

Erweiterung des Praktikums Angewandte Gentechnik um eine *in silico* Klonierungseinheit

1 Antragsteller/in

Arbeitsgruppe Technische Biologie

M.Sc. Sebastian Kruth, Sabine Vogt, M.Sc. Till Steinmetz, Dr. Blaise Kimbadi Lombe,
Prof. Dr. Markus Nett

2 Kurzbeschreibung des Projektes

Klonierungen sind für die Biotechnologie von tragender Bedeutung, um gentechnisch veränderte Organismen für Produktionszwecke zu erzeugen. Die Durchführung einer Klonierung erfordert eine sorgfältige Planung. Dazu werden sowohl in der Academia als auch in der Industrie spezielle, kommerziell erhältliche Klonierungsprogramme verwendet. Bei der Erweiterung des Praktikums Angewandte Gentechnik um eine *in silico* Klonierungseinheit sollen die Studierenden den Umgang mit einem solchen Programm erlernen. Des Weiteren sollen ihnen fundamentale Grundkenntnisse vermittelt werden, die es für die Vorbereitung und Nacharbeitung eines Klonierungsexperiments braucht.

3 Details zum Projekt

3.1 Istzustand vor Beantragung

Klonierungen sind eines der Kerngebiete der molekularen Biotechnologie. Das Anwendungsspektrum der mittels Klonierung generierten Stämme reicht von der Herstellung chemischer Ausgangsstoffe, wie z.B. 1,3-Propandiol, bis hin zu Feinchemikalien und Pharmawirkstoffen (Bsp.: Insulin). Aktuell erlernen die Studierenden verschiedene Klonierungsstrategien in der Vorlesung Angewandte Gentechnik und deren praktische Durchführung in dem begleitenden Praktikum. In der Vorlesung werden zwar Grundlagen wie Primerdesign vermittelt, nicht aber der Umgang mit der Software, die dafür üblicherweise verwendet wird. Auch im Praktikum werden Vorbereitungen wie das Primerdesign aus zeitlichen und technischen Gründen bisher nicht durchgeführt. Die Nachbearbeitung des Klonierungsexperiments mit entsprechenden Programmen ist zurzeit nicht Bestandteil des Praktikums.

Bisheriger Verlauf des GT-Praktikums:

In einem Zeitraum von fünf Praktikumstagen führen die Studierenden eine Klonierung durch. Dabei handelt es sich um das Einfügen eines Gens in einen Vektor. Der Vektor und der Wirtstamm *E. coli* TOP10 sind für das Blau-Weiß-Screening konzipiert.

Durchzuführen sind folgende Schritte:

- Amplifizierung des zu klonierenden Gens durch PCR
- Isolierung der Vektor-DNA aus einer Bakterienkultur
- Restriktionsverdau von PCR-Produkt und Vektor
- Ligation der durch Restriktionsverdau erzeugten DNA-Moleküle
- Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen
- Transformation der Zellen mit dem Ligationsprodukt
- Überprüfung der erfolgreichen Klonierung mittels PCR und Restriktionsanalyse
- Analyse der Produktbildung in den Transformanten

3.2 Projektziel/Projektbeschreibung

Die Digitalisierung spielt eine immer wichtigere Rolle in der molekularen Biotechnologie. Die Erstellung von rekombinanten Stämmen zur Produktion von Chemikalien wird sowohl in der Academia als auch in der Industrie mit Hilfe von Klonierungsprogrammen geplant. Ziel der Erweiterung des Praktikums Angewandte Gentechnik soll sein, Studierende im Umgang mit einem industriell genutzten Klonierungsprogramm zu schulen. Schließlich sollen die Studierenden in Einer- und Zweiertteams eigene Konstrukte erstellen und die benötigten Primer designen. Dabei sollen Primer für verschiedene Klonierungsstrategien erstellt werden. Dafür wird zuerst gezeigt, wie die Vorbereitung des im Klonierungsexperiment praktisch erzeugten Konstrukts *in silico* funktioniert. Zusätzlich soll die Nacharbeitung des praktischen Klonierungsexperiments mittels *in silico* Programmen gezeigt werden, indem Sequenzierungsergebnisse analysiert werden.

Als Klonierungsprogramm soll SnapGene verwendet werden. SnapGene wird sowohl von der Arbeitsgruppe Technische Biologie als auch vom Lehrstuhl Bioprozesstechnik verwendet, so dass ausreichend Knowhow zu diesem Programm an der Fakultät BCI vorhanden ist. In ihm können zahlreiche Klonierungen simuliert werden. Zudem unterstützt die Software auch beim Primerdesign. Es ist im Unterschied zu vielen anderen Klonierungsprogrammen besonders benutzerfreundlich und eignet sich deshalb auch für Einsteiger im Bereich *in silico* Klonierung. Des Weiteren stellt SnapGene auch Videos zu Verfügung, die die einzelnen Funktionen erklären, sowie eine 30-Tage-Testversion, die interessierte Studierende auch im privaten Umfeld austesten können.

Durch die Optimierung von Arbeitsabläufen wird die Integration der *in silico* Klonierungseinheit zu keiner Verlängerung des Praktikums führen!

3.3 Einzelmaßnahmen, Schritte etc.

Vor Beginn des Praktikums:

- Planung passender Räumlichkeiten
- Vorbereitung der Erweiterung (Erstellung von Präsentationen, Erweiterung des Praktikumsskripts, Vorbereitung der Übungen für die *in silico* Klonierung)

Erweiterte Praktikumsdurchführung:

- Bisheriges GT-Praktikum (zeitliche Abläufe werden optimiert; so soll z.B. die zeitaufwendige Isolierung von pDNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion durch ein schnelleres Verfahren ersetzt werden)
- Vermittlung der Theorie zu Klonierungsprogrammen
 - Grundlagenwissen
 - Darstellung der praktisch durchgeführten Klonierung *in silico*
 - Erläuterung Primerdesign für verschiedene Klonierungsstrategien
 - Kontrolle der Klonierung mittels Sequenzierung
- *In silico* Übungen
 - Durchführung der *in silico* Klonierung
 - Erstellung der Primer für verschiedene Klonierungsstrategien
 - Eigenständige Kontrolle der Sequenzierungsergebnisse

3.4 Geplante Laufzeit

Jährliche Durchführung als Teil des Praktikums Angewandte Gentechnik, Start WS 21/22, zeitlicher Rahmen: 1 Praktikumstag.

3.5 Indikatoren zur Evaluation des Projektes

Die Evaluation des Projektes erfolgt nach erstmaliger Durchführung durch das Projektteam sowie durch die Studierenden als Teil der Evaluation des Praktikums Angewandte Gentechnik.

3.6 Nachhaltigkeit/Verstetigung

Die Studierenden erlernen durch die Erweiterung fundamentale Grundkenntnisse im Bereich *in silico* Klonierung. Gerade bei Abschlussarbeiten mit einem biotechnologischen Thema ist das von immensem Vorteil. In der praktikumsfreien Zeit können die Lizenzen über den betreffenden PC-Pool auch von Studierenden für ihre Abschlussarbeiten genutzt werden.

Veranstaltungen, die sich auch mit *in silico* Klonierung beschäftigen, gibt es an der TU Dortmund zurzeit nicht. Neben der Verwendung des Klonierungsprogramms im Praktikum Angewandte Gentechnik kann es auch in Zukunft innerhalb des Bachelorpflichtmoduls Bioengineering I (Vorlesung Gentechnik) und des Masterwahlmoduls Fundamentals of Synthetic Biology genutzt werden, was eine Anschaffung noch lohnenswerter macht. Vor allem die Erweiterung der Übungen in Gentechnik würde sich anbieten.