

Synthetische biologie in de praktijk

iGEM TU Eindhoven 2016



Doelgroep: HAVO/VWO bovenbouw

Vakgebied: Biologie

Tijdsduur: ± 40 minuten

Inleiding

Synthetische biologie is het (her)programmeren van een biologisch systeem (cellen of bacteriën) zodat deze een specifieke taak verrichten. Dit wordt bereikt door de genetische informatie (DNA) van de cellen aan te passen. Er wordt voorspeld dat deze genetische modificatie een enorme impact hebben op de huidige maatschappij. Echter, het krijgt nog niet de aandacht die het nodig heeft op scholen volgens ons. Het duurt namelijk een tijd voordat informatie in biologie- en scheikundeboeken terecht komt. Dat is de reden dat wij deze les gemaakt hebben. Het is belangrijk voor kinderen om al vroeg op de hoogte te zijn over synthetische biologie en hier een mening over te vormen. In deze les wordt al aanwezige kennis die opgedaan kan zijn via de les, maar ook via de (sociale) media gecombineerd.

Deze les is gemaakt door studenten uit het iGEM team van de Technische Universiteit Eindhoven. De iGEM competitie is een studentencompetitie op het gebied van synthetische biologie. Aan de editie van 2016 doen 304 teams van over de hele wereld mee. Naast het werk dat ons team uitvoert in het lab is een belangrijk onderdeel van de competitie het naar de maatschappij brengen en toegankelijk maken van synthetische biologie. Met deze les proberen wij dat te doen.

Dit lessenpakket bestaat uit een PowerPoint presentatie waaruit duidelijk wordt wat synthetische biologie is en wat het te maken heeft met de dingen die de leerlingen al weten en een werkblad met vragen over de stof uit de PowerPoint. Het is de bedoeling dat de opdrachten tussen de PowerPoint presentatie door gemaakt worden, daarom staan de antwoorden van het werkblad in de slides en is er dus geen uitwerking van het werkblad.

Voor de centrale pagina van het lespakket, waar de PowerPoint presentaties, werkbladen en uitwerkingen van de werkbladen zijn te vinden, bezoek onze site! (http://2016.igem.org/Team:TU-Eindhoven/Lesson_package)

Inhoudsopgave

- PowerPoint presentatie
- Werkblad
- Tips

PowerPoint presentatie

Hieronder staan de slides van de PowerPoint presentatie met daarnaast extra toelichting wat er verteld kan worden. De PowerPoint presentatie is te downloaden via [deze](#) link.

Slide 1



This is a special class about synthetic biology. Dit is een special les over synthetische biologie. Deze les is gemaakt door het TU/e iGEM team 2016.

Het doel van deze les is om de basis achtergrond kennis van synthetische biologie bij te brengen en vervolgens iets dieper in te gaan op de praktijk.

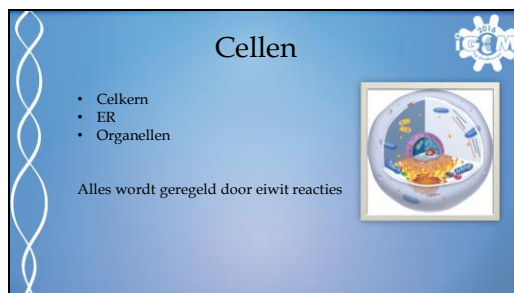
Slide 2



Niet iedereen weet wat synthetische biologie is. Genetische modificatie doet meestal wel een belletje rinkelen. Genetische modificatie is het aanpassen van het DNA van een organisme. Synthetische biologie doet dit ook, bij cellen en bacteriën, zodat deze bepaalde taken verrichten. Zo kunnen bacteriën dienen als fabriekjes voor eiwitten en gassen. Met T-cellen kunnen specifieke antilichamen gemaakt worden.

Synthetische biologie richt zich ook op het ontrafelen van de vele reacties die in de cel plaats vinden.

Slide 3

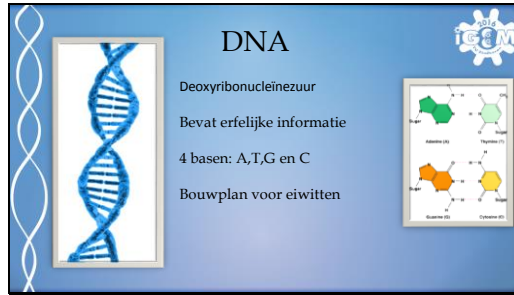


Organismen bestaan uit heel veel cellen. Deze cellen hebben allemaal een celkern met daarin het DNA (behalve rode bloedcellen), het endoplasmatisch reticulum en vele organellen. (mitochondrium, golgi systeem, vesicles.)

Welke delen van het DNA worden afgelezen bepaald uiteindelijk wat voor eiwitten er in de cel worden gemaakt.

Hoe bepaald wordt welk DNA er gelezen wordt en welke eiwitten er gemaakt moeten worden, wordt allemaal geregeld door reacties in de cel.

Slide 4

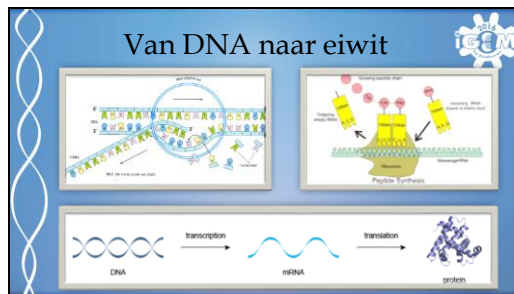


DNA staat voor deoxyribonucleïnezuur. Het DNA is eigenlijk een soort boek waar alle informatie instaat die een organisme nodig heeft om te overleven. In plaats van letters en woorden staat de informatie opgeschreven in basen en codons.

Het DNA kent 4 basen: Adenine, Thymine, Guanine en Cytocine. DNA bestaat uit 2 strengen die tegen over elkaar liggen en gedraaid zijn in een helix vorm. Tegenover een A komt altijd een T en tegenover een G komt altijd een C.

3 basen vormen samen een codon, wat uiteindelijk vertaald kan worden naar een aminozuur. DNA bevat eigenlijk alle bouwplannen voor de eiwitten die de cel nodig heeft.

Slide 5



In deze slide wordt de kennis over transcriptie en translatie even opgefrist.

Er komt een signaal de cel binnen dat een bepaald eiwit gemaakt moet worden. Een DNA polymerase gaat naar de promotor van het gen en gaat het DNA aflezen.

De DNA polymerase haalt de twee strengen een stukje uit elkaar om een kopie te kunnen maken. Deze kopie is niet gemaakt van het zelfde materiaal als DNA, maar van RNA (ribonucleïnezuur). RNA bevat niet de base T maar de base U. Het kopie wordt Messenger RNA genoemd, omdat het de boodschap (het bouwplan van het eiwit) van de celkern naar het cytoplasma brengt.

In het cytoplasma (of ER) bevinden zich ribosomen. Ribosomen kunnen het Messenger RNA aflezen en het vertalen naar een aminozuur volgorde.

Dit doet het ribosoom met T-RNA. T-RNA' zijn de link tussen de genetische code en het eiwit. Elk T-RNA bevat een condon code en het bijbehorende aminozuur.

De aminuzeren vormen samen het eiwit.

Slide 6



Bacteriën worden in de synthetische biologie gebruikt om eiwitten te maken.

Bacteriën zijn organismen die uit maar 1 cel bestaan. Bacteriën planten zich niet voort door het DNA van 2 organismen te combineren, maar door zich te delen.

Om toch genoeg genetische variantie te kunnen ontwikkelen, kunnen bacteriën onderling delen DNA uitwisselen. Dit DNA worden plasmiden genoemd. Een plasmide is een stuk circulair DNA dat onder ander antibiotica bevat. Naast plasmiden hebben bacteriën ook lineair DNA. Dit bevindt zich los in de cel, bacteriën hebben geen celkern.

Slide 7



Nu de basis achtergrond kennis van synthetische biologie is opgefrist, is het tijd voor meer diepgang. Wat komt er bij kijken wanneer je zelf in een laboratorium aan de slag gaat om met een bacterie een eiwit te maken?

(de stappen zijn versimpeld om het begrijpelijk en leuk te houden voor alle leerlingen)

Het begint punt is het gen van het eiwit en een plasmide met kanamycine resistentie.

Eerst moet er een plasmide met het gen voor het eiwit worden gemaakt.

Slide 8

Knippen

Knippen van het gen en de plasmide

Twee restrictie enzymen bijvoorbeeld:

- HindIII
- BamHI

De plasmide en het gen moeten worden geknipt, zodat ze daarna in elkaar passen.

Hiervoor hebben het gen en de plasmide dezelfde knip sequenties nodig. Deze specifieke DNA sequenties worden herkend door restrictie enzymen, die het DNA door knippen.

Om het gen en de plasmide in elkaar te kunnen laten passen, moeten ze met dezelfde enzymen geknipt worden.

Slide 9

Knippen opgaven

Onderdeel	Benodigde massa/concentratie	Eind volume
DNA van gen (200 ng/ µL)	3 µg	15 µL
10x CutSmart buffer	1x	5 µL
Restrictie enzym BamHI (20 U/ µL)	10 U	0,5 µL
Restrictie enzym HindIII (20 U/ µL)	10 U	0,5 µL
H ₂ O		29 µL
Total		50 µL

Alle opgaven staan op het werkblad. In de slides staan de versimpelde versies om de antwoorden weer te kunnen geven.

Antwoorden van de tabel:

$$3000/200 = 15$$

$$10/20 = 0,5$$

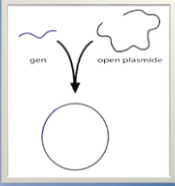
$$50 - (15 + 5 + 0,5 + 0,5) = 29$$

Slide 10

Plakken

Aan elkaar plakken van het gen en de open plasmide

Geeft een dichte plasmide met het gen



The diagram shows a wavy line representing a gene and a circular line representing an open plasmid. Arrows point from both towards a central point where they meet. Below this, a circular plasmid is shown with a wavy line inside it, representing the recombinant plasmid.

Nu het gen en de plasmide met dezelfde enzymen zijn geknipt, passen ze in elkaar en kunnen ze aan elkaar worden geplakt.

Het resultaat is een plasmide met het gewenste gen erin.

Slide 11

plakken opgaven

Waarom wordt er bij de digestie met twee verschillende restrictie enzymen geknipt, en niet met één?

Wanneer er maar één restrictie enzym gebruikt wordt, kan de vector dichtgaan zonder dat het gen erin zit.



The diagram shows a DNA double helix with two different restriction sites. The first site is GATCGGAT (overhangs: GTGCA, CACGTTGGA) and the second is CAATC (overhangs: ATACG, TAGGCTAG). Red lines indicate the cut sites. Below, a circular plasmid is shown with a wavy line inside it, representing the recombinant plasmid.

opgaven

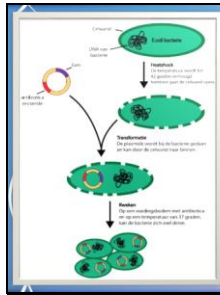
Slide 12

Plan van aanpak

- Een plasmide maken met het gen erin ✓
- Bacteriën maken met de plasmide erin
- Controleren van plasmide
- Eiwitten produceren

De eerste stap is uitgevoerd. De tweede stap is het inbrengen van de plasmide in een bacterie.

Slide 13



Transformatie

Bacteriën een heat shock geven
Plaat de bacteriën uit
Laat ze s' nachts delen

The diagram illustrates the transformation process in four stages: 1. 'Cellen' (Cells) showing a plasmid being introduced into a bacterial cell. 2. 'Heat shock' where the cell membrane becomes more permeable. 3. 'Transformatie' where the plasmid is integrated into the bacterial genome. 4. 'Kolonies' where the transformed cells grow into colonies on a petri dish.

Tijdens de transformatie wordt de plasmide in de bacteriën gebracht.

Om dit te kunnen doen geven we de bacteriën eerst een heat shock. Dit doen we door de bacterie eventjes op 42 graden te brengen.

Door de heat shock gaat de celwand iets open staan. Nu is het voor de plasmide mogelijk om de bacterie binnen te gaan.

Vervolgens platen we de bacteriën uit op een petrischaaltje. In het petrischaaltje zit de antibiotica kanamycine, zodat alleen onze bacterie kan overleven. We laten de plaat de hele nacht op 37 graden staan, zodat de bacteriën veel kunnen delen.

Slide 14



Transformatie opgaven

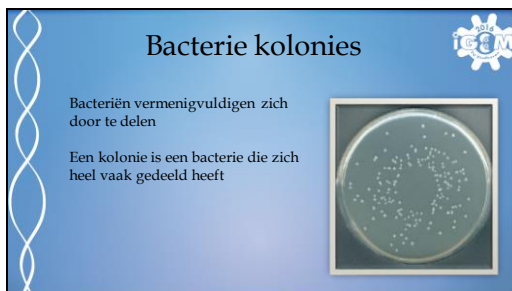
Wat is de functie van de heat shock?
Door de heat shock gaat de bacterie celwand open en kan de plasmide naar binnen.

Waarom is het belangrijk dat de voedingsbodem antibiotica bevat?
Anders zouden andere bacteriën, en ook de bacteriën waar de transformatie niet bij gelukt is, zich kunnen vermenigvuldigen.

Wat denk je dat er zou gebeuren bij de transformatie wanneer de ligatie niet gelukt is?
Dan bevatten de bacteriën niet de plasmide met de juiste antibiotica resistentie. Er zullen geen bacteriën groeien.

opgaven


Slide 15



Bacterie kolonies

Bacteriën vermenigvuldigen zich door te delen

Een kolonie is een bacterie die zich heel vaak gedeeld heeft



The image shows a petri dish with a dark agar surface. Numerous small, white, circular bacterial colonies are scattered across the surface, representing the result of a successful transformation and growth.


De volgende dag zijn er op de plaat allerlei puntjes ontstaan. Dit noemen we kolonies.

Wat is er gebeurd?

Tijdens het uitplaten hebben we tientallen bacteriën over de plaat uitgesmeerd. Deze bacteriën hebben zich s' nachts heel vaak gedeeld. Hierdoor is elke bacterie uitgegroeid tot een hoopje bacteriën, die voor het menselijk oog zichtbaar zijn.

Vanwege de antibiotica kunnen alleen de bacteriën met ons plasmide overleven op de plaat.

Slide 16

Bacterie kolonies opgaven 


Hoe ontstaat een kolonie?
Wanneer 1 bacterie zich heel vaak deelt, worden deze bacteriën zichtbaar. Dit noemen we een kolonie.

Waarom is de vorming van kolonies zo handig voor het onderzoek?
Een kolonie is heel vaak dezelfde bacterie (dezelfde plasmide) hierdoor gaan we dus verder met één plasmide.

Waarom wordt de plaat vervolgens in de koelkast bewaard?
Op 4 graden zullen de bacteriën niet meer delen. De plaat groeit dus niet vol en is zo even te bewaaren.

opgaven

Slide 17


Bacteriën kweken 

Voor ongeveer 5 kolonies wordt er een kweek ingezet.

Een kweek bevat:

- LB medium (voedingstoffen)
- Antibiotica
- Bacterie kolonie


De kweekjes worden een hele nacht op 37 graden geschut.



Nu moeten we proberen zoveel mogelijk bacteriën te krijgen. Dit doen we door ze te kweken.

Van de plaat halen we een aantal kolonies en doen ze met LB-medium en weer antibiotica in een erlenmeyer. De kweekjes laten we de hele nacht op 37 graden staan. In de 37 graden incubator worden ze ook geschut.

Slide 18



Bacteriën kweken opgaven

- Een bacterie deelt elke 20 minuten
- Je begint met 50 bacteriën
- Je wilt 5 miljoen bacteriën hebben

Hoelang moet de kweek blijven staan?


$N = B \cdot 2^{t/20}$

$50 \cdot 2^{t/20} = 5.000.000 \quad 2^{t/20} = 100.000 \quad t = \ln(100.000) / \ln(2) = 16.6$

$16.6 \cdot 20 \text{ minuten} = 332 \text{ minuten} = 5 \text{ uur en } 32 \text{ minuten}$


Waarom is het nodig dat de buisjes geschut worden?

Door het schudden worden de voedingsstoffen en bacteriën beter verdeeld in het medium. Het belangrijkste van het schudden is dat de bacteriën genoeg zuurstof krijgen.




opgaven

Slide 19




Plan van aanpak

- Een plasmide maken met het gen erin ✓
- Bacteriën maken met de plasmide erin ✓
- **Controleren van plasmide**
- Eiwitten produceren




Nu hebben we bacteriën met ons plasmide erin. Althans, dat hopen we. De volgende stap is het controleren van de plasmide in de gekweekte bacteriën.

Slide 20



Plasmide zuivering => DNA sequensen

- Houden alleen de plasmiden over
- Controleren of gen daadwerkelijk in de plasmide zit
- Opsturen voor sequensen
- Dit wordt door gespecialiseerde bedrijven gedaan



Door plasmide zuivering toe te passen op de helft van de kweek, houden we heel veel plasmiden over.

De plasmiden kunnen we opsturen voor sequencing. Door deze techniek kunnen we de exacte basepaar sequentie van ons plasmide achterhalen en controleren of het gen erin zit.

Slide 21

DNA sequensen Sanger methode

In elk buisje 4 gewone basen
In elk buisje 1 gekleurde base
Het DNA wordt niet verlengt als een gekleurde base is ingebouwd

DNA aanmaak richting →

buisje met gekleurde G	buisje met gekleurde C	buisje met gekleurde T	buisje met gekleurde A
ATGCTAGACG TACG	ATGCTAGACG TAC	ATGCTAGACG T	ATGCTAGACG T
ATGCTAGACG TACGATCTG	ATGCTAGACG TACGATC	ATGCTAGACG TACG	ATGCTAGACG TACGAT
	ATGCTAGACG TACGATCTGC	ATGCTAGACG TACGATC	ATGCTAGACG TACGATCT

DNA sequencing

Het DNA wordt eerst kort verwarmd, hierdoor laten de twee strengen los. DNA polymerase bindt aan een van de strengen en maakt de tegenoverliggende streng aan. Tijdens de sequencing zijn er in elk buisje 1 gekleurde base variant toegevoegd. Wanneer de DNA polymerase een gekleurde base inbouwt, dan kan er geen volgende base meer ingebouwd worden en stopt de DNA polymerase met het aanmaken van het DNA.

Door dit heel vaak te doen krijg je heel veel DNA stukjes van verschillende lengten. Door dit op een gel te scheiden op basis van grootte, is de sequentie te achterhalen.

Slide 22

DNA sequensen opgave

Wat is de basenpaar sequentie?

CGCGATTACGTC

opgave

Slide 23



Slide 23: Plan van aanpak

- Een plasmide maken met het gen erin ✓
- Bacteriën maken met de plasmide erin ✓
- Controleren van plasmide ✓
- Eiwitten maken

The slide features a blue background with a white DNA double helix on the left and the iGEM 2016 logo in the top right corner.

Nu we de plasmide hebben gecontroleerd kunnen we onze bacterie de eiwitten laten maken.

Slide 24



Slide 24: Eiwitten maken

DNA gen wordt afgelezen
Heel veel eiwit wordt gevormd

The slide features a blue background with a white DNA double helix on the left and the iGEM 2016 logo in the top right corner.

Door een stofje toe te voegen aan onze bacterie kweek, wordt de aanmaak van eiwit gestimuleerd. Hierdoor maken de bacteriën heel veel van ons eiwit aan.

Slide 25



Slide 25: Eiwit zuivering


Alleen het pure eiwit blijft over
Testen van het eiwit
Resultaten beschrijven

The slide features a blue background with a white DNA double helix on the left and the iGEM 2016 logo in the top right corner.

Vervolgens kunnen we de eiwitten uit de kweek opzuiveren. We houden dan alleen ons pure eiwit over.

Het eiwit kan dan getest worden. Hier kun je uiteraard een verslag over schrijven als een echte onderzoeker.

Slide 26



Plan van aanpak


- Een plasmide maken met het gen erin ✓
- Bacteriën maken met de plasmide erin ✓
- Controleren van plasmide ✓
- Eiwitten maken ✓



Dit waren alle stappen om een bacterie een eiwit te laten maken.

Natuurlijk is het niet altijd zo makkelijk. Ook kan er in het laboratorium een keer iets fout gaan en moeten dingen overnieuw.

Slide 27




Geïnteresseerd?

iGEM is een jaarlijkse wereldwijde competitie in de synthetische biologie.

Honderden teams werken aan hun eigen project.

Alle teams komen in oktober samen in Boston om hun resultaten te laten zien.

Meer informatie:
www.igem.org
<http://2016.igem.org/Team:TU-Eindhoven>



Werkblad Synthetische biologie in de praktijk

Digestie

Om het DNA van je gen in een plasmide te brengen, moeten het gen en de plasmide met dezelfde restrictie enzymen geknipt worden.

Vraag 1

Hieronder zie je een deel van een digestie protocol. Het DNA van het gen moet aan beide kanten geknipt worden. We voegen het DNA, de restrictie enzymen en een buffer, om voor de juiste omstandigheden te zorgen, bij elkaar in een pcr epje.

Om de juiste hoeveelheden bij elkaar te doen, moet de tabel verder ingevuld worden.

Onderdeel	Nodige massa/concentratie	Eind volume
DNA van gen (200 ng/ μL)	3 μg	... μL
10x CutSmart buffer	1x	5 μL
Restrictie enzym BamHI (20 U/ μL)	10 U	... μL
Restrictie enzym HindIII (20 U/ μL)	10 U	... μL
H ₂ O		... μL
Total		50 μL

Het water wordt gebruikt om het eindvolume aan te vullen tot 50 μL .

Micro (μ) = 10^{-6}

Nano (n) = 10^{-9}

U betekent actieve eenheden.

Vraag 2

BamHI en HindIII zijn restrictie enzymen. Restrictie enzymen knippen het DNA bij een specifieke sequentie.



De onderstaande DNA streng wordt geknipt met beide restrictie enzymen.

ATCTTAGGCTAAGGATCCGCCATTGGTCATTAGGCGAAGCTTATAGCG
TAGAATCCGATTCCTAGGCGGTAACCAGTAATCCGCTTCGAATATCGC

2a) Waar knippen de restrictie enzymen? Teken dit in de bovenstaande DNA sequeentie.

2b) Hoeveel baseparen lang is het geknipte stuk, als je alleen het dubbelstrengs gedeelte meetelt?

.....

Ligatie

Bij ligatie worden het geknipte gen en de open geknipte plasmide aan elkaar geplakt.

Vraag 1

Welke stukken DNA passen in elkaar?

GTGCA	GATCCGTAT
CACGTTCGA	GCATA

ATACG	CAATC
TATGCCTAG	CATGGTTAG

TAACGGTAC	AATTCGTAA
ATTGC	GCATT

GATCG	AGCTTCTGG
CTAGCTTAA	AGACC

Vraag 2

Waarom wordt de digestie met twee verschillende, en niet met één restrictie enzym, gedaan?

.....

.....

Transformatie

Tijdens de transformatie wordt de plasmide in de bacterie gebracht.

Vraag 1

Wat is de functie van de heat shock?

.....

.....

Vraag 2

Waarom is het belangrijk dat de voedingsbodem (de juiste) antibiotica bevat?

.....

.....

Vraag 3

Wat verwacht je dat er gebeurt bij de transformatie als de ligatie niet gelukt is, de open plasmiden en het gen zijn nog los van elkaar?

.....

.....

Kolonie vorming

Vraag 1

Hoe ontstaat een kolonie?

.....

.....

Vraag 2

Waarom is het extra handig voor het onderzoek dat bacteriën kolonies vormen?

.....

.....

Vraag 3

Waarom wordt de plaat, na enkele kolonies te hebben gepakt in de koelkast bewaard?

.....

.....

Kweek inzetten

Vraag 1

Bacteriën planten zich niet voort zoals zoogdieren dat doen, maar vermenigvuldigen zich door te delen. Onder de juiste omstandigheden deelt een bacterie zich elke 20 minuten.

Stel je wilt na de kweek 5 miljoen bacteriën hebben. Je gokt dat je begint met 50 bacteriën in de kweek. Hoelang moet je de kweek dan laten staan?

.....

Vraag 2

De buisjes worden tijdens het kweken van de bacteriën in een 37 graden incubator gezet. Deze incubator schut de buisjes op en neer. Waarom is het nodig dat de buisjes geschut worden?

.....

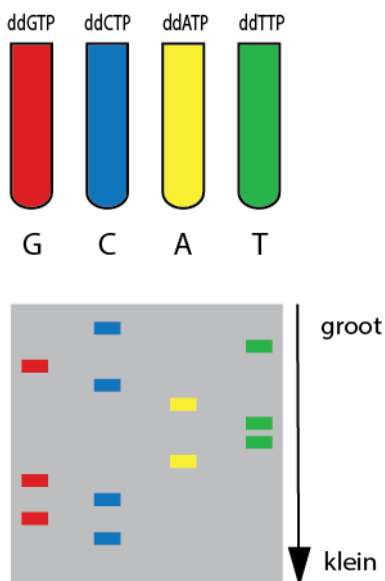
.....

Sequensen

Sequensen kan met verschillende methoden worden gedaan. De veruit meest gebruikte methode is Sanger sequencing.

Tijdens deze methoden worden 4 verschillende buisjes gebruikt. Het DNA wordt door gewone base verlengt, maar elk buisje bevat van 1 van de vier baseparen een gekleurde variant. Wanneer deze gekleurde variant bindt, kan de vorming van het DNA niet verder gaan.

Wanneer het resultaat op gel wordt gezet krijg je bandjes van verschillende grootten te zien.



Hier zie je een gel met de resultaten van een sanger sequencing. Wat is de basepaar sequentie?

.....

Tips

- Heeft u een fout gevonden in de werkbladen of antwoordenbladen of wilt u deze aanpassen? Of heeft u een andere vraag of opmerking? Mail iGEM@TUE.nl met als onderwerp van de e-mail "Lessenpakket 2016".