**BglBricks: A flexible standard for biological part assembly**

**صفحه اول: Background:**قطعات بیولوژیک استاندارد ، مانند قطعات BioBricks ، زمینه ای برای یک رشته مهندسی جدید فراهم می کند که طراحی و ساخت سیستم های بیولوژیکی مصنوعی را با کاربردهای مختلف در انرژی زیستی ، مواد جدید ، درمان ها و اصلاح محیط زیست امکان پذیر می کند. اگرچه استاندارد اصلی مونتاژ BioBricks کاربرد گسترده ای یافته است ، اما دارای کاستی های متعددی است که دامنه کاربردهای بالقوه آن را محدود می کند.

**Results:** این سیستم جدید از آنزیم های محدود کننده BglII و BamHI ، استفاده می کند و منجر به یک توالی اسکار(زخم) 6تایی اسید نوکلئوتیدی می شود که گلیسین-سرین را کد می کند ، که یک اتصال دهنده پپتیدی بی ضرر در بیشتر کاربردهای فیوز پروتئینها است. ما سودمندی استاندارد جدید را در سه کاربرد متمایز ، از جمله ساخت دستگاههای بیان ژن سازنده فعال با طیف گسترده ای از پروفایل های بیان ، ساخت ترکیبات پروتئینی کایمریک ، دارای فیوزهای چند دامنه و ادغام هدفمند توالی DNA عملکردی در جایگاههای خاص ژنوم E. coli.

**Conclusions:** استاندارد BglBrick بستر جدید و انعطاف پذیرتری را برای تولید قطعات بیولوژیکی استاندارد و اتوماتیک کردن assemblyه DNA فراهم می کند. کار بر روی واکنشهای assemblyه BglBrick و همچنین توسعه ابزارهای اتوماسیون و بیوانفورماتیک در حال حاضر در حال انجام است. این ابزارها بنیادی را فراهم می کنند که می توان مهندسی ژنتیک را از یک هنر فنی فشرده به یک رشته کاملاً مبتنی بر طراحی تبدیل کرد.

**Background:** دو چالش اصلی در سنتتیک بیولوژی عبارتند از: اول ، دانستن چگونگی طراحی توالی هایی که عملکرد خاصی را به وجود می آورند. و دوم ، نحوه ساخت DNA رمزگذار با عملکرد مد نظر به شکلی که بتوان آن را به راحتی به سلول شناساند. قطعات استاندارد assembly ، مانند BioBricks ™، با تشخیص اینکه واحدهای عملکردی توالی DNA به طور مکرر در پروژه های مختلف مورد استفاده مجدد قرار می گیرند ، الگویی ارائه می دهند که به هر دو این مشکلات می پردازد. این واحدها ، که شامل پروموترها ، مکانهای اتصال ریبوزوم ، توالی کد کننده پروتئین ، و غیره ، عناصر غیر قابل کاهش از ترکیب ژنتیکی را نشان می دهند ، و به همین ترتیب ، "قطعات اساسی" در نظر گرفته می شوند.

**صفحه دو:** استاندارد BioBricks که توسط نایت و همکاران توصیف شد ، اولین اجرای یک استراتژی برای تعریف قوانین ترکیب بود که اجازه می دهد assembly قطعات بیولوژیکی استاندارد با استفاده از یک شیمی واحد انجام شود. روش assembly از هضم آنزیم محدود کننده تکراری و واکنش های اتصال برای جمع آوری قطعات اساسی کوچک به قطعات مرکب بزرگتر استفاده می کند. سایتهای محدود کننده XbaI و SpeI در انتهای '5 و 3' قسمتهای اساسی قرار می گیرند. هضم با این آنزیم ها انتهای چسبنده سازگار ایجاد می کند که می تواند آن ها را به صورت head-to-tail متصل کند. اتصال دو قسمت باعث ایجاد یک دنباله اسکار در بین قطعات می شود که هیچ یک از مکان های اصلی را در بر ندارد و بنابراین ، با هضم بعدی با XbaI یا SpeI بی تأثیر است. محصول بدست آمده یک قطعه مرکب جدید با همان مشخصات assembly دو قسمت اصلی است. و هنوز در سایت های محدود کننده XbaI و SpeI در انتهای 5 و 3 قرار دارند و از این رو assembly تکراری قطعات مرکب بزرگتر و بزرگتر امکان پذیر است. بیش از 2000 قسمت اساسی که مطابق با این استاندارد هستند ، شرح داده شده اند و از آنها در ساخت طیف وسیعی از مدارهای ژنتیکی و دستگاه های بیوسنتز استفاده شده است.

یک مسئله با استاندارد اصلی BioBricks، ، که در اینجا به آن پرداخته شده است ، توانایی ترکیب عناصر رمزگذار قطعات فیوز شونده به پروتئین است مانند tagهای پپتیدی و دومین های منفرد پلی پپتیدها برای کاربردهای مهندسی پروتئین ..

مهندسی پروتئین مدولار یک بحث در حال ظهور زیست شناسی مصنوعی است. متأسفانه ، طرح اصلی BioBricks ™ (BBF RFC 10) برای ساخت پروتئین های کایمریک مناسب نیست زیرا توالی اسکار 8 نوکلئوتیدی که پس از اتصال آنها بین قطعات باقی می ماند ، به دو دلیل با فیوژن پروتئین سازگار نیست: اول ، توالی اسکار (TACTAGAG) تیروزین را کد می کند و به دنبال آن یک کدون توقف می آید. و دوم ، یک اسکار 8 نوکلئوتیدی یک تغییر فریم را بین دو توالی کد گذار قرار می دهد. از لحاظ تئوریک ، می توان با زیاد کردن توالی اسکار تا تعدادی از نوکلئوتید که ضرب 3 است ، این مشکل برطرف شود ، به طوری که کدون توقف دیگر در قاب نیست و تغییر قاب از بین می رود. در این مدت ، تعدادی پیشرفت در استاندارد BioBricks اصلی ، همراه با استراتژی ها و استانداردهای کاملاً جایگزین assembly ، پیشنهاد و یا توسعه یافته اند. به عنوان مثال استاندارد Biofusion (BBF RFC 23) ، استاندارد BioBricks را اصلاح می کند تا یک توالی اسکار 6 نوکلئوتیدی کوچکتر (ACTAGA) ایجاد کند که ترئونین-آرژنین را رمزگذاری می کند ، بنابراین هم شیفت های قاب خواندن و هم کد های توقف رمزگذاری شده را از بین می برد . متأسفانه ، کدون AGA کد کننده آرژنین یک کدون نادر در E. coli است ، و علاوه بر این ، سایت XbaI را می توان با متیلاسیون dam مسدود کرد زمانی که با توالی خاصی در کنار هم باشد. استاندارد Fusion Parts (BBF RFC 25) که توسط تیم Freiburg 2007 iGEM تهیه شده است ، یکی دیگر از الحاقات استاندارد BioBricks است که می کوشد برخی از معایب قالب Biofusion را کاهش دهد. در اینجا ، از سایت های محدود کننده AgeI و NgoMIV برای تولید یک توالی اسکار 6 نوکلئوتیدی (ACCGGC) رمزگذاری کننده ترئونین-گلیسین استفاده می شود. سرانجام ، استاندارد ++BioBricks یک استاندارد مونتاژ بدون زخم است که از دو مرحله برای assembly استفاده می کند. از آنزیم های محدود کننده نوع II برای شناسایی سایت های کنار قسمت مد نظر و هضم در مرز قطعه مد نظر استفاده می کند. انتهای چسبده سپس قبل از بستن بدون زخم ، که هدف نهایی استراتژی های assembly استاندارد است ، صاف می شوند. متأسفانه هنوز واکنش های قوی لازم برای اجرای چنین روشی مشخص نشده است. همه این استانداردها ، همراه با لیست کاملی از مزایا و معایب آنها ، در صفحه استاندارد و قالبهای BBF شرح داده شده است.

**استاندارد قوی و جدید معرفی شده در این مقاله: آخر صفحه 2 و شروع 3:**

استاندارد BglBrick از assembly با آنزیم های محدود کننده BglII و BamHI پشتیبانی می کند که به ترتیب در انتهای 5 و 3 ’قسمتهای اساسی قرار دارند. این آنزیم ها دارای مزایای متعددی نسبت به آنهایی هستند که در استاندارد های قبلی استفاده شده اند: اول ، آنها دارای سابقه استفاده گسترده ای هستند که قابلیت اطمینان آنها را تضمین می کند. دوم ، آنها با کارایی بالا برش می خورند. سوم ، آنها تحت تأثیر همپوشانی با متیلاسیون dcmیا dam نیستند. سرانجام ، آنها منجر به یک توالی اسکار 6 اسید نوکلئوتیدی (GGATCT) کد کننده گلیسین-سرین می شوند ، توالی ای که ثابت شده که در اکثر برنامه های تلفیقی پروتئین در انواع سیستم های میزبان ، از جمله E. coli ، مخمر و انسان بی ضرر است. در بخش های بعدی ، ما استفاده از استاندارد BglBrick را در 3 برنامه متنوع به نمایش می گذاریم.

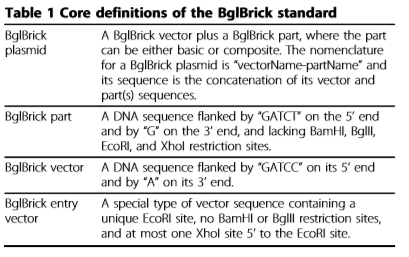
**صفحه 3 بخش Results:**

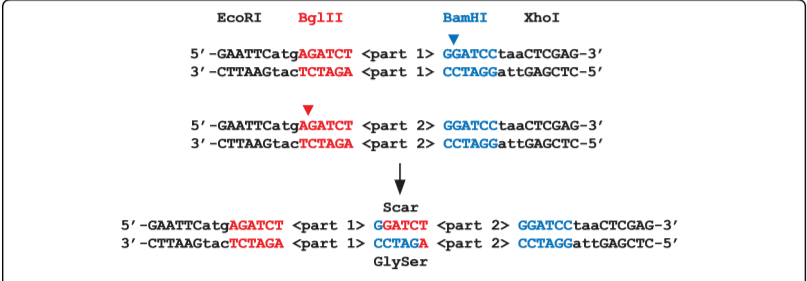
**Definition of the BglBrick standard:**

استاندارد BglBrick با ترکیب نظری DNA ها سروکار دارد ، اما نه assembly فیزیکی آنها.. در اینجا ، فقط قوانین لازم برای پشتیبانی از توصیف قسمت ها و وکتور هستند ، تبدیل مجدد با EcoRI و BamHI و الحاق با XhoI ، BamHI و BglII به طور رسمی تعریف شده اند. بنابراین ، با توجه به اینکه قطعات BglBrick را می توان با استفاده از روشهای مختلف ، از جمله مونتاژ PCRbased ، مونتاژ کرد ، حذف جزئیات گسترده مونتاژ عمدی است. یک قسمت BglBrick به عنوان یک توالی DNA تعریف می شود که توسط "GATCT" در انتهای 5 "و توسط " G "در انتهای 3" و با فاقد سایت های محدود کننده داخلی BamHI ، BglII ، EcoRI و XhoI احاطه شده است. یک وکتور BglBrick به عنوان یک توالی DNA تعریف می شود که "GATCC" در انتهای 5 "و" A "در انتهای 3" آن قرار دارد. یک پلاسمید BglBrick به عنوان وکتور BglBrick بعلاوه یک قسمت BglBrick تعریف می شود ، جایی که این قطعه می تواند پایه یا مرکب باشد. نام یک پلاسمید BglBrick "vectorName-partName"" است و توالی آن الحاق توالی های وکتور و توالی قسمت (های) آن است. هر یک از توالی های بردار یا بخشی دارای نام منحصر به فردی است که مربوط به توالی دقیق آن است. مشتقات BglBrick وکتور یا بخشی که حتی با یک نوکلئوتید متفاوت هستند یک نام منحصر به فرد دارند. اکثر پلاسمیدهای BglBrick (اما نه همه) یک کاست EcoRI-BglII-BglBrick-BamHI-XhoI را کدگذاری می کنند. وکتور ورودی BglBrick نوع خاصی از وکتور است که برای پناه دادن به قطعات اساسی و پشتیبانی از مونتاژ آنها استفاده می شود و به عنوان توالی ای حاوی یک سایت منحصر به فرد EcoRI ، بدون سایت های BamHI یا BglII و حداکثر یک سایت XhoIدر 5' سایت EcoRI تعریف می شود. . از سایت EcoRI برای تسهیل انتقال قطعات بین وکتورها استفاده می شود. همچنین می تواند برای واکنشهای مونتاژ ورودی "پیشوند" (منطقه پیشوند قطعه وکتوری بین EcoRI و BglII است) استفاده شود. به طور مشابه ، در صورت وجود ، می توان از سایت XhoI برای تسهیل واکنش های مونتاژ ورودی "پسوند" استفاده کرد (منطقه پسوند قطعه وکتوری بین BamHI و XhoI است). با توجه به تعریف اصلی استاندارد BglBrick به عنوان حداقل استاندارد مونتاژ که سازگاری را تضمین می کند اما هیچ قانون مشخصی در مورد ترکیب وضع نمی کند ، کدون های شروع و توقف بخشی از تعریف نیستند. به همین ترتیب ، تعریف اصلی هیچ محدودیتی در محل سایر سایت های محدودکننده ، origin های همانندسازی و نشانگرهای انتخاب آنتی بیوتیک یا طول و توالی مناطق "پیشوند" و "پسوند" ایجاد نمی کند. چنین محدودیتهای دیگری ، زیرمعیارهای قالب BglBrick در نظر گرفته می شوند ، قوانینی هستند که توسط جامعه تعریف می شوند و توسط فرآیند RFC BBF توصیف می شوند. این زیر استانداردها ممکن است شامل قوانینی برای مکان گذاری کدون شروع یک توالی کدگذاری ، مکانهای دیگر سایتهای محدود کننده ، مجموعه های وکتوری برای پروتکل های مونتاژ استاندارد خاص و غیره باشد.

**Standard assembly:**

وارد کردن پیشوند یک استراتژی برای مونتاژ استاندارد قطعات BglBrick است که توسط پلاسمیدهای حاوی وکتور ورودی BglBrick تسهیل می شود. این نوع پلاسمیدها سایتهای محدود کننده منحصر به فرد BglII و BamHI را که به ترتیب منتهی به انتهای 5 و 3 'قطعات متصل می شوند ، رمزگذاری می کنند (شکل 1). به طور خلاصه ، برای پیوستن به دو قسمت اساسی A و B ، به ترتیب ، پلاسمید حاوی قسمت A با BamHI (که 3 'قسمت را قطع می کند) و EcoRI (وکتور را برش می دهد) هضم می شود ، در حالی که پلاسمید حاوی قسمت B با BglII (که 5 "قسمت را قطع می کند) و EcoRI هضم می شود. این دو قسمت اساسی از طریق اتصال head-to-tail به هم متصل می شوند تا یک قطعه مرکب تولید شود ، که خودش نیز به ترتیب توسط سایت های منحصر به فرد BglII و BamHI در انتهای 5 و 3 احاطه شده است. در قسمت مرکب جدید ، قطعات A و B توسط یک دنباله اسکار 6 نوکلئوتیدی جدا می شوند. توالی اسکار هنگامی که در قالب ترجمه می شود ، گلیسین-سرین ، یک اتصال دهنده بی خطر پپتید برای ترکیبات پروتئین را کد می کند.



**صفحه 4:**

**توضیحات شکل 1:**

سایت های محدود کننده منحصر به فرد BglII (با رنگ قرمز) و BamHI (با رنگ آبی) به ترتیب قطعات اصلی BglBrick را در انتهای 5 و 3 ’خود احاطه می کنند. سایت های محدودکننده EcoRI و XhoI که در پروتکل های مختلف برای مونتاژ قطعات استفاده می شوند نیز نشان داده شده اند. برش هر DNA با آنزیم مناسب (نوک پیکان های رنگی) انتهای چسبنده سازگار ایجاد می کند. اینها را می توان از طریق اتصال (فلش سیاه) سر به دم متصل کرد تا قطعات مرکب جدا شده توسط یک دنباله اسکار 6 نوکلئوتیدی (ggatct) تولید شود. وقتی در قالب ترجمه می شود ، توالی اسکار بین قطعات کد کننده گلیسین-سرین ، یک اتصال دهنده پپتید برای بیشتر کاربردهای فیوزی پروتئین، است.

**Assembly of protein expression devices with ranging expression profiles:**

یکی از اهداف تکراری زیست شناسی مصنوعی شناسایی قابل پیش بینی و قابل اعتماد توالی DNA است که خاصیت بیولوژیکی خاصی را در سطح دقیق فعالیت ارائه می دهد. یک رویکرد کلی به این هدف ، جمع آوری اطلاعات کمی در مورد عملکرد قطعات خاص است. برای شروع پرداختن به این موضوع ، ما کتابخانه ای از سایت های اتصال دهنده ریبوزوم (RBS) را برای توانایی آنها در ارائه سطوح مختلف بازده ترجمه در قالب BglBrick ، ​​آزمایش کردیم (شکل 2). ما ابتدا با جهش زایی اشباع کتابخانه ای از قطعات RBS را در یک پلاسمید BglBrick ایجاد کردیم. از بین جهش های بدست آمده ، انواع مختلفی را انتخاب کردیم که دامنه فعالیت های RBS مشاهده شده در کتابخانه را برای استفاده به عنوان قطعات اساسی در بر می گرفت. با استفاده از مونتاژ استاندارد ، ما یک سری قطعات مرکب متشکل از یک پروموتر Tet سازنده فعال ، یک نوع RBS و یک توالی کدگذاری lacZ ساخته ایم. فعالیت بتاگالاکتوزیداز هر یک از انواع با استفاده از روش میلر تعیین شد. این آزمایشات نشان می دهد که می توان از مجموعه BglBrick برای ایجاد مجموعه ای از دستگاه های بیان پروتئین عملکردی استفاده کرد که طیف گسترده ای از پروفایل های بیان را نشان می دهد.

**Assembly of multi-domain fusion protein devices:**

یکی از مزایای اصلی استاندارد BglBrick این است که اسکار 6 نوکلئوتیدی تولید شده پس از مونتاژ دو قسمت مجاور ، یک اتصال دهنده انعطاف پذیر گلیسین-سرین را هنگام ترجمه در قالب رمزگذاری می کند. برای نشان دادن اینكه از استاندارد BglBrick می توان برای جمع آوری دستگاههای كاربردی فیوز پروتئین متشكل از چندین قسمت ORF استفاده كرد ، ما دستگاههایی را ساختیم كه چندین حوزه را رمزگذاری می كند ، از جمله چندین تكرار چندین موتیف پروتئین-پروتئین. این دستگاه ها برای رمزگذاری پروتئین های "طعمه bait" مهندسی شده اند و از نظر توانایی آنها در پایین کشیدن "طعمه prey" با استفاده از روشهای کشش in vitro آزمایش شده اند. برای ساخت دستگاه طعمه bait ، ما ابتدا قطعات مرکب حاوی 0 ، 1 یا 4 تکرار از یک موتیف تعاملی SH3 حاوی یک اتصال دهنده گلیسین-سرین در N- ترمینال را که با توالی اسکار BglBrick جدا شده اند ، اضافه می کنیم که یک تکرار گلیسین-سرین اضافی می افزاید. ما همچنین از استاندارد BglBrick برای اتصال این قطعات ترکیبی به انتهای C-ترمینال آنزیم HMG-CoA سنتاز (HMGS) استفاده کردیم. علاوه بر این ، در HMGS برای کمک به خالص سازی پروتئین ، N-terminal با GST برچسب(tag داشت) گذاری شد. به عنوان طعمه ، ما از HMG CoA ردوکتاز (HMGR) استفاده کردیم ،که N-terminal آن با دامنه تعامل SH3 برچسب گذاری شده بود. در این آزمایشات ، HMGS و HMGR به عنوان "حامل" تکرار لیگاند پپتید طعمه SH3 (bait) و دامنه طعمه (prey)SH3 مورد استفاده قرار گرفتند ، بنابراین باید برای عملکرد اتصال مطلوب بی اثر در نظر گرفته شود.

**آخر صفحه 4 و ادامه در 5:**مونتاژ مبتنی بر آنزیم محدود کننده به ویژه یک استراتژی جذاب برای ساخت دستگاههایی با عناصر تکرار شونده است که به دو دلیل عمده می تواند مشکل ساز باشد. اولاً ، ایجاد دستگاههای حاوی توالی های تکراری با استفاده از روشهای مبتنی بر PCR دشوار است زیرا عدم align مناسب و annealing غلط پرایمرها اغلب محصولات کوتاهتر از حد مورد نظر تولید می کنند. دوم ، توالی های حاوی عناصر تکرار شونده می توانند اهدافی برای نوترکیبی باشند ، که اغلب می تواند منجر به دستگاه های پاک شده و / یا تنظیم مجدد شود. در این جا ، ما با ایجاد سه قسمت اساسی در قالب BglBrick ، ​​همه موتیف های لیگاند SH3 را رمزگذاری می کنیم ، خطر ایجاد نوترکیبی همولوگ در سلول را کاهش می دهیم. از ترکیبات این سه قسمت برای جمع آوری قطعات مرکب تکراری توسط مونتاژ استاندارد استفاده شد. اگرچه ما موارد ترکیب مجدد با دستگاههای حاوی حداکثر چهار تکرار یکسان را مشاهده نکرده ایم ، اما این امر می تواند برای مونتاژ دستگاههایی با تعداد تکرارهای بیشتر یکسان باشد.

**Targeted integration of BglBrick devices into the E. coli genome:**

هدف تکراری دیگر در زیست شناسی مصنوعی ، مهندسی سویه های میکروبی است که ژن های معرفی شده را به صورت پایدار و قابل پیش بینی ، چه در نسخه های منفرد یا به عنوان بخشی از مدارهای پیچیده ژنتیکی بیان کنند. برای دستیابی به این سطح از تنظیمات ، ما به ابزاری نیاز داریم که ادغام هدفمند توالی DNA را در مناطق خاص کروموزوم باکتریایی تسهیل کند. Wanner و همکاران یک سیستم یکپارچه سازی ژنومی ، مبتنی بر پلاسمیدهای CRIM (برای همانند سازی ، یکپارچه سازی و مدولار) را توصیف کرده اند که امکان ادغام تک کپی چند پلاسمید را در چندین مکان مشخص از یک ژنوم E. coli فراهم می کند. اینها ثابت کردند که این کار شدنی هست و در مقاله توضیحش هست دیگه ننوشتم چون مرتبط با کار ما نبود.

**صفحه 9:**

در توسعه استاندارد BglBrick ، ​​ما تشخیص دادیم که سودمندی هر استراتژی مونتاژ اساساً بر دو عامل استوار است: اول ، استحکام ذاتی آنزیم های محدود کننده درگیر در فرآیند مونتاژ. و دوم ، مطلوبیت توالی اسکار که پس از اتصال آنها به یکدیگر بین قطعات باقی می ماند. ما با انتخاب آنزیم هایی با سابقه استفاده گسترده ، قابلیت اطمینان نشان داده شده ، کارایی بالا در برش و در نتیجه ایجاد یک دنباله اسکار بی خطر ، این نکات را مورد توجه قرار داده ایم.

**Standard assembly of basic parts:**

اگرچه چندین پروتکل خاص برای مونتاژ استاندارد BglBrick در حال توسعه است ، اما می توان از استراتژی کلی توصیف شده در اینجا به عنوان ورود پسوند نام برد. به طور خلاصه ، برای پیوستن به دو پلاسمید حاوی قسمتهای A و B ، به ترتیب ، پلاسمید حاوی قسمت A با BamHI (که 3 'قسمت را قطع می کند) و XhoI (وکتور را برش می دهد) هضم می شود. به همین ترتیب ، پلاسمید حاوی قسمت B با BglII (که 5 'قسمت را قطع می کند) و XhoI بریده می شود. قطعات DNA توسط الکتروفورز جدا می شوند ، قسمتهای مد نظر روی ژل خالص سازی می شوند ، و برای تشخیص ویژگی ها و نگهداری به E. coli منتقل می شوند.