

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Егидарова Елена Юрьевна

**Разработка системы экспрессии рекомбинантных  
генов в клетках *Enterococcus spp.***

Выпускная квалификационная работа  
По направлению подготовки «Биология»

Работа выполнена  
в отделе молекулярной микробиологии НИИ  
экспериментальной медицины СЗО РАМН

Зав. лаборатории:  
д.м.н., профессор Суворов А. Н.

Научные руководители:  
Старший преподаватель каф.микробиологии СПбГУ  
Коженкова Елена Васильевна  
Научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ ИЭМ  
Карасева Алена Борисовна

Санкт-Петербург

2019

## Оглавление

Список сокращений.....	3
Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	5
1.1 Плазмиды как векторы для доставки ДНК в клетки реципиентов.....	5
1.2 Альтернатива <i>E.coli</i> как системы синтеза гетерологичных белков.....	6
1.3 Определение пробиотиков.....	9
1.4 Характеристика бактерий рода <i>Enterococcus</i> и их применение в качестве пробиотических препаратов.....	10
1.5 Характеристика бактериоцинов энтерококков.....	12
1.6 Области применения флуоресцентных белков.....	14
Глава 2. Материалы и методы.....	17
2.1 Штаммы и условия культивирования.....	17
2.2 Выделение и очистка ДНК.....	17
2.2.1 Экспресс выделение геномной ДНК методом термического лизиса.....	17
2.2.2 Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E.coli</i> .....	17
2.2.3 Экстракция тотальной ДНК.....	18
2.2.4 Выделение ДНК из агарозного геля.....	19
2.2.5 Очистка ПЦР амплификата.....	19
2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	19
2.4 Линейный электрофорез в агарозном геле.....	20
2.5 Молекулярное клонирование.....	20
2.5.1 Рестрикция вектора и амплификата.....	20
2.5.2 Лигирование.....	21
2.5.3 Трансформация клеток <i>E.coli</i> .....	21
2.6 Электропорация клеток <i>E.faecium</i> .....	21
2.7 Оценка экспрессии репортерных генов.....	22
2.7.1 Детекция флуоресценции.....	22
2.7.2 Индукция флуоресценции синтетическим феромоном EntF.....	22
2.7.3 Оценка стабильности плазмид в энтерококках.....	23
Глава 3. Результаты.....	24
3.1 ПЦР-амплификация слитых конструкций, состоящих из промоторной области гена <i>entA</i> и кодирующей части репортерного гена.....	24

3.2 Клонирование слитых конструкций в плазмиду и трансформация <i>E.coli</i> .....	26
3.3 Электропорация <i>E.faecium</i> .....	28
3.4 Индукция экспрессии репортерных генов при помощи синтетического феромона.....	32
3.5 Оценка стабильности плазмиды pBSU101 в клетках энтерококков.....	33
Глава 4. Обсуждение полученных результатов.....	35
Заключение.....	38
Выводы.....	40
Список литературы.....	41

## Список сокращений

eGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок

LB – среда Лурия-Бертани

TNB – среда Тода-Хьюита

TurboRFP – красный флуоресцентный белок

МКБ – молочно-кислые бактерии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

OD – оптическая плотность

П. н. – пары нуклеотидов

## Введение

В настоящее время идет активный поиск новых систем экспрессии рекомбинантных генов в клетках самых разных микроорганизмов. Одним из перспективных направлений этого поиска можно считать создание рекомбинантных штаммов энтерококков, которые могут быть применены в качестве «живых вакцин» - пробиотических штаммов содержащих рекомбинантные плазмиды и экспрессирующих поверхностные антигенные белки патогенных бактерий (Гупаловаи др.,2013).

Одними из наиболее удобных для использования репортерных генов на ранних этапах разработки экспрессионных векторов являются гены, кодирующие разнообразные флуоресцентные белки. Наблюдать экспрессию этих генов в бактериальных культурах возможно без трудоемкого этапа выделения и анализа мРНК.

Кроме того, в настоящее время активно изучается возможность использования энтерококков в качестве пробиотических бактерий для человека и животных. Создание штамма энтерококков, прижизненно меченного флуоресцентными белками, могло бы способствовать изучению длительности персистирования, локализации и установлению эффективности вводимых пробиотиков в организме лабораторных животных.

В связи с этим была поставлена следующая **цель исследования**:

Исследовать экспрессию рекомбинантных генов, помещенных под контроль промотора гена *entA* в клетках энтерококков.

**Задачи исследования:**

1. Создать генетическую конструкцию, состоящую из кодирующей части генов флуоресцентных белков *turborfp* и *egfp*, и промоторной области гена *entA* штамма *Enterococcus faecium*L-3.
2. Создать плазмидный вектор, содержащий полученную генетическую конструкцию и внедрить его в клетки в клетки *Enterococcus faecium*.
3. Качественно оценить экспрессию репортерных генов в клетках полученных рекомбинантных штаммов.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1 Плазмиды как векторы для доставки ДНК в клетки-реципиенты

В настоящее время генная инженерия является одной из наиболее интенсивно развивающихся отраслей биотехнологии. В основе ее методов лежат биохимические, генетические и молекулярно-биологические методы. Основной задачей генной инженерии является получение рекомбинантной ДНК, которая представляет собой искусственно созданную комбинацию из генетических последовательностей разных организмов. Первая рекомбинантная ДНК была создана в 1972 году в лаборатории Поля Берга. Именно это событие считают моментом зарождения генной инженерии (Журавлева, 2016).

Существуют разные способы доставки чужеродной ДНК в клетку бактерии-реципиента, однако, наиболее часто в качестве векторов используют природные и искусственные плазмиды. Термин «плазида» ввел Джошуа Ледерберг в 1952 году (Lederberg, 1952). Плазмидами называют экстрахромосомные молекулы ДНК, которые не являются органеллами или паразитами (вирусами) (Журавлева, 2016).

В целом, вектор должен иметь набор характеристик, которые делают его пригодным для трансформации и удобным для последующего выявления полученных трансформантов. Первый компонент - это ориджин репликации (*ori*), который будет распознаваться механизмом клеточной репликации, а также будет определять количество копий данной плазмиды в клетке. В зависимости от количества клеток-хозяев, в которых могут реплицироваться плазмиды, их подразделяют на векторы с широким и векторы с узким кругом хозяев. Другим необходимым компонентом вектора является маркер селективности. В качестве него может выступать любой ген, обеспечивающий избирательное преимущество для трансформантов. Например, ауксотрофия или устойчивость к антибиотикам.

Еще одним компонентом вектора можно считать последовательность полилинкера или сайт множественного клонирования (MCS), который содержит несколько сайтов, распознаваемых различными ферментами рестрикции (Czamanski et al., 2019).

Ранние векторные системы были созданы на основе природных плазмид и, в основном, из-за их механизма репликации, круг хозяев ограничивался клетками *E. coli*,

которая, все же, не является идеальной системой экспрессии гетерологичных белков для многих областей биотехнологии. В последующем, благодаря получению векторов с широким кругом хозяев, удалось использовать технологии рекомбинантных ДНК для самых различных бактерий (Czamanski et al., 2019).

## 1.2. Альтернатива *E.coli* как системы синтеза гетерологичных белков

Исторически одной из самых популярных систем для экспрессии рекомбинантных белков являются бактерии *Escherichia coli*. Несомненными преимуществами *E. coli* как системы для синтеза гетерологичных белков можно считать недорогие и простые среды для культивирования, короткое время генерации, апатогенность, большой выбор разработанных векторов и высокий выход целевого продукта (до 50 %, 10–1000 мг/л) (Журавлева, 2016).

Однако не всякий белок может быть успешно синтезирован в этой системе. Недостатки данного объекта могут быть обусловлены отличиями в использовании кодонов по сравнению с другими организмами. Кроме того, в клетках *E. coli* могут образовываться тельца включения, в которых скапливаются рекомбинантные белки, что сильно усложняет последующий процесс их выделения и очистки. Другие проблемы использования *E. coli* связаны с активностью протеаз, неправильной укладкой белков с дисульфидными связями и малым выходом растворимых белков, имеющих размер более 60 кДа (Журавлева, 2016).

Поэтому в последнее время прилагается много усилий для оптимизации *E. coli* как системы для синтеза гетерологичных белков. Кроме того, постоянно идет поиск все новых и новых возможных микроорганизмов как продуцентов ряда экономически интересных метаболитов и белков.

Еще одной давно известной и по-прежнему актуальной системой для синтеза гетерологичных белков являются дрожжи. В качестве модельных объектов наиболее известны дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а так же дрожжи рода *Pichia*. Дрожжевые клетки часто применяют в качестве продуцентов. Достоинствами дрожжей являются их быстрый рост, легкость выращивания и большое разнообразие (более 500) подробно охарактеризованных штаммов, что позволяет подобрать оптимальный штамм для каждого конкретного исследования. При этом дрожжи, в отличие от бактерий, не продуцируют эндотоксины и способны к осуществлению некоторых посттрансляционных модификаций: протеолитический процессинг, укладка белка,

образование дисульфидных связей и гликозилирование (белки же, синтезированные в бактериях, лишены этих модификаций и, зачастую, характеризуются нерастворимостью и неправильной укладкой, что естественно сказывается на их свойствах). Тем не менее, дрожжи не способны осуществлять сложные модификации, например, гликозилирование, производимое дрожжами, отличается от такового в клетках высших эукариот (Журавлева, 2016).

Одним из перспективных направлений поиска новых продуцентов является использование грамположительных бактерий как организмов для производства гетерологичных белков. Например, одним из возможных продуцентов могут быть грамположительные почвенные бактерии *Streptomyces lividans*. При использовании стрептомицетов в качестве продуцентов, гетерологичные гены сливаются с нуклеотидными последовательностями, кодирующими сигнальные пептиды Sec, которые являются активно секретируемыми эндогенными белками грамположительных бактерий *Streptomyces* spp. В этом случае рекомбинантные белки эффективно секретируются непосредственно во внешнюю среду, что, во-первых, является благоприятным условием для правильной укладки белков, а, во-вторых, облегчает процесс очистки целевого продукта (Anné et al., 2016).

Помимо этого, несомненными преимуществами *Str. lividans* можно считать отсутствие внешней мембраны с липополисахаридами, низкую активность протеаз, ограниченное функционирование системы рестрикции-модификации, что позволяет использовать неметилованную ДНК для трансформации или конъюгации, и избегать формирования телец включения (Hamed et al., 2018; Tsolis et al., 2018).

Эти особенности делают *Str. lividans* привлекательной альтернативой замены стандартных систем наработки гетерологичных белков.

К настоящему времени уже разработано большое количество векторов, включая репликативные плазмидные векторы, фаговые векторы и специальные векторы для интеграции ДНК в хромосому *Streptomyces* (Anné et al., 2016).

Другой бактерией, интересной для производства гетерологичных белков являются различные виды *Bacillus*, включая *B. subtilis*. Они могут продуцировать такие ферменты как протеазы, амилазы и липазы в количестве до 25 г / л (Anné et al., 2016). *B. subtilis* в настоящее время являются самыми хорошо изученными в мире микробиологии грамположительными бактериями, что делает их идеальным модельным объектом для изучения многих фундаментальных процессов, таких как репликация хромосом, регуляция генов, метаболизм, секреция белков и

дифференцировка бактериальных клеток. Это привело к возможности использования *B. subtilis* в промышленных условиях. Штамм *B. subtilis* 168 является непатогенным и не содержит экзотоксинов и эндотоксинов. Следовательно, он считается условно-безопасным для применения в промышленности. Кроме того, несколько улучшенных функций этого штамма, такие как высокая активность секреции гетерологичных ферментов и белков и легкость генетических манипуляций, позволяют *B. subtilis* служить идеальным микроорганизмом для использования в промышленности (Cui et al., 2018).

Еще одной группой перспективных микроорганизмов можно считать молочнокислые бактерии (МКБ). Молочнокислые бактерии представляют собой филогенетически разнообразную группу грамположительных, аэротолерантных, не образующих спор палочек или кокков. Они способны сбраживать углеводы с образованием молочной кислоты в качестве основного конечного продукта. Достоинствами МКБ являются их хорошая изученность и относительная безопасность (инфекции, вызванные лактобациллами, встречаются очень редко; а если и возникают, то чаще всего это оппортунистические инфекции, наблюдаемые у людей с ослабленным иммунитетом). Так же штаммы *Lactococcus lactis* экспрессируют очень мало мембраносвязанных или секретируемых протеаз (доказано, что в таких штаммах HtrA является единственной внеклеточной протеазой), следовательно, уменьшается риск разрушения гетерологичного белка (Anné et al., 2016).

Другим интересным аспектом рекомбинантных лактококков является то, что они могут быть использованы в качестве живых векторов для доставки антигенных или терапевтических белков к слизистым оболочкам для лечения аллергических, инфекционных и желудочно-кишечных заболеваний.

Один из успешных примеров – штамм *L. lactis*, продуцирующий противовоспалительный цитокин IL-10, который заметно уменьшил патологию колита в мышинной модели эксперимента (Anné et al., 2016). Другим интересным примером использования пробиотических бактерий в терапии и профилактике болезней могут служить «живые вакцины» на основе рекомбинантного штамма энтерококков *Enterococcus faecium* L-3. Для этих целей был сконструирован рекомбинантный штамм, в хромосому которого была встроена последовательность антигена стрептококка группы В, и данным штаммом иммунизировали лабораторных животных. Пятидневное нанесение живой энтерококковой вакцины на слизистую оболочку влагалища крыс стимулировало развитие местного и системного иммунного ответа с накоплением в

сыворотке крови и вагинальных секретах антител, специфичных к продуцируемому энтерококками антигену стрептококков. Подобные живые вакцины не только стимулировали выработку иммуноглобулинов к антигенам стрептококка, но и обеспечивали благоприятный фон для борьбы с инфекцией за счет усиления защитных реакций врожденного иммунитета (Гупалова и др., 2013).

### 1.3. Определение пробиотиков

Известный российский ученый И.И. Мечников еще в начале прошлого века начал изучать полезные для здоровья человека молочнокислые бактерии. Так начала зарождаться популярная в наши дни дисциплина - пробиотическая микробиология (Ермоленко, 2009).

Понятие «пробиотики» в настоящее время имеет много различных определений. Одно из возможных звучит следующим образом: «Под пробиотиками в настоящее время понимают препараты или пищевые продукты, содержащие живые бактерии, которые после попадания в человеческий организм оказывают благотворное воздействие, в первую очередь за счет восстановления нормального микробиоценоза кишечника» (Бондаренко, Суворов, 2007).

Пробиотические препараты активно используются как в медицине, так и в ветеринарии. Препараты-пробиотики широко применяются в качестве пищевых добавок, а также входят в состав биоогуртов и других молочнокислых продуктов. К микроорганизмам, включенным в состав пробиотиков, предъявляются следующие требования: они должны быть не патогенны и не токсичны, содержаться в продукте в достаточном количестве, сохранять жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт организма хозяина, быть устойчивыми к длительному хранению, а также оказывать положительное влияние на собственную микробиоту живого организма и подавлять развитие патогенных бактерий (Бондаренко, Суворов, 2007; Каширская, 2009). Пробиотики не считаются лекарственными препаратами и рассматриваются только как средства, благотворно влияющие на здоровье людей и животных (Каширская, 2009).

Большинство пробиотиков содержат *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp., реже в их состав входят *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. или спорообразующие бактерии, *Bacillus subtilis*. Кроме того, многие пробиотики содержат дрожжевые организмы. Все пробиотики можно подразделить на те, что включают только один вид

микроорганизмов и те, которые содержат два и более индивидуальных вида (Liu et al., 2018).

Помимо самих пробиотиков существуют так же пребиотики и синбиотики.

Под пребиотиками понимают не перевариваемые ингредиенты пищи, которые избирательно стимулируют рост и/или метаболическую активность одной или нескольких групп бактерий, которые обитают в толстой кишке человека или животного (Gibson, Roberfroid, 1995). Пребиотики могут включать в себя такие ингредиенты как фруктозо-олигосахариды, инулин, галакто-олигосахариды, лактулоза и лактитол (Каширская, 2009).

Синбиотики же в свою очередь представляют собой рациональную смесь пробиотиков и пребиотиков.

#### **1.4. Характеристика бактерий рода *Enterococcus* и их применение в качестве пробиотических препаратов**

Ранее энтерококки относились к стрептококкам группы D, пока более детальное изучение не показало, что правильнее выделить их в отдельный род (Бондаренко, Суворов, 2007). По современным представлениям род *Enterococcus* относится к семейству *Enterococcaceae* (тип *Firmicutes*, класс *Bacilli*, порядок *Lactobacillales*).

Энтерококки являются грамположительными бактериями, имеют овальную или сферическую форму и представлены парами или небольшими цепочками (Миронова, Коршукова, 2015). Не образуют споры или капсулы. Являются факультативными анаэробами. Оптимальная температура культивирования составляет 35-37° С (Бондаренко, Суворов, 2007), однако, согласно литературным данным, энтерококки способны выживать в довольно широком диапазоне температур - от 5 до 65°С. Они так же толерантны к высоким концентрациям солей и перепадам значений рН в пределах от 4,5 до 10 (Fisher, Phillips, 2009).

Бактерии рода *Enterococcus* обладают многими необходимыми для пробиотиков качествами. Они участвуют в синтезе витаминов, в том числе витамина В12, который в свою очередь является фактором роста для таких представителей микрофлоры кишечника как бифидобактерии (Алехина, Суворов, 2007). Кроме того, энтерококки являются иммуностимуляторами, благодаря которым поддерживается уровень цитокинов, необходимый для нормальной работы системы врожденного иммунитета (Бондаренко, Суворов, 2007). Еще одно полезное свойство энтерококков заключается в

их способности подавлять рост патогенных микроорганизмов. Это обусловлено выработкой особых пептидов бактериоцинов, которые являются «естественными антибиотиками» (Алехина, Суворов, 2007).

Наиболее часто в пробиотиках используются такие представители энтерококков как *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*. Одним из наиболее хорошо изученных и эффективных для применения штаммов является *Enterococcus faecium* L-3 (Суворов, Алехина, 2002). Он обладает сильной антагонистической активностью по отношению к патогенам, а так же кислотоустойчивостью и устойчивостью к желчным кислотам, что позволяет использовать его в бескапсульной форме – в виде пищевого кисломолочного продукта (Алехина, Суворов, 2007).

Наиболее успешно пробиотики на основе энтерококков используют при лечении дисбиозов, вызванных разными причинами, в том числе приемом антибиотиков. Сам по себе дисбиоз является не заболеванием, а только симптомом (Каширская, 2009). Под дисбиозом кишечника понимают качественные и количественные изменения микробиоты человека. На данный момент энтерококки являются компонентом таких препаратов-пробиотиков как: Ламинолакт (в состав которого входит штамм *Enterococcus faecium* L-3), Бифиформ, Линекс, и Bioflorin, содержащие специальный непатогенный штамм *Enterococcus faecium* SF68.

Энтерококки также являются неотъемлемой частью таких традиционных в разных странах пищевых продуктов, как сыры, колбасы, сметана и др. (Алехина, Суворов, 2007; Бондаренко, Суворов, 2007; Fisher, Phillips, 2009).

Однако существуют данные говорящие о высоком патогенном потенциале некоторых штаммов энтерококков. Первое описание энтерококковой инфекции, а точнее инфекционного эндокардита, было дано в еще в 1899 году (Arias, Murray, 2012). Помимо эндокардита энтерококки могут быть причиной таких заболеваний как инфекции мочеполовой системы, инфекции новорожденных, бактериемии, септический артрит, эндофтальмит, остеомиелит (Бондаренко, Суворов, 2007; Arias, Murray, 2012; Sava et al., 2010). Кроме того, в последнее время энтерококки стали частыми возбудителями внутрибольничных инфекций, в том числе послеоперационных сепсисов.

Усиление роли энтерококков в качестве патогенов во многом можно объяснить их множественной резистентностью к воздействию антибиотиков (Бондаренко, Суворов, 2007).

Согласно литературным данным наиболее важными факторами патогенности энтерококков являются такие поверхностные белки как энтерококковый поверхностный белок (Esp) (Sava et al., 2010; VanWamel et al., 2007), субстанция агрегации (AS)(Миронова, Коршукова, 2015; Gilmore et al.,2014; Mundy et al.,2000), коллаген-связывающийся белок (ACE) (Миронова, Коршукова, 2015; Sava et al., 2010), а так же желатиназа и молекулы, входящие в состав клеточной стенки (Paulson et al., 2003; Sava et al., 2010; Semedo et al.,2003).

Однако, необходимо отметить, что, не смотря на потенциальную патогенность, энтерококки обычно не способны вызывать инфекции у здорового хозяина, доказательством чего может быть их присутствие в нормальной микробиоте кишечника человека и животных (Arias, Murray, 2012; Sava et al., 2010).

### **1.5. Характеристика бактериоцинов энтерококков**

Бактериоцины энтерококков или, по-другому, энтероцины - это секретируемые за пределы бактериальной клетки антимикробные пептиды, которые обеспечивают регуляцию популяции бактерий и их антагонистическую активность по отношению к другим бактериям (Щепитова, 2015). Спектр ингибирования обычно ограничен штаммами, обитающими в той же экологической нише, что и штамм-продуцент бактериоцина. Исключением являются молочнокислые бактерии, чьи бактериоцины обладают широким спектром действия (Nilsen et al., 1998). Бактериоцины обычно являются термостабильными белками, но на их продуцирование влияют такие факторы как pH среды и наличие других бактерий. NaOH и этанол могут выступать в качестве ингибиторов образования бактериоцинов (Nilsen et al., 1998). Данные пептиды способны при контакте с бактерией вызывать повреждение клеточной стенки с последующей гибелью клетки (Бондаренко, Суворов,2007).

В последнее время энтероцины вызывают все больший интерес в качестве альтернативы химическим консервантам, поскольку являются безвредными для эукариотических клеток, устойчивыми к воздействиям pH и из-за своей пептидной природы подвержены протеолизу в желудочно-кишечном тракте (Щепитова, 2015). Кроме того, на данный момент, нет никаких сообщений о возникновении устойчивости бактерий к действию энтероцинов. Примером успешного использования бактериоцина в качестве консерванта может выступать низин - лантибиотик, пептид, обладающий антибактериальной активностью широкого спектра действия, в том числе,

направленной против пищевых патогенов. Низин был первым бактериоцином, который был использован в промышленных масштабах в пищевой промышленности, и в настоящее время он широко признан в качестве безопасного и естественного консерванта в некоторых пищевых продуктах во многих странах, включая США (Hansen, Sandine, 1994; Nilsen et al., 1998).

Так как в данной работе для конструирования рекомбинантного вектора использовалась промоторная область гена *entA*, то далее подробнее остановимся на особенностях строения и регуляции экспрессии оперона энтероцина А.

Энтероцин А является высокостабильным пептидоподобным пептидом с молекулярной массой 4,8 кДа, воздействующим как на грамположительные так и на грамотрицательные бактерии (Щепитова, 2015).

Если смотреть на хромосомную карту оперона гена *entA* (рис. 1), то в начале оперона располагаются последовательности гена самого энтероцина А и гена иммунитета к энтероцину А (*entI*). Кроме них в состав оперона входят ген, кодирующий фактор индукции экспрессии энтероцина (*entF*), ген гистидин киназы (*entK*) и ген белка регулятора ответа (*entR*). Непосредственно за последовательностями этих генов на хромосоме следуют последовательности белков EntT и EntD гомологичных ABC-переносчикам и вспомогательным факторам, соответственно.

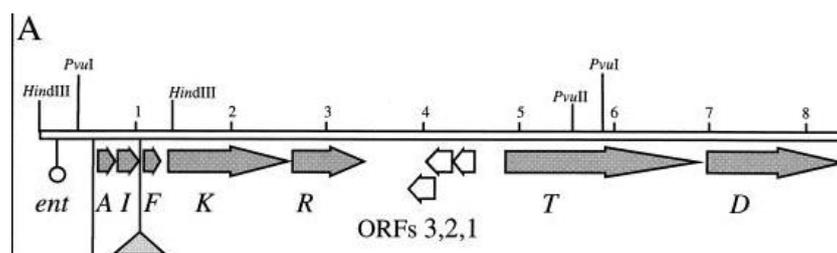


Рис. 1. Схема хромосомного локуса, содержащего открытой рамки считывания генов, связанных с продукцией и транспортом пептида EntA (O’Keeffe et al.,1999).

Экспрессия бактериоцина происходит с помощью двухкомпонентный регуляторной системы EntK/EntR, включающий в себя гистидин-протеинкиназу EntK, воспринимающую сигнал, а затем передающую его на регулятор EntR, который в дальнейшем осуществляет непосредственную активацию экспрессии генов. Сигналом для запуска экспрессии EntA является фактор индукции экспрессии EntF. (Hickey et al., 2003; Nilsen et al., 1998; O’Keeffe et al.,1999).

Фактор индукции представляет собой пептид, секретируемый самой клеткой, и служащий внеклеточным сигналом, который вызывает транскрипцию генов

бактериоцина. EntF является автоиндуктором, то есть, сам стимулирует свое образование (Nilsen et al., 1998). Исходя из этого, уровень экспрессии гена, находящегося под контролем промоторной области *entA*, можно регулировать количеством добавленного к культуре фактора индукции.

В эксперименте Hickey et al. было показано, что после добавления фактора индукции, активность помещенной под промотор *entA*  $\beta$ -глюкуронидазы возрастала в 20 раз по сравнению с неиндуцированными клетками. Для опыта был взят штамм *E. faecium* DPC3675, в котором производство EntF было нарушено с помощью вставки транспозона Tn916. Нарушение не затрагивало гены *entK* и *entR*. Таким образом, данный штамм сам не был способен производить фактор индукции, но был удобен для изучения влияния на экспрессию гена *entA* добавляемого к культуре синтетического феромона. В качестве индикаторных организмов были использованы *Listeria innocua* DPC1770 и *L. lactis* DPC3147. Кроме прочего, результаты продемонстрировали, что концентрации всего 0,2 нМ синтетического EntF оказалось достаточным для получения максимальной экспрессии (Hickey et al., 2003).

## 1.6. Области применения флуоресцентных белков

В 2008 году Осаму Шимомуре, Роджеру Циену и Мартину Чалфи была присуждена Нобелевская премия по химии за выделение зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein или GFP) из медузы *Aequorea victoria* (Shimomura, 2005). На данный момент существует несколько десятков естественных и искусственных генов, которые кодируют флуоресцентные белки, испускающие свет всех длин волн видимого спектра, от сине-зеленого до рубиново-красного. Тем не менее, наиболее часто применяются зеленый и красный флуоресцентные белки (Баймиев и др., 2011).

Самым широко применяемым флуоресцентным белком, несомненно, является GFP. Такая ситуация сложилась отчасти из-за изобилия данного белка в природных условия, отчасти благодаря тому, что именно он был открыт раньше других флуоресцентных белков. Флуоресцентные белки семейства GFP представляют собой пептиды размером 220-240 аминокислотных остатков, молекулярный вес которых составляет приблизительно 25кДа. Важно, что все GFP-подобные белки имеют более или менее выраженную тенденцию к олигомеризации. Даже GFP *Aequorea victoria*, который считается мономерным, образует димеры в высоких концентрациях. Тем не менее, следует отметить, что, на данный момент, уже существуют мономерные

флуоресцентные белки, удовлетворяющие большинству желаемых характеристик, например, улучшенный зеленый флуоресцентный белок eGFP (Chudakov et al., 2010).

Еще одним достаточно популярным в лабораторных исследованиях флуоресцентным белком является семейство белков RFP. Интересно, что свечение многих флуоресцентных белков, которые называются красными, такие как DsRed, TagRFP, TurboRFP и другие, на самом деле может выглядеть оранжево-красным. В настоящее время в этом оранжево-красном спектре наиболее оптимальными выглядят пять мономерных флуоресцентных белков: TagRFP, TagRFP-T, mStrawberry, mRuby и mCherry. Наиболее ярким из них является TagRFP. Однако, он уступает улучшенному TagRFP-T в фотостабильности. Ближе к красному цвету спектра излучения находятся белки mStrawberry и mRuby. Они выигрывают в яркости, но проигрывают в фотостабильности по сравнению с mCherry (Chudakov et al., 2010).

Флуоресцентные белки нашли многочисленные области применения в различных сферах науки (Shabayek, Spellerberg, 2016). Фотоактивируемые флуоресцентные белки позволяют наблюдать локализацию интересующих белков в клетке, белок-белковые взаимодействия, «старение» белков.

Кроме того, флуоресцентные белки являются важным инструментом в маркировании отдельных клеток и целых тканей для визуализации их морфологии и местоположения. Наконец, целые организмы могут быть помечены с помощью флуоресцентных белков для визуального различия трансгенных особей и особей дикого типа, а также для создания необычно окрашенных аквариумных рыб и других домашних животных (Chudakov et al., 2010).

Еще одна широко используемая область применения флуоресцентных белков - это изучение экспрессии промоторов как бактериальных, так эукариотических генов (Gleich-Theurer et al., 2009; Bauer et al., 2018).

Имеются методы позволяющие изучать активность сразу двух промоторов, так называемые расщепленные флуоресцентные белки. Это белки, разделенные на две части, которые находятся под контролем двух разных промоторов. При условии, что оба эти промотора работают в одной клетке, две части белка могут соединиться в функциональный белок и генерировать флуоресценцию (Chudakov et al., 2010).

Зачастую в изучении бактерий, в том числе и при наблюдении за патогенами в клетках хозяина, необходимы методы прижизненного маркирования. В настоящее время одними из самых удобных прижизненных маркеров являются гены флуоресцентных белков.

В распоряжении ученых имеется два основных метода маркирования бактериальных клеток. Это встраивание гена флуоресцентного белка и его последующая экспрессия в составе векторной плазмиды или в составе хромосомы бактерии-реципиента. Несомненным преимуществом хромосомной экспрессии является стабильность, но существует и ряд недостатков, таких как однокопийность вставки, относительно невысокий уровень выхода целевого продукта и случайность встраивания, которая может привести к мутациям штамма-реципиента. Плазмидная вставка лишена этих недостатков, однако, в этом случае имеется высокая вероятность элиминации плазмиды со временем (Баймиев и др., 2011).

Одним из несомненных преимуществ прижизненного флуоресцентного мечения клеток является возможность использования стандартных микроскопов, оснащенных общедоступными комплектами флуоресцентных фильтров (Muturi et al., 2019).

Несмотря на все свои достоинства, флуоресцентные белки не лишены некоторых недостатков.

Хотя флуоресцентные белки в качестве репортерных сыграли важную роль во многих открытиях, добавление флуоресцентной метки может нарушить нормальное функционирование белка, представляющего интерес. Например, при искусственном введении в клетки дрожжей флуоресцентных слитых белков, они могут попасть в окислительную среду эндоплазматического ретикулума. В том случае, если эти белки, содержат внутренние цистеины, которые могут вызывать образование ненативных дисульфидных мостиков, то это будет приводить к их неправильному фолдингу и отсутствию флуоресценции (Jiang et al., 2016).

Кроме того, нежелательными эффектами флуоресцентных белков является их олигомеризация, которая может привести к недооценке концентрации белка, и их токсичность. Искусственная мономеризация, в большинстве случаев, приводит к потере яркости, более медленной скорости созревания и снижению стабильности флуоресценции (Jiang et al., 2016; Shemiakina et al., 2012).

Поэтому в настоящее время разрабатываются все новые и новые модификации флуоресцентных белков, в которых учитываются и устраняются все прежние недостатки и это позволяет успешно использовать их в практике.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Штаммы и условия культивирования

В работе использовали следующие штаммы из коллекции отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ»: *E.faecium* L-3, *E.faecium* А64, *E.coli* JM109.

Выращивание *E.coli* JM109 проводили на среде LB (Лурия-Бертани) следующего состава: NaCl - 5 г/л; триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л; рН 7,0 при постоянном перемешивании на шейкере и температуре 37° С.

Для культивирования энтерококков применяли среду ТНВ (Тода-Хьюита) следующего состава: настой говяжьего сердца - 500 г/л; пептический перевар животной ткани - 20 г/л; глюкоза - 2 г/л; NaCl - 2 г/л; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 2 г/л; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 2,5 г/л; конечное значение рН (при 25°С) 7,8 ± 0,2. Бактерии выращивали в термостате при 37° С.

Для длительного хранения штаммов их подвергали замораживанию при - 80° С в подходящей питательной среде с добавлением глицерола до 25% объема.

### 2.2 Выделение и очистка ДНК

#### 2.2.1 Экспресс выделение геномной ДНК методом термического лизиса

Бактериальные клетки выращивали в жидкой питательной среде 12-18 часов, затем клетки подвергали центрифугированию в течение 1 минуты при 13,4 тыс. об/мин. Удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 50 мкл стерильной дистиллированной воды при помощи шейкера Vortex. Затем пробирки помещали в термоблок марки Biosan, модель Bio TDB-120 на 10 мин при 100° С. Полученную суспензию снова центрифугировали при прежних условиях. Выделенную ДНК хранили при -18° С.

#### 2.2.2 Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli*

Выделение плазмид в зависимости от объема выращенной культуры проводили при помощи коммерческих наборов AxyPrep Plasmid Midiprep Kit (объем 50 мл) или

AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (объем от 5 до 15 мл) в соответствии с прилагающимися к наборам инструкциями.

### 2.2.3 Экстракция тотальной ДНК

Тотальную ДНК выделяли с помощью фенол-хлороформа по следующей схеме. Для начала получали ночную культуру. С этой целью культуру клеток размораживали и 200 мкл исходной суспензии пересеивали в 10 мл жидкой питательной среды. Затем выращенную в течение ночи культуру центрифугировали 15 мин при 3,5 тыс. об/мин и удаляли супернатант. Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл ТЕ буфера (объемы добавляемых веществ приводятся в расчете на исходные 10 мл ночной культуры), добавляли 10 мкл лизоцима и инкубировали 1 час при 37° С, периодически помешивая. После этого во флакон добавляли 4 мкл протеинкиназы К и снова инкубировали в течение 15 минут при 65° С. Добавляли 70 мкл 10% SDS и инкубировали 45 мин при 65° С. Затем добавляли фенол, насыщенный ТЕ буфером, объемом 1:1 и аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки в течение 4 мин. Центрифугировали при 4000 об/мин 15 минут. Полученный супернатант переносили в чистую пробирку, после чего добавляли смесь фенол-хлороформа (в соотношении 1:1) объемом 1:1 и аккуратно перемешивали. Центрифугировали полученную смесь при прежних условиях и перемещали супернатант в чистые пробирки. Затем добавляли хлороформ объемом 1:1 и аккуратно перемешивали. Снова центрифугировали при прежних условиях и переносили в чистые пробирки. После этого добавляли 2,5 объема абсолютного этанола охлажденного до -20° С, хорошо перемешивали и оставляли на ночь в холодильнике. На следующий день центрифугировали при 4000 об/мин 15 минут и добавляли 96% спирт по объему спирт-раствор 2:1. После этого можно было наблюдать выпадение ДНК в виде полупрозрачного осадка. Проводили центрифугирование при 12 тыс об/мин в течение 5 минут и удаляли супернатант. В пробирку добавляли 1 мл 70% спирта и перемешивали на Vortex. После отмывания 70% спиртом добавляли 75 мкл буфера содержащего РНКазу и на 15 минут помещали в термостат при 37° С. Центрифугировали суспензию при 12 тыс. об/мин 5 минут, после чего удаляли супернатант, а ДНК, осевшую на стенках, высушивали от остатков спирта при комнатной температуре в течение 0,5 часа. Осадок ДНК растворяли в 100 мкл воды или ТЕ буфера.

## 2.2.4 Выделение ДНК из агарозного геля

Из геля вырезали фрагмент с ДНК определенного размера с помощью прибора DigiDoc-It System фирмы BioImaging Systems. ДНК из геля извлекали при помощи коммерческого набора AxyPrep DNA Gel Extraction Kit в соответствии с прилагающейся инструкцией.

## 2.2.5 Очистка ПЦР амплификата

После подтверждения успешного прохождения реакции ПЦР при помощи электрофореза в агарозном геле, проводили выделение амплификата из ПЦР-смеси при помощи коммерческого набора QIAquick PCR Purification Kit, согласно приложенной к реагентам инструкции.

## 2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проходила по схеме:

- 1) Денатурация ДНК
- 2) Отжиг праймеров
- 3) Элонгация цепи

Температура для отжига праймеров рассчитывали по следующей формуле:  
 $T=2x(A+T) + 4x(G+C)$ .

В состав реакционной смеси объемом 20 мкл входило: 10 мкл буфера (уже включающего в себя смесь нуклеотидов и полимеразу), по 0,5 мкл каждого из пары праймера, 4 мкл воды и 5 мкл ДНК. В работе использовался амплификатор Терцик фирмы ДНК-технологии не имеющий горячей крышки, поэтому в каждую пробирку с ПЦР смесью добавляли по 20 мкл минерального масла для избегания испарения смеси.

Прибору задавали следующие параметры реакции:

1. Денатурация ДНК при 93° С в течение 1 мин;
2. Амплификация фрагментов ДНК:
  - окончательная денатурация при 93° С в течение 40 сек.;
  - собственно отжиг праймеров при 55° С в течение 40 сек.;
  - элонгация при 72° С в течение 1 мин.

Данный процесс повторялся в течение тридцати циклов.

3. Элонгация оставшихся цепей при 72° С в течение 1,5 мин.

## 2.4 Линейный электрофорез в агарозном геле

Для разделения фрагментов ДНК и визуализации результатов ПЦР использовали линейный электрофорез в 1% агарозном геле. Для его приготовления 1 г агарозы плавил в 100 мл однократного буфера TAE (Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота – 8,96 мл, вода – 73,3 г). Для визуализации ДНК использовали интеркалирующий краситель-бромистый этидий марки Helicon. В качестве маркера длины ДНК для установления молекулярного размера продукта использовали GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder и GeneRuler 1kb DNA Ladder фирмы Thermo Fisher Scientific в зависимости от длины разгоняемых на электрофорезе фрагментов. Электрофорез проводили в камере WIDEMINI-SUBGELLGT марки Bio-Rad с источником питания Power Pac Basic марки BioRad при использовании режима 400мА, 75W и 200V. Оценка результатов электрофореза проводилась под УФ - светом с использованием прибора VersaDoc MP4000 и фильтра Ethidium Bromid 605UV TRANS.

## 2.5 Молекулярное клонирование

### 2.5.1 Рестрикция вектора и вставки

Для создания рекомбинантной конструкции использовали плазмиду pAT29, в составе полилинкера которой присутствовали сайты рестрикции EcoRI и BamHI. Полученная слитая конструкция из промоторной области гена *entA* и кодирующих областей репортерных генов также содержала по краям данные сайты, по которым и проводили гидролиз эндонуклеазами рестрикции и последующее лигирование вектора и амплификата.

Гидролиз ДНК рестриктазами проводился в соответствии с инструкцией, приложенной к набору ThermoScientific Fast Digest XhoI.

### 2.5.2 Лигирование

Лигирование проводили согласно инструкции приложенной к набору Rapid DNA Ligation Kit Thermo Fisher Scientific. Соотношение компонентов лигирования - вставка/вектор 3:1.

### 2.5.3 Трансформация клеток *E.coli*

Для трансформации выращивали ночную культуру клеток *E.coli* на жидкой питательной среде LB. Затем 2% ночной культуры пересеивали в свежую среду LB и доращивали до оптической плотности (OD) 0,3-0,4 при длине волны 600 нм. Выращенную культуру разливали по пробиркам объемом по 1 мл и центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин. Осадок ресуспендировали в 200 мкл 0,1 М хлорида кальция и выдерживали во льду в течение 1,5 часов. После этого суспензия подвергалась центрифугированию при прежних условиях, надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в смеси из 187,5 мкл хлорида кальция и 65 мкл воды. В полученную суспензию вносили 20 мкл плазмиды и выдерживали еще 1 час во льду. Затем содержимое пробирки перемешивали и на 2 мин помещали в термоблок Bio TDB-120 марки BIOSAN при 42° С, после чего сразу же еще 10 минут выдерживали во льду. Для восстановления жизнеспособности клеток в пробирку добавляли 1 мл питательной среды LB и на 1 час помещали в термостат при 37° С. Через час пробирку центрифугировали при 12 тыс. об/мин, большую часть среды удаляли, а в оставшихся 50-100 мкл осадок ресуспендировали. Суспензию переносили на чашку Петри с твердой питательной средой, содержащей спектиномицин в концентрации 100 мкг/мл, посев проводили при помощи стеклянного шпателя.

### 2.6. Электропорация клеток *E.faecium*

Для начала проводилась подготовка компетентных клеток для трансформации. Для этого в 6 мл ТНВ, содержащую 0,6% глицина, сеяли культуру энтерококка и оставляли на ночь при температуре +37° С. Затем 1мл ночной культуры пересеивали в 50 мл свежей питательной среды ТНВ и инкубировали до OD 0,2-0,4. После этого культуру помещали в лед и отмывали от среды 4 раза. Для этого культуру заливали 20 мл 10% глицерола, охлажденного до 4° С, и центрифугировали при 3,5 тыс. об/мин и

температуре 4° С в течение 20 мин. После последней отмывки клетки ресуспендировали в 1 мл 10% глицерола и центрифугировали 5 мин при 5 тыс. об/мин и 4° С. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл 10% глицерола и разливали в пробирки по 50 мкл. После этого к клеткам при постоянном охлаждении добавляли плазмидную ДНК и проводили электропорацию в приборе GenePulser Xcell марки BIO-RAD в кювете с использованием Preset протокола для *Streptococcus pyogenes* (V= 2100, 25 mF, TC= 5 микросек, кювета 1 мм). После электропорации в кювету добавляли 1 мл ТНВ, перемешивали, полученную суспензию переносили в пробирки и инкубировали клетки в течение часа при 37° С. Через час суспензию центрифугировали при 12 тыс. об/мин, удаляли большую часть питательной среды, а в оставшемся объеме ресуспендировали осадок и производили посев на чашку Петри с твердой питательной средой, содержащей спектиномицин в концентрации 120 мкл/мл. Посев осуществляли при помощи стеклянного шпателя.

## 2.7 Оценка экспрессии репортерных генов

### 2.7.1 Детекция флуоресценции

Для оценки флуоресценции бактерий выращивали на чашках Петри с твердой питательной средой с указанной выше концентрацией спектиномицина, а после этого помещали в камеру прибора Versa Doc MP4000. Флуоресценцию RFP оценивали с использованием режима Cy3 605 BP Green LED. Для детекции флуоресценции GFP был использован режим Cy2 530 BP Blue LED.

### 2.7.2 Индукция флуоресценции колоний синтетическим феромоном EntF

Для оценки влияния феромона-индуктора EntF на флуоресценцию колоний штамма *E.faecium*, трансформированного плазмидой, бактерии сеяли газоном на чашку Петри с твердой питательной средой ТНВ и антибиотиком в концентрации 120 мкг/мл. Поверх газона, каплями по 10 мкл, наносили синтетический феромон и помещали чашку на сутки в термостат при температуре 37° С. Результаты эксперимента визуализировали на приборе VersaDoc MP4000.

### 2.7.3 Оценка стабильности плазмид в штамме *E.faecium*

Для оценки стабильности плазмиды штамм *E.faecium* А64, трансформированный плазмидой pBSU101, одновременно заседали в 1 мл ТНВ и в 1 мл ТНВ+120 мкг/мл спектиномицина и выращивали сутки при 37° С. На следующий день из этих двух пробирок была сделана серия десятикратных разведений. Последние три разведения в виде капель объемом 10 мкл высевали на твердую питательную среду ТНВ с антибиотиком (120мкг/мл) и среду без антибиотика по 3 и более капель из каждого разведения. На следующий день результаты посева оценивали визуально, проводили подсчет колоний, а способность колоний к флуоресценции анализировали на приборе VersaDoc MP4000. Из пробирок с суточной культурой клеток отбирали по 20 мкл и переседали в новые пробирки с ТНВ и ТНВ+120 мкг/мл спектиномицина. Подобные процедуры проводили каждый день в течение 6 суток.

Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel.

## Глава 3. Результаты

### 3.1. ПЦР-амплификация слитых конструкций, состоящих из промоторной области гена *entA* и кодирующей части репортерного гена

Для получения слитых конструкций использовали метод ПЦР. Матрицей ДНК для промоторной области гена *entA* служила ДНК пробиотического штамма *E.faecium* L-3, для гена *turborfp* – плаزمида рTurboRFP-B (Баймиев и др., 2011), а для гена *egfp* – плазмида рBSU101 (Aumanns et al., 2011). Схема ПЦР приведена на рисунке 2. Для создания конструкций с геном *turborfp* амплификацию промоторной области гена *entA* проводили при помощи праймеров p1 и p2, а для создания конструкции с геном *egfp* промоторную область амплифицировали при помощи праймеров p1 и p3. Амплификацию кодирующей последовательности гена *turborfp* проводили при помощи праймеров rfp1 и rfp2; гена *egfp* — при помощи праймеров gfp1 и gfp2. Праймеры p2 и p3 были сконструированы таким образом, что содержали участок, комплементарный последовательности промоторной области гена *entA*, и участок, комплементарный началу кодирующим частям генов *turborfp* и *egfp*, соответственно. В результате были получены амплификаты промоторной области гена *entA* и последовательностей генов *turborfp* и *egfp* размерами 246 п. н., 716 п. н. и 720 п. н., соответственно.

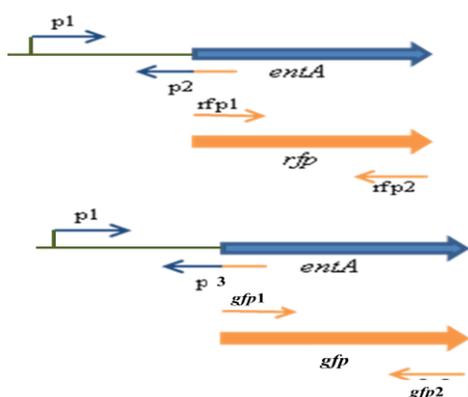


Рис.2. Схема получения амплификатов промоторной области гена *entA* и генов *turborfp* и *egfp*. Синими стрелками обозначен ген *entA* и праймеры к промотору гена *entA*. Оранжевые стрелки – гены *turborfp* и *egfp* и праймеры к их последовательностям.

Полученные амплификаты смешивали попарно (репортерный ген и промотор) и ставили ПЦР с использованием прямого праймера p1 и праймеров *gfp2* и *gfp2* в качестве обратных. Праймер p1 содержал на 5' конце сайт рестрикции *Bam*HI, а праймеры *gfp2* и *gfp2* содержали на своих 5' концах сайты рестрикции *Eco*RI. В итоге, получили ампликат PentARFP размером 948 п. н., представляющий собой слитую конструкцию из промоторной области гена *entA* и кодирующей части гена *turborfp* (рис. 3А), а также ампликат PentAGFP размером 952 п. н. представляющий собой слитую конструкцию из промоторной области гена *entA* и кодирующей части гена *egfp* (рис. 3Б). На рисунке 3Б помимо полосы, размером около 1000 п.н. можно увидеть еще полосы, имеющие размер приблизительно и 750 п. н. и 300 п. н. Последняя полоса, вероятно, соответствует неспецифичному ПЦР-ответу, в то время как полоса размером 750 п. н., скорее всего, является исходной копией гена *egfp*.

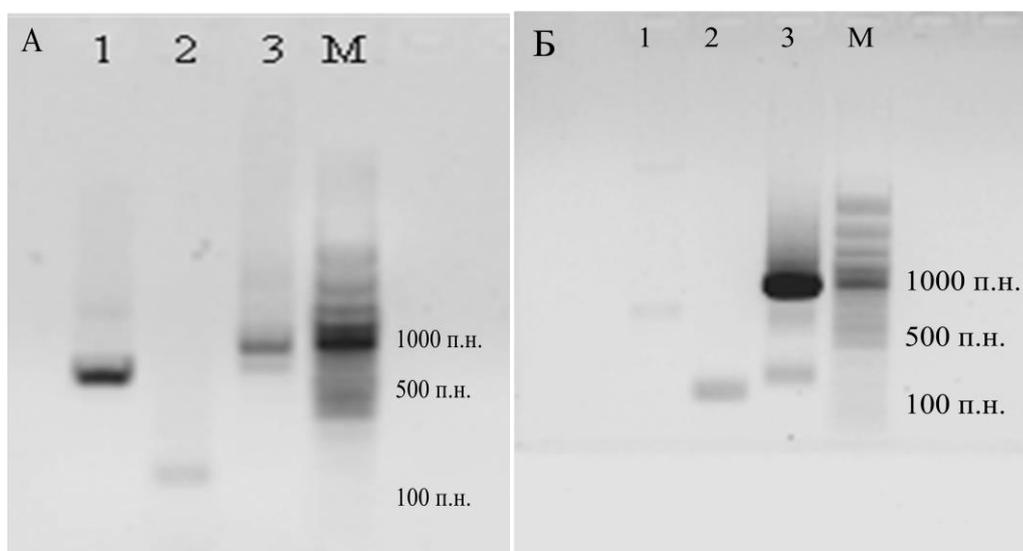


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР. **3А.** М – маркер длины фрагментов ДНК, 1 - ген *rfp*, 2 – промоторная область гена *entA*, 3 – слитая конструкция *pentARFP*. **3Б.** М – маркер длины фрагментов ДНК, 1 - ген *gfp*, 2 – промоторная область гена *entA*, 3 – слитая конструкция *pentAGFP*.

### 3.2 Клонирование слитых конструкций в плазмиду и трансформация *E.coli*

Для работы была выбрана плазида широкого круга хозяев pAT29, способная реплицироваться в клетках как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий (рис. 4) (Trieu-Cuot et al., 1990).

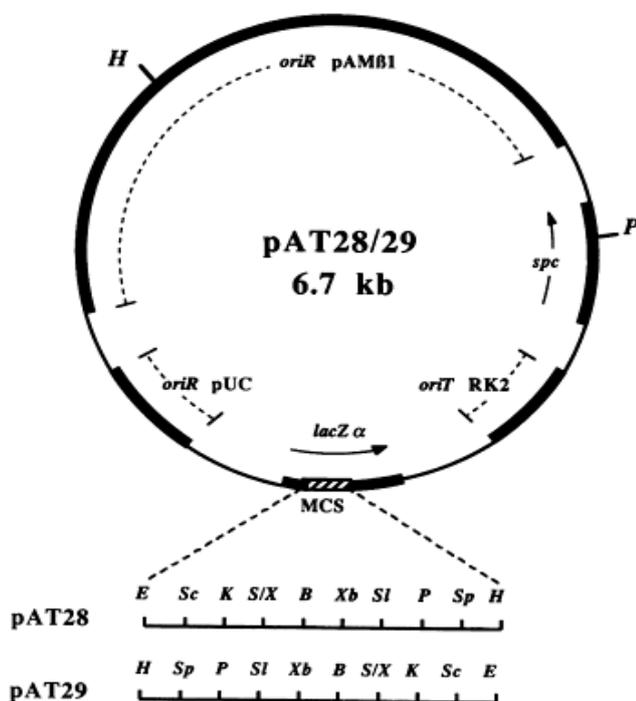


Рис. 4. Структура плазмиды pAT29 (Trieu-Cuot et al., 1990).

spc – ген устойчивости к спектиномицину, MCS – последовательность полилинкера.

Вектор pAT29 и амплификаты PentARFP и PentAGFP гидролизовали при помощи эндонуклеаз рестрикции, лигировали, а полученными лигазными смесями проводили трансформацию компетентных клеток штамма *E.coli* JM109. Колонии, выросшие на агаризованной среде LB, содержащей спектиномицин, были отобраны и проанализированы при помощи системы детекции Versa Doc MP4000.

При освещении чашек Петри ультрафиолетом с использованием режима Су3 (фильтр эмиссии - 605 нм), можно было наблюдать яркое свечение колоний, предположительно содержащих рекомбинантную плазмиду со встроенным фрагментом PentARFP, в то время как колонии *E.coli* JM109 без плазмиды почти не видны при данном освещении (пример показан на рис. 5). Кроме того, было отмечено, что обладающие флуоресцентным RFP-фенотипом трансформированные колонии в

отличие от исходного штамма *E.coli* JM109, имели розовую окраску, видимую невооруженным глазом (рис. 5Б)

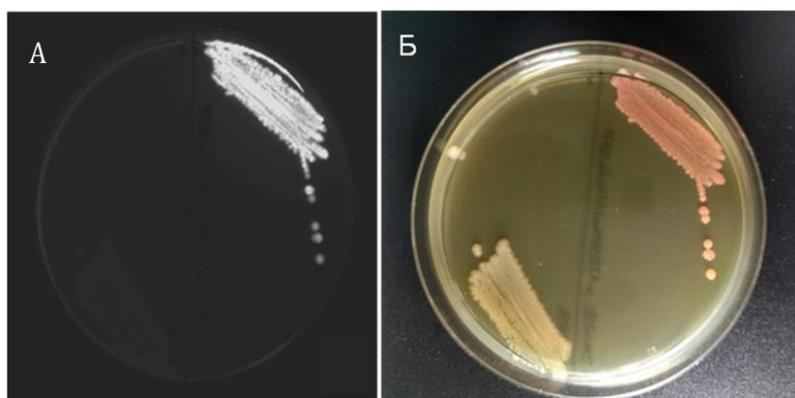


Рис. 5. Целевой фенотип штамма *E.coli* JM109, трансформированного рекомбинантной плазмидой рАТ29PentARFP.

На чашках клоны *E.coli* JM109 экспрессирующие ген *turborfp* в сравнении с клонами *E.coli* JM109, не содержащими плазмиды рАТ29PentARFP. А – чашка Петри при освещении в VersaDoc MP4000 с использованием режима Cy3. Б – чашка Петри при комнатном освещении.

Для детекции флуоресценции у клонов предположительно содержащих рекомбинантную плазмиду со встроенным фрагментом PentAGFP использовался режим Cy2 (фильтр эмиссии - 530 нм). В результате, было установлено, что полученные клоны не обладали способностью к флуоресценции и не имели видимой окраски. Проверка этих клонов методом ПЦР позволила обнаружить клон, у которого плазмида содержала вставку, однако ее размер был почти в два раза меньше, чем ожидалось (около 500 п.н. вместо ~1000 п.н.). Результаты можно видеть на рисунке 13. Поэтому в дальнейшей работе были использованы только клоны *E.coli* JM109, трансформированные рекомбинантной плазмидой, содержащей вставку PentARFP. В данном случае также был использован метод ПЦР для дополнительного подтверждения наличия в трансформированных клонах рекомбинантных плазмид.

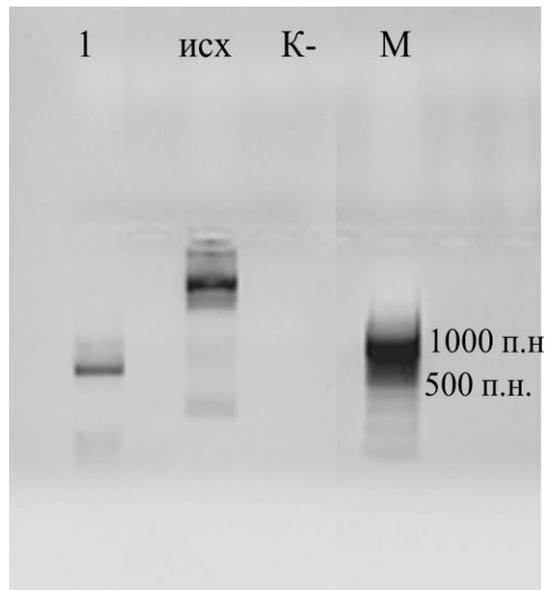


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами к полилинкеру рAT29PentAGFP, изолированной из *E.coli* JM109.

1 - амплификат вставки, исх – амплификат области полилинкера, К- - отрицательный контроль (ПЦР смесь без добавления ДНК-матрицы), М - маркер длины фрагментов ДНК.

В результате был выбран один штамм, обозначенный *E.coli* JM109pink, имеющий розовую окраску колоний, и у которого было подтверждено наличие плазмиды рAT29pentARFP. Все это говорит о том, что созданная конструкция из последовательности репортерного гена *turborfp*, находящегося под контролем промотора гена *entA* успешно функционирует в клетках *E.coli* JM109.

### 3.3 Электропорация *E.faecium*

Плазмида рAT29PentARFP была выделена из штамма *E.coli* JM109pink и проверена при помощи электрофореза в агарозном геле. На рисунке 7 можно видеть, что исходная плазмида рAT29 имеет меньший размер (6,7 т.н.п.) по сравнению с рекомбинантной плазмидой (размер около 7,5 т.н.п.) (рис. 7). Полоса размером приблизительно 3000 п.н. на дорожке, обозначенной как «pink», вероятно соответствует одноцепочечной кольцевой ДНК плазмиды рAT29PentARFP.

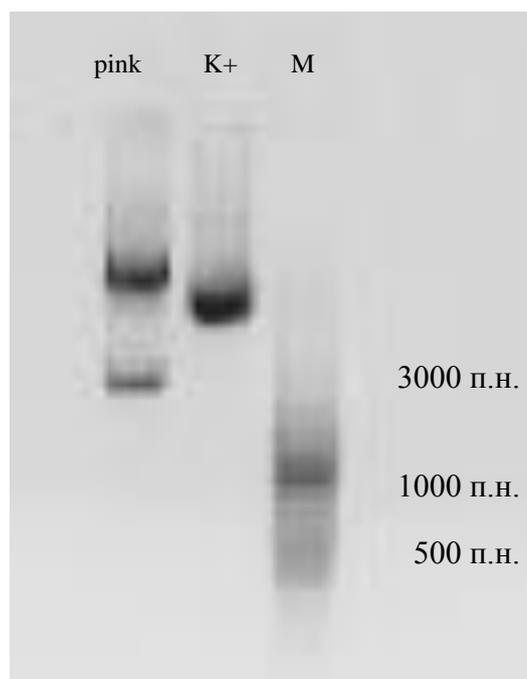


Рис. 7. Электрофореграмма ДНК плазмид рАТ29PentARFP и рАТ29.

pink - плазида рАТ29PentARFP, К+ - плазида рАТ29, М – маркер длины фрагментов ДНК.

Прежде всего, была проверена возможность успешной электротрансформации штаммов *E.faecium* исходной плазмидой рАТ29. Для этого были выбраны: пробиотический штамм *E.faecium* L-3 и штамм *E.faecium* А64 из коллекции отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ». В результате штамм *E.faecium* А64 удалось трансформировать исходной плазмидой рАТ29, а получить трансформированный штамм *E.faecium* L-3 не удалось даже после многократного повторения.

Впоследствии штамм *E.faecium* А64 трансформировали рекомбинантной плазмидой рАТ29PentARFP и контрольной плазмидой рBSU101, содержащей ген зеленого флуоресцентного белка (*egfp*) под контролем промотора гена *cfb* (Aumanns et al., 2011). Вектор рBSU101 создан на основе плазмиды рАТ28, которая по своему строению является идентичной плазмиде рАТ29 и отличается от нее только последовательностью полилинкера (рис. 8) (Trieu-Cuot et al., 1990). Доподлинно известно, что данной плазмидой трансформировали штаммы *E.faecium* и полученные трансформанты успешно экспрессировали ген *egfp*. Исходя из этого, плазида

pBSU101 была выбрана в качестве контроля адекватности проводимой процедуры трансформации.

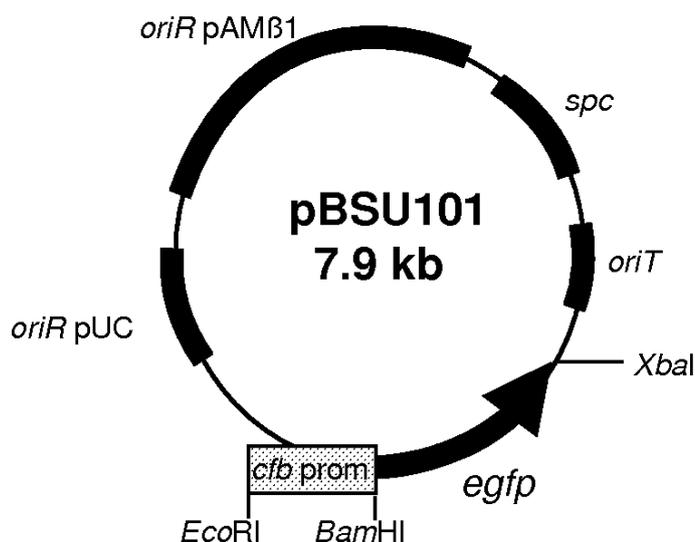


Рис. 8. Структура плазмиды pBSU101 (Aumanns et al., 2011).

*spc* – ген устойчивости к спектиномицину, *egfp* – ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка, помещенный под контроль промотора гена *cfb* (*cfbprom*).

В результате проведенной работы были получены два вида трансформантов *E.faecium* A64, способных расти на среде, содержащей спектиномицин.

Проверку успешности электротрансформации энтерококков дополнительно проверяли методом детекции флуоресценции колоний при помощи прибора VersaDoc.

Клоны *E.faecium* A64+pBSU101 обладали выраженным флуоресцентным фенотипом при использовании режима детекции Cy2 (рис. 9). После трансформации *E.faecium* A64 плазмидой pAT29PentARFP были получены клоны, способные расти на среде, содержащей спектиномицин (в отличие от исходного штамма *E.faecium* A64), но флуоресценция колоний при использовании режима Cy3 не была установлена.

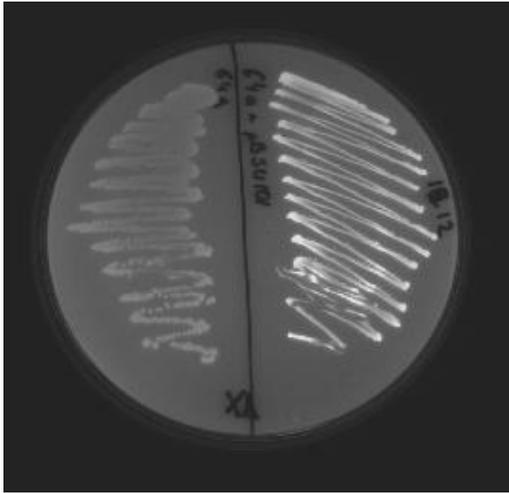


Рис. 9. Трансформированный (справа) и исходный (слева) штаммы *E.faecium* A64+ pBSU101 на среде ТНВ без антибиотика (при освещении в приборе VersaDoc MP4000 с использованием режима Су2).

Для того чтобы подтвердить наличие рекомбинантных плазмид в клетках штаммов-мутантов использовали метод ПЦР с праймерами, фланкирующими область полилинкера плазмиды рАТ29. Таким образом, при использовании рАТ29 в качестве матрицы должен был амплифицироваться короткий фрагмент ДНК размером 227 н.п., соответствующий области полилинкера, а при использовании рекомбинантной плазмиды — фрагмент ДНК, приблизительно равный размеру вставки (1000 нуклеотидов) (рис. 10).

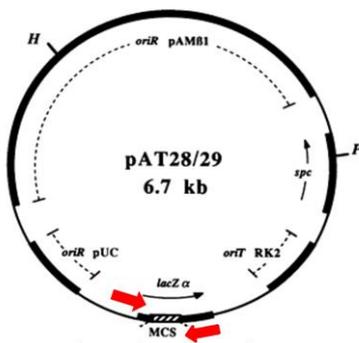


Рис. 10. Схема ПЦР для подтверждения наличия в бактериальных клетках рекомбинантной плазмиды.

MCS — последовательность полилинкера, spc — ген устойчивости к спектиномицину, красные стрелки — прямой и обратный праймеры для ПЦР.

Было определено, что полученные клоны содержат рекомбинантные плазмиды, однако в случае плазмиды рАТ29PentARFP, трансформанты приобретали устойчивость к спектиномицину, но не обладали способностью флуоресцировать при освещении УФ. На рисунке 11 приведены результаты ПЦР ДНК штамма *E.faecium* A64, содержащего рекомбинантную плазмиду рАТ29PentARFP.

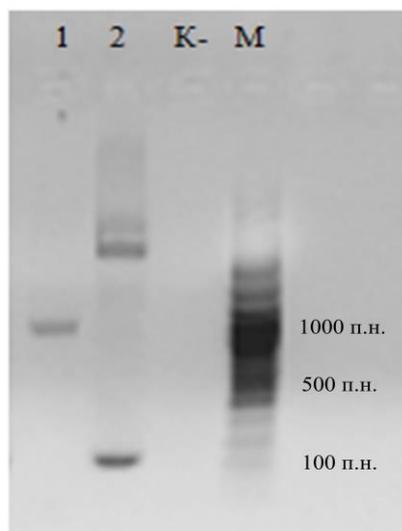


Рис. 11. Электрофореграмма продуктов ПЦР на наличие плазмиды рАТ29PentARFP в штамме *E.faecium* А64.

1 - амплификат вставки 2 – амплификат области полилинкера, К- - отрицательный контроль (ПЦР смесь без добавления ДНК-матрицы), М - маркер длины фрагментов ДНК.

### 3.4. Индукция экспрессии репортерных генов при помощи синтетического феромона

Предполагалось, что отсутствие свечения полученных клонов может быть связано с тем, что промотор гена *entA* нужно дополнительно индуцировать для появления детектируемой экспрессии гена *turborfp*, находящегося под его контролем, поэтому необходимо внесение в среду пептида-индуктора. Для проверки данной теории проводили индукцию свечения клонов при помощи синтетического феромона EntF. На газонный посев штамма *E.faecium*, трансформированного плазмидой рАТ29PentARFP, капали феромон и через сутки оценивали свечение.

По результатам эксперимента индукция экспрессии промотора гена *entA* синтетическим феромоном EntF и, соответственно, находящегося под его контролем гена *rfp*, не привела к появлению свечения у штамма-мутанта.

### 3.5 Оценка стабильности плазмиды pBSU101 в клетках энтерококков

Бактериям, трансформированным рекомбинантными плазмидами, при росте в отсутствие селективного фактора, чаще всего антибиотика, свойственно со временем терять данные плазмиды (Баймиев и др., 2011). Поскольку трансформанты *E.faecium*A64+ pAT29PentARFP, не проявляли флуоресцентный фенотип, то было решено изучить стабильность плазмид в клетках энтерококков на штамме трансформированном контрольной плазмидой pBSU101, содержащей ген *egfp*.

Для этого качественно и количественно оценивали общее число колоний и число флуоресцирующих клонов в 24-часовых культурах, которые пересевали в свежую жидкую питательную среду с антибиотиком или без антибиотика в течение 6 дней. Из разведений суточной культуры отбирали 10 мкл и точно наносили на твердую питательную среду ТНВ, содержащую и не содержащую спектиномицин. Далее через сутки оценивали число выросших клонов и их способность к флуоресценции. Флуоресценцию клонов детектировали с помощью освещения в приборе VersaDoc MP4000. Схема эксперимента по оценке стабильности плазмид представлена на рисунке 12.

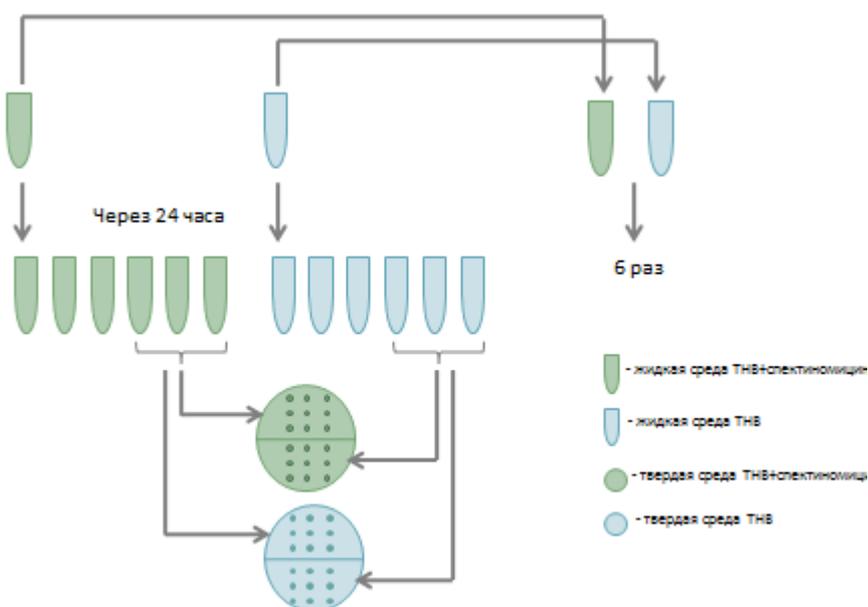


Рис. 12. Схема эксперимента по оценке стабильности плазмиды в клетках энтерококков.

Было установлено, что:

- 1) В культурах ежедневно пересеваемых на среду с антибиотиком общее число клонов в посевах через 24 часа составляло  $10^9$  КОЕ/мл. Все клоны флуоресцировали при освещении УФ.
- 2) При инкубировании бактерий в среде с антибиотиком и последующем высеве на твердую питательную среду без антибиотика общее число клонов и число флуоресцирующих колоний через 24 часа также составляло  $10^9$  КОЕ/мл.
- 3) Если же бактерий инкубировали на среде без спектиномицина, то при последующих высевах на питательную среду с антибиотиком через 6 пассажей снижалось как число образующихся клонов с  $10^8$  до  $10^6$  КОЕ/мл, так и число флуоресцирующих колоний до  $10^5$  КОЕ/мл.
- 4) В культурах, которые выращивали и ежедневно пересевали на среду без антибиотика, общее число клонов во всех пассажах через 24 часа составляло  $10^9$  КОЕ/мл, в то время как количество флуоресцентных клонов постепенно снижалось и через 6 пассажей также составляло  $10^5$  КОЕ/мл. Один из типичных результатов представлен на рис 13.

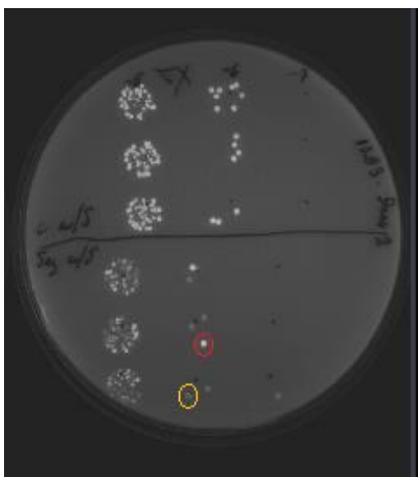


Рис. 13. Клоны энтерококков на среде ТНВ без антибиотика при освещении в приборе VersaDoc MP4000 с использованием режима Су2.

Красным цветом выделен клон *E.faecium* А64, экспрессирующий *egfp*, желтым – не экспрессирующий этот ген.

В результате, можно констатировать, что плаزمида стабильно реплицируется в клетках энтерококка при выращивании на среде, содержащей спектиномицин, и постепенно теряется при выращивании на среде, не содержащей антибиотик.

## Глава 4. Обсуждение полученных результатов

В данной работе мы проверяли возможность гетерологичной экспрессии в энтерококках рекомбинантных генов, помещенных под контроль промотора гена *entA*.

Ген *entA* у энтерококков кодирует антимикробный пептид EntA (энтероцин А), который отвечает за способность энтерококков подавлять рост некоторых видов бактерий. В норме ген *entA* экспрессируется под воздействием пептидного феромона-индуктора EntF, который вырабатывается самим энтерококком, однако, продукция энтероцина А может дополнительно стимулироваться при добавлении в среду синтетического пептида-индуктора EntF. Как уже говорилось, пептид EntF продуцируется и секретируется во внешнюю среду теми же штаммами энтерококков, которые продуцируют энтероцин А, а ген индуктора *entF* расположен рядом с геном *entA* (O’Keeffe et al., 1999). Пептид EntF может быть искусственно синтезирован и добавлен к культуре клеток энтерококков, что вызовет усиление экспрессии гена *entA* и других генов, необходимых для синтеза и секреции энтероцина А, а так же автоиндукцию экспрессии гена *entF*. Это было показано в работе O’Keeffe et al., в которой индуцировали выработку бактериоцина EntA у культур *E.faecium* DPC1146 добавлением химически синтезированного пептида-индуктора (O’Keeffe et al., 1999). Таким образом, добавление к среде этого пептида-индуктора теоретически позволит регулировать экспрессию любого рекомбинантного гена, помещенного под контроль промотора гена *entA*, при наличии в геноме штамма-продуцента двухкомпонентной регуляторной системы EntK/EntR и в результате получать более высокий выход целевого продукта.

В качестве репортерных генов в данной работе использовались гены флуоресцентных белков eGFP и TurboRFP. Использование генов флуоресцентных белков обосновано простотой процедуры определения их экспрессии: появление флуоресцентного фенотипа у штаммов, трансформированных векторами с генами рекомбинантных флуоресцентных белков, является доказательством их экспрессии, и не требует выделения РНК и постановки обратной транскрипции.

В качестве реципиентов рекомбинантных плазмид были выбраны следующие штаммы *E.faecium*: *E.faecium* L-3 и *E.faecium* A64. Штамм *E.faecium* L-3 является пробиотическим и был выделен из препарата Ламинолакт (Авена), кроме того данный штамм обладает антагонистической активностью по отношению к патогенным

бактериям, возможно в том числе за счет продукции пептида EntA, так как наличие гена *entA* было установлено у этого штамма (Karaseva et al., 2016). Штамм *E.faecium* A64 был выделен из организма здорового добровольца, и у этого штамма так же, как и у штамма *E.faecium* L-3, ранее было показано наличие гена *entA*. Поэтому предполагалось, добавление в среду синтетического феромона EntF будет усиливать экспрессию.

Полученный в результате трансформации штамм, обозначенный *E.coli* JM109pink, обладал целевым фенотипом, что подтверждает функциональность полученной конструкции.

В данной работе так и не удалось получить штамм *E.faecium* L-3, трансформированный какой-либо из плазмид рAT29 (исходной или рекомбинантной). Ранее было показано, что этот штамм содержит плазмиду (Karaseva et al., 2016), и было сделано предположение, что наличие данной плазмиды мешает успешной трансформации. Поэтому, в дальнейшей работе использовали только штамм *E.faecium* A64, у которого изначально было показано отсутствие каких либо плазмид, и который удалось трансформировать как исходной плазмидой рAT29, так и рекомбинантными плазмидами рAT29PentARFP, а также плазмидой рBSU101.

В результате работы были получены штаммы *E.faecium* A64, содержащие рекомбинантную плазмиду рAT29PentARFP, но не способные к флуоресценции. Индукция экспрессии гена *turborfp* в клетках *E.faecium* не принесла видимых результатов (изменение фенотипа колоний не было установлено).

Исходя из литературных данных, некоторые типы красных флуоресцентных белков (RFP) могут обладать цитотоксическим действием на клетки бактерий, что может быть одной из причин отсутствия флуоресцирующих штаммов энтерококков из-за низкой вероятности получения жизнеспособных штаммов-мутантов (Chudakov et al., 2010; Shemiakina et al., 2012).

Тот штамм, который был выбран в данной работе как потенциально содержащий плазмиду рAT29PentARFP, что было доказано при помощи метода ПЦР, мог содержать плазмиду со смещенной рамкой считывания последовательности гена *turborfp*, что привело к нарушению синтеза функционального пептида RFP клетками энтерококков.

Еще одной возможной причиной отсутствия флуоресценции трансформированного штамма энтерококка этой рекомбинантной плазмидой могут быть модификации флуоресцентного белка, зависящие от структуры этого белка и от

значения pH среды (Jiang et al., 2016). Энтерококки в ходе своего метаболизма могут продуцировать кислоты и тем самым закислять среду внутри и вне клетки. Можно предположить, что кислая среда влияет на правильный фолдинг белка TurboRFP, в результате чего при повышенной кислотности среды утрачивается флуоресценция этого белка.

Чтобы определить причину отсутствия флуоресценции у клонов-мутантов *E.faecium* A64+pEntAturboRFP необходимо провести секвенирование вставки в рекомбинантной плазмиде pAT29PentARFP, чтобы оценить возможные мутации, оказывающие влияние на экспрессию гена *turborfp*.

Еще одним необходимым действием в данном случае является выделение РНК из рекомбинантных штаммов и постановка ПЦР с обратной транскрипцией для определения наличия или отсутствия экспрессии гена *turborfp*.

На данный момент, на основе всего вышеописанного было сделано предположение, что ген *turborfp* не подходит для использования в качестве репортерного гена в клетках *E.faecium*.

В работе были так же изучены полученные ранее клоны *E.coli* JM109, предположительно содержащие рекомбинантную плазмиду pAT29PentAGFP, но не обладающие флуоресцентным фенотипом.

По результатам ПЦР с праймерами, фланкирующими область полилинкера плазмиды pAT29, было определено, что плазида содержала вставку, размер которой составлял приблизительно 500 п.н., что примерно в два раза меньше размера слитой конструкции из промоторной области гена *entA* и кодирующей последовательности гена *egfp*. Возможно, в составе последовательности полученной при амплификации слитой конструкции мог содержаться неучтенный сайт рестрикции EcoRI или BamHI, вследствие чего, при клонировании в плазмидный вектор встроилась только часть слитой конструкции. Подобное явление может объяснить отсутствие свечения у полученных клонов. Поэтому в дальнейшем необходимо провести секвенирование фрагмента, встроившегося в вектор pAT29, и исходной вставки (слитой конструкции), чтобы изучить последовательность вставки на наличие сайтов рестрикции. В случае, если в просеквенированной последовательности будут обнаружены неучтенные сайты рестрикции EcoRI или BamHI, то работа по созданию рекомбинантного вектора pAT29PentAGFP может быть продолжена с использованием других сайтов рестрикции для процедуры клонирования слитой конструкции в вектор.

В настоящее время активно изучается возможность использования энтерококков в качестве пробиотических бактерий для человека и животных. Одним из важных этапов исследования является постановка экспериментов с участием лабораторных животных, в ходе которых оцениваются различные показатели безопасности и эффективности пробиотической терапии. Так как энтерококки присутствуют в организме животных в норме, то проследить распространенность, локализацию, а также длительность персистенции вводимых пробиотических штаммов возможно только косвенными методами. Одним из методов прямого отслеживания пробиотика в организме лабораторного животного может служить прижизненное маркирование штамма при помощи трансформации плазмидой, содержащей ген флуоресцентного белка.

Однако, есть сведения о том, что бактериям, трансформированным рекомбинантной плазмидой, при росте в отсутствие селективного фактора (антибиотика), свойственно со временем терять данную плазмиду, а, следовательно, и флуоресценцию, что делает их непригодными для исследований на лабораторных животных.

Исходя из этих данных нами была проверена стабильность плазмиды pBSU101 в энтерококках. Было установлено, при наличии селективного фактора плазида стабильно реплицируется в клетках трансформантов при ежедневных пересевах течении 6 суток. Наблюдаемое нами снижение доли флуоресцирующих клонов при росте на среде без антибиотика не исключает возможности использования данного вектора для прижизненного маркирования пробиотических штаммов, по крайней мере, в краткосрочных экспериментах с лабораторными животными.

## Заключение

В результате проведенной работы был получен рекомбинантный вектор, созданный на основе плазмиды широкого круга хозяев pAT29, в которую была встроена слитая конструкция из кодирующей области гена *turborfp* и промоторной области гена *entA*. Внедрение данного вектора в клетки штамма *E.coli* JM109 привело к появлению целевого фенотипа у бактериальных клеток. При этом присутствие данного вектора в клетках *E.faecium* A64 привело к приобретению ими устойчивости к селективному фактору спектиномицину, но способность к флуоресценции у штаммов

отсутствовала. При трансформации того же штамма *E.faecium* плазмидой pBSU101, содержащей ген *egfp*, наблюдали появление характерной флуоресценции у энтерококков. Это привело нас к заключению, что для применения в качестве репортерного гена, позволяющего оценить экспрессию гетерологичных генов в энтерококках, а также для их прижизненного мечения, следует использовать ген *egfp* вместо *turborfp*.

В перспективе планируется использовать полученные данные для конструирования рекомбинантных векторов, которые могли бы способствовать гетерологичной экспрессии генов в клетках различных грамположительных и грамотрицательных бактерий.

## **Выводы:**

1. Сконструированная экспрессионная плазмида может быть использована для внедрения целевых генов в клетки *E.coli* и *E.faecium* A64.
2. Клетки рекомбинантного штамма *E.faecium* A64 наследуют вектор, несущий ген флуоресцентного белка TurboRFP.
3. При отсутствии селективного фактора в среде происходит постепенная элиминация плазмиды pBSU101 из клеток рекомбинантного *E.faecium* A64.

## Список литературы

1. Алехина Г.Г. Пробиотики – новый подход к старым проблемам / Г.Г. Алехина, А.Н. Суворов // Успехи современного естествознания. - 2007. – №6. - с 36-39.
2. Баймиев Ан.Х. Получение флуоресцентно меченных штаммов клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых для их детекции *in vivo* и *in vitro* / Ан.Х. Баймиев, Р.С. Ямиданов, Р.Т. Матниязов, Д.К. Благова, Ал.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // Молекулярная биология. – 2011. - №6. – с 984-991.
3. Бондаренко В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В. М. Бондаренко, А. Н. Суворов – 2007.
4. Госманов Р.Г. Ветеринарная санитарная микробиология / Р.Г. Госманов, А.И. Ибрагимова. – Казань. - 2006.
5. Гупалова Т.В. Создание и опыт применения живой вакцины на основе штамма пробиотика *Enterococcus faecium* L3 для профилактики вагинальной инфекции, вызванной *Streptococcus agalactiae* / Т. В. Гупалова, Г. Ф. Леонтьева, Е. И. Ермоленко, К. Б. Грабовская, Т. А. Крамская, А. Н. Цапиева, И. В. Королева, А. Н. Суворов // Медицинский академический журнал. – 2013. - №2. – с 64-70.
6. Ермоленко Е.И. Молочнокислые бактерии: индивидуальные особенности действия на патогенные микроорганизмы, макроорганизм и его микробиоту / Е.И. Ермоленко – 2009.
7. Журавлева Г.А. Генная инженерия в биотехнологии / Г.А. Журавлева. – СПб: Эковектор.- 2016. – с 328.
8. Каширская Н.Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры / Н.Ю. Каширская // Трудный пациент. – 2009. - №2.
9. Миронова А.В. Факторы вирулентности энтерококков / А.В. Миронова, О.А. Коршукова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2015. - №2. – с73-78.
10. Суворов А.Н. Пробиотики. Критерии выбора оптимального штамма / А.Н. Суворов, Г.Г. Алехина // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2002. - № 2-3. – с 126.

11. Щепитова Н.Е. Биологические свойства фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных / Н.Е. Щепитова – 2015.
12. Anné J. Protein Secretion in Gram-Positive Bacteria: From Multiple Pathways to Biotechnology / J. Anné, A. Economou, K. Bernaerts // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2016. – № 404. – p 267-308.
13. Arias C.A. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance / C.A.Arias, B.E. Murray // Nature Reviews Microbiology. - 2012. - № 10(4). – 266-278.
14. Aymanns S. High-Level Fluorescence Labeling of Gram-Positive Pathogens / S. Aymanns, S. Maurerer, Ger van Zandbergen, C. Wolz, B. Spellerberg // PLoS ONE. – 2011. - № 6(6), e19822.
15. Bauer R. Regulation of the  $\beta$ -hemolysin gene cluster of *Streptococcus anginosus* by CcpA / R. Bauer, S.Maurerer, B. Spellerberg // Scientific reports. – 2018. - № 8(1).
16. Chudakov D.M. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues / D.M. Chudakov, M.V. Matz, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov // Physiological Reviews. – 2010. - № 90(3). – p 1103–1163.
17. Cui W. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond / W. Cui, L. Han, F. Suo, Z. Liu, L. Zhou, Z. Zhou // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. - № 34(10).
18. Czamanski L. N. The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools / L. N. Czamanski, C. A. Westmann, L. Martins-Santana, Luana de Fátima Alves, L. M. O. Monteiro, M.-E. Guazzaroni, R. Silva-Rocha // Microbial Biotechnology. – 2019. - №12(1). – p 125–147.
19. Fisher K. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* / K. Fisher, C. Phillips // Microbiology. – 2009. – 155. – № 6. – p1749–1757.
20. Gibson G.R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics / G.R. Gibson, M.B. Roberfroid // The Journal of Nutrition. – 1995. - № 125(6).–p1407-1412.
21. Gleich-Theurer U. Human Serum Induces Streptococcal C5a Peptidase Expression / U. Gleich-Theurer, S. Aymanns, G. Haas, S. Maurerer, J. Vogt, B. Spellerberg // Infection and immunity. - 2009. - № 77(9). - p 3817–3825.

22. Hamed M.B. Monitoring Protein Secretion in *Streptomyces* Using Fluorescent Proteins / M. B. Hamed, K. Vrancken, B. Bilyk, J. Koepff, R. Novakova, L. van Mellaert, M. Oldiges, A. Luzhetskyy, J. Kormanec, J. Anne, S. Karamanou, A. Economou // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. - 9:3019.
23. Hansen J.N. Nisin as a model food preservative / J.N. Hansen., W.E. Sandine// *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 1994. - 34(1). –p 69-93.
24. Hickey R.M. Potential of the enterocin regulatory system to control expression of heterologous genes in *Enterococcus* / R.M. Hickey, D.P. Twomey, R.P. Ross1, C. Hill // *Journal of Applied Microbiology*. – 2003. - № 95(2). –p 390-397.
25. Jiang Y. Polyglutamine toxicity in yeast uncovers phenotypic variations between different fluorescentprotein fusions / Y. Jiang, S. E. Di Gregorio, M. L. Duennwald, P. Lajoie // *Traffic*. – 2016. – № 18(1). – p 58-70.
26. Karaseva A. Draft Genome Sequence of Probiotic *Enterococcus faecium* Strain L-3 /A. Karaseva, A. Tsapieva, J. Pachebat, A. Suvorov // *Genome Announcements*. - 2016. – 4(1):e01622-1.
27. Lederberg J. Cell genetics and hereditary symbiosis / J. Lederberg // *Physiological Reviews*. – 1952. - №32(4).–p403–430.
28. Liu Y. Probiotics in Disease Prevention and Treatment / Y. Liu, D.Q. Tran, J.M. Rhoads // *The Journal of Clinical Pharmacology*. – 2018. - №58. –p 164-179.
29. Gilmore M.S. Enterococci From Commensals toLeading Causes of Drug Resistant Infection / M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike – 2014.
30. Mundy L.M. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance / L.M. Mundy, D.F. Sahn, M.S. Gilmore // *Clinical Microbiology Revier*. – 2000. - № 13(4).–513-22.
31. Muturi E. Green, Yellow, and Red Fluorescent Proteins as Markers for Bacterial Isolates from Mosquito Midguts / E. Muturi, J. Ramirez, C.-H. Kim // *Insects*. – 2019. – № 10(2).– p 49.
32. NilsenT. An Exported Inducer Peptide Regulates Bacteriocin Production in *Enterococcus faecium* CTC492 /T. Nilsen, I.F. Nes, H. Holo // *Journal of Bacteriology*. – 1998. - №4.–p1848–1854.
33. O’KeeffeT. Characterization and Heterologous Expression of the Genes Encoding Enterocin A Production, Immunity, and Regulation in *Enterococcus*

- faecium*DPC1146 /T. O’Keeffe, C. Hill, R. P. Ross // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. - №4.-p1506–1515.
34. Paulson I.T. Role of mobile DNA in the evolution of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* / I.T. Paulson, L. Banerjee, G.S. Myers et al. // Science. – 2003. - Vol. 299. -№ 5615. - p 2071-2074.
35. Sava I.G. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections / I.G. Sava, E. Heikens, J. Huebner // Clinical Microbiology and Infection. – 2010. – № 16(6). – p 533-540.
36. Semedo T. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? /T. Semedo, M.A. Santos, M.F Lopes, J.J. Figueiredo Marques,M. T. Barreto Crespo, R. Tenreiro // Systematic and applied microbiology. – 2003. - № 26. - p 13–22.
37. Shabayek S. Making Fluorescent Streptococci and Enterococci for Live Imaging / S. Shabayek, B. Spellerberg// Bacterial Patogenesis. – 2016. – p 141-159.
38. Shemiakina I.I. A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity / I.I. Shemiakina, G.V. Ermakova, P.J. Cranfill, M.A. Baird, R.A. Evans, E.A. Souslova, D.B. Staroverov, A.Y. Gorokhovatsky , E.V. Putintseva , T.V. Gorodnicheva, T.V. Chepurnykh , L. Strukova , S. Lukyanov, A.G. Zaraisky , M.W. Davidson, D.M. Chudakov, D. Shcherbo // Nature communications. – 2012. – № 3(1).
39. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein / O. Shimomura // Journal of Microscopy. – 2005. - № 217(1). – p 3-15.
40. Trieu-Cuot P. A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria / P. Trieu-Cuot, C. Carlier, C. Poyart-Salmeron, P. Courvalin // Nucleic Acids Research. – 1990. - Vol. 18. - № 14.- p 4296.
41. Tsolis K.C. Secretome Dynamics in a Gram-Positive Bacterial Model / K. C. Tsolis , M. B. Hamed, K. Simoens, J. Koepff , T. Busche, C. Rückert, M. Oldiges, J. Kalinowski, J. Anné, J. Kormanec, K. Bernaerts, S. Karamanou, A. Economou // Molecular and Cellular Proteomics. – 2018. - RA118.000899.
42. Van Wamel W.J. Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation / W.J. Van Wamel, A.P. Hendrickx, M.J Bonten, J. Top, G. Posthuma, R.J. Willems// Infection and immunity. – 2007. - № 75(2). - p 924–931.