

BIOLOGIA SYNTETYCZNA: BUDOWANIE FUNKCJONALNYCH UKŁADÓW ZE STANDARYZOWANYCH CZĘŚCI

Elżbieta Jankowska^{1,3}, Krzysztof Szczepaniak^{2,3,4}, Dorota Sabat^{1,3}

¹ Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Genetyki i Biotechnologii, ul. A. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

² Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Biologii Molekularnej, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

³ Koło Naukowe Biologii Syntetycznej "Genesis", Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

⁴ Autor korespondencyjny, email: szczepaniak.krzysiek@gmail.com

Streszczenie: *Biologia syntetyczna to nowa, dynamicznie rozwijająca się dziedzina nauk biologicznych, łącząca elementy biologii molekularnej, inżynierii genetycznej i bioinformatyki. Jej założeniem jest stosowanie inżynierskiego podejścia do projektowania żywych układów pełniących rozmaite funkcje. To podejście przejawia się między innymi w tym, że tworzone, gromadzone i używane są standaryzowane "części" biologiczne, dające się w prosty sposób łączyć w bardziej złożone funkcjonalne układy. Istotny wkład w dynamiczny rozwój biologii syntetycznej ma działalność silnej społeczności naukowców i studentów uczestniczących rokrocznie w konkursie iGEM (International Genetically Engineered Machine). Drużyna z Uniwersytetu Warszawskiego (UW) reprezentowała Polskę w tej rywalizacji już czterokrotnie. W ramach zeszłorocznego konkursu rozpoczęliśmy projekt mający na celu stworzenie "adaptorów ekspresji". Wyszliśmy od problemu jakim jest nierówny poziom ekspresji różnych białek znajdujących się pod kontrolą tego samego RBS (Ribosome Binding Site, miejsca wiązania rybosomu). Przy użyciu odpowiedniego algorytmu stworzyliśmy adaptory zawierające zadany RBS i pozwalające na uzyskanie jednolitego poziomu ekspresji różnych białek umieszczanych za takim adaptorem. Przeprowadziliśmy wstępne badania laboratoryjne, ale prace nad ostatecznym potwierdzeniem działania adaptorów wciąż są prowadzone na Wydziale Biologii UW. W tej pracy, oprócz zarysu projektu, rozpoczętego w roku 2011 przedstawimy zwięźle główne założenia biologii syntetycznej oraz miejsce konkursu iGEM w jej rozwoju..*

Słowa kluczowe: *wibrodiagnostyka, estymatory sygnału drganiowego, SIBI, MatLab*

Abstract: *Synthetic biology is a novel, dynamically developing branch of biological sciences which incorporates molecular biology, genetic engineering and bioinformatics. Its main principle is to apply engineering approach to the design of living systems performing various functions. This approach is manifested in creating, gathering, and using standardized biological 'parts', which can be easily merged into more sophisticated, functional systems. Dynamic development of synthetic biology is facilitated by active community of scientists and students participating every year in the iGEM competition (International Genetically Engineered Machine). University of Warsaw (UW) Team represented Poland four times in this competition. In our last year's entry we undertook the project of creating brand new type of parts called "expression adapters". What inspired us was the problem of unstandardized expression level of different proteins being under control of the same RBS (Ribosome Binding Site). Using adequate algorithm we obtained adapters including given RBS and allowing for uniform expression rates of different proteins fused with this adapter. We conducted preliminary work in wet laboratory, but research aiming for final confirmation of adapters' operation is still being conducted at the Faculty of Biology, UW. In this paper, apart from outlining the scientific project we initiated in 2011, we will briefly present the main aspects of synthetic biology and the role of iGEM competition in its development.*

Keywords: *vibrodiagnosis, vibroacoustics estimators, SIBI, MatLab*

1. Wstęp

Biologia syntetyczna jest stosunkowo nową dziedziną w obrębie nauk biologicznych, chociaż sama jej nazwa

pojawiała się w pracach naukowych na długo przed ukończeniem projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu. Jednym z pierwszych naukowców, o ile nie pierwszym, który użył tego terminu w rozumieniu

zbliżonym do współczesnego, był polski genetyk, Wacław Szybalski. Pisał on w pracy z 1974 roku: "Pozwólcie mi teraz skomentować pytanie 'co dalej'? Do tej pory pracowaliśmy w opisowej fazie biologii molekularnej. (...) Lecz prawdziwe wyzwanie rozpocznie się, gdy wkroczymy w fazę biologii syntetycznej w naszych badaniach. Wówczas opracujemy nowe elementy kontrolne i dodamy te nowe moduły do istniejących genomów lub zbudujemy całkowicie nowe genomy. To będzie pole badań o nieskończonym potencjale i praktycznie nieograniczonej możliwości tworzenia nowych, lepszych obwodów kontrolnych..." [1].

Słowa profesora Szybalskiego można uznać za podstawę dzisiejszej definicji biologii syntetycznej, według której jej głównym założeniem jest rozwijanie i stosowanie inżynierskich narzędzi do kontroli procesów komórkowych przy użyciu dobrze scharakteryzowanych części, pełniących określone funkcje [2]. Takie nowatorskie podejście do biologii, w praktyce łączące genetykę, biologię molekularną, informatykę i chemię, znajduje praktyczne zastosowanie na wielu polach. Jednym z ważniejszych jest możliwość zrozumienia działania już istniejących układów biologicznych poprzez konstruowanie ich całkowicie lub częściowo syntetycznych odpowiedników w myśl zasady: "to, co umiem zbudować, mogę zrozumieć". Biologia syntetyczna znajduje istotne zastosowania w bioremediacji [3], tworzeniu biosensorów [4], biopaliw [5,6] a nawet rozpoczyna pełnić rolę w medycynie [7]. Inżynierskie podejście, którym charakteryzuje się biologia syntetyczna znajduje odzwierciedlenie również w użyciu narzędzi matematycznych i informatycznych do tworzenia modeli opisujących badane zjawiska. Dzięki nim można zaplanować przebieg doświadczenia, dobrać optymalne metody oraz przewidzieć wyniki zanim jeszcze wejdzie się do laboratorium. Dzięki temu można zaoszczędzić czas, pieniądze i wysiłek, gdyż eksperymentalna część projektu jest zdecydowanie najdroższa, najbardziej czasochłonna i najmniej przewidywalna.

2. Konkurs iGEM i Partsregistry

Ważną rolę w rozwoju biologii syntetycznej i jej popularyzacji pełni międzynarodowy konkurs iGEM (International Genetically Engineered Machine) [15]. Startujące w nim drużyny studenckie otrzymują na początku wakacji zestaw biologicznych części wybranych z repozytorium popularnie zwanego Partsregistry. Przez cały okres przerwy wakacyjnej drużyna pracuje z otrzymanymi częściami jak również nowymi, tworzonymi samodzielnie, w celu opracowania układu biologicznego o określonej funkcji i sprawdzenia jego działania w żywych komórkach.

Podstawowymi celami konkursu są: promowanie tworzenia biologicznych części w jednolitym standardzie, zbieranie i katalogowanie tak utworzonych części w uporządkowanym systemie o otwartym dostępie, rozwijanie wiedzy i umiejętności studentów biorących udział w konkursie, jak również popularyzowanie wiedzy na temat biologii w społeczeństwie. Projekt przygotowany przez drużynę musi należeć do jednej z kilku kategorii: żywność i energetyka, środowisko, zdrowie i medycyna, produkcja, nowe zastosowanie, badania podstawowe, przetwarzanie informacji lub oprogramowanie [8].

Wiele razy pojawiło się już sformułowanie "biologiczna część". Jest to fragment DNA pełniący w komórce określoną funkcję. Może to być na przykład gen kodujący określone białko, promotor czy miejsce wiązania rybosomu – możliwości jest wiele. Części, na których opiera się iGEM i Partsregistry są budowane zgodnie ze standardem BioBrick (Rysunek 1). Standard ten, opracowany przez badaczy z Massachusetts Institute of Technology (MIT) [10] zakłada, że nasza biologiczna część posiada określone kilkunastonukleotydowe sekwencje dodane na obu końcach. Te sekwencje, zwane odpowiednio prefix i suffix, zawierają miejsca rozpoznawane przez określone enzymy restrykcyjne, które przecinają DNA. Poszczególne warianty standardu BioBrick wykorzystują różne enzymy rozpoznające inne sekwencje nukleotydowe w DNA, lecz najpopularniejszy, najczęściej stosowany w Partsregistry, wykorzystuje cztery popularne enzymy: EcoRI, XbaI, SpeI i PstI. Każdy z nich na skutek cięcia tworzy na nici DNA ściśle określone „lepkie końce”, czyli takie, które zawierają krótki jednoniciowy łańcuch nukleotydów. Ponieważ XbaI i SpeI tworzą końce, które są ze sobą komplementarne, fragmenty DNA przecięte tymi enzymami mogą się ze sobą łatwo połączyć. Dzięki temu można więc łączyć ze sobą biologiczne części w dowolnej kolejności. Tworzenie części o standardowych, określonych miejscach cięcia pozwala na przewidywalne i proste składanie wielu części w większy system [9]. (Rysunek 2) Ponadto, użycie enzymów, które rozpoznają miejsce cięcia o długości sześciu lub więcej nukleotydów sprawia, że prawdopodobieństwo znalezienia się dodatkowego miejsca cięcia w obrębie funkcjonalnej części sekwencji DNA jest niskie.

Jak już wspomniano wcześniej, części wytworzone przez uczestników konkursu iGEM są deponowane w Registry of Standard Biological Parts, w skrócie Partsregistry. Dostępny na stronie <http://partsregistry.org> katalog pozwala wyszukiwać interesujące nas sekwencje według kilku kluczy. Każda biologiczna część posiada unikalny identyfikator. Zarejestrowani użytkownicy mogą dodawać nowe części lub edytować opisy już istniejących, wzbogacając w ten sposób ich charakterystykę. Warunkiem

dodania części jest przesłanie próbki zawierającej DNA nowej "cegiełki" do fizycznego repozytorium w MIT. Partsregistry udostępnia uczestnikom konkursu iGEM wszystkie części znajdujące się w katalogu, których DNA jest aktualnie dostępne. Wystarczy zgłosić zapotrzebowanie i opłacić koszty przesyłki. Nie trzeba być zalogowanym użytkownikiem, aby przeglądać katalog, więc będąc niezaangażowanym w iGEM naukowcem można zwrócić się o daną część do laboratorium, w którym została wytworzona. Ponieważ sekwencje nukleotydowe wszystkich części są dostępne w katalogu, można też zamówić ich syntezę w zewnętrznej firmie. Zawartość Partsregistry jest objęta licencją Creative Commons, co oznacza, że jest ona dostępna dla każdego bezpłatnie.

Historia konkursu sięga 2003 roku, kiedy to w wyniku warsztatów organizowanych na MIT powstała idea zorganizowania dla studentów formy naukowej rywalizacji związanej z biologią syntetyczną. Pierwszy konkurs iGEM odbył się w 2004 roku i wystartowało w nim zaledwie 5 drużyn wyłącznie ze Stanów Zjednoczonych. Stopniowo konkurs nabierał rozpędu i stawał się coraz popularniejszy - w 2011 roku startowało w nim już 165 drużyn z ponad 20 krajów świata. Drużyna Uniwersytetu Warszawskiego nieprzerwanie bierze udział w zawodach od 2008 roku [8].

3. Projekt drużyny Uniwersytetu Warszawskiego na iGEM 2011

Drużyna Uniwersytetu Warszawskiego startowała w ubiegłym roku w kategorii badań podstawowych, które w myśl konkursu są interpretowane jako działania mające na celu dalsze rozwijanie i ulepszanie standardów biologii syntetycznej, jak również tworzenie narzędzi do jeszcze prostszego, szybszego i wydajniejszego manipulowania biologicznymi częściami. Drużyną kierował mgr Michał Lower z pomocą Anny Olchowik, natomiast do grona najaktywniejszych członków należeli: Elżbieta Jankowska, Dorota Sabat, Krzysztof Szczepaniak i Paweł Urbański. Funkcję opiekunów naukowych pełnili prof. dr hab. Jacek Bielecki i dr Radosław Stachowiak, pracownicy Wydziału Biologii UW.

Nasz projekt, "Synthetic Cloning and Expression Control" (Syntetyczne klonowanie i kontrola ekspresji) składał się z dwóch części. W pierwszej z nich opracowaliśmy protokół do szybkiego klonowania fragmentów DNA bez konieczności transformowania komórek bakteryjnych. Metoda ta opiera się na użyciu polimerazy $\phi 29$ i amplifikacji typu "toczącego się koła" (rolling circle

amplification) [16]. Protokół jest dostępny na stronie internetowej drużyny [14]. W drugiej części projektu zajęliśmy się problemem standaryzacji poziomu ekspresji białek, w tym celu tworząc nową kategorię części, nazwaną przez nas adaptarami ekspresji.

Adaptory ekspresji

Bardzo ważną klasą BioBricków są RBS, czyli miejsca wiązania rybosomów [17]. W *Partsregistry* części te są określane jako silne lub słabe na podstawie pomiarów z białkiem fluorescencyjnym. Zakłada się, że niezależnie od użytej z nimi sekwencji kodującej białko, RBS-y będą zapewniały taki sam poziom ekspresji. Doświadczenie laboratoryjne pokazuje jednak, że nie jest to prawda, a co za tym idzie, wybierając dany RBS nie można mieć pewności, jaki będzie poziom ekspresji. Powodem, dla którego obserwuje się takie wahania jest fakt, że struktura drugorzędowa, którą przyjmuje mRNA ma duży wpływ na poziom ekspresji. Zmienia ona dostępność RBS dla podjednostki 30S rybosomu i wpływa na wydajność syntezy białka (Rysunek 3) [11]. Aby bliżej przyjrzeć się temu problemowi i zaproponować jego rozwiązanie wykonaliśmy szereg pomiarów poziomu ekspresji białek fluorescencyjnych [19] pod kontrolą tego samego promotora, ale różnych RBS. Pomiarami objęliśmy pięć białek: GFP, SF-GFP, RFP, YFP i mORANGE, każde łącząc z czterema RBS, które w *Partsregistry* są oznaczone identyfikatorami B0031, B0032, B0033 i B0034. Po zmierzeniu fluorescencji wszystkich otrzymanych konstruktów okazało się, że poziom ekspresji zapewniany przez dane RBS silnie zależy od połączonej z nim sekwencji kodującej białko. (Tabela 1)

Zaproponowane przez nas rozwiązanie, czyli adaptory ekspresji (Rysunek 4), ma w założeniu umożliwić uzyskanie podobnego poziomu ekspresji dla danego zestawu białek, których sekwencje kodujące można połączyć z danym adaptorem. Adaptor ekspresji składa się z RBS, spaceru o długości 5 par zasad i losowej sekwencji kodującej białko o długości 10 aminokwasów. Owa proteina tworzy taką strukturę drugorzędową, która umożliwia podjednostce 30S połączenie się z RBS-em, oraz spełnia warunek nie kierowania białka na drogę degradacji [12]. Aby zaprojektować funkcjonalne adaptory mgr Michał Lower napisał program komputerowy, w którym użył

algorytmu genetycznego. Działanie programu polega na tym, że w pierwszym kroku generuje on wyjściową populację zestawów spacer - początek białka o losowej sekwencji, połączonych z zadanymi białkami fluorescencyjnymi, a następnie poddaje je ocenie programem RBS Calculator [11]. Ocenia on jaką strukturę drugorzędową przyjmie mRNA zawierające dany RBS i sekwencję kodującą i jakiego poziomu ekspresji można się w związku z tym spodziewać. Nasz program następnie wybiera najlepsze adaptory, biorąc pod uwagę dwa parametry: wysokość poziomu ekspresji (wyliczoną przez RBS Calculator) oraz odchylenie standardowe poziomu ekspresji różnych białek pod kontrolą tego samego adaptora. Niskie odchylenie standardowe oznacza zbliżony poziom ekspresji dla różnych białek, czyli to, co chcemy osiągnąć. Spośród wyjściowej populacji te sekwencje, które uzyskały najwyższe oceny przechodzą do kolejnego etapu algorytmu genetycznego. Imituje on działanie rekombinacji i mutacji genetycznych, wprowadzając losową zmienność. Powstała nowa populacja sekwencji ponownie jest oceniana za pomocą RBS Calculator. Najlepsze "przeżywają" i są wykorzystywane w kolejnym powtórzeniu cyklu. Ostatecznie uzyskaliśmy około 20 adaptorów, które spełniały nasze oczekiwania, czyli każdy zapewniał stały poziom ekspresji dla różnych białek pod tym samym RBS. Spośród nich wybraliśmy sześć, które reprezentowały różne poziomy ekspresji, od bardzo wysokiej do niskiej. Nad tym zestawem zostały podjęte prace eksperymentalne.

Dzięki użyciu adaptorów możemy posługiwać się jednym wybranym RBS i umieszczać pod nim zadane białka z przewidywalną siłą ekspresji. Możliwość precyzyjnej kontroli poziomu ekspresji genów jest kluczowa przy budowie wieloelementowych układów biologicznych. Istnieje bardzo wiele mechanizmów składających się na kontrolę ekspresji genów, jednak adaptory ekspresji miałyby umożliwić panowanie nad jednym z nich.

Prace laboratoryjne nad potwierdzeniem działania adaptorów ekspresji wciąż są prowadzone na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, jako badania do pracy magisterskiej jednej ze studentek. Wstępne wyniki uzyskane podczas trwania konkursu iGEM 2011 pozwalają na pewien optymizm, jednak wymagają dalszych prac.

4. Plany drużyny na przyszłość

W tym roku nasza drużyna również startuje w konkursie iGEM, tym razem z projektem diametralnie różnym od zeszłorocznego. Nasz pomysł polega na stworzeniu szczepu *Escherichia coli*, który będzie miał zdolność wnikania do komórek eukariotycznych. Komórka bakteryjna następnie będzie ulegać rozpadowi (lizie), uwalniając do wnętrza komórki eukariotycznej kolistą cząsteczkę DNA nazywaną plazmidem. Plazmid ten będzie miał możliwość wbudowania się w genom komórki gospodarza, dzięki czemu będzie mogła nastąpić ekspresja ułożonego na nim genu i w konsekwencji produkcja białka. Planujemy przetestować ten układ z użyciem białek fluorescencyjnych, co pozwoli na łatwą detekcję. Po uzyskaniu działającego systemu planujemy zbudowanie podobnego ze szczepem *Bacillus subtilis* jako dostarczycielem plazmidu. Ten etap projektu chcemy przeprowadzić ze względu na to, że naturalne systemy inwazyjne, które zaprzęgamy do naszych doświadczeń pochodzą od bakterii zbliżonych budową bardziej do *B.subtilis* niż *E.coli* [18]. W związku z tym, oczekujemy zwiększenia wydajności wchodzenia bakterii do gospodarza. Ponadto, chcielibyśmy powiększyć w *Partsregistry* liczbę części biologicznych przeznaczonych dla *B.subtilis*. Prawie wszystkie części tam zdeponowane są przeznaczone do użycia w *E.coli*, gdyż jest to z pewnością najlepiej zbadana i najszerzej stosowana bakteria. Nie jest jednak optymalna dla niektórych zastosowań, stąd nasza chęć zwiększenia zainteresowania *B.subtilis*. W projekcie będziemy się opierać na wiedzy i doświadczeniu pracowników Zakładu Mikrobiologii Stosowanej Wydziału Biologii UW, który prowadzi badania w zbliżonej dziedzinie. Również doświadczenie drużyny iGEM naszej uczelni z roku 2010 będzie cenne, gdyż projekt ma rozwijać wówczas zastosowane podejście [13].

9. Podsumowanie

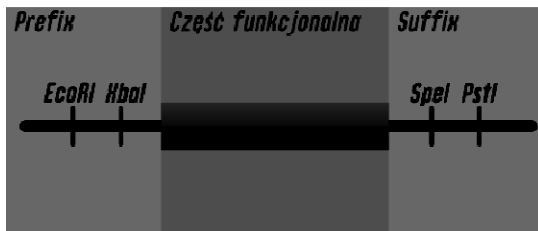
Biologia syntetyczna jest fascynującą dziedziną przynoszącą każdego dnia nowe odkrycia i ciekawe zastosowania rozwiązań wypracowanych poprzez inżynierskie podejście do budowania układów żywych. Łączy w sobie wiele, czasem odległych gałęzi nauk w funkcjonalną całość. Konkurs iGEM pozwala młodym naukowcom wziąć udział w projekcie, który może dać im wiele doświadczenia i umiejętności, jak również szansę zaprezentowania się na międzynarodowej arenie naukowej. Popularyzacja wiedzy na temat biologii jest ważnym aspektem konkursu, bardzo przydatnym w naszym kraju. Chcielibyśmy dać przykład projektu jaki można realizować w ramach iGEM i mamy nadzieję, że nasz artykuł zachęci studentów do formowania kolejnych drużyn na terenie naszego kraju.

Podziękowania

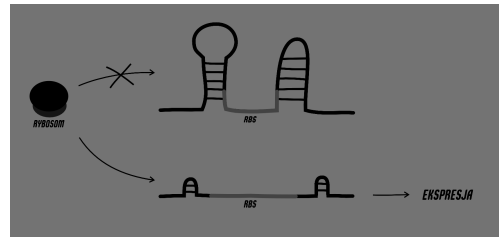
Realizacja naszego projektu nie byłaby możliwa bez szeregu sponsorów, którzy wsparli nas finansowo i materiałowo w tym przedsięwzięciu. Kierujemy nasze podziękowania do Fundacji Uniwersytetu Warszawskiego, Rektora Uniwersytetu Warszawskiego, Dziekana Wydziału Biologii UW, BioCentrum Edukacji Naukowej i oligo.pl. Chcielibyśmy też w tym miejscu podziękować prof. dr. hab. Jackowi Bieleckiemu i dr. Radosławowi Stachowiakowi za patronat, opiekę i cenne rady. Specjalne podziękowania należą się też Michałowi Lowerowi i Ani Olchowik za pomysły, wielki nakład pracy, kierowanie całym projektem i cierpliwe wprowadzanie nas w tajniki konkursu. Wreszcie, dziękujemy Pawłowi Urbańskiemu za wszystkie godziny spędzone razem w laboratorium i poza nim, a także Ani Puławskiej i Cherry Moreno za udzieloną pomoc.

Literatura

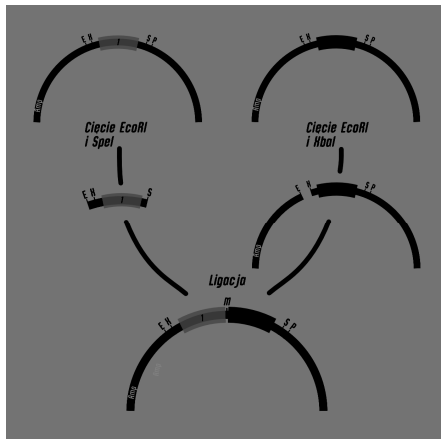
1. Waclaw Szybalski, *In Vivo and in Vitro Initiation of Transcription*, Page 405. In: A. Kohn and A. Shatky (Eds.), *Control of Gene Expression*, pp. 23–4, and Discussion pp. 404–5 (Szybalski's concept of Synthetic Biology), 411–2, 415–7. New York: Plenum Press, 1974
2. Mukherji S, van Oudenaarden A. Synthetic biology: understanding biological design from synthetic circuits. *Nat Rev Genet*. 2009 Dec;10(12):859-71. Epub 2009 Nov 10. Review. PubMed PMID: 19898500; PubMed Central PMCID: PMC3138802.
3. Gilbert ES, Walker AW, Keasling JD. A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003; 61:77–81. [PubMed: 12658518]
4. Rajendran M, Ellington AD. Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc. *Anal Bioanal Chem*. 2008; 390:1067–1075. [PubMed: 18049815]
5. Steen EJ, Chan R, Prasad N, Myers S, Petzold CJ, Redding A, Ouellet M, Keasling JD. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb Cell Fact*. 2008; 7:36. [PubMed: 19055772]
6. Waks Z, Silver PA. Engineering a synthetic dual organism system for hydrogen production. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75:1867–75. [PubMed: 19201964]
7. Anderson JC, Clarke EJ, Arkin AP, Voigt CA. Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria. *J Mol Biol*. 2006; 355:619–627. [PubMed: 16330045]
8. www.igem.org
9. <http://partsregistry.org>
10. Knight, T. (2003), Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. MIT Synthetic Biology Working Group.
11. Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA. Automated design of synthetic ribosome binding sites to precisely control protein expression. *Nat Biotechnol*. 2009 Oct;27(10):946-50. Epub 2009 Oct 4. PubMed PMID: 19801975; PubMed Central PMCID: PMC2782888.
12. Varshavsky A. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*. 1997 Jan;2(1):13-28. Review. PubMed PMID: 9112437.
13. <http://2010.igem.org/Team:Warsaw>
14. <http://2011.igem.org/Team:Warsaw>
15. Goodman C. Engineering ingenuity at iGEM. *Nat Chem Biol*. 2008 Jan;4(1):13. [PubMed PMID: 18084272]
16. John R, Müller H, Rector A, van Ranst M, Stevens H. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol*. 2009 May;17(5):205-11. doi: 10.1016/j.tim.2009.02.004. Epub 2009 Apr 15. Review. [PubMed PMID: 19375325]
17. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 1999 Jul 8;234(2):187-208. Review. [PubMed PMID: 10395892.]
18. Bielecki J, Youngman P, Connelly P, Portnoy DA. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature*. 1990 May 10;345(6271):175-6. [PubMed PMID: 2110628.]
19. Remington SJ. Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Sci*. 2011 Sep;20(9):1509-19. doi: 10.1002/pro.684. Epub 2011 Jul 19. Review. PubMed PMID: 21714025; PubMed Central PMCID: PMC3190146.



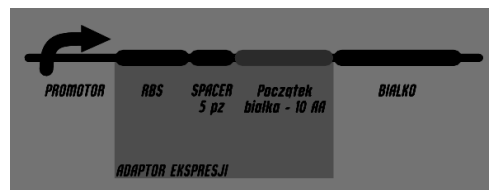
Rysunek 1: Schemat budowy tzw. *BioBrick'a*. Prefix i suffix zawierają po dwa miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne. Część funkcjonalna zawiera sekwencję pełniącą pożądaną rolę, na przykład kodującą białko lub będącą elementem takim jak promotor, RBS czy terminator.



Rysunek 3: Poglądowy schemat wpływu struktury drugorzędowej mRNA na dostępność RBS dla rybosomu.



Rysunek 2: Standard BioBrick (wersja RFC10) i składanie części zgodne z nim stworzonych. W górnej części rysunku schematycznie przedstawione są pojedyncze części. Każda składa się z miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne: E - EcoRI, X - XbaI, S - SpeI, P - PstI, jak również sekwencji nadającej funkcjonalność (1/2). Łączenie dwóch części przebiega następująco: najpierw część 1 jest cięta przy użyciu EcoRI i SpeI. Mieszanie reakcyjną następnie rozdziela się na żelu agarozowym i wycina się prążek odpowiadający wstawce, czyli fragmentowi 1, wraz z otaczającymi miejscami cięcia enzymów. Wstawka jest następnie izolowana z wyciętego prążka. Równolegle przeprowadza się reakcję cięcia części nr. 2, za pomocą EcoRI i XbaI. Otrzymany otwarty plazmid łączy się ze wstawką za pomocą ligazy. Pomiędzy fragmentami 1 i 2 pozostaje tak zwana blizna, czyli pozostałość po miejscach cięcia enzymów, nie rozpoznawana przez żaden z nich. Tak powstała złożona część może być dalej rozbudowana, ponieważ zachowała flankujące je miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne.



Rysunek 4: Budowa adaptora ekspresji. Od lewej kolejno składa się on z RBS, spaceru i początku białka. Promotor nie jest częścią adaptora. Bezpośrednio za adaptorem rozpoczyna się właściwa sekwencja kodująca białko. Spacer ma długość 5 par zasad, ponieważ jest to optymalna odległość między RBS a początkiem białka, która pozwala na wydajną ekspresję [11].

Protein	%B0034	error %B0034	RBS
GFP	22,82	0,5	B0031
			B0032
			B0033
			B0034
			B0031
			B0032
			B0033
			B0034
			B0031
			B0032
	37,69	2,5	B0033
			B0034
			B0031
			B0032
	0,00	0,4	B0033
			B0034
			B0031
			B0032
	100,00	1,7	B0034
			B0031
			B0032
			B0033

Tabela 1: Wyniki pomiarów fluorescencji białek umieszczonych pod różnymi RBS. RBS oznaczony jako B0034 był przyjmowany jako punkt odniesienia dla pozostałych. W trzeciej kolumnie podano błąd pomiarowy [14].