

Synthetic biology in the lab

iGEM TU Eindhoven 2016



Target Group: Last years of high school (16-18 years)

Subjects: Biology/Sociology

Timespan: ± 40 minutes

Introduction

Synthetic biology is reprogramming of biologic systems (cells or bacteria) and letting them perform certain tasks. This is achieved by altering the genetic information (DNA) of the cells. It is predicted that genetic modification will have a huge impact on society, however, it doesn't get the attention it deserves on school according to us. It takes some time before this information enters the newest biology and chemistry books. For that reason we developed this lesson. It is important for children to be aware of synthetic biology and to be able to form an opinion about it. In this lesson, the existing knowledge of children (school, (social) media) is combined to introduce children to the societal aspects of synthetic biology.

This lesson is made by student participating in the iGEM team from Eindhoven University of Technology. The iGEM competition is a student competition in the field of synthetic biology. The edition of this year (2016) has over 300 participating teams. Besides the research and lab work part of this project it is important to bring synthetic biology to society and make it accessible for everyone. This is the goal we want to reach with this lesson package.

This lesson package consists of a PowerPoint presentation with slides with an introduction to synthetic biology and how you apply this in the lab. In this teacher's guide, extra information on the PowerPoint slides is included. Also a worksheet (and its answers) is present in the teacher's guide. This worksheet is meant to be filled in by students during the presentation. With this worksheet students can test their knowledge about synthetic biology and lab techniques. The answers of the worksheet are listed on the PowerPoint presentation.

For the main page of the lesson package, where the PowerPoint presentation and teacher's guide can be found, visit our site! (<http://2016.igem.org/Team:TU-Eindhoven/HP/Silver>)

Note: the extra information on the PowerPoints slides is not available in English in this guide (as it was aimed at Dutch schools) but is available on request (igem@tue.nl)

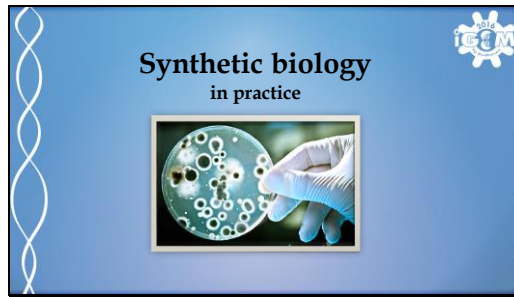
Table of contents

- PowerPoint presentation
- Worksheet
- Tips

PowerPoint presentation

Below are the slides of the PowerPoint presentation with next to them extra explanation for each slide. The PowerPoint presentation can be downloaded at <http://2016.igem.org/Team:TU-Eindhoven/HP/Silver>

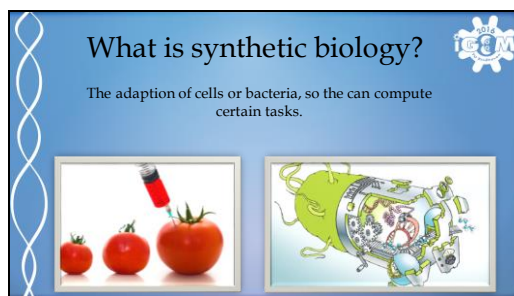
Slide 1



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.

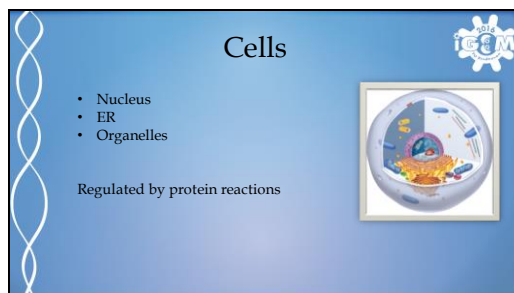
Slide 2



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

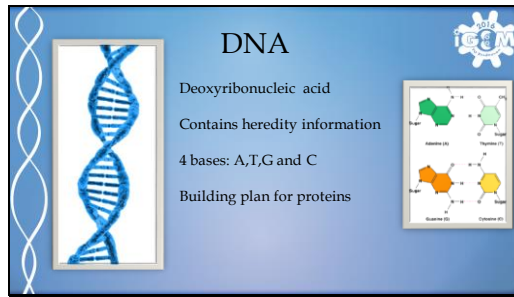


Organismen bestaan uit heel veel cellen. Deze cellen hebben allemaal een celkern met daarin het DNA (behalve rode bloedcellen), het endoplasmatisch reticulum en vele organellen. (mitochondrium, golgi systeem, vesicles.)

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

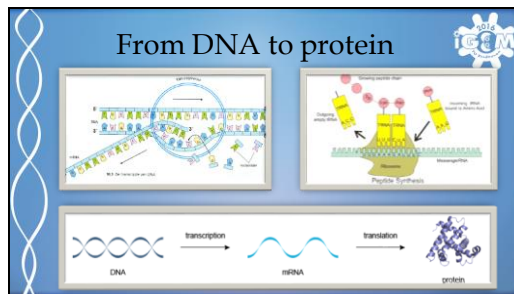


DNA staat voor deoxyribonucleïnezuur. Het DNA is eigenlijk een soort boek waar alle informatie instaat die een organisme nodig heeft om te overleven. In plaats van letters en woorden staat de informatie opgeschreven in basen en codons.

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.

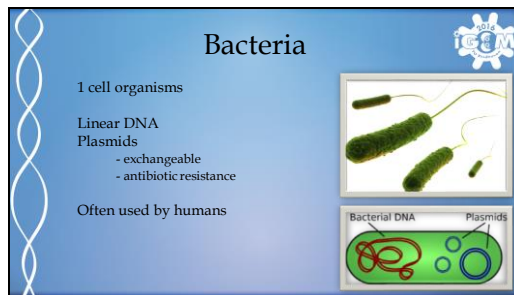
De DNA polymerase haalt de twee strengen een stukje uit elkaar om een kopie te kunnen maken. Deze kopie is niet gemaakt van het zelfde materiaal als DNA, maar van RNA (ribonucleïnezuur). RNA bevat niet de base T maar de base U. Het kopie wordt Messenger RNA genoemd, omdat het de boodschap (het bouwplan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

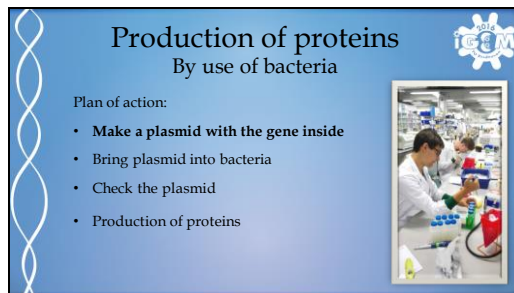


Bacteriën worden in de synthetische biologie gebruikt om eiwitten te maken.

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

Digestion

Cutting of the gene and plasmid

Two restriction enzymes
For example:

- HindIII
- BamHI

HindIII

▼ AAGCTT
TTCGAA ▲

BamHI

▼ GGATCC
CCTAGG ▲

Gene open plasmid

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

Digestion exercises

Part	Needed mass/concentration	final volume
DNA of gene (200 ng/ µL)	3 µg	15 µL
10x CutSmart buffer	1x	5 µL
Restriction enzyme	10 U	0.5 µL
BamHI (20 U/ µL)	10 U	0.5 µL
Restriction enzyme		
HindIII (20 U/ µL)		
H ₂ O		29 µL
Total		50 µL

GGATCC
CCTAGG ▲

ATCTTAGGCTAAGC**AT**CCGCCATTGGTCATTAGGCGA**AG**CTATAGCG
TAGAATCCGATTCCTAG**TC**GGTAACCGTAACCGTATCCGCTTCGA**AT**ATCGC

20 bases long

AAGCTT
TTCGAA ▲

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

Antwoorden van de tabel:

$$3000/200 = 15$$

$$10/20 = 0.5$$

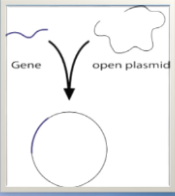
$$50 - (15 + 5 + 0.5 + 0.5) = 29$$

Slide 10

Ligation

Putting the open plasmid and gene together

Gives a closed plasmid with the gene inside



The diagram illustrates the ligation process. On the left, a linear DNA fragment labeled 'Gene' is shown. On the right, a circular DNA molecule labeled 'open plasmid' is shown. An arrow points from both towards a central circular DNA molecule labeled 'closed plasmid with the gene inside', representing the final product of the ligation.

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

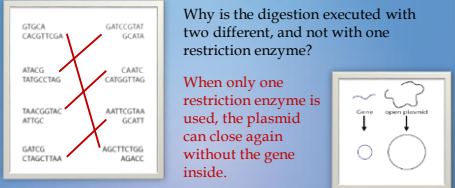
Het resultaat is een plasmide met het gewenste gen erin.

Slide 11

Ligation exercises

Why is the digestion executed with two different, and not with one restriction enzyme?

When only one restriction enzyme is used, the plasmid can close again without the gene inside.



The diagram shows two DNA fragments with sticky ends. The top fragment has the sequence GTGCA (top) and CACGTTGGA (bottom). The bottom fragment has the sequence ATACG (top) and TAGGCTAG (bottom). The sticky ends are highlighted in red. To the right, a circular plasmid with a gene fragment is shown, illustrating that it can close without the gene if only one enzyme is used.

opgaven

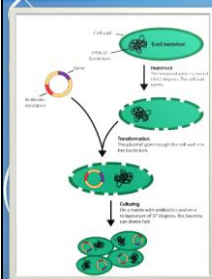
Slide 12

Plan of action:

- Make a plasmid with the gene inside ✓
- **Bring plasmid into bacteria**
- Check the plasmid
- Production of proteins

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

Slide 13



The diagram illustrates the transformation process in four stages: 1. **Cell wall**: A bacterium with a cell wall and a plasmid. 2. **Heat shock**: The cell wall is weakened by heat, allowing the plasmid to enter. 3. **Transformation**: The plasmid is integrated into the bacterial chromosome. 4. **Cloning**: The transformed bacterium divides to form a colony.

Transformation

Give bacteria a heat shock
Spread cells onto a plate
Cells will divide overnight

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

Transformation exercises

What is the function of the heat shock?
The heat shock opens the cell wall of the bacteria, so the plasmid can get through.

Why is it important that the matrix of the plate contains (the correct) antibiotic?
Otherwise all kinds of bacteria, also the ones where the transformation has not been successful, can multiply on the plate.


What do you expect that would happen during the transformation if the ligation has not been successful?
These bacteria do not contain the right antibiotic resistance. The bacteria will not grow on the plate.

opgaven

Slide 15

Colony formation

Bacteria multiply by dividing themselves
A colony is a bacterium that has divided many times



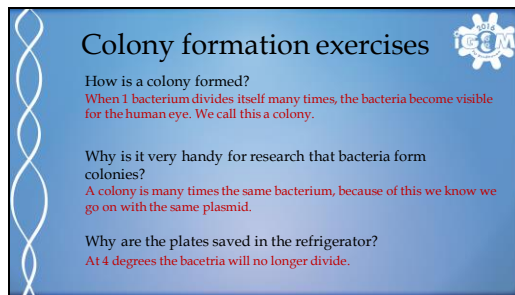
De volgende dag zijn er op de plaat allerlei puntjes ontstaan. Dit noemen we kolonies.

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



Colony formation exercises

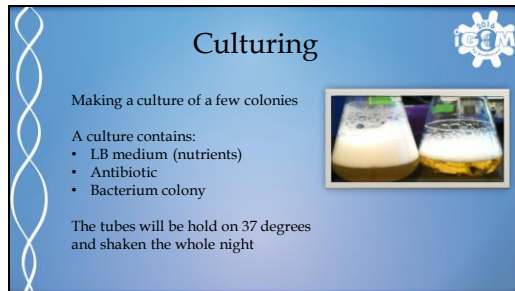
How is a colony formed?
When 1 bacterium divides itself many times, the bacteria become visible for the human eye. We call this a colony.

Why is it very handy for research that bacteria form colonies?
A colony is many times the same bacterium, because of this we know we go on with the same plasmid.

Why are the plates saved in the refrigerator?
At 4 degrees the bacteria will no longer divide.

oppgaven

Slide 17




Culturing

Making a culture of a few colonies

A culture contains:

- LB medium (nutrients)
- Antibiotic
- Bacterium colony

The tubes will be hold on 37 degrees and shaken the whole night



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

Culturing exercises

- A bacterium divides every 20 minutes
- You start with 50 bacteria
- You want 5 million bacteria

How long do you need to wait?

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

$50 \cdot 2^{t/20} = 5,000,000 \quad 2^{t/20} = 100,000 \quad t = \ln(100,000) / \ln(2) = 16.6$

$16.6 \cdot 20 \text{ minutes} = 332 \text{ minutes} = 5 \text{ hours and } 32 \text{ minutes}$

Why is it necessary that the tubes are shaken?

When the tubes are shaken, the bacteria and the nutrients spread evenly through the tube. More importantly the bacteria will get enough oxygen this way.

oppgaven

Slide 19

Plan of action:

- Make a plasmid with the gene inside ✓
- Bring plasmid into bacteria ✓
- Check the plasmid
- Production of proteins

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 sequencing Sanger method

Every tube contains 4 normal bases
Every tube contains 1 colored base
The DNA will not be extended when a colored base is build in.

DNA synthesis →

Tube with coloured G	Tube with coloured C	Tube with coloured T	buisje met gekleurde T
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.

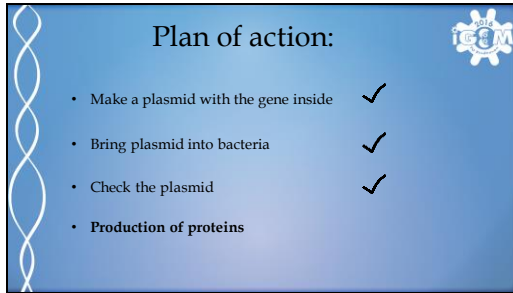
Slide 22

DNA sequencing exercises

What is the base pair sequence?
CGCGATTACGTC

oppgave

Slide 23



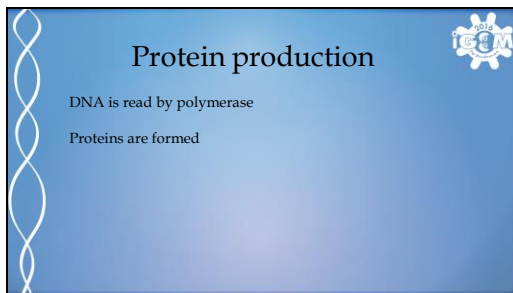
Plan of action:

- Make a plasmid with the gene inside ✓
- Bring plasmid into bacteria ✓
- Check the plasmid ✓
- **Production of proteins**

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



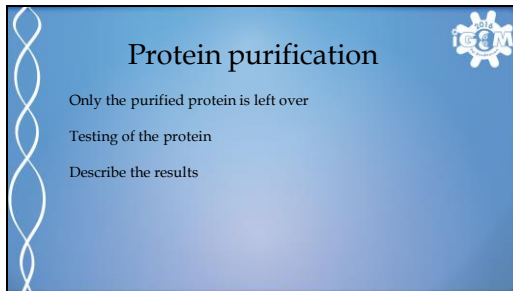
Protein production

DNA is read by polymerase
Proteins are formed

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



Protein purification


Only the purified protein is left over
Testing of the protein
Describe the results

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 of action:


- Make a plasmid with the gene inside ✓
- Bring plasmid into bacteria ✓
- Check the plasmid ✓
- Production of proteins ✓



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




Interested?

iGEM is a yearly worldwide competition in synthetic biology. Hundreds of teams work on there own project.

All teams come together in Boston to show there results

More information:
www.igem.org
<http://2016.igem.org/Team:TU-Eindhoven>



Worksheet synthetic biology in practice

Digestion

To make it possible to bring the DNA of the gene into the plasmid, the DNA of the gene and the plasmid need to be cut by the same restriction enzymes.

Question 1

A part of a digestion protocol is shown below. The DNA of the gene needs to be cut at both sides. The DNA, the restriction enzymes and a buffer must be put together in the correct concentrations.

Fill in the table to find out how much of the ingredients you need.

part	Needed mass/concentration	final volume
DNA of gene (200 ng/ μL)	3 μg	... μL
10x CutSmart buffer	1x	5 μL
Restriction enzyme BamHI (20 U/ μL)	10 U	... μL
Restriction enzyme HindIII (20 U/ μL)	10 U	... μL
H2O		... μL
Total		50 μL

The water is used to bring the final volume to 50 μL .

Micro (μ) = 10^{-6}

Nano (n) = 10^{-9}

U means active units.

Question 2

BamHI and HindIII are restriction enzymes. Restriction enzymes cut DNA at specific sequences.



The DNA strand below will be cut by both of the restriction enzymes.

ATCTTAGGCTAAGGATCCGCCATTGGTCATTAGGCGAAGCTTATAGCG
TAGAATCCGATTCCTAGGCGGTAACCAGTAATCCGCTTCGAATATCGC

2a) Where do the restriction enzymes cut? Draw this in the sequence above.

2b) How many base pairs long is the sequence after it is been cut if you only count the double strand part?

.....

Ligation

During the ligation the sequences are put back together.

Question 1

Which parts of DNA fit into each other?

GTGCA	GATCCGTAT
CACGTTCGA	GCATA

ATACG	CAATC
TATGCCTAG	CATGGTTAG

TAACGGTAC	AATTCGTAA
ATTGC	GCATT

GATCG	AGCTTCTGG
CTAGCTTAA	AGACC

Question 2

Why is the digestion executed with two different, and not with one restriction enzyme?

.....

.....

Transformation

During the transformation the plasmids are brought into the bacteria

Question 1

What is the function of the heat shock?

.....

.....

Question 2

Why is it important that the matrix on the plate contains (the correct) antibiotic?

.....

.....

Question 3

What do you expect to happen during the transformation if the ligation has not been successful and the open plasmid and the gene are still separated?

.....

.....

Colony formation

Question 1

How is a colony formed?

.....

.....

Question 2

Why is it very handy for research that bacteria form colonies?

.....

.....

Question 3

Why are the plates, after picking some colonies, saved in the refrigerators?

.....

.....

Culturing

Question 1

Bacteria do not propagate the same way mammals do, but they multiply by dividing themselves. Under the correct circumstances a bacterium divides every 20 minutes.

After the culturing you want to have 5 million bacteria. You start with around 50 bacteria in the tube. How long do you need to wait?

.....

Question 2

During the culturing the tubes are placed in a 37 degrees of Celsius incubator. The incubator shakes the tubes. Why is it necessary that the tubes are shaken?

.....

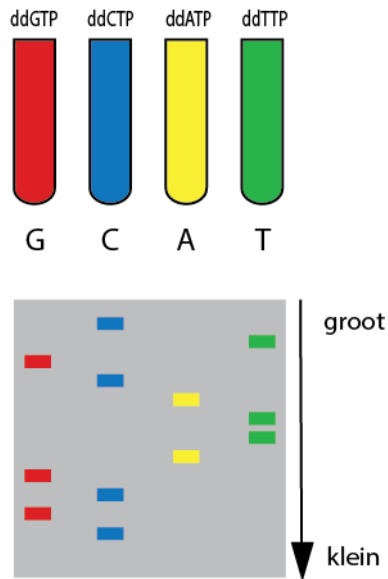
.....

Sequencing

Sequencing can be done by many methods. One of the most used methods is Sanger sequencing.

4 tubes are used. Every tube contains all the normal bases and one colour variant. The DNA will be extended if a normal base is built in. Only when a colour variant is built in, the DNA synthesis is stopped.

When the result is put on a gel, many straps of different length appear.



Above you see a gel with the results of a sanger sequencing. What is the base pair sequence of the DNA strand?

.....

Tips

- Have you found a mistake in the worksheets or in the answers? Or do you have a question or remark? Let us know! Mail iGEM@TUE.nl with “Synthetic biology course” as topic.