

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ,
СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 579.66

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ РЕПОРТЕРЫ turboGFP И turboRFP ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОМОТОРОВ В *Escherichia coli*: ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

© 2023 г. К. В. Лавров¹ *, Е. Г. Гречишникова¹, А. О. Шемякина¹,
А. Х. Берналь Мунгарро¹, М. С. Потапова¹, Д. Д. Дербиков¹, А. С. Яненко¹

¹Курчатовский геномный центр Национального исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: lavrov.ko@gmail.com

Поступила в редакцию 15.09.2023 г.

После доработки 30.09.2023 г.

Принята к публикации 11.10.2023 г.

Флуоресцентные белки – удобные репортеры, широко используемые в бактериях. Однако сегодня недостаточно информации о возможностях и ограничениях их использования для разработки и оптимизации экспрессионных кассет при конструировании бактериальных продуцентов для биотехнологии. В статье описаны особенности сверхэкспрессии генов зеленого и красного флуоресцентных белков: turboGFP и turboRFP соответственно – в *Escherichia coli* под контролем регулируемого изопропил-β-D-1-тиогактопиранозидом (ИПТГ) фагового промотора T5. Оба белка синтезируются в основном в растворимой форме и обладают заметной цитотоксичностью, которая при сверхэкспрессии в присутствии ИПТГ приводит к задержке роста культур и накоплению клонов, не синтезирующих исследуемые белки. При одинаковых условиях культивирования накопление таких клонов для turboRFP выражено сильнее, чем для turboGFP. При сниженном уровне экспрессии (в отсутствие ИПТГ) указанные эффекты снижаются (для turboRFP) или не проявляются вообще (для turboGFP). Обсуждены возможные причины цитотоксичности исследованных белков для клеток *E. coli*. Предложены практические рекомендации по использованию генов исследованных белков в качестве репортерных при разработке экспрессионных кассет. В частности, определен уровень продукции исследуемых белков, при котором не наблюдается негативных эффектов, и указаны возможности и ограничения метода цитофлуориметрической сортировки клеток при разработке штаммов-продуцентов.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, флуоресцентные белки, цитотоксичность, цитофлуориметрия, экспрессия генов, репортеры

DOI: 10.56304/S0234275823040063

Флуоресцентные белки (ФБ) – универсальные репортеры, вводимые в клетки для решения широкого круга задач визуализации, трекинга и измерения активности различных процессов [1–3]. Универсальность ФБ обусловлена тем, что их наличие и локализация могут быть легко определены, а концентрация легко измерена без дополнительных реагентов – по излучаемому ими свету. Для бактерий круг задач, решаемых с помощью репортеров вообще и ФБ в частности, имеет свою специфику и включает следующие: изучение свойств промоторов, разработку биосенсоров на внутриклеточные метаболиты, контроль целостности клеточной стенки, слежение за клетками бактерий в окружающей среде или тканях и другие [4].

Список сокращений: ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; ФБ – флуоресцентный(е) белок(ки); turboGFP (green fluorescent protein) – улучшенный зеленый флуоресцентный белок; turboRFP (red fluorescent protein) – улучшенный красный флуоресцентный белок.

Представленная здесь работа ориентирована в первую очередь на молекулярно-биотехнологические задачи, связанные с разработкой штаммов бактерий-продуцентов. В ходе таких работ используют репортеры, в том числе ФБ, для оптимизации транскрипционной активности промоторов, предназначенных для экспрессии целевых генов. Один из ключевых этапов такой оптимизации – введение в клетки плазмид с экспрессионной кассетой, содержащей ген ФБ, и получение библиотеки клонов, содержащих кассету и, следовательно, синтезирующих ФБ. Результатом этого этапа работы является количественная оценка флуоресценции клонов, отражающая количество синтезированного в них ФБ, и выбор клонов, обладающих определенными характеристиками. В тех случаях, когда необходим перебор библиотек генетических элементов, для отбора отличающихся по флуоресценции клонов используют высокопроизводительную тех-

нику, например клеточные сортеры, измеряющие флуоресценцию индивидуальных клеток [5].

Для таких работ используют ФБ с максимальной нейтральностью, что необходимо для жизнедеятельности клетки. Однако известно, что некоторые ФБ обладают определенным уровнем цитотоксичности [6–10]. Возможными причинами токсического эффекта могут быть следующие: образование нерастворимых олигомеров [10], окислительный стресс при созревании активного центра (из-за образования пероксида водорода [11]), окислительный стресс при освещении (из-за генерации активных форм кислорода [12]). Каковы бы ни были причины токсичности, важен ее результат: при культивировании клеток, продуцирующих ФБ, повышается частота мутаций, снижающих экспрессию генов ФБ (например, J. Liljeuhm и др. [6] обнаружили этот эффект для 2 из 14 ФБ). Возникновение мутантов со сниженной экспрессией может вносить существенную погрешность в оценку транскрипционной активности промоторов, что затрудняет отбор необходимых для дальнейшей работы конструкций.

Несмотря на популярность ФБ как репортеров, систематическая информация об уровнях их возможной цитотоксичности отсутствует, в том числе и для наиболее разработанных бактерий *Escherichia coli*. В связи с расширением применения таких репортеров для конструирования штаммов необходимо дополнять имеющуюся информацию по цитотоксичности для существующих вариантов ФБ.

Объектами представленной работы были turboGFP [13] и turboRFP [14] – соответственно зеленый и красный ФБ, представители нового поколения быстросозревающих и малоагрегирующих флуоресцентных репортеров. Задачами работы были оценка и сравнение цитотоксичности turboGFP и turboRFP в клетках *E. coli*, определение границ применимости этих белков для определения уровней экспрессии, задаваемых промоторами, а также выработка рекомендаций по оптимизации экспрессии для промоторов, выходящих за эти границы. Нас также интересовала применимость указанных ФБ как для спектрофотометрических, так и для цитофлуориметрических методов оценки экспрессии.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы, плазмиды и условия культивирования

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1. Культивирование штаммов *E. coli* проводили при 37°C с использованием плотной или жидкой питательной среды Лурия–Бертани (LB) [15] следующего состава, г/л: триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, хлористый натрий – 5, рН 7.0–7.2, – кроме того, в случае плот-

ной среды добавляли 20 г/л агар-агара. Культивирование в жидкой среде проводили при постоянном перемешивании (300 об/мин). В качестве селективного агента при отборе клонов *E. coli*, содержащих плазмиду, использовали ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Для повышения уровня экспрессии использовали изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации 100 мкг/мл.

Культивирование и пассирование клеток E. coli в жидкой среде

Колонию свежеполученного трансформанта засеивали истощающим штрихом на плотную среду без ИПТГ, инкубировали в течение ночи и проверяли на отсутствие неокрашенных колоний. Для первого пассажа использовали 5 мл жидкой среды и растили клетки до оптической плотности 0.2 при 492 нм (A_{492}). Полученную культуру инкубировали в течение 24 ч, после чего 50 мкл суспензии пересевали в 5 мл такой же среды и инкубировали в тех же условиях. Культуру второго пассажа еще раз пересевали в тех же условиях и получали клетки третьего пассажа.

Спектрофотометрический и флуоресцентный анализ

Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли в микропланшетах с плоским дном (Deltalab, Испания) на планшетном спектрофотометре (ридере) Multiscan (Thermo LabSystems Inc, США) при длине волны 492 нм (объем образца – 300 мкл/лунка).

Флуоресценцию клеточных суспензий измеряли на планшетном спектрофотометре (ридере) Safire II (Tecan, Швейцария) с параметрами, приведенными в табл. 2, в черных микропланшетах с плоским прозрачным дном (Greiner Bio-One, Австрия) (объем образца – 100 мкл/лунка). Клетки предварительно промывали 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.5). Интенсивность флуоресценции (FI) клеток, выраженную в условных единицах (у.е.), рассчитывали как отношение флуоресценции клеточных суспензий к оптической плотности суспензии, измеренной на планшетном ридере Safire II (Tecan) при длине волны 492 нм в той же аликвоте клеток.

Молекулярно-генетический анализ

Плазмиды вводили в клетки *E. coli* с помощью электротрансформации с использованием электропоратора Gene Pulser Xcell (BioRad, США). Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* с помощью набора GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя. Рестрикционное профилирование плазм-

Таблица 1. Используемые в работе штаммы, плазмиды и гены флуоресцентных белков
Table 1. Strains, plasmids, and fluorescent protein genes used

Штамм/плаزمид/ген	Описание	Источник
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Генотип штамма: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10 (Tet^R)</i>] – использован для экспрессии генов ФБ	StrataGene, США
<i>E. coli</i> XL1-Blue pTurboGFP-B	Штамм <i>E. coli</i> XL1-Blue, содержащий плазмиду pTurboGFP-B.	Данная работа
<i>E. coli</i> XL1-Blue pTurboRFP-B	Штамм <i>E. coli</i> XL1-Blue, содержащий плазмиду pTurboRFP-B.	Данная работа
pTurboGFP-B	Автономнореплицирующаяся плаزمид, содержащая ген <i>turbogfp</i> под контролем промоторной области фага T5 со встроенным оператором лактозного оперона <i>lacO</i> – P _{T5(lacO)} , Amp ^R . Нуклеотидная последовательность приведена в файле S1 Дополнительных материалов.	ЗАО “Евроген”, Россия
pTurboRFP-B	Автономнореплицирующаяся плазмид, содержащая ген <i>turborfp</i> под контролем промоторной области фага T5 со встроенным оператором лактозного оперона <i>lacO</i> – P _{T5(lacO)} , Amp ^R . Нуклеотидная последовательность приведена в файле S2 Дополнительных материалов.	ЗАО “Евроген”, Россия
<i>turbogfp</i>	Ген белка turboGFP, нуклеотидная последовательность приведена в файле S1 Дополнительных материалов.	[13]
<i>turborfp</i>	Ген белка turboRFP, нуклеотидная последовательность приведена в файле S2 Дополнительных материалов.	[14]

Таблица 2. Параметры для измерения интенсивности флуоресценции (FI) клеточных суспензий на планшетном ридере Safire II

Table 2. Parameters for measuring the fluorescence intensity (FI) of cell suspensions on a Safire II plate reader

Заданный параметр	<i>E. coli</i> XL1 pTurboGFP-B	<i>E. coli</i> XL1 pTurboRFP-B
Длина волны возбуждения, нм	482	553
Ширина спектральной щели, нм	10	10
Длина волны испускания, нм	518	586
Ширина спектральной щели, нм	17	20

мид проводили эндонуклеазами рестрикции *PvuI*, *PvuII* и *XhoI* согласно рекомендациям производителя ферментов (Thermo Fisher Scientific).

Электрофоретический анализ белков

Электрофорез белков в 12%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ) проводили по методу Лэммли [16] с последующим окрашиванием Coomassie G-250. Для приготовления клеточных лизатов клетки дважды промывали в 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.5), ресуспендировали до оптической плотности 7 при длине волны 600 нм в том же буфере и разруша-

ли ультразвуком при 0°C на гомогенизаторе Soniprep 150 (Sanyo, Япония). Полученный лизат осветляли центрифугированием при 3000 g. Концентрацию белка в супернатанте (растворимая фракция) определяли по методу Бредфорда с использованием набора реагентов Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). На дорожку геля наносили ~10 мкг белка.

Осадок, полученный в результате центрифугирования, растворяли в буфере для нанесения в объеме, равном объему клеточной суспензии, взятому для лизирования. На дорожку геля наносили объем, равный таковому для соответствующей

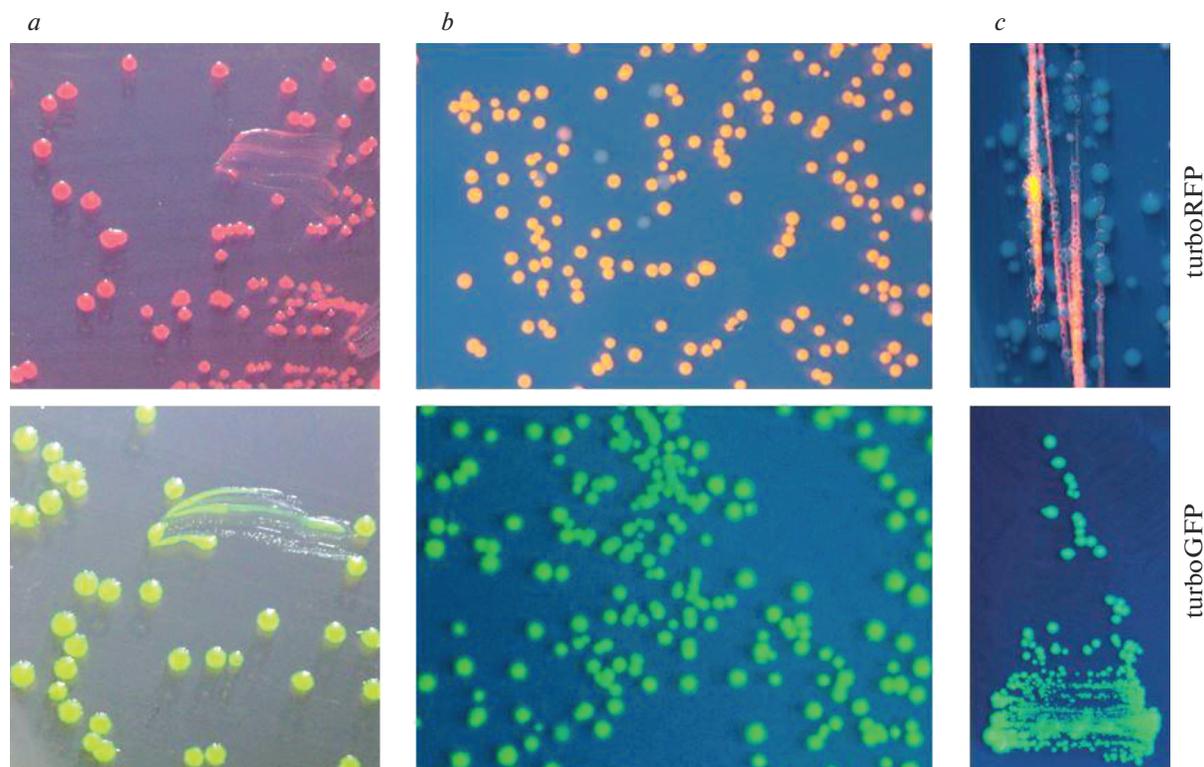


Рис. 1. Колонии трансформантов *E. coli* с генами флуоресцентных белков. Анализ колоний проведен при освещении дневным светом (а), в ультрафиолетовом свете (b) и в ультрафиолетовом свете при пересеве окрашенных колоний истощающим штрихом на ИПТГ-содержащую среду (с).

Fig. 1. Colonies of *E. coli* transformants with fluorescent protein genes. Colony analysis was carried out under daylight illumination (a), under ultraviolet light (b), and under ultraviolet light when stained colonies were subcultured with a depletion streak onto IPTG-containing medium (c).

шей растворимой фракции. В качестве маркера использовали Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Проточная цитофлуориметрия

Проточную цитофлуориметрию проводили на приборе CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа суспензию клеток разводили в физиологическом растворе до оптической плотности 0.05 при 600 нм и пропускали через детектор со скоростью 300–500 событий/с до набора ~50000 событий. Флуоресценцию возбуждали синим лазером (488 нм) и считывали в каналах FITC (525 нм с шириной полосы 40 нм) для turboGFP и PE (585 нм с шириной полосы 42 нм) для turboRFP. В качестве отрицательного (нефлуоресцирующего) контроля использовали клетки изогенного штамма, не синтезирующего ФБ. В качестве контроля для отсека событий детекции, не связанных с клетками, использовали данные, полученные при анализе физиологического раствора (без клеток). Для визуализации данных использовали гистограммы, представляющие зависимость числа клеток от интенсивности их флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения культур *E. coli*, синтезирующих turboGFP и turboRFP, использовали идентичные плазмиды с соответствующими генами, находящимися под контролем ИПТГ-регулируемого промотора T5 (кассеты $P_{T5(lacO)}-turbogfp$ и $P_{T5(lacO)}-turborfp$). Библиотеки независимых клонов, полученные после электротрансформации и культивирования (без ИПТГ) в течение 24 ч, были окрашены соответственно в зеленый и розовый цвет (рис. 1a), что облегчало визуальный контроль наличия экспрессии. Вероятно, эта заметная базальная экспрессия была связана с “протеканием” lacO (сайта связывания лактозного репрессора, встроенного в промотор T5) и с повышенной копийностью плазмиды, содержащей гены ФБ.

Визуальный контроль выявил различия в стабильности экспрессии зеленого и красного белков – как при первичном получении клонов, так и при дальнейшем их пассировании (рис. 1, табл. 3).

Для клеток *E. coli*, содержащих ген белка turboRFP, среди 3000 колоний окрашенных в розовый цвет трансформантов обнаружено около 1.5% неокрашенных (рис. 1b), в то время как для turboGFP

Таблица 3. Особенности появления неокрашенных клонов при культивировании на плотной среде клеток *E. coli*, содержащих ген флуоресцентного белка
Table 3. Peculiarities of the appearance of non-colored clones during cultivation of the fluorescent protein gene-containing *E. coli* cells on solid medium

ФБ/условия индукции	Наличие неокрашенных клонов	
	при первичном получении трансформантов	при пассажах окрашенных плазмидных клонов штрихом
turboGFP/–ИПТГ	Могут появляться, ~0.2% клонов	Не появляются в течение 4–5 пассажей
turboGFP/+ИПТГ	Нет данных	Могут появляться в течение 4–5 пассажей (но эффект нестабилен)
turboRFP/–ИПТГ	Стабильно появляются, ~1.5% клонов	Появляются в небольшом количестве в течение 4–5 пассажей
turboRFP/+ИПТГ	Нет данных	Появляются в большом количестве уже на первом пассаже

их было около 0.2%. Неокрашенные колонии возникали и при дальнейших пассажах окрашенных колоний на плотной среде, причем для культур с красным белком этот эффект был выражен значительно сильнее (табл. 3). Присутствие в среде ИПТГ, то есть повышение экспрессии целевых генов, усиливало появление неокрашенных клонов как с turboGFP, так и с turboRFP. Для обеих культур размер неокрашенных колоний был существенно больше, чем окрашенных, что указывало на повышенную скорость роста неокрашенных

культур (рис. 1с). При пассажах неокрашенных колоний на твердой среде цвет не восстанавливался. Кроме того, неокрашенные культуры не давали детектируемого на спектрофотометре флуоресцентного сигнала (рис. 2).

Быстрое накопление нефлуоресцирующих клонов при повышенной экспрессии целевого продукта приводило к тому, что для таких культур невозможно было получить воспроизводимые значения FI. Оценка степени накопления нефлуоресцирующих клонов на твердой среде осложнялась так-

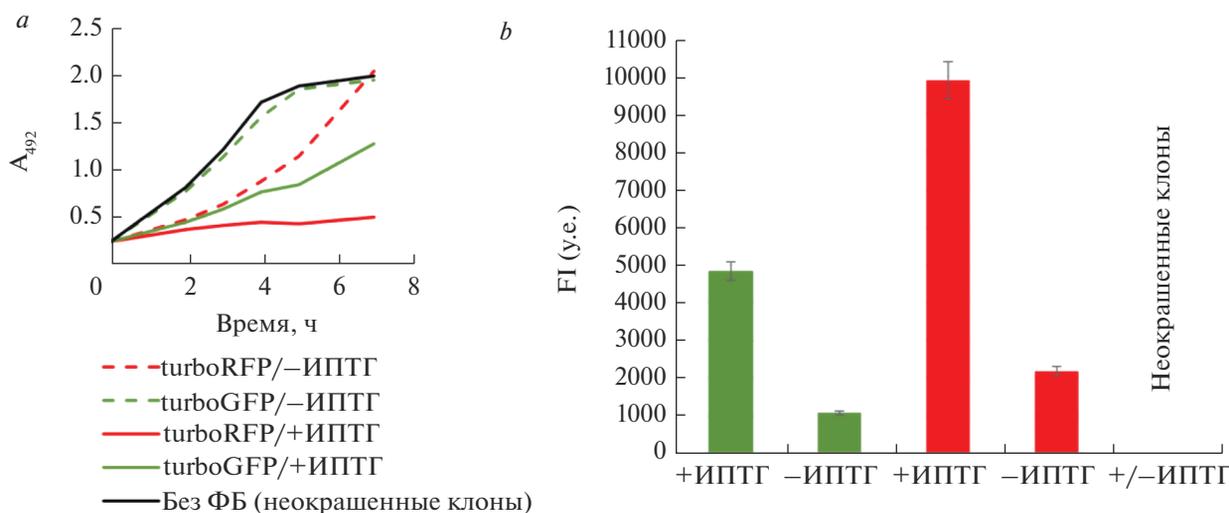


Рис. 2. Влияние экспрессии генов флуоресцентных белков на скорость роста культуры *E. coli*. *a* – Кривые роста клеток *E. coli*, экспрессирующих гены ФБ, в условиях повышенной и пониженной индукции. *b* – Интенсивность флуоресценции (FI) клеток *E. coli*, экспрессирующих гены ФБ, после культивирования в течение 7 ч (первый пассаж). Культуры без ФБ (неокрашенные клоны) – клоны, потерявшие флуоресценцию в ходе пассирования.

Fig. 2. Effect of fluorescent protein (FP) gene expression on the growth rate of *E. coli* culture. *a* – Growth curves of *E. coli* cells expressing FP genes under conditions of increased and decreased induction. *b* – Fluorescence of *E. coli* cells expressing FP genes after cultivation for 7 h (the first passage). Cultures without FP (non-colored clones) are clones that lost fluorescence during passaging.

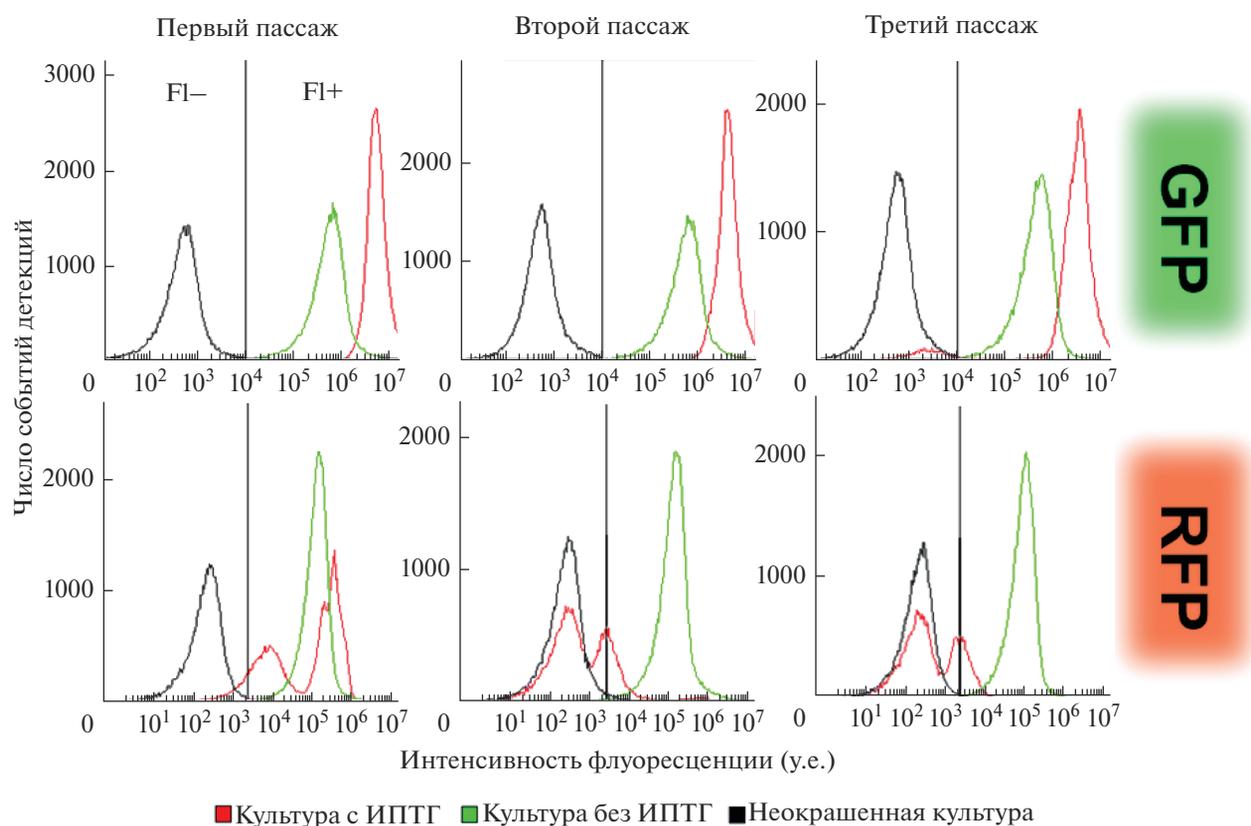


Рис. 3. Цитофлуориметрический анализ жидких культур *E. coli*, содержащих гены флуоресцентных белков. Вертикальная линия на каждой диаграмме условно разделяет зоны флуоресцирующих (FI+) и нефлуоресцирующих клеток (FI–), как указано на верхней диаграмме первого пассажа.

Fig. 3. Cytofluorimetric analysis of liquid cultures of *E. coli* containing fluorescent protein genes. The vertical line in each diagram conditionally separates the zones of fluorescent (FI+) and non-fluorescent cells (FI–), as indicated in the upper diagram for the first passage.

же тем, что у выросших за ночь при 37°C культур окрашенность была не выражена, поэтому охарактеризовать “чистоту” культуры было трудно. Склонность культур трансформированных клеток *E. coli* накапливать неокрашенные (нефлуоресцирующие) клетки мы оценили методом проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки растили в жидкой среде в присутствии и отсутствии ИПТГ. Окрашенные и “обесцветившиеся” клоны *E. coli*, содержащие ген ФБ, растили в течение 3 пассажей (см. раздел “Условия эксперимента”) и клетки из каждого пассажа анализировали на цитофлуориметре (рис. 3).

В культурах клеток, содержащих гены ФБ и культивируемых без ИПТГ, на всех пассажах флуоресценция распределялась в одном пике – с разбросом в пределах двух порядков. Следует сказать, что на планшетном ридере флуоресцентный сигнал для таких суспензий был высоким – порядка $(4–10) \times 10^3$ у.е. (рис. 2b), – поэтому правая часть графиков, представленных на рис. 3, содержащая такой пик, обозначена как зона флуоресцирующих клеток. Левая часть, содержащая аналогич-

ный пик клеток из неокрашенных клонов (флуоресцентный сигнал отсутствует, см. рис. 2b), обозначена как зона нефлуоресцирующих клеток.

Присутствие в среде ИПТГ, то есть сверхэкспрессия целевого продукта, не изменяло характера распределения turboGFP на первых двух пассажах. Однако после третьего пассажа в культурах появлялся второй пик, причем в зоне без флуоресценции. Возможно, это субпопуляция клеток, потерявших флуоресценцию лишь частично.

Для культур с turboRFP присутствие ИПТГ уже на первом пассаже приводило к появлению клеток со сниженной флуоресценцией, а на втором пассаже клетки с высокой интенсивностью флуоресценции практически исчезали, появлялись нефлуоресцирующие и оставались клетки с промежуточной интенсивностью сигнала. Доля последних визуально не снижалась и на третьем пассаже.

Таким образом, при культивировании в условиях сверхэкспрессии генов ФБ заметная часть трансформированных клеток *E. coli* теряла способность синтезировать целевой белок, что особенно на-

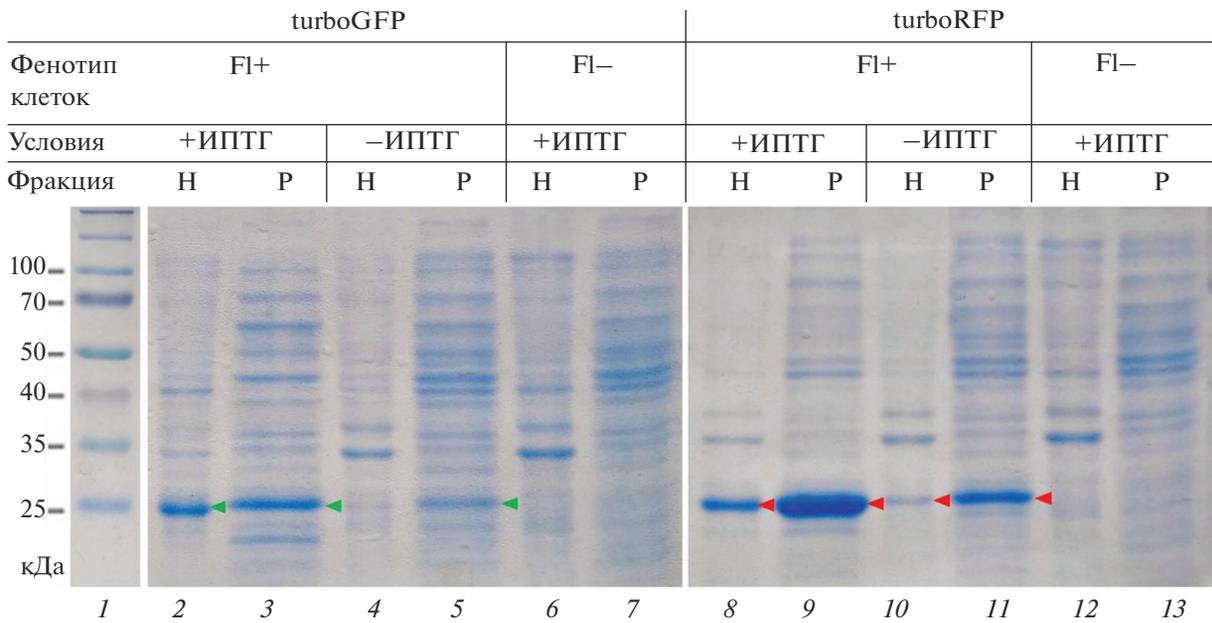


Рис. 4. Электрофорез бесклеточных экстрактов культур *E. coli*, экспрессирующих флуоресцентные белки (Fl+) и потерявших флуоресценцию (Fl-). На трек 1 нанесен маркер молекулярной массы белков Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Пояснения остальных дорожек с опытными растворами приведены над изображениями гелей, в том числе условия культивирования (с индукцией или без: +ИПТГ и -ИПТГ соответственно) и обозначения фракций, полученных в результате центрифугирования клеточного лизата (Н – нерастворимая фракция, Р – растворимая фракция). Положение белков turboGFP и turboRFP отмечено соответственно зелеными и красными стрелками. Приведена типичная электрофореграмма.

Fig. 4. Electrophoresis of cell-free extracts of *E. coli* cultures expressing fluorescent proteins (Fl+) and those that have lost fluorescence (Fl-). Track 1 contains a Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder molecular weight marker (Thermo Fisher Scientific). Explanations of the other lanes with experimental solutions are given above the images of the gels, including the cultivation conditions (with or without induction: +IPTG and -IPTG, respectively) and designations of fractions obtained by centrifugation of the cell lysate (I – insoluble fraction, S – soluble fraction). The positions of turboGFP and turboRFP proteins are indicated by green and red arrows, respectively. A typical electrophoregram is shown.

глядно продемонстрировано цитофлуориметрическим анализом клеток, выросших на жидкой среде. Важно заметить, что культура *E. coli*, экспрессирующая turboGFP, была более стабильна, чем экспрессирующая turboRFP.

В культурах, выглядевших неокрашенными на чашках (рис. 1), с недетектируемой флуоресценцией (рис. 2b) проанализировано наличие целевых продуктов: turboGFP и turboRFP (рис. 4). Оказалось, что ФБ в таких клетках – как в нерастворимой, так и в растворимой фракции – визуально не детектировались (рис. 4, дорожки 6, 7 и 12, 13).

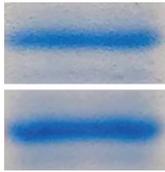
Как видно из данных, представленных на рис. 4, полная потеря флуоресценции у трансформированных клеток *E. coli* обусловлена отсутствием экспрессии целевых продуктов – зеленого и красного ФБ. Логично предположить, что это результат мутаций, произошедших в плазмидной ДНК, содержащей экспрессионную кассету. Для выяснения характера предполагаемых изменений были проанализированы плазмиды, выделенные из неокрашенных клонов. По результатам рестрикционного профилирования эти плазмиды не

отличались от использованных для трансформации клеток (данные не приведены). Секвенирование экспрессионной кассеты $P_{T5(lacO)}-turboRfp$ из 4 независимых нефлуоресцирующих клонов выявило точечные мутации и микроделеции в гене *turboRfp*, приводящие к сдвигу рамки считывания. Очевидно, именно эти мутации стали причиной потери флуоресценции клетками.

Достаточно высокая частота появления мутантных клонов, потерявших или снизивших экспрессию ФБ, указывает на то, что эти белки обладают определенной токсичностью для *E. coli*. Для оценки этого параметра мы проанализировали влияние экспрессии генов изучаемых ФБ на скорость роста клеток-продуцентов в жидких культурах в присутствии и в отсутствие в ИПТГ, то есть при разной интенсивности синтеза turboGFP и turboRFP. Культуры растили в течение одного 7-часового пассажа, для сравнения использовали неокрашенные культуры (рис. 2).

Оказалось, что без ИПТГ замедляется только рост культуры, экспрессирующей ген белка turboRFP (рис. 2a). В присутствии ИПТГ скорость роста

Таблица 4. Корреляция между содержанием флуоресцентного белка в клетке и появлением нефлуоресцирующих клонов в культуре**Table 4.** Correlation between the content of fluorescent protein in a cell and the appearance of non-fluorescent clones in culture

ФБ/условия роста		ЭФ в SDS-ПААГ ^a	Нефлуоресцирующие клоны	
			цитофлуориметрия ^b	визуальный анализ ^c
1	GFP/–ИПТГ	“Малое” количество 	Не выявлены после 3 пассажей	Появляются при первичном получении плазмидных клонов (~0.2%) и при дальнейших пассажах штрихом
2	GFP/+ИПТГ RFP/–ИПТГ	“Среднее” количество 	Появляется небольшая доля (нестабильно от опыта к опыту)	Стабильно появляются в небольшом количестве при пассажах
3	RFP/+ИПТГ	“Большое” количество 	Значительная доля после одного пассажа	Стабильно преобладают при пассажах

Примечание: ^a Изображения белковых полос воспроизведены с рис. 4; ^b рост на жидкой среде; ^c рост на плотной среде.
Note: ^a Images of protein bands are reproduced from Fig. 4; ^b growth on liquid medium; ^c growth on solid medium.

культур, экспрессирующих исследуемые белки, снижалась, при этом в большей степени в клетках с геном *turborfp* (рис. 2a). Влияние экспрессии гена *turbogfp* в присутствии ИПТГ было сходно с таковым для клеток с геном *turborfp* в отсутствие ИПТГ. Значения интенсивности флуоресценции клеток, отражающие количество ФБ в точке 7 ч культивирования, представлены на рис. 2b.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что синтез turboGFP и turboRFP негативно влияет на физиологию *E. coli*, снижая скорость роста культуры. Обнаруженное накопление клонов, потерявших или снизивших экспрессию изучаемых генов, видимо, является следствием этого негативного влияния. Мы считаем, что разница в эффекте появления нефлуоресцирующих клонов зависит не от того, какой именно ФБ (из двух исследованных) синтезируется в клетке, а от его количества (табл. 4).

При пассировании культур такие клоны воспроизводимо возникали уже при продукции ФБ, достигающей “среднего” уровня (табл. 4). Цитофлуориметрия при указанных уровнях продукции не выявляла такие клоны стабильно (рис. 3), что, вероятно, связано с небольшой их долей в популяции, полученной после 3 пассажей.

При относительно невысоком уровне продукции turboGFP (табл. 4) экспрессия была стабильной и клоны, потерявшие экспрессию, не обнаружены. Для turboRFP данных по сравнимому уровню продукции не получено, так как содержание этого белка, при одинаковых условиях экспрессии, было выше, чем turboGFP (рис. 4).

На основании полученных данных можно сформулировать практические рекомендации по границам применимости в клетках *E. coli* исследованных ФБ в качестве репортеров для количественной оценки активности промоторов. Мы считаем, что, независимо от характеристик используемой экспрессионной системы (копийность кассеты, активность промотора), верхняя граница определяется количеством синтезируемого ФБ – примерное содержание указано в строке 1 табл. 4. Мы оцениваем такое количество как “малое”. Достижимые сегодня уровни суперпродукции различных целевых белков в *E. coli* [17–20] существенно выше, чем приведенные нами. Это обусловлено использованием высокоактивных промоторов, что необходимо для реализации задач биотехнологии. Однако для таких процессов, как сверхэкспрессия генов биосинтеза метаболитов, выявленный нами хотя и невысокий, но в то же время без-

опасный уровень синтеза репортера может быть достаточен. Для создания же промышленных “био-катализаторов” экспрессии генов требуются существенно более высокие уровни продукции целевого белка (например, см. работу [21]). Для безопасной работы с промоторами со сравнимой или более высокой транскрипционной активностью, чем у использованного нами, можно применять более низкую копияность экспрессионной кассеты с геном ФБ (например, низко/однокопийные плазмиды или одну копию в хромосоме) и снижение эффективности инициации трансляции мРНК целевого белка (неоптимальные рибосомсвязывающие сайты и стартовые кодоны).

Нижняя граница применимости определяется возможностью отличить уровень флуоресценции, связанный с репортером, от собственной флуоресценции клеток. При измерении на спектрофотометре собственная флуоресценция клеток как в зеленом, так и в красном каналах не превышала 5 единицы. Достигнутые уровни флуоресценции (порядка 10^3 у.е., рис. 2) позволяют измерять активность промоторов в диапазоне 2–3 порядков слабее, чем использованный промотор T5.

Отдельного анализа требует вопрос использования исследуемых репортеров для цитофлуориметрической сортировки клеток бактерий после лабораторной эволюции промоторов: например, после ненаправленного внесения мутаций в целевые промоторы. Разброс измеряемых на цитофлуориметре сигналов флуоресценции отдельных клеток превышал порядок (рис. 3), что согласуется с данными других авторов [5]). Следовательно, для суспензий клеток, флуоресценция которых различалась в 5 раз на спектрофотометре (рис. 2), графики распределения флуоресценции, полученные на цитофлуориметре (рис. 3), будут существенно перекрываться. В силу этого, по нашему мнению, после ненаправленного внесения мутаций возможна эффективная сортировка вариантов, отличающихся от среднего исходной популяции не менее, чем на порядок. Дополнительно нужно отметить, что нам не удалось найти в литературе обсуждения причин такого большого разброса по интенсивности флуоресценции отдельных клеток. Из общих соображений понятно, что это может быть связано как с несовершенством измерения, так и с естественными различиями в содержании ФБ в индивидуальных клетках.

Несколько слов о цитотоксичности исследованных нами ФБ. Мы полагаем, что наиболее вероятной причиной их токсического действия на клетки может быть окислительный стресс. Дело в том, что при “созревании” активного центра ФБ, то есть хромофора, генерируется пероксид водорода. Фототоксичность, то есть генерация активных форм кислорода при освещении, не могла играть значительной роли, так как культуры расти-

ли в темноте. Как и другие авторы [6, 9], мы обнаружили различный уровень цитотоксичности исследованных нами белков. Это различие может быть связано как с различным их содержанием в клетках (рис. 4), так и с разным уровнем пероксида водорода, генерируемого зелеными и красными ФБ: красные хромофоры претерпевают две стадии окисления с выходом двух молекул H_2O_2 на хромофор, в то время как зеленые хромофоры индуцируют образование только одной молекулы [11]. Развивая вышеприведенные соображения, приходим к заключению, что возможным способом преодоления цитотоксичности при сверхэкспрессии ФБ может быть удаление излишков образовавшейся перекиси водорода, например путем дополнительной экспрессии гена каталазы или других пероксидаз.

В работе охарактеризованы особенности использования генов белков turboGFP и turboRFP как репортеров для оценки активности промоторов в *E. coli*. Показано, что оба белка обладают сравнимой степенью цитотоксичности, которая при их сверхэкспрессии приводит к существенной задержке роста клеток продуцента и быстрому накоплению клонов, не синтезирующих целевой продукт. Практическим результатом проведенного нами исследования можно считать рекомендации по “безопасной” для *E. coli* работе с изученными флуоресцентными белками: определены уровни их экспрессии, при которых токсический эффект на клетки минимален или вообще отсутствует. Также даны рекомендации по возможности использования этих флуоресцентных белков при исследовании высокоактивных промоторов. Актуальность выполненной нами работы обусловлена тем, что флуоресцентные белки – популярные репортеры, а бактерии *E. coli* – наиболее широко используемые в биотехнологии модельные и промышленные микроорганизмы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят старшего научного сотрудника Геномного центра НИЦ “Курчатовский институт” Татьяну Игоревну Калинину за полезное критическое обсуждение результатов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала: <https://sciencejournals.ru/journal/biotekh/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ghim C.-M., Lee S.K., Takayama S., Mitchell R.J. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Rep.*, 2010, 43(7), 451–460. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2010.43.7.451>
2. Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.*, 2002, 102(3), 759–782. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>
3. Rodriguez E.A., Campbell R.E., Lin J.Y., Lin M.Z., Miyawaki A., Palmer A.E., Shu X., Zhang J., Tsien R.Y. The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 2017, 42(2), 111–129. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.010>
4. Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Novikov A.D., Lavrov K.V., Yanenko A.S. Rhodococcus: sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2023, 43(6), 835–850. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2091976>
5. Chen Y.-J., Liu P., Nielsen A.A., Brophy J.A., Clancy K., Peterson T., Voigt C.A. Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. *Nat. Methods*, 2013, 10(7), 659–664. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2515>
6. Liljeruhm J., Funk S.K., Tietscher S., Edlund A.D., Jamal S., Wistrand-Yuen P., Dyrhage K., Gynnå A., Ivermark K., Lövgren J. Engineering a palette of eukaryotic chromoproteins for bacterial synthetic biology. *J. Biol. Eng.*, 2018, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0100-0>
7. Strack R.L., Strongin D.E., Bhattacharyya D., Tao W., Berman A., Broxmeyer H.E., Keenan R.J., Glick B.S. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat. Methods*, 2008, 5(11), 955–957. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1264>
8. Zhou J., Lin J., Zhou C., Deng X., Xia B. Cytotoxicity of red fluorescent protein DsRed is associated with the suppression of Bcl-xL translation. *FEBS Lett.*, 2011, 585(5), 821–827. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.013>
9. Shen Y., Chen Y., Wu J., Shaner N.C., Campbell R.E. Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *PLoS One*, 2017, 12(2), e0171257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171257>
10. Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*, 2005, 2(12), 905–909. <https://doi.org/10.1038/nmeth819>
11. Zhang L., Patel H.N., Lappe J.W., Wachter R.M. Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128(14), 4766–4772. <https://doi.org/10.1021/ja0580439>
12. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushkevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. A genetically encoded photosensitizer. *Nat. Biotechnol.*, 2006, 24(1), 95–99. <https://doi.org/10.1038/nbt1175>
13. Evdokimov A.G., Pokross M.E., Egorov N.S., Zarausky A.G., Yampolsky I.V., Merzlyak E.M., Shkoporov A.N., Sander I., Lukyanov K.A., Chudakov D.M. Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein. *EMBO Rep.*, 2006, 7(10), 1006–1012. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400787>
14. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods*, 2007, 4(7), 555–557. <https://doi.org/10.1038/nmeth1062>
15. Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.*, 2004, 186(3), 595–600. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.595-600.2004>
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
17. Suzuki M., Zhang J., Liu M., Woychik N.A., Inouye M. Single protein production in living cells facilitated by an mRNA interferase. *Mol. Cell*, 2005, 18(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.011>
18. Лавров К.В., Яненко А.С. Клонирование гена новой ациламидазы из *Rhodococcus erythropolis* и его экспрессия в *Escherichia coli*. *Генетика*, 2013, 49(10), 1236–1236. <https://doi.org/10.7868/S0016675813070096>
19. Новиков А.Д., Рябченко Л.Е., Леонова Т.Е., Ларинова Г.А., Лавров К.В., Глинский С.А., Яненко А.С. Бактериальный штамм *Alcaligenes denitrificans* C-32 содержит две нитрилазы с разной субстратной специфичностью. *Биотехнология*, 2016, 32(6), 45–52. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2016-32-6-45-52>
20. Studier F.W. T7 expression systems for inducible production of proteins from cloned genes in *E. coli*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2018, 124(1), e63. <https://doi.org/10.1002/cpmb.63>
21. Shemyakina A.O., Grechishnikova E.G., Novikov A.D., Asachenko A.F., Kalinina T.I., Lavrov K.V., Yanenko A.S. A set of active promoters with different activity profiles for superexpressing *Rhodococcus* strain. *ACS Synth. Biol.*, 2021, 10(3), 515–530. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00508>

Fluorescence Reporters turboGFP and turboRFP for Promoter Evaluation in *Escherichia coli*: Possibilities and Limitations

K. V. Lavrov^{a, #}, E. G. Grechishnikova^a, A. O. Shemyakina^a,
A. H. Bernal Mungarro^a, M. S. Potapova^a, D. D. Derbikov^a, and A. S. Yanenko^a

^a*Kurchatov Genome Center of the National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia*

[#]*e-mail: lavrov.ko@gmail.com*

Abstract—Fluorescent proteins are convenient reporters widely used in cell biology. However, today there is insufficient information on the possibilities and limitations of their use for the development and optimization of expression cassettes in the design of bacterial producers for biotechnology. Here, the features of overexpression of genes of green (turboGFP) and red (turboRFP) fluorescent proteins in *Escherichia coli* under the control of the IPTG-regulated phage promoter T5 were investigated. Both proteins were synthesized mainly in soluble form and exhibited significant cytotoxicity. In the presence of IPTG in the culture, overexpression of the turboGFP or turboRFP led to a delay in culture growth and the accumulation of clones that did not synthesize these proteins. Under the same cultivation conditions, the accumulation of such clones was more pronounced for turboRFP than for turboGFP. At a reduced expression level (in the absence of IPTG), these effects diminished (for turboRFP) or did not appear at all (for turboGFP). Possible reasons for the cytotoxicity of the studied proteins for *E. coli* cells were discussed. Practical recommendations for using the genes of investigated proteins as reporters in the development of expression cassettes were proposed. In particular, the level of production of the investigated proteins, at which no negative effects were observed, was determined, and the possibilities and limitations of the cytofluorimetric cell sorting method in the development of strains-producers were indicated.

Keywords: *Escherichia coli*, fluorescent protein, cytotoxicity, cytofluorimetry, gene expression, reporters