteurpipetten
- één oefen-gel in een schaalpje
- 15 lege “eppendorf” tubes (open) in een plastic zakje
- witte stickertjes om de tubes te labelen
- Een rekje met de volgende tubes:
 - 1 “eppendorf” tube met rode sticker: 300 microliter van de oranje oefenoplossing
 - 1 “eppendorf” tube met blauwe sticker: 50 microliter van de blauwe oplossing om de gel te laden
 - 1 “eppendorf” tube met witte sticker: 20 microliter van de restrictie buffer (5 maal geconcentreerd)
 - 1 “eppendorf” tube met gele sticker met 1 milliliter water
 - 1 “eppendorf” tube met bruine sticker: 5 microliter DNA gevonden op de plaats van de misdaad (van onder de nagels van de bewaker)
 - 6 “eppendorf” tubes 6 (nummer 1 tot 6) met DNA van de 6 verdachten.
- 1 “eppendorf” tube met groene sticker met het restrictie-enzym is voor in de practicumzaal beschikbaar op een ijsblok (raadpleeg de CSI assistent)
- 1 grote tube met blauwe dop zal voor in de practicumzaal beschikbaar zijn met 35 milliliter agaroseoplossing (raadpleeg de CSI assistent)
- handschoenen in verschillende maten zullen voor in de practicumzaal beschikbaar zijn (raadpleeg de CSI assistent)
- plakband om de foto van je gel in te plakken is ook beschikbaar bij de CSI assistenten.

VOOR DE CHEMISCHE ANALYSE:

- 1 buret van 25 mL
- 1 pipet van 5 mL
- 3 erlenmeyers van 100 mL
- oplossingen van 0,100 M NaOH
- 1 bekeerglas + 1 trechter
- 4 indicator-oplossingen
- 5 te onderzoeken monsters
- detergentia en gedemineraliseerd water
- 3 veiligheidsbrillen
- toiletpapier
- liniaal
- rekenmachine
- klok of horloge

Materiaal dat je zelf dient mee te brengen:

- schrijfgerei (pen, potlood, papier)
- labjas

Mission I: Crime Scene Investigation - DNA fingerprinting.

Achtergrondinformatie

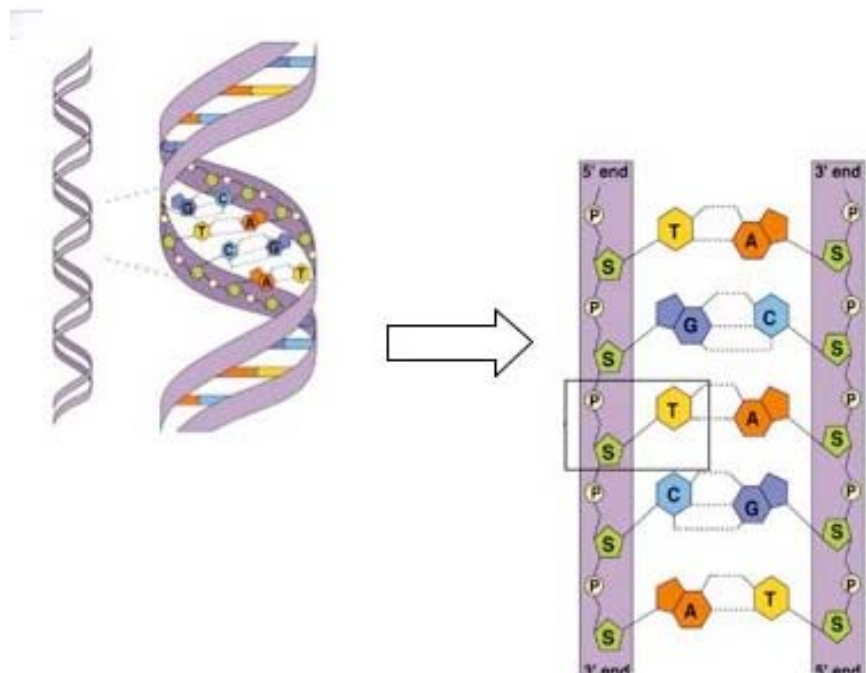
De structuur van DNA

De kenmerken van alle levende wezens, inclusief de mens, zijn voor een groot deel bepaald door de informatie die in hun DNA zit en dat ze overgeërfd hebben van hun ouders. De moleculaire structuur van DNA kan voorgesteld worden als een ritssluiting waarvan elke tand één van de 4 letters voorstelt (A, C, G, or T) en waarvan de tegenoverstaande tanden een paar vormen, A-T of G-C (baseparen). De letters A, C, G en T staan voor adenine, cytosine, guanine en thymine, de elementaire bouwstenen van DNA.

De informatie die in het DNA zit wordt voornamelijk bepaald door de sequentie van de basen langs de rits. De kenmerken van een mens zijn grotendeels het resultaat van de informatie in de DNA code. Organismen die er anders uitzien of die andere kenmerken hebben, hebben ook andere sequenties. Hoe meer de organismen van elkaar verschillen, hoe meer verschillend hun genetische code is.

De dubbele DNA helix kan als volgt voorgesteld worden:

(coderende streng) 5' CCACTCATATTTTCTTCAATGTCAA3'
 (complementaire streng) 3' GGTGAGTATAAAAGAAGTTACAGTT5'



DNA Fingerprinting (DNA Profiling)

Net zoals vingerafdrukken, die door detectives en politielaboratoria werden gebruikt in de jaren '30 heeft ieder mens een unieke DNA fingerprint. Gewone vingerafdrukken komen enkel voor op de vingertoppen en kunnen zelfs chirurgisch veranderd worden, maar DNA fingerprints zijn dezelfde voor elke cel, elk weefsel en elk orgaan van een bepaalde persoon. Als gevolg hiervan is DNA fingerprinting de belangrijkste methode voor het identificeren en het onderscheiden van personen geworden. DNA fingerprinting is bovendien een heel snelle manier om de DNA sequentie van 2 verschillende organismen te vergelijken.

DNA fingerprinting maakt gebruik van verschillende DNA segmenten waarin de sequentie van mens tot mens verschilt door mutaties. Wanneer deze segmenten dan geknipt worden met restrictie-enzymen ontstaan segmenten van een verschillende lengte. Wanneer het DNA van een individu gemuteerd is in de site die door het restrictie-enzym wordt herkend en geknipt, zal het DNA van dat individu dus niet geknipt worden op die plaats. Als gevolg daarvan zullen de fragmenten die ontstaan een lengte hebben die verschillend is aan die van een ander fragment, dat geknipt is met hetzelfde enzym. Deze fragmenten kunnen dan van elkaar gescheiden worden door gel-electroforese en een uniek bandenpatroon zal ontstaan. Deze banden kunnen gebruikt worden om een persoon te identificeren.

Technische info over DNA fingerprinting

1: DNA structuur

Gemiddeld Moleculair Gewicht van 1 nucleotide: 330 Dalton

1 pmol van een fragment DNA van 1kb (=1000Baseparen) (dubbelstrengig): 0,66µg

$N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

2: DNA restrictie.

Speciale enzymen die restrictie-enzymen worden genoemd worden gebruikt om DNA te knippen op specifieke plaatsen. Een restrictie-enzym herkent en knipt DNA enkel op een specifieke sequentie van nucleotiden. Wanneer deze sequentie 3 maal voorkomt in een lineaire DNA molecule zullen er door behandeling met het enzym dus 4 fragmenten ontstaan, elk met een bepaalde lengte. Bijna al deze restrictie-enzymen herkennen palindromische sequenties. Een palindroom verwijst naar een woord dat hetzelfde blijft als het van achter naar voor gelezen wordt. (bv. De naam Leon Noel). In DNA heeft een palindroom een verschillende betekenis omdat genomisch DNA dubbelstrengig is. Zo is bijvoorbeeld de restrictiesite van het enzym *EcoRI* dit palindroom:

5 ' GAATTC 3 '
3 ' CTTAAG 5 '

Voor een enkele streng is het 'omgekeerde complement' hetzelfde als de sequentie van de streng zelf. Dit betekent dat de sequentie van de complementaire streng van achter naar voor gelezen dezelfde is als de sequentie van de top streng.

AflIII, het enzym dat in jullie analyse gebruikt zal worden herkent de volgende palindromische sequentie:

5 ' ACRYGT 3 '
3 ' TGYRCA 5 '

R en Y betekenen dat het enzym meerdere nucleotiden op deze plaats herkent: R kan zowel A als G zijn en Y kan zowel C als T zijn.

3: Scheiden van DNA fragmenten en hun lengte bepalen: gel electroforese

De DNA fragmenten die bekomen worden na restrictie kunnen op basis van hun lengte van elkaar gescheiden worden door een techniek die electroforese wordt genoemd. De DNA fragmenten worden door een gel gestuurd die gemaakt is van agarose. (geleiachtig product dat uit zeewier wordt gehaald). De gel kan voorgesteld worden als een grote zeef waarvan de gaatjes kleiner

worden naar het einde toe. Als er elektrische stroom op de gel wordt gezet worden de DNA fragmenten erdoor gedreven. Kleinere partikels kunnen dan verder door de gel migreren dan de grotere, aangezien de grotere vast komen te zitten in de zeef. Na het lopen van de gel kunnen de DNA fragmenten zichtbaar gemaakt worden door een fluorescente stof die zich nestelt tussen de basen van het DNA. Deze stof wordt toegevoegd aan de gel voor hij wordt gemaakt en gelopen, maar wordt pas fluorescent door blootstelling aan UV licht. Daarom wordt de gel, na het lopen van de stalen op de gel, op een UV-transilluminator gelegd, dan kunnen de verschillende DNA fragmenten gezien worden als banden op de gel. Op deze manier wordt een restrictiepatroon van een bepaald DNA staal zichtbaar.

Organisatie en planning van de opdracht

Tijd (minuten)	Opdracht
0 – 30'	Lees de instructies en organiseer de groep om zo efficiënt mogelijk te werken. Er wordt aangeraden dat iemand van jullie team de chemische analyse doet, iemand anders de DNA fingerprinting en de laatste coördineert en analyseert de resultaten.
30' - 45'	Indien nodig, train jezelf om de micropipet te gebruiken. Gebruik de oranje oplossing om een paar microliters op te pipetteren en breng de druppel op de bodem van een eppendorf tube. Probeer dit een aantal keer om kleine volumes te leren manipuleren zonder luchtbellens te maken. Je kan ook proberen om een aantal druppels bij elkaar te brengen op de bodem van een eppendorf tube. (Probeer bv. 4+3+2+1 microliter samen te brengen en check of het totaal 10 microliter is) (raadpleeg de visuele gids)
45'-1h15	Assembleer de DNA restrictie reactie in de tubes. Zie protocol 1.1.
1h15-2h	Plaats de 7 monsters in de 37°C incubator. Gedurende deze 45 minuten zal het enzym het DNA knippen. Terwijl de reactie plaatsvindt kan je je electroforese gel al voorbereiden en gieten. (waarschuwing: gebruik handschoenen!) Zie protocol 1.2. (raadpleeg de visuele gids) Train jezelf om de oefengel te laden die gegeven is. (lees protocol 1.3) Gebruik de oranje oplossing. Het is de bedoeling om 10 microliter te laden in 1 well (putje) van de gel (de densiteit van de oplossing is zo dat de oplossing in de well zal 'vallen', je hoeft dus enkel de micropipet traag leeg te maken bovenaan in of vlak boven de well. Zorg ervoor dat alles in de well terecht komt en maak geen luchtbellens.
2h-2h30	Maak je monsters klaar en laad de electroforese gel (waarschuwing: gebruik handschoenen) Zie protocol 1.3 (raadpleeg de visuele gids)
2h30-3h00	Laat de electrophorese gel lopen (deze operatie zal voor jou uitgevoerd worden door een speciale CSI assistent). Terwijl de gel loopt kan je de vragen beantwoorden.
3h00-3h15	Haal de gel uit de electoforese bak (waarschuwing: draag handschoenen) en neem een foto van je gel (deze operatie zal voor jou uitgevoerd worden door een speciale CSI assistent) Waarschuwing: draag een masker wanneer je je gel aan UV blootstelt.
3h15-4h	Analyseer de resultaten en beëindig het oplossen van de vragen.

Protocol 1.1. Assembleren van de DNA restrictie reactie

Voor elk DNA monster moet een restrictie reactie geassembleerd worden in **deze volgorde** die het volgende bevat:

- 1) Water (x microliter, berekend zodat het totale volume 10 microliter is)
- 2) Buffer (Moet 5 maal verdund worden in het totale reactievolume)
- 3) DNA (gebruik 2 microliter, de exacte hoeveelheid zal je later berekenen)
- 4) Restrictie-enzym (gebruik 2 microliter)

Je mag eenzelfde micropipet gebruiken, maar dan dien je ze in water te spoelen na elke pipettering (1 maal op en neer pipetteren van 10 microliter water is voldoende).

Meng door het geheel voorzichtig op en neer te pipetteren (maak geen luchtbellen)

Incubeer de reacties door ze in een rekje in de 37°C incubator te plaatsen.

TIPS:

- Doe het water dat je gebruikt voor het spoelen van de micropipet in een aparte tube zodat het water voor de reactie niet verontreinigd.
- Vergeet niet om de tubes goed te sluiten vooraleer je ze incubeert

Protocol 1.2. Gieten van de electrophoresis gel (raadpleeg je visuele gids)

Waarschuwing: de agarose gel en de electroforese buffer bevatten een lage hoeveelheid van een mutagene stof (ethidium bromide). Draag handschoenen wanneer je deze gebruikt en veeg elke druppel die je morst onmiddellijk op. In geval van morsen, verwittig de dichtstbijzijnde assistent.

Je zal ongeveer 9 milliliter van de hete agarose oplossing op de glasplaat moeten gieten, waarop de oplossing dan kan stollen. Hiervoor doe je het volgende:

- 1) Plaats de glazen plaat op een vlak oppervlak.
- 2) Plaats de kam tussen de twee klemmen en plaats het geheel over de glasplaat, parallel met de kortste zijde op ongeveer 8-10mm van de rand. De kam moet loodrecht staan op de langste zijde. Alle 7 tanden van de kam moeten boven de glazen plaat staan. Deze tanden zullen 7 gaatjes maken in de gel (wells) waarin je later het DNA aanbrengt..
- 3) Plaats de drie kaartjes tussen de glazen plaat en de kam om een kleine ruimte ertussen te creëren.
- 4) Neem de kaartjes weg, maar laat de gecreëerde ruimte intact.
- 5) Doe handschoenen aan
- 6) Ga de tube met agarose halen bij de CSI assistent, deze bevat 25 ml hete, gesmolten agarose. Let op: ga de agarose niet te vlug halen want dan zal hij te vroeg stollen (na ongeveer 5 minuten). Als je de agarose bent gaan halen mag je hem niet meer terugbrengen.
- 7) Gebruik een Pasteur pipet om de agarose uit de tube op te zuigen en breng hem op de glazen plaat. De agarose mag niet van de plaat lopen en je moet ongeveer 9 ml gebruiken. Je kan best de agarose traag op de plaat brengen met de pipet kort bij de glazen plaat terwijl je de gel verspreid. Maak geen luchtbellen en wees voorzichtig dat je de druppel niet laat 'vallen' op de plaat. Start van aan de kam. De agarose moet een laag van uniforme dikte vormen (werk snel). Zorg ervoor dat de gel niet uit verschillende laagjes op elkaar bestaat.
- 8) Laat de gel stollen, dit duurt maximaal 10 minuten, de gel zal troebel worden in plaats van doorzichtig.
- 9) Voor je naar de electroforese tafel gaat: verwijder de kam door hem voorzichtig opwaards uit de gel te trekken.
- 10) Wanneer je de gel verplaatst om naar de electroforese te gaan: laat hem op de glazen plaat liggen

Eén gel is voldoende, maar er wordt genoeg agarose voorzien om er een tweede te proberen indien de eerste niet lukt. Hou er echter rekening mee dat de agarose zal stollen in de tube.

OPTION:

- **Wanneer je een probleem zou hebben met het gieten van de gel kan je er één vragen aan de supervisors die al werd klaargemaakt. Dit zal je toelaten om het experiment toch af te werken. Hou er echter rekening mee dat je dit 16,6% van de punten zal kosten.**
- **Wanneer je agarose al gestold is, maar je wil toch nog eens proberen om zelf een gel te maken kan je ook een verse tube gesmolten agarose vragen. Dit kost je dit 6,6% van de punten.**

Op jullie tafel ligt een informatieblad met foto's:

Foto 1: Het gebruik van micropipetten

Foto 2-4: Het maken van de electroforese gel

Foto 5: Het laden van de gel

Protocol 1.3. Voorbereiding van de stalen en laden van de gel voor electroforese

Na de 45 minuten incubatie haal je je stalen uit de incubator. Voeg 1 microliter van de gel-lading oplossing toe aan ieder staal en meng goed. Ga met de stalen en je gel op de glazen plaat naar de electroforese tafel en vraag de assistent om je te helpen (draag handschoenen!).

De assistent zal je aanwijzen in welke electroforesebak je je gel samen met de glazen plaat mag plaatsen. De gel moet loodrecht op de electrodes geplaatst worden. De buffer moet net over je gel vloeien. Laad de stalen op de gel met behulp van je micropipet.

Van links naar rechts moet je de stalen in deze volgorde laden:

DNA van op de plaats van de misdaad, en dan de stalen van de verdachten van 1 tot 6.

Vraag aan de assistent je electroforese te starten.

Laat de electroforese lopen tot de blauwe kleurstof de rand van de gel heeft bereikt. Let op dat het niet van de gel afloopt. Dit duurt niet langer dan 30 minuten. Wanneer dit punt is bereikt, waarschuw de assistent en ga naar de UV transillumintor. Laat je gel van de glazen plaat glijden en plaats hem op de illuminator en doe een masker aan. Je kan de gel kort bekijken. Dan zal de assistent een Polaroid foto nemen die je kan meenemen. Neem je gel van de illuminator en leg hem terug op de glazen plaat (neem hem mee naar je plaats en hou hem bij voor het geval de foto niet gelukt is). Wacht ongeveer een minuut vooraleer de foto te openen.

Waarschuwing: wees voorzichtig wanneer je je gel laadt. Jouw gel zal aan de ene kant van de box liggen, en dat van de andere groep aan de andere kant. Als je de gel van het andere team stoort zodat hun resultaat erdoor belemmerd wordt, zal uw team onmiddellijk gediskwalificeerd worden.

ANTWOORDFORMULIER

Team ID:

Q1: Hoeveel *AflIII* restrictiesites kan je vinden in de volgende sequentie? Omcirkel de sites.

A1: Aantal sites = _____

5' GCAGAGAACATGTCGAAGCGGCTCCTCTGAATGTACACCCTGGGATGTACAGTCAGAAGGCGGC
TCGCCC GGCGCTGGAGGAGCGAGCTAAGAGCAGTGGGGACGCGTGTACAAGATCAAAGAGGAGCAC
TTAAGGGACACGTTCGAGACAGGGCAGCCACGCGTGAATTCTGCCGG3'

Q2: Hoeveel andere enzymen dan *AflIII* knippen de bovenstaande sequentie? Neem enkel enzymen die een 6 baseparige palindromische sequentie herkennen in beschouwing. Onderstreep alle gevonden sites.

A2: Aantal andere restrictie enzymen = ____

Q3: Naar welke electrode migreert het DNA tijdens de electroforese?

A3: + electrode OF – electrode

Q4: Waarom migreert het DNA naar deze electrode? (omcirkel de goede antwoord(en))

- A4: Het is een base
 Het is een zuur
 Het is een complexe biologische molecule
 Het is positief geladen
 Het is negatief geladen
 Het is een lipide
 Het is een erg lang polymeer

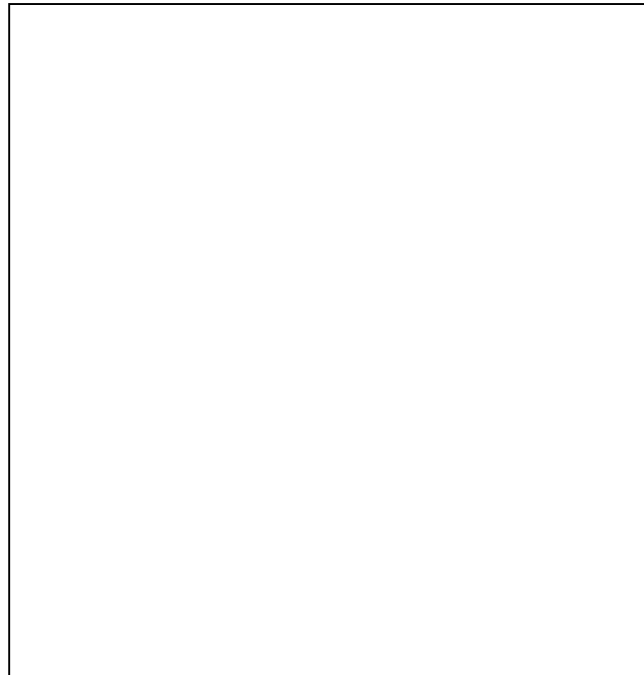
Q5: Wie was aanwezig op de plaats van de misdaad? (omcirkel het juiste antwoord(en))

- A5: Verdachte 1
 Verdachte 2
 Verdachte 3
 Verdachte 4
 Verdachte 5
 Verdachte 6
 Geen van deze

Q6: Kleef je foto in dit kadertje en noteer hoeveel banden je ziet voor elk staal

A6:

Staal	Aantal banden
Dader	
Verdachte 1	
Verdachte 2	
Verdachte 3	
Verdachte 4	
Verdachte 5	
Verdachte 6	



Q7: Vul deze table in, noteer hoeveel microliter van elk reagens je gebruikt hebt voor de restrictie reactie.

A7:

DNA	
Buffer	
Water	
Enzym	
Totaal	

Q8: Vanwege de urgentie van de missie heb je niet de tijd gehad om nauwkeurig te berekenen hoeveel DNA je gebruikt hebt voor de reacties. Herinner je dat je 2 microliter van elk DNA staal hebt gebruikt. Bereken nu het volgende:

A8: Vul in de tabel in hoeveel microgram DNA je gebruikt hebt in de verschillende digestiereacties. Weet dat de gemiddelde lengte van 1 DNA molecule 10.000 bp was en dat de concentraties van de verschillende stalen de volgende zijn:

Staal	1	2	3	4	5	6
Concentratie	500 ng/ μ L	$6,49 \times 10^{-8}$ M	$7,57 \times 10^{-2}$ pmol/ μ L	$6,01 \times 10^{-10}$ kg/ μ L	0,42 g/L	81,4 nM
Hoeveelheid (μg)						

Q9: Hoeveel DNA moleculen waren er aanwezig in je restrictiereactie, wetende dat het DNA van op de plaats van de misdaad een concentratie van 0,5 microgram per microliter had, en dat de lengte ervan 10724 baseparen was.

A9 = _____ DNA moleculen

Q9: Indien de concentratie van het restrictie enzym *AflIII* dat je gebruikt hebt 1.5 units per microliter is, en dat 1 unit correspondeert met de hoeveelheid enzym dat nodig is om 1 microgram DNA één maal te knippen gedurende 1 uur. Je hebt 1.0 microgram lineair DNA van de plaats van de misdaad gebruikt. Wat is dan de minimale hoeveelheid (in microliter) enzym dat je gebruikt had kunnen hebben om ervoor te zorgen dat het DNA volledig geknipt was.

A9 = _____ microliter

Mission II: Crime Scene Investigation - Chemical analysis.

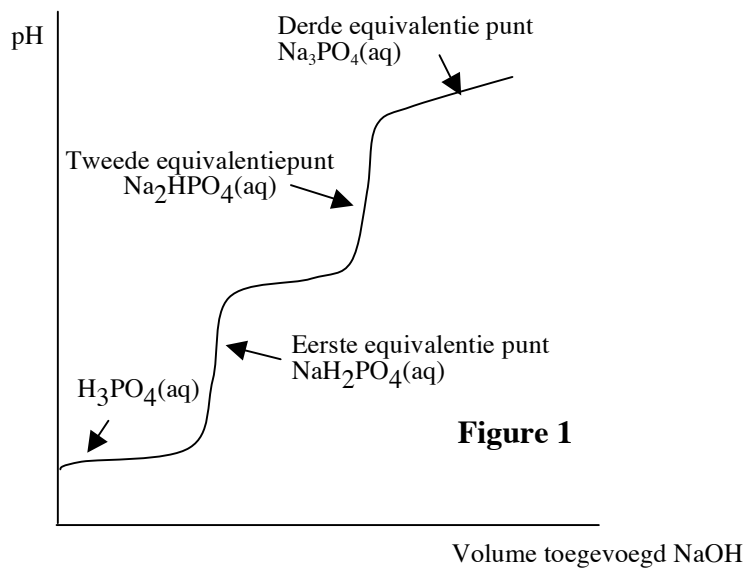
!!! Opgelet: de oplossingen zijn niet drinkbaar

2. Methode

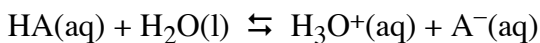
De concentratie aan fosforzuur van ieder specimen zal bepaald worden door titratie met 0,100 M NaOH oplossingen. Verschillende pH indicatoren zijn beschikbaar.

2.1 Voorbereidend werk

Om een geschikte pH indicator te kiezen moet men de pH waarden van de equivalentie punten van de titratie kurve (zie figuur 1) berekenen.



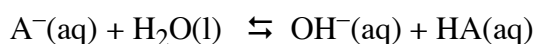
De pH van de equivalentiepunten kan geschat worden met behulp van de zuur dissociatie constanten.. Deze constanten zijn de evenwichtsconstanten voor de dissociatie van het zuur in waterig midden:



HA is het zuur en A^- is de geconjugeerde base. De zuur dissociatie constante K_a van deze reactie is

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

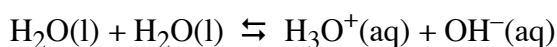
Men kan ook een base-protonatie constante K_b van een zwakke base A^- als volgt definiëren



$$K_b = \frac{[\text{OH}^-][\text{AH}]}{[\text{A}^-]}$$

A^- is het base en HA zijn geconjugeerd zuur.

De ion-product constante K_w van water is gedefinieerd aan de hand van volgend evenwicht (auto-protonatie of water)



$$K_w = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$$

Tabel 1 K_a , $\text{p}K_a$, K_b en $\text{p}K_b$ waarden van fosforzuur ($\text{p}K = -\log_{10} K$)

Zuur	K_a	$\text{p}K_a$	Geconjugeerde base	K_b	$\text{p}K_b$
H_3PO_4	$5,93 \times 10^{-3}$	2,23	H_2PO_4^-	$1,69 \times 10^{-12}$	11,77
H_2PO_4^-	$6,32 \times 10^{-8}$	7,20	HPO_4^{2-}	$1,58 \times 10^{-7}$	6,80
HPO_4^{2-}	$4,84 \times 10^{-13}$	12,32	PO_4^{3-}	$2,07 \times 10^{-2}$	1,68

Tabel 1

Dit betekent dat het H_2PO_4^- anion zuur is, terwijl de HPO_4^{2-} en PO_4^{3-} ionen basisch zijn.

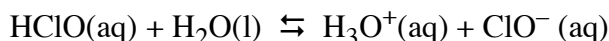
Noteer dat fosforzuur een triprotisch zuur is met opeenvolgende zuur dissociatie constanten ongeveer 10^{-5} maal de waarden van de vorige. Om deze reden kan men de tweede en derde dissociaties van H_3PO_4 (en de autoprototatie van H_2O) verwaarlozen bij de pH berekening van het eerste equivalentie punt met het zure H_2PO_4^- anion. Voor de pH berekening van het tweede en het derde equivalentie punt met de basische anionen HPO_4^{2-} en PO_4^{3-} kan men respectievelijk de eerste en de derde en de eerste en de tweede dissociaties van H_3PO_4 verwaarlozen.

Bij de equivalentie punten heeft men oplossingen van respectievelijk NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 en Na_3PO_4 .

Als voorbeelden van pH berekeningen van zure en basische ionen volgen hier twee pH berekeningen.

Voorbeeld 1 : pH berekening van een 0,05 M waterige oplossing van HClO (een zwak zuur)

De K_a waarde van een waterige oplossing van $\text{HClO}(\text{aq})$ is $3,0 \times 10^{-8}$ M. De evenwichts vergelijking is



De enige andere bron van $\text{H}_3\text{O}^+(\text{aq})$ komt van de autoprotontatie reactie van $\text{H}_2\text{O}(\text{l})$. Maar, omdat $K_a \gg K_w$, kunnen we in dit geval deze bron van $\text{H}_3\text{O}^+(\text{aq})$ verwaarlozen en volgende concentratie tabel opstellen voor de initiële en evenwichts concentraties van de stoffen in oplossing :

Concentratie	$\text{HClO}(\text{aq})$	+	$\text{H}_2\text{O}(\text{l})$	\rightleftharpoons	$\text{H}_3\text{O}^+(\text{aq})$	+	$\text{ClO}^-(\text{aq})$
Initieel	0,050 M		-		~0		0
Evenwicht	$0,050 \text{ M} - [\text{ClO}^-]$		-		$[\text{H}_3\text{O}^+]$		$[\text{ClO}^-]$
Evenwicht (substitutie $[\text{H}_3\text{O}^+]$ i.p.v. $[\text{ClO}^-]$)	$0,050 \text{ M} - [\text{H}_3\text{O}^+]$		-		$[\text{H}_3\text{O}^+]$		$[\text{H}_3\text{O}^+]$

Tabel 2

Combineren we de gegevens van deze tabel met de formule voor K_a , dan bekomen we

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{ClO}^-]}{[\text{HClO}]} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]^2}{0,050 \text{ M} - [\text{H}_3\text{O}^+]} = 3,0 \times 10^{-8} \text{ M}$$

We gebruiken de methode van opeenvolgende benaderingen om deze vergelijking op te lossen. Verwaarlozing van $[\text{H}_3\text{O}^+]$ t.o.v. 0,050 M, geeft de eerste benaderde oplossing:

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \sqrt{(0,050 \text{ M})(3,0 \times 10^{-8} \text{ M})} = 3,9 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Omdat $[\text{H}_3\text{O}^+]$ zeer klein is t.o.v. 0,050 M, geeft de tweede benadering dezelfde waarde van $[\text{H}_3\text{O}^+]$ als de eerste benadering: in het bijzonder

$$\frac{[\text{H}_3\text{O}^+]^2}{0,050 \text{ M} - 3,9 \times 10^{-5} \text{ M}} = 3,0 \times 10^{-8} \text{ M}$$

en

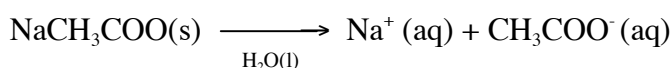
$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \sqrt{(0,050 \text{ M} - 3,9 \times 10^{-5} \text{ M})(3,0 \times 10^{-8} \text{ M})} = 3,9 \times 10^{-5} \text{ M}$$

De pH van de oplossing is

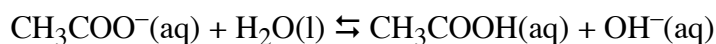
$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+] = -\log (3,9 \times 10^{-5}) = 4,41$$

Voorbeeld 2 : pH berekening van een 0,05 M waterige oplossing van NaCH_3COO .

Wanneer men $\text{NaCH}_3\text{COO}(\text{s})$ oplost in water, worden gesolvateerde natrium en acetaat ionen geproduceerd



De natrium ionen zijn neutraal, zodat ze niet met $\text{H}_2\text{O}(\text{l})$ reageren; maar de acetaat ionen, geconjugeerde basen van een zwak zuur, zijn basisch en reageren als volgt



$K_b = 5,75 \times 10^{-10} \text{ M}$ voor deze reactie. Omdat $K_a \gg K_w$, verwaarlozen we in dit geval $\text{H}_3\text{O}^+(\text{aq})$ afkomstig van de autoprotontatie reactie van water and noteren

Concentratie	$\text{CH}_3\text{COO}^-(\text{aq})$	+	$\text{H}_2\text{O}(\text{l})$	\rightleftharpoons	$\text{CH}_3\text{COOH}(\text{aq})$	+	$\text{OH}^-(\text{aq})$
Initieel	0,050 M		-		0		$\square 0$
Evenwicht	$0,050 \text{ M} - [\text{CH}_3\text{COOH}]$		-		$[\text{CH}_3\text{COOH}]$		$[\text{OH}^-]$
Evenwicht (substitutie [OH ⁻] voor [CH ₃ COOH])	$0,050 \text{ M} - [\text{OH}^-]$		-		$[\text{H}_3\text{O}^+]$		$[\text{OH}^-]$

Tabel 3

De uitdrukking voor K_b is

$$5,75 \times 10^{-10} \text{ M} = \frac{[\text{OH}^-]^2}{0,050 \text{ M} - [\text{OH}^-]}$$

Verwaarlozing van $[\text{OH}^-]$ t.o.v. 0,050 M, geeft

$$[\text{OH}^-] = (0,050 \text{ M} \times 5,75 \times 10^{-10} \text{ M})^{1/2} = 5,4 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Wat te verwaarlozen is t.o.v 0,050 M, zoals kan bevestigd worden door opeenvolgende benaderingen. De pOH kan men bekomen vanuit de $[\text{OH}^-]$ waarde :

$$\text{pOH} = -\log[\text{OH}^-] = -\log(5,4 \times 10^{-6}) = 5,27$$

De pH van de oplossing is

$$\text{pH} = 14,00 - \text{pOH} = 8,73$$

Taak 1

Bereken de pH van de 3 equivalentie punten van de titratie of 0,100 M fosforzuur met 0,100 M NaOH.

Taak 2

Keuze van een indicator. Er zijn 4 indicatoren ter beschikking. Het pH domein van de kleur verandering en de kleur verandering is opgegeven in tabel 4.

Indicator	pH domein	kleur verandering	Kleur verandering
1) Methyl oranje (M.O.)	3,1 – 4,4		rood naar oranje
2) Methyl rood (M.R.)	4,4 – 6,2		rood naar geel
3) Broomthymol blauw (B.T.B.)	6,2 – 7,6		geel naar blauw
4) Fenolftaleine (f.f.)	8,0 – 10,0		kleurloos naar paarsrood

Tabel 4

Welke indicator kiest U voor het eerste en het tweede equivalentiepunt? Duid het indicator nummer aan in het antwoordformulier.

Om kwantitatief de concentratie van zuur te bepalen moet u het equivalentie punt kiezen .

Taak 3

Keuze van het equivalentiepunt en motivatie van de keuze. Selecteer het gepaste antwoord in het antwoordformulier.

2.2. Titraties

Materiaal waarover u beschikt :

- 1 buret van 25 mL
- 1 pipet van 5 mL
- 3 erlenmeyers van 100 mL
- Oplossing van 0,100 M NaOH
- 1 beker + 1 trechter
- 4 indicator oplossingen
- 5 specimen met onbekende concentratie
- Detergenten en gedemineraliseerd water
- Veiligheidsbrillen
- Toiletpapier

Taak 4

Bepaal de concentratie fosforzuur in de 5 onbekende oplossingen. Voer 3 titraties per onbekende uit.. Rapporteer in het antwoord formulier voor iedere onbekende oplossing het volgende :

- ingezet volume van onbekende oplossing
- toegevoegd volume van NaOH (3 metingen en hun gemiddelde)
- concentratie fosforzuur

Taak 5

Identificeer de oplossing(en) aan dewelke fosforzuur werd toegevoegd door de indringer. Hoeveel zuur (in kg per lot) heeft hij toegevoegd?

Taak 6

Hoe zou je het overtollige fosforzuur neutraliseren in elk lot zodat de nieuwe drank de oorspronkelijke zuurgraad krijgt. Welke van de volgende oplossingen zou je gebruiken om het weer drinkbaar te maken: $\text{NH}_3(\text{aq})$, CaCO_3 , NaOH, KOH, of NaHCO_3 ?

Geef de chemische formule van de neutraliserende oplossing, zijn concentratie en de totale hoeveelheid in kg voor elk lot. Het volume van de neutraliserende oplossing moet 10% van het volume van het lot bedragen.

ANTWOORD FORMULIER

Team ID:

Taak 1: pH van de 3 equivalentie punten

1. Equivalentie punt 1 pH:
- Equivalentie punt 2 pH:
- Equivalentie punt 3 pH:

Taak 2: Keuze van de indicator

2. Equivalentie punt 1 indicator n°
- Equivalentie punt 2 indicator n°

Taak 3: Keuze van het equivalentie punt

- 3.1 Equivalentie punt eerste
- tweede
- derde

Motivatie

- 3.2 Een kleiner volume van titratie agent (NaOH) is beter
- Een groter volume van titratie agent is beter
- Er kan een betere kleurverandering vastgesteld worden

Taak 4: Titraties

Onbekende oplossing	Volume onbekende ingezet	Volume NaOH toegevoegd	Concentratie fosforzuur
1 mL	1 M
 mL	2	
 mL	3	
	gemiddelde mL	
2 mL	1 M
 mL	2	
 mL	3	
	gemiddelde mL	
3 mL	1 M
 mL	2	
 mL	3	
	gemiddelde mL	
4 mL	1 M
 mL	2	
 mL	3	
	gemiddelde mL	
5 mL	1 M
 mL	2	
 mL	3	
	gemiddelde mL	

ANTWOORD FORMULIER

Team ID:

Taak 5: Identificatie van de lot aan dewelke fosforzuur was toegevoegd

5.	Lot n°	Fosforzuur werd toegevoegd	Totale massa toegevoegd zuur
	1	<input type="checkbox"/> kg
	2	<input type="checkbox"/> kg
	3	<input type="checkbox"/> kg
	4	<input type="checkbox"/> kg
	5	<input type="checkbox"/> kg

Taak 6: Neutralisatie van het fosforzuur in overmaat

6.	Lot n°	Neutralisatie stof	Concentratie	Totale massa neutralisatie stof
	1	 M kg
	2	 M kg
	3	 M kg
	4	 M kg
	5	 M kg

Tijdsschema (min)	Acties
0 – 30'	Lees de instructies en organiseer uw team voor een efficiënte werking. Er wordt aanbevolen dat een lid van uw CSI team de chemische analyses van de loten uitvoert, een andere kan starten met de DNA vingerafdrukken en de laatste kan het werk coördineren en de resultaten analyseren.
30' - 1u00	Berekening van de pH van de equivalentie punten en keuze van de indicator en het equivalentie punt. Indien u de pH berekening niet kunt uitvoeren dan kan u de resultaten na 1u00 bekomen; u bekomt dan wel geen punten voor taak 1. Maak u vertrouwd met de titratie instrumenten. Een voorbereidende titratie voor de bepaling van de kleuromslag bij het equivalentie punt wordt aanbevolen.
1u00'-3u30	Titraties van de 5 onbekende oplossingen, je hebt ongeveer 30 minuten per oplossing nodig.
1u30-3u45	Berekeningen van de concentraties van de onbekende oplossingen, de totale massa van het aan de lots toegevoegde zuur en de totale massa van de neutraliserende stof. Doe deze berekeningen voor iedere oplossing na de titraties.
3u30-4u00	Rapportering van de resultaten en invullen van het antwoord formulier.