铜和镍响应的双组分基因诱导表达系统的设计与 优化

丁文骏 1,2, 周胜虎 1,2*, 邓禹 1,2*

1 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 2141222 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122

丁文骏,周胜虎,邓禹. 铜和镍响应的双组分基因诱导表达系统的设计与优化[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 2145-2157. DING Wenjun, ZHOU Shenghu, DENG Yu. Design and optimization of a two-component inducible gene expression system responsive to copper and nickel[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 2145-2157.

摘 要:双组分系统是一种广泛存在于细菌中的信号传递系统,能够有效地发挥信号识别、 信号传导、基因调节这 3 种功能,从而实现信号的跨膜传输和放大。基于双组分系统构建的 基因表达调控工具已被广泛应用于合成生物学和环境监测领域。传统基因诱导系统 T7 和 P_{BAD}系统存在成本高、诱导剂易被细胞利用、诱导剂浓度与基因表达水平线性差等问题。为 了开发低成本、诱导剂浓度与基因表达水平线性高的诱导系统,本研究基于双组分系统 CusS-CusR 和嵌合 NrsS/CusS-CusR,成功开发了分别由 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导的基因表达系统。通 过优化组氨酸激酶(CusS 或 NrsS/CusS)与响应调节蛋白(CusR)的表达水平,将 Cu²⁺诱导表达 系统本底表达荧光强度由 2 400 a.u.降低至 852 a.u.,动态范围由 1.2 倍提升至 8.7 倍。同样结 构的 Ni²⁺诱导表达系统本底荧光强度为 2 711 a.u.,动态范围为 5.6 倍。进一步通过提升目标 基因的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)强度和报告质粒拷贝数,使 Cu²⁺诱导系统 和 Ni²⁺诱导系统的动态范围分别提升至 50.0 倍和 14.3 倍。与传统 T7 和 P_{BAD}诱导系统相比, 本研究构建的 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导系统表现出更优的诱导梯度和更低的诱导成本,不仅为传统表 达系统提供了有力补充,也为满足多样化实验需求提供了更多选择。

关键词:双组分系统;铜离子诱导系统;镍离子诱导系统;蛋白表达;生物传感器

生物技术与方法。

资助项目:国家重点研发计划(2024YFA0918000);江苏省重点研发计划(现代农业)(BE2022322);江苏省杰出青年基金 (BK20220089);国家自然科学基金(22378170,22478156)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2024YFA0918000), the Key Research and Development Project of Jiangsu Province (Modern Agriculture) (BE2022322), the Distinguished Young Scholars of Jiangsu Province (BK20220089), and the National Natural Science Foundation of China (22378170, 22478156).

^{*}Corresponding authors. E-mail: DENG Yu, dengyu@jiangnan.edu.cn; ZHOU Shenghu, zhoush@jiangnan.edu.cn Received: 2025-01-23; Accepted: 2025-03-17; Published online: 2025-03-18

Design and optimization of a two-component inducible gene expression system responsive to copper and nickel

DING Wenjun^{1,2}, ZHOU Shenghu^{1,2*}, DENG Yu^{1,2*}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Two-component systems (TCS) are signal transduction systems ubiquitous in bacteria, effectively performing signal recognition, transduction, and gene regulation to achieve transmembrane signal transmission and amplification. Gene expression regulation tools based on TCS have been extensively applied in synthetic biology and environmental monitoring. The traditional gene induction systems, T7 and PBAD systems, have problems such as high cost, ease of inducer utilisation by cells, and poor linearity between inducer concentration and gene expression level. In order to develop low-cost induction systems with high linearity between inducer concentration and gene expression level, in this study, we developed two gene expression systems induced by Cu²⁺ and Ni²⁺ based on the CusS-CusR TCS and the chimeric NrsS/CusS-CusR TCS. By optimizing the expression levels of histidine kinase (CusS or NrsS/CusS) and the response regulator (CusR), we reduced the background fluorescence intensity of the Cu²⁺-inducible system from 2 400 a.u. to 852 a.u. and improved its dynamic range from 1.2 folds to 8.7 folds. The Ni²⁺-inducible system with a similar structure demonstrated a background fluorescence intensity of 2 711 a.u. and a dynamic range of 5.6 folds. Subsequently, we increased the ribosome binding site (RBS) strength and plasmid copy number, increasing dynamic ranges of 50.0 folds and 14.3 folds for the Cu²⁺- and Ni²⁺-inducible systems, respectively. Compared with T7- and P_{BAD} -inducible systems, the Cu²⁺- and Ni²⁺-inducible systems developed in this study exhibit improved induction gradients and decreased induction costs, providing robust complements to existing expression systems and offering versatile options for diverse experimental applications. Keywords: two-component system; copper ion-inducible system; nickel ion-inducible system; protein expression; biosensor

双组分系统(two-component system, TCS) 是一类广泛存在于原核生物中的信号转导系统^[1], 通过介导细胞外与细胞内信号传递,在渗透压 调节、运动性、趋化性、毒力因子生成等多种 关键细胞过程的调控中发挥重要作用^[2-5]。典型 的 TCS 通常由 2 种功能蛋白串联构成,分别是 负责细胞膜外信号识别的组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和负责胞内基因表达调控的响应调 节蛋白(response regulator, RR)^[6]。HK 主要由跨 膜传感模块、信号转换模块以及激酶控制模块 组成^[7-8],跨膜传感模块包括 2 个 α 跨膜螺旋跨 膜结构域(transmembrane, TM)和周质感觉结构 域(ligand binding domain, LBD)。当胞外配体与 LBD 内的底物口袋结合后,会引起 TM 的构象 变化,该构象变化被信号转换模块 HAMP 结构 域接收后进一步传递至激酶核心模块(Dhp 和 CA 结构域)。Dhp 和 CA 结构域催化 ATP 的 γ-磷酸基团转移至 HK 保守的 His 残基上,从而 形成磷酸化的 HK。RR 主要由负责接收 HK 信号的结构域(receiver domain, REC)和负责基因表达调控的 DNA 结合结构域(DNA binding domain, DBD)组成。REC 会接受 HK 上的磷酸基团使自身磷酸化从而引发 RR 的构象动态变化,这种构象变化会进一步改变 RR 对 DNA 的亲和力,进而实现对目标基因转录表达的调控^[9]。基于这一工作原理,TCS 可作为潜在的基因诱导表达系统,与 IPTG 和阿拉伯糖等诱导表达系统互为补充,形成多元化的表达体系。

高效的诱导表达系统要求诱导剂廉价、稳 定、不易被微生物利用,基因表达水平与诱导 剂水平正相关。Cu²⁺和 Ni²⁺等金属离子是潜在 的廉价稳定诱导剂。因此,基于 Cu²⁺和 Ni²⁺的 TCS 具有成为新型诱导表达系统的潜力。近年 来,利用双组分系统工程化构建的表达系统在 合成生物学[10-14]、环境监测和微生物环境修复 领域得到了广泛应用。基于恶臭假单胞菌的 TCS——TodS/TodT 构建的生物传感器受到苯、 甲苯、二甲苯等有机污染物的激活进而调节 tod 基因的表达,从而产生分解这些芳香族化合物 的酶^[15]。基于大肠杆菌(Escherichia coli) TCS——CusS/CusR和ZraS/ZraR系统开发了特 异性识别铜离子和锌离子的双组分传感器。进 一步通过将下游调控基因替换为与金属离子结 合短肽(CBP 和 ZBP)嵌合的外膜蛋白 OmpCt-CBP 和 OmpCt-ZBP, 实现了微生物对铜离子和锌 离子的特异性吸附,每克细胞干重的最大吸附量 分别达到(13.0±0.3) mg 和(11.40±0.42) mg^[10]。此 外,利用结构域交换技术开发的铽生物传感器 也展现出良好的金属特异性[16]。将生物传感器 的报告基因替换为目标基因,即可实现可控诱 导的基因表达。然而,现有的 Cu²⁺和 TB³⁺表达 系统存在动态范围较低和最大表达水平较低等 问题,限制了其在基因诱导表达中的应用。

为了克服上述挑战,本研究以 CusS/CusR

和嵌合 NrsS-CusS/CusR 系统为基础,分别开发 了由 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导的蛋白表达系统。通过优 化 HK (CusS 或 NrsS-CusS)与 RR (CusR)的表达 比例,成功解决了因细菌内源性双组分系统之 间串扰而导致的高本底表达问题。进一步优化 报告质粒的拷贝数及目标基因的 RBS 强度,显 著提高了目标基因的诱导表达倍数和最大表达 水平。与 T7 和 P_{BAD}表达系统相比,Cu²⁺和 Ni²⁺ 诱导系统具有诱导剂成本低、梯度调控效果好 等优势,表达不同蛋白质的稳定性较高,不仅 为传统基因诱导表达系统提供了重要补充,还 进一步拓宽了蛋白表达工具的选择范围,在生 物工程领域中具有巨大的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所用菌株和质粒如表1所示。

1.1.2 主要试剂

无水氯化钙、五水硫酸铜、六水氯化镍、 甘油、氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司, IPTG、阿拉伯糖、氯霉素、链霉素购自生工生 物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 主要培养基

LB培养基: 胰蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉5 g/L、 NaCl 10 g/L (121 ℃, 灭菌 20 min); LB 固体培 养基是在 LB 液体培养基基础上加入 15 g/L 琼 脂制备而成。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

2×Rapid *Taq* Master Mix 和 2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) (南京诺唯赞生物科技股 份有限公司)被分别用于菌落 PCR 和基因/启动 子扩增。*Dpn* I 用于全质粒 PCR 产物消化。 BBa_J23109和BBa_J23100启动子以及RBS29、 RBS30 等不同强度 RBS 均来源于安德森网站

表1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics and functions	Source
Strains		
Escherichia coli JM109	Wild-type strains for plasmid construction	Lab store
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue ($\Delta cusS\Delta cusR$)	Gene expression system performance characterization	Lab store
Plasmids		
pCDFDuet-1	CloDF13 ori, P _{T7} , Sm ^R	Lab store
pACYCDuet-1	p15A ori, P77, Cm ^R	Lab store
pJKR-H-cadR	pUC ori, P_{BAD} , Amp^R	Lab store
pACYC-CusS-CusR	pACYCDuet-1, P _{BBa_J23109} , cusS, P _{BBa_J23100} , cusR	Lab store
pACYC-NCusS-CusR	pACYCDuet-1, <i>nrsSt/cusSt</i> , <i>cusR</i>	Lab store
pCDF-P _{cusC} -G10-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBSG10, sfgfp	Lab store
pACYC-T7-CusS/CusR	pACYCDuet-1, P _{T7} , cusS/cusR	This study
pACYC-CusS/CusR	pACYCDuet-1, P _{BAD} , cusS-cusR	This study
pCDF-P _{cusC} -S29-GFP	pCDFDuet-1, Pcusc, RBS29, sfgfp	This study
pCDF-P _{cusC} -S30-GFP	pCDFDuet-1, Pcusc, RBS30, sfgfp	This study
pCDF-P _{cusC} -S31-GFP	pCDFDuet-1, Pcusc, RBS31, sfgfp	This study
pCDF-P _{cusC} -S32-GFP	pCDFDuet-1, Pcusc, RBS32, sfgfp	This study
pCDF-P _{cusC} -S33-GFP	pCDFDuet-1, Pcusc, RBS33, sfgfp	This study
pCDF-P _{cusC} -S34-GFP	pCDFDuet-1, Pcusc, RBS34, sfgfp	This study
pCDF-P _{cusC} -S35-GFP	pCDFDuet-1, P _{cusC} , RBS35, sfgfp	This study
pCDF-P _{cusC} -S64-GFP	pCDFDuet-1, Pcusc, RBS64, sfgfp	This study
pCDF-T7-GFP	pCDFDuet-1, P _{T7} , RBS35, sfgfp	This study
pCDF-T7-OFP	pCDFDuet-1, P _{T7} , RBS35, mOrange	This study
pCDF-T7-RFP	pCDFDuet-1, P _{T7} , RBS35, rfp	This study
pCDF-T7-YFP	pCDFDuet-1, PT7, RBS35, venus	This study
pCDF-P _{BAD} -GFP	pCDFDuet-1, P _{BAD} , RBS35, <i>sfgfp</i>	This study
pCDF-P _{BAD} -OFP	pCDFDuet-1, P _{BAD} , RBS35, mOrange	This study
pCDF-P _{BAD} -RFP	pCDFDuet-1, P _{BAD} , RBS35, rfp	This study
pCDF-P _{BAD} -YFP	pCDFDuet-1, PBAD, RBS35, venus	This study

(https://parts.igem.org/)。空载质粒 pACYCDuet-1 和空载质粒 pCDFDuet-1 分别用于构建 Cu²⁺和 Ni²⁺传感质粒和蛋白报告质粒。质粒构建方法采 用 Gibison 组装和全质粒 PCR^[17-18]。本研究所 用引物如表 2 所示。

Cu²⁺传感质粒 pACYC-CusS/CusR 的构建 流程如下:使用引物 CusS/CusR-F 和 CusS/ CusR-R 从大肠杆菌基因组中扩增获得 *cusS/ cusR* 片段,将该片段连接至 pACYCDuet-1 质 粒 T7 启动子下游,得到质粒 pACYC-T7-CusS/ CusR,使用引物 BAD-F 和 BAD-R 从质粒 pJKR-H-*cadR* 上扩增获得阿拉伯糖启动子相关 片段,将 pACYC-T7-CusS/CusR 启动子替换为 P_{BAD},获得质粒 pACYC-CusS/CusR。Ni²⁺传感 质粒 pACYC-NCusS-CusR 中 nrsS_p为组氨酸激酶 NrsS 截短片段, cusS_p为组氨酸激酶 CusS 截短片段,拼接后形成的嵌合蛋白 NcusS。

报告质粒 pCDF-P_{cusC}-S29-GFP 的构建流程 如下:以 pCDF-P_{cusC}-G10-GFP 质粒为模板,使 用引物 RBS29-F 和 RBS29-R 进行全质粒 PCR, 将纯化得到的 PCR 产物经过 *Dpn* I 消化后进行 转化,得到 pCDF-P_{cusC}-S29-GFP 质粒。更换 RBS 的相关质粒均按照此方法进行构建。相关质粒 为 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导系统报告质粒。

报告质粒 pCDF-T7-GFP 的构建流程如下: 以质粒 pCDF-P_{cusC}-G10-GFP 为模板,使用引物 GFP-F 和 GFP-R 扩增获得 *sfgfp* 片段,连接至 pCDFDuet-1 质粒 T7 启动子下游获得质粒 pCDF-

表 2 本研究所用引物

Table 2Primers used in this studyPrimerSequence $(5' \rightarrow 3')$ CusS/CusR-FatgaaactgtgatgtgatacaaaagaaCusS/CusR-FaaataatagacctcitgataaccaaagaggcBAD-FaaataatgacctcitgataaccaaagggcBAD-RatggaaacagtagaagattgcgataaggtagagaagaRBS29-FgttcaccaggaaaccatcatagtcgataaggtagagaacgttcaccggtgttcaccaggaaacctactagatgcgataggtagaagaactRBS30-FgattaaagaggagaatactagatgcgataggtagagaacgttcaccggtgttcaccggtRBS31-FagtcaccaggaaacctactagatgcgataggtagagaacgttcaccggtgttcaccggtRBS31-RagtaccacaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS32-FgagtcaccacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS31-RagtacttctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgattttatgccgttcaccggtRBS33-FtaggtcaccacaggaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS33-RagtagtctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttatgccgccagtagttictctttctagaaggctcataatttctggtgatttatgccgcgggaaaaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgttacccggtRBS35-FagatattctcttttatatctagaaggctcataatttctggtgattttatgccgcagtagtctgtgtgtcactagaaggctatagtgaagaactgttcaccggtgttacccggtRBS34-RagtattttcctcttttatactagaaggctatagtggaagaactgttcaccggtgttacccggtRBS35-RagtatttcccttttactagaaggctatagtggaagaactgttcaccggtgttacccggtRBS4-Ragtattccctttttactagaaggctatagtgga		
Primer Sequence (5'→3') CusS/CusR-F atgaacatgttgattgtcgaagatgaaaagaa CusS/CusR-R ttaageggtaatgtgataacaaacttgtccc BAD-F aatatatgaccctcttgataaccaaggggc BAD-R atgggaaacagtagagattgcgataagag RBS29-F gttcaccaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS30-F gattaaagaggagaaactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS30-R agtatttctcctctttaatctctagaaggctcataatttctggtgat ttttatgc RBS31-F agtcaccacggaaacctactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-R agtaggttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgat ttttatgc RBS32-R gagtcacacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS32-R agtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccg RBS33-R agtagtctctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc RBS34-R agtagtttcctgttgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc RBS34-R agtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc RBS35-F agataagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS4-R agtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc RBS4-R agtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgattt atgccgc RBS64-R agtatttccctttttctagaaggctcataatttctggtgattt	Table 2 Pr	imers used in this study
CusS/CusR-FatgaaactgttgattgtagaaaaagttgcccBAD-FaatataatgaccctttgataaccaacttgtccBAD-FatgagaaacgtagagagttgcgataaaagBAD-RagtgaaacagtagagagttgcgataaagBBS29-FgttcaccaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaagagagaaactactagatgcgtataggtgaagaactRBS30-Fgattaagaggagaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaacggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaacggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaacggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaacggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaaccaggaaactactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaaccaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgstaaccaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtgagtaccacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacacaaggaagatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacacaggaagatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtggtacaccaggaagaatactagatgcgtataggtgaagaact <td>Primer</td> <td>Sequence $(5' \rightarrow 3')$</td>	Primer	Sequence $(5' \rightarrow 3')$
Cuss/CusR-RtaageggtaatgtgataacaaacttgteceBAD-FaaatatagaccctttgataaccaagagggBAD-RatggagaaacagtagagattgogataaaaagRBS29-FgttcaccaggaacctactagatgogtataggtgaagaatRBS29-RagtaggtttcotgtggaactagaggtgaagggaaatactagatgogataggtgaagaatgttcaccggtgttcaccggtRBS30-RagtatttetcotctttaatetctagaaggetcataatttetggtgatRBS31-RagtaccacaggaaactactagatgogtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS31-RagtagtttcotgtggactctagatgogtaaggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS32-RgatcaccaggaaagtactagatgogtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS33-RagtagttcotgtggactctagatgogtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS33-RagtagttcotgtggactctagatgogtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS33-RagtagttcotgtggactctagatgogtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS3-RagtagttcotgtggactctagatgogtataggtgaagaactgttcaccggtgttcaccggtRBS3-RagtatttectotttectagaaggctcataatttetggtgatttatgocgcagtattecccttttaatetctagaaggctcataatttetggtgattgttcaccggtgttacccggtRBS3-RagtatteccttttaatetctagaaggctcataatttetggtgattgttcaccggtgttacccggtRBS3-RagtatteccttttctagaaggctcataatttetggtgatgagaactgttcaccggtgttacccggtRBS3-RagtatteccttttctagaaggctcataatttetggtgatgagaactgttcaccggtgttacccggtRBS4-Ragtattcoccttttctagaaggctcataatttetggtgatgagaactgttcaccggtgttacccggt <td>CusS/CusR-F</td> <td>atgaaactgttgattgtcgaagatgaaaagaa</td>	CusS/CusR-F	atgaaactgttgattgtcgaagatgaaaagaa
BAD-FaaatataatgacctcttgataacccaagaggcBAD-RatggagaacagtagagattgcgataaaagRBS29-FgttcaccaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtRBS29-RagtaggtttcctgtgtgaactctagaaggctcataatttctggtgattitatgcRBS30-FgattaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtRBS31-FagtacccaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtRBS31-FagtaccacaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtRBS31-RagtaggttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgattttatgcRBS32-FgagtcaccaggaagtactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtRBS33-FtagagtcaccaggaagtactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtRBS33-RagtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttatgccgcRBS34-RagtatttcctctttctagaaggctcataatttctggtgattttatgccgcRBS34-RagtatttcctctttctagaaggctcataatttctggtgattttatgccgcRBS35-FagataaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttcaccggtRBS35-RagtattcctcttttaatctagaaggctcataatttctggtgatttttatgccgRBS64-RagtattccccttttctctagaaggctataggtgaagaactgtgcdgaactggcatgcatctagatgcgtataggtgaagaacgtgtcaccggtRBS64-RagtagtaggaggaatactagatgcaaaaggagaagagagaagagagaaactgtgctggOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcaaaaggagaagagaa	CusS/CusR-R	ttaagcgggtaatgtgataacaaaccttgtccc
BAD-RatggagaacagtagagagttgogataaaaagRBS29-Fgttcaccaggaaacctactagatgogtataggtgaagaact gttcaccggtRBS29-Ragtaggtttoctgtgtgaactctagatgogtataggtgaagaact gttcaccggtRBS30-Fgattaaagagagagaatactagatgogtataggtgaagaact gttcaccggtRBS31-Fagtactctagaaggctcataatttotggtgat tttatgcRBS31-Ragtacttoctetttaatctctagaaggctcataatttotggtgat tttatgccRBS32-Fgagtcaccaggaaactactagatgogtataggtgaagaact gttcaccggtRBS32-Fgagtcaccaggaaactactagatgogtataggtgaagaact gttcaccggtRBS32-Ragtagttoctgtgtgactctagaaggctcataatttotggtgat tttatgccRBS33-Ftagagtcaccaggaagtactagatgogtataggtgaagaact gttcaccggtRBS33-Ragtagtcotgtgtgactctagaaggctatagttgaggaagaact gttcaccggtRBS34-Ragtagttoctgtgtgactctagaaggctatagttgaggaagaa tgtcaccggtRBS34-Ragtagttoctgtgtgactctagaaggctatagtgaagaact gttcaccggtRBS34-Ragtatttoctcttttottagaaggctatagtggaagaact gttcaccggtRBS35-Fagatttaagaggggaaatactagatgogtataggtgaagaact gttcaccggtRBS64-Fagagaagaggggaaatactagatgogtataggtgaagaact tgtcaccggtRBS64-Ragtatttoccttttoctagaaggctatagttgaagaact ggtggGFP-Fattaagaggagaatactagatgctatagttgaagaac tgtcaccggtGFP-Ratgogagaatactagatgctataggtgaagaaca ggtgctGFP-Ratgotagactggcatgcatcttatacagtcgtcataccgt ggtggtGFP-Ratgotagactggcatgcatcttatacagtcataccacc ggtgctGFP-Fattaagaggagaatactagatgcaaaaggagaagaagagaac aatatggctaGFP-Ratgotagactggcatgcatcttatacagtcacaaggaagaagaac aatatggctaGFP-Ratgotagactg	BAD-F	aaatataatgaccctcttgataacccaagagggc
RBS29-Fgttcaccaggaactactaggtgegtaggtgaggaact gttcaccggtRBS29-Ragtaggtttctgtgtgaactctagaaggctcataatttctggtg attttatgcRBS30-Fgattaaggggagaatactagatgcgtataggtgaggaact gttcaccggtRBS31-Ragtagtttctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtga tttatgcRBS31-Ragtagtttctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtga tttatgcRBS32-Fgagtcaccacggaaactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS32-Fagtagtttctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgat tttatgccRBS32-Ragtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccgRBS33-Ragtagtttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccgRBS34-Ragtagttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcRBS34-Ragtagtttcctgttgtgactctagaaggctataggtgaagaact tgttcaccggtRBS35-Fagataagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtattccctctttctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS4-Ragtatttccctctttaatctcagaaggctatagtgaagaact tgttcaccggtRBS4-Ragtatttcccttttaatctagaaggctatagtgaagaact tgttcaccggtRBS4-Ragtatttcccttttaatctagaaggctatagtgaagaact tgttcaccggtRBS4-Ragtatttcccttttaatctagaaggctatagtgaagaact tgttcaccggtRBS4-Ragtattccccttttctagaaggctatagtggaagaact tgttcaccggtRBS4-Ragtattccccttttctagaaggctatagtggaagaact tgttcaccggtRBS4-Ragtattccccttttctagaaggctaagtggtaaggagaatactagatgcgtaaggtgaagaact tgttcaccggtRBS4-Ragtattccccttttctagaaggctaagtgcgtaaggtgaagaact tgttcaccggtRBS64-Ragtattccccttttctagaaggcaatactagatgcgtaaggtgaagaaca tgtcaccggtGFP-F	BAD-R	atggagaaacagtagagagttgcgataaaaag
gttcaccggt RBS29-R agtagtttcctgtgtgaactctagaaggctcataatttctggtg attttatgc RBS30-F gattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-F agtcacacaggaaactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-F agtcacacaggaaactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS32-F gagtcacacaggaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS32-F tagagtcacacaggaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS33-F tagagtcaccaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS33-F tagagtcaccaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS33-F tagagtcaccaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS34-F agagaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS34-F agagaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS34-F agagaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS34-R agtatttcctctttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc RBS35-R agttatagagggaaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS64-R agtatttcccttttctcagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc GFP-F attaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgttt caccggtftgtt GFP-R atgctgaactggcatgcatcttatacagttcataccatccgt gggtga OFP-F attaagaggggaatactagatgctataggtgaagaactgtt caccggtftgtt GFP-R atgctgaactggcatgcatcttatacagttcataccatccat	RBS29-F	gttcacacaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaact
RBS29-Ragtaggttteetgtgtgaactetagaaggeteataatttetggtg attitatgeRBS30-Fgattaagaggagaataetagatgegtaaggtgaagaaet gtteaceggtRBS30-Ragtattteteetettaateetagaaggeteataatttetggtgat tttatgeRBS31-Fagteacaeaggaaaeetaetagatgegtaaggtgaagaaet gtteaceggtRBS31-Ragtaggttteetgtgaetetagaaggeteataatttetggtga ttttatgeeRBS32-Fgagteacaeaggaaagtaetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS32-Ragtagttteetgtgtgaetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeeRBS33-Ftagagteacaeaggaagataetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS33-Ragtagteetgtgtgaetetagaaggeteataatttetggtgattt tatgeegeRBS33-Ragtagteetgtgtgaetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeRBS34-Ragtattteetetttetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeRBS35-Ragtattaaggaggaaataetagatgegtataggtgaagaaet tgtteaceggtRBS64-Ragtatteetetttetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeRBS64-Ragtattteeetttetetagaaggeteataattetggtgattt atgeegeGFP-Fattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaet ggtgtgOFP-Ratgetagaactggeatgeatatagtggaagaaggagaaggagaaggggaaataetagatgetaaggtgaagaagg ggtgaOFP-Fattaaagaggagaataetagatgectataagttegteetaeegt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaataetagatgectataagtegteataeegt gggtgaOFP-Ratgetagaactggeatgeatettataeagteetaeaeegt gggtgetOFP-Ratgetagaactggeatgeatettaacagtegeataeegt gggtgeOFP-Fattaaagaggagaataetagatgetaaaagggagaagaagagagaagaag aataggeteataeetgeatgeatettaacagteecaeeceg gggtgeOFP-Ratgetagaactggeatgeatettaaaagtgeaaaaggagaagaagagagaagaggagaagaagg		ottcaccoot
 RBS30-F aftitage RBS30-F gattaaagaggagaaatactagatgegtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-F agtacacaggaaacctactagatgegtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-R agtagttteetgtgtgactetagaaggeteataatttetggtga ttttatge RBS31-R agtagttteetgtgtgactetagaaggeteataatttetggtga ttttatge RBS32-F gagtcacacaggaaagtactagatgegtataggtgaagaact gttcaceggt RBS32-R agtactteetgtgactetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeeg RBS33-F taggtcacacaggactactagatgegtataggtgaagaact gttcaceggt RBS33-R agtagtetetgtgactetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeege RBS34-F agagaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaact gttcaceggt RBS34-F agagaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaact gttcaceggt RBS35-F agattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaact gttcaceggt RBS35-R agtatteetetttaatetetagaaggeteataatttetggtgatttt tatgee RBS64-F agagaaagagggaaatactagatgegtataggtgaagaactgtt caceggt RBS64-R agtatteetetttettaatetagatgegtataggtgaagaactgtt caceggt RBS64-R agtatteetetttettagaaggeteataatttetggtgatttt atgeege GFP-F attaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaactgtt caceggtgtgt OFP-F attaaagaggagaatactagatgetaaaggagaagagagaagaga	RBS29-R	agtaggttteetgtgtgaagtetagaaggeteataatttetggtg
RBS30-F gattaagagggaaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-F agtcaccaggaaactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-F agtacaccaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS31-R agtaggttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtga ttttatgcc RBS32-F gagtcacacaggaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS33-F tagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS33-F tagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS33-F agagaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS34-F agagaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS35-F agattaagggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS35-F agattaagggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS35-F agattaagggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS35-F agattaagggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS35-F agattaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS35-R agtattcccttttctctagaaggctcataatttctggtgattt atgccgc RBS64-F agagaaaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS64-R agtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgattt atgccgc GFP-F attaaagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaactgt caccggtgttgtt GFP-R atgctagaactggcatgcatctttgtacagttggtcatacgt gggtga OFP-F attaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaacg ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcataccatccat	RB527-R	agtaggitteetgigigaaetetagaaggeteataattetggig
RBS30-FgataaagaggaaatactagatgegtatagtegtaggtgaagaactgttcaceggtRBS30-RagtattteteetttaatetetagaaggeteataatttetggtgattttatgeRBS31-FagtecacacaggaaactactagatgegtataggtgaagaactgttcaceggtRBS31-RagtaggttteetgtgtgaetetagatggeteataatttetggtgatttttatgecRBS32-FgagteacacacaggaaagtaetagatgegtataggtgaagaactgttcaceggtRBS32-RagtagtteetgtgtgaetetagaaggeteataatttetggtgattttatgecgRBS33-FtagagteacacaggaetaetagatgegtataggtgaagaactgttcaceggtRBS33-RagtagteetgtgtaetetagaaggeteataatttetggtgattttafgeegeRBS34-RagtattteeteetttetetetagaaggeteataatttetggtgattttafgeegeRBS35-FagataaagaggggaaataetagatgegtataggtgaagaactgttcaceggtRBS35-RagtatteeteetttetagaaggeteataatttetggtgatttttatgeeRBS64-RagtattteecettttetetagaaggetaaaggagaaataetagatgegtaaggaagaagagggftP-FattaagagggagaataetagatgegtataggtgaagaactgttcaceggtgttgttGFP-RatgetagaactggeatgeatettaaattegatgeteetaaattegggtggOFP-Ratgetagaactggeatgeatettaaagtgeaagaagagaag	DDS20 E	
giteacegiRBS30-RagtattteteetetttaatetetagaaggeteataatttetggtgattittatgcRBS31-FagteacacaggaaacetactagatgegtaaggtgaagaactgtteaceggtRBS31-RagtaggttteetgtgaetetagaaggeteataatttetggtgatittatgccRBS32-FgagteacacaggaaagtaetagatgegtataggtgaagaactgtteaceggtRBS33-FtagagteacacaggaetaetagatgegtataggtgaagaactgtteaceggtRBS33-RagtagteetgtgaetetagaaggeteataatttetggtgattttattgeegeRBS34-FagagaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaactgtteaceggtRBS35-FagataaagaggagaaataetagatgegtataggtgaagaaacttgtteaceggtRBS35-RagtatteetetttaateetgaaggeteataatttetggtgatttatgeegeRBS35-RagtatteetettagaaggeteataatttetggtgatttatgeegeRBS4-RagtatteetettagaaggegaaataetagatgegtataggtgaagaactgtteaceggtRBS4-RagtatteetettagaaggegaaataetagatgegtataggtgaagaacttgtteaceggtRBS64-FagagaaagaggggaaataetagatgegtataggtgaagaacttgtteaceggtRBS64-RagtatteecetttetetetagaaggeteataatttetggtgatttatgeegeGFP-FattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaactggtggOFP-FattaaagaggagaataetagatgecaaaggagaagagaaaataggetaactgeeatgeattettaeagtteateeataecaeggtgtRP-FatgetagaaetgeeatgeattettaeagtteateeataecaecaeggtgtRP-Fatgetagaaetggeatgeatettaaeagtgeagaagagagag	KB550-1	
RBS30-Ragtattictectettaatetetagaaggeteataattictggtgat tittatgeRBS31-Fagtagtticetettaatetetagaaggeteataattictggtga gtteaceggtRBS31-Ragtagtticetgtgtgactetagaaggeteataattictggtga tittatgeeRBS32-Fgagteacacaggaagataetagatgegtaaggtgaagaaet gtteaceggtRBS32-Ragtacttteetgtgtgactetagaaggeteataattietggtgat titatgeeRBS33-Ftagagteacacaggactaetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS33-Ragtagteetgtgtgactetagaaggeteataattietggtgattit atgeegeeRBS34-Ragtatteeteettettettettettetgagaggeteataattetggtgattit atgeegeRBS35-Ragataaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaet tgtteaceggtRBS35-Ragattaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaet tgtteaceggtRBS35-Ragattaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaae tgtteaceggtRBS4-Fagagaaagaggggaaataetagatgegtataggtgaagaae tgtteaceggtRBS64-Fagagaaagaggggaataetagatgegtataggtgaagaae tgtteaceggtRBS64-Ragtattteeetttettettetagaaggeteataatttetggtgattit atgeegeGFP-Fattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaectg gggtgaOFP-Fattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaeca aatatggetatOFP-Ratgetagaaetggeatgeatetttaacagtteateeataecaec ggtgetRFP-Ratgetagaaetggeatgeatettaacagtegteataegte ggtgetRFP-Ratgetagaaetggeatgeatettataeagteeaaaggagaaggagaaggagaaggagaaggagaaggagaaggaga	DDG20 D	glicaceggi
IttiatgeRBS31-Fagtacacacaggaaacctactagatgegtataggtgaagaact gtteaceggtRBS31-Ragtagttteetgtgaetetagaaggeteataatttetggtga ttttatgeeRBS32-Fgagtacacacaggaaagtaetagatgegtataggtgaagaact gtteaceggtRBS32-Ragtacttteetgtgaetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeegRBS33-Ftagagteacacaggaetaetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS33-Ftagagteacacaggaetaetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS33-Ragtagteetgtgaetetagaaggeteataatttetggtgattt atgeegeRBS34-Fagagaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaet ggteaceggtRBS35-Fagattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS35-Ragtattteetettttaateetagaaggeteataatttetggtgattt ttatgeeRBS64-Fagagaaagaggggaaataetagatgegtataggtgaagaaet tgtteaceggtRBS64-Ragtattteeetetttettetagaaggeteataatttetggtgattt tatgeegeGFP-Fattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaetgt eaceggtgttgttGFP-Ratgetagaetggeatgeatetttaagatgegtaaggagaaa ggtgaOFP-Ratgetagaactggeatgeatettataeagteetaaagteetaae ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettataeagteetaetaeceate ggtgetRFP-Ratgetagaactgeetageatgeatettataeagteetagagaga ggtegeaYFP-Ratgetagaactggeatgeattetgteetagagagagagagagagagagag	KB830-K	agtattictcctctttaatctctagaaggctcataattictggtgat
RBS31-Fagtcacacaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS31-Ragtaggtttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtga ttttatgccRBS32-Fgagtcacacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS32-Ragtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccgRBS33-Ftagagtacacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS33-Ragtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgccRBS34-Fagagaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaact tgttcaccggtRBS35-Fagattattcctctttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcRBS35-Fagattaagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS64-Faggaaagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaact tgttcaccggtRBS64-Ragtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgattt tatgccgcGFP-Fattaaagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaact ggtggaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaacc gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcataattccatccatcc		tttatgc
gitcaccggiRBS31-RagtaggitticctgitgiactetagaaggeteataattitetgitgaRBS32-FgagtacacaggaaagtactagatgegtataggigaagaactgitcaccggiagtagtitteetgitgiactetagaaggeteataattitetgitgiattittatgeegRBS32-RagtagteacacaggactactagatgegtataggigaagaactgitcaccggiRBS33-FtagagteacacaggactactagatgegtataggigaagaactgitcaccggiRBS33-RagtagteetgitgigaetetagaggeteataattietggigattitatgeegeeRBS34-FagagaaagaggagaataetagatgegtataggigaagaactgitcaccggiRBS35-FagatatteeteetttetagaaggeteataattietggigattitatgeegeRBS35-FagatataagaggagaataetagatgegtataggigaagaactgitcaccggiRBS35-RagtatteeteetttaateetagaaggeteataatteeggigaagaactgitcaccggiRBS64-FaggaaagaggggaataetagatgegtaaggigaagaactgitcaccggitgittGFP-FattaaagaggagaataetagatgegtaaggagaactgitcaccggitgittGFP-FattaaagaggagaataetagatgegtaaggagaactgitcaccggitgittGFP-RatgetagaactggeatgeatettaaattegatgetaagagaagaacaataggetaOFP-RatgetagaactggeatgeatettaacagteetaaceatggitgeiRFP-FatgetagaactggeatgeatetaataagteetaaceategitgetRFP-FatgetagaactggeatgeatetagatgeagaaggagaaggYFP-RatgetagaactggeatgeattetgtecaaaaggagaaggagaaggYFP-Ratgetagaactggeatgeattettgaaaggagaaggagaaggagaaggagaaggagaaggagaaggaga	RBS31-F	agtcacacaggaaacctactagatgcgtataggtgaagaact
RBS31-Ragtagtttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtga ttttatgccRBS32-Fgagtcacacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaact gftcaccggtRBS32-Ragtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccgRBS33-Ftagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS33-Ragtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgattt atgccgccRBS34-Fagagaaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS35-Fagataatagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Fagataagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS64-Faggaaaagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaac tgtcaccggtRBS64-Ragtatttcccttttctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact ggtggaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaac tgtcaccggtGFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttgtcataccgt 		gttcaccggt
ttttatgccRBS32-Fgagtcacacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS32-Ragtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccgRBS33-Ftagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS33-Ragtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgattt atgccgccRBS34-Fagagaaagggagaaatactagatgcgtataggtgaagaact tgttcaccggtRBS35-Fagatttctccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcRBS35-Fagatttctccttttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS35-Ragtattctccttttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS4-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtattctccttttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS64-Fagagaaagggggaaatactagatgcgtataggtgaagaact gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaacca gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcataagtgagagaac aatatggctatOFP-Ragctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatcataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcataagagagag	RBS31-R	agtaggtttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtga
RBS32-Fgagtcacacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS32-Ragtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccgRBS33-Ftagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS33-Ragtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgccRBS34-Fagagaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS34-Ragtatttctccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcRBS35-Fagattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtattctccttttatctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS64-Fagagaaagagggaaatactagatgcgtataggtgaagaact tgttcaccggtGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtGFP-Ratgctagaactggcatgcatcttgtacagtccataccgt gggtgaOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttgtacagttcataccatc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttgtgccccagttgcaggagaagg gcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagagag		ttttatgcc
gttcaccggt RBS32-R agtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccg RBS33-F tagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS33-R agtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcc RBS34-F agagaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS35-F agattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS35-R agtattctccttttatatctctagaaggctcataatttctggtgatttt ttatgcc RBS64-F agagaaagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaact tgttcaccggt RBS64-F agagaaagaggggaatactagatgcgtataggtgaagaact tgttcaccggt RBS64-R agtatttccccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc GFP-F attaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgt caccggtgttgtt GFP-R atgctagaactggcatgcatctttatacagttcatccataccgt ggtgta OFP-F attaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagaac aatatggctat OFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-F attaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagaaca atataggcatat OFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-F attaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagaagaac atataggctat OFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-F attaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagaaca atataggcatat OFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcattcttgtgccccagtttgctaggga yfP-F attaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagaaga gtcgca YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtacaatgatgcaagagagag	RBS32-F	gagtcacacaggaaagtactagatgcgtataggtgaagaact
RBS32-Ragtacttteetgtgtgaetetagaggeteataatttetggtgatt ttatgeegRBS33-Ftagagtaeacaggaetaetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS33-Ragtagteetgtgtgaetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeeRBS34-Fagagaaagaggagaaataetagatgegtataggtgaagaae tgtteaceggtRBS34-Ragtattteteetttetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeRBS35-Fagataagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS35-Ragtatteteetttetetagaaggeteataatttetggtgattt ttatgeeRBS64-Fagagaaagaggggaaataetagatgegtataggtgaagaaet tgteaceggtRBS64-Ragtattteeettttetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeGFP-Fattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaec tgteaceggtGFP-Ratgetagaaetggeatgeatgaetgaetaggtgaagaaec aatatggetatOFP-Fattaaagaggagaataetagatgetaaaggagaagaaac aatatggetaOFP-Ratgetagaaetggeatgeatettaaatteagatgetaacag ggtgaOFP-Ratgetagaaetggeatgeatettaaagteetaaaggaagaagaa ggtgetRFP-Fatgetagaaetggeatgeatettaaagteetaaagteetae ggtgetRFP-Ratgetagaaetggeatgeatettataeagtteateeataecae ggtegeYFP-Fattaaagaggagaataetagatggtataaaaggagaagaaga gtegeaYFP-Rattaaagaggagaataetagatggtataaaaggagaagaagg gtegeaYFP-Rattaaagaggagaataetagatggtataaaaggagaagaaga gtegeaYFP-Rattaaagaggagaataetagatggtateaaaaggagaagagaga gtegea		gttcaccggt
Toto toto toto totottatgccgRBS33-Ftagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS33-Ragtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgccRBS34-Fagagaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS34-Ragtatttctccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcRBS35-Fagataaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtattctccttttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS4-Ragtatttcccttttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS35-Ragtattaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaact tgtcaccggtGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgg tgtcaccggtGFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtacagttcgtcataccgt gggtgaOFP-Ratgctagaactggcatgcatttaacagtcgtcataccacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcattttaacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtacagttgctaggga ggtgaOFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgcccagttgctaggg ggtgcQfP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgcccagttgctgga ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgcccagttgctgga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggggaatactagatggtatcaaaaggagaagagg tatttacagggYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatcc	RBS32-R	agtactttcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatt
RBS33-Ftagagtacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact gttacacggtRBS33-Ragtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgccRBS34-Fagagaaagggagaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS34-Ragtatttctccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcRBS35-Fagattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtatttcctctttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS35-Ragtatttcccttttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS64-Fagagaaagggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS64-Ragtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaagagagaa actaggtgtatOFP-Ratgctgaactggcatgcattttacagttcatccataccac ggtgctRFP-Ratgctgaactggcatgcattctgtgcccagtttgctaggg ggtgaOFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgcccagttgctaggga ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgcccagttgctaggg ggtgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtacaaaggagaagagagg ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcaccacc ggtgctYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcaccacc ggtgctYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcaccaccag 		ttatgccg
gttcaccggt RBS33-R agtagtcctgtgtgactctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcc RBS34-F agagaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggt RBS34-R agtatttctccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgc RBS35-F agattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS35-R agtattcctctttaatctctagaaggctcataatttctggtgattt ttatgcc RBS64-F agagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggt RBS64-R agtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgattt atgccgc GFP-F attaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgtt GFP-R atgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtga OFP-F attaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagagaac atatggctat OFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgca YFP-F attaaagaggagaatactagatggtataagggagaagagagag	RBS33-F	tagagtcacacaggactactagatgcgtataggtgaagaact
RBS33-Ragtagtoctgtgtgactotagaaggotcataatttotggtgatttt atgcogocRBS34-Fagagaaagaggagaaatactagatgogtataggtgaagaac tgttcacoggtRBS34-Ragtatttotoctotttototagaaggotcataatttotggtgatttt atgcogocRBS35-Fagataaagaggagaatactagatgogtataggtgaagaact gttcacoggtRBS35-Ragtattotoctotttaatototagaaggotcataatttotggtgatt ttatgocRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgogtataggtgaagaac tgttcacoggtRBS64-Ragtatttocototttaatototagaaggotcataatttotggtgattt tatgoogGFP-Fattaaagaggagaatactagatgogtataggtgaagaactgt cacoggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtcataccgt gggtgaOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgcccagtttgctagga ggtcgaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagag ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactacaaggagaagagag gctaaYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactaccatccat		ottcaccoot
RBSDD Ralgugteetegggateetetagatggatgateetetagatgggteetetaattteteggtgattte atgccgccRBS34-Fagaaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS34-Ragtattteteettettetetagaaggeteataatttetggtgattt atgccgcRBS35-Fagattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtatteteetttaatetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgccRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS64-Ragtattteeetttetteteagaaggeteataatttetggtgattt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatetttgtacagttegteeataccgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagaac aatatggetatOFP-Ratgctagaactggcatgcatettaacagtteateeataecacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatettaacagtteateeataecacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattetgtgeccaaggag ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcattetgtgeccaaggagagagagagag ggtgatYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataacteatecateccatg ggtgat	RBS33-R	agtagtectototoactetagaaggeteataatttetogtgattt
AlgeogeeRBS34-Fagagaaagaggagaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS34-Ragtattteteettttetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgcogeRBS35-Fagataaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtatteteettttaatetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeeRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS64-Ragtattteceettttaatetetagaaggeteataatttetggtgattt atgcegeGFP-Fattaaagagggggaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggeatgeatetttgtacagttegteeataccgt gggtgaOFP-Ratgctagaactggeatgeatettaacagteeataaggagaagaagaa aatatggetatOFP-Ratgctagaactggeatgeatettaacagtteateeataecacc ggtgetRFP-Fatgctagaactggeatgeatgeatettaacagtteateeataecacc ggtgetRFP-Ratgctagaactggeatgeattettgtgeeceataggag ggtcgeaYFP-Ratgctagaactggeatgeattettgtgeeceaggagaagagag gtegtaaYFP-Ratgctagaactggeatgeattttgtataactacaccaccag ggtgatYFP-Ratgctagaactggeatgeattettgtgeeceaggagagagagagagagagagagagagagagagag	KD555-K	agaagee
RBS34-Pagagaagaggggaaatactagatgegtataggtgaagaac tgttcaceggtRBS34-Ragtatttetcetetttettettagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeRBS35-Fagattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaac gttcaceggtRBS35-Ragtattetcetetttaatetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeeRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgegtataggtgaagaac tgttcaceggtRBS64-Ragtattetcetetttettettaatetgatgeteataatttetggtgattt ttatgeeGFP-Fattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaac tgttcaceggtGFP-Ratgetagaactggeatgeatetttgtacagttegteeataatt eaceggtgtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagaagaa ggtgetOFP-Ratgetagaactggeatgeatetttatacagtteateeataecaec ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettatacagtteateeataecaec ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettegtgeatggaagaaggaga ggtegeaYFP-Rattaaagaggagaatactagatggtateaaaaggagaagagaga ggtegeaYFP-Ratgetagaactggeatgeattttgtataacteateeataecaec ggtgetYFP-Ratgetagaactggeatgeattttgtataacteateeataecaec ggtgat	DDS24 E	
IghteaceggiRBS34-Ragtatttecctetttectagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeRBS35-Fagattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaet gtteaceggtRBS35-Ragtatteteetttaatetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeeRBS64-Fagagaaagaggggaaataetagatgegtataggtgaagaae tgtteaceggtRBS64-Ragtattteeetttettettettetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeGFP-Fattaaagaggagaataetagatgegtataggtgaagaaetgtt caceggtgttgttGFP-Ratgetagaaetggeatgeatetttgtaeagttegteetaaaggegaaaae gggtgaOFP-Fattaaagaggagaataetagatgteaaaaggagaagaagaa ggtgetOFP-Ratgetagaaetggeatgeatetttataeagtteateetaeceace ggtgetRFP-Ratgetagaaetggeatgeatgeatettataeagtteateetaeceace ggtgetRFP-Ratgetagaaetggeatgeatettettgtaeagttegteaggag ggtegeYFP-Rattaaagaggagaataetagatggtateaaaaggagaagaagag ggtegeYFP-Ratgetagaaetggeatgeattettgtataaeteateetae ggtgetYFP-Ratgetagaaetggeatgeattttgtataaeteateetae ggtgat	KD554-1	agagaaagaggagaaalactagatgegtataggtgaagaac
RBS34-Ragtattictectifictetagaaggeteataattietggtgattit atgeegeRBS35-Fagattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaact gtteaceggtRBS35-Ragtatteteetttaatetetagaaggeteataattietggtgatt ttatgeeRBS64-Fagagaaagggggaaatactagatgegtataggtgaagaac tgtteaceggtRBS64-Ragtatteeettettettettettetagaaggeteataattetggtgatt atgeegeGFP-Fattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaactgtt caceggtgttgttGFP-Ratgetagaactggeatgeatetttgtacagttegteetataet gggtgaOFP-Fattaaagaggagaataetagatgteaaaaggagaagagaa aatatggetatOFP-Ratgetagaactggeatgeatettatacagtteateetaecaec ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettatacagtteateetaecaec ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettettgtacagttgetaggga ggtegeaYFP-Rattaaagaggagaatactagatggtateaaaaggagaagaga ggtegeaYFP-Ratgetagaactggeatgeattettgtacaategatggtateaaaaggagaagaga ggtegeaYFP-Ratgetagaactggeatgeattettgtateateetaeaaaggagaagaga ggtgat	DDC24 D	
atgccgcRBS35-Fagattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtatteteetttaatetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgccRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgtteaccggtRBS64-Ragtatteeettettettettettettetagaaggeteataatttetggtgattt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgetagaactggeatgeatetttgtacagttegteetaagg gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaa aatatggetatOFP-Ratgetagaactggeatgeatetttatacagtteateetaecaec ggtgctRFP-Ratgetagaactggeatgeatgeatettatacagtteateetaecaec ggtgctRFP-Ratgetagaactggeatgeattetgtgeetaggag ggtegaYFP-Rattaaagaggagaatactagatggtateaaaaggagaagaga ggtegetYFP-Ratgetagaactggeatgeattttgtataacteateetaecaec ggtgetYFP-Ratgetagaactggeatgeattttgtataacteateetaecaec ggtget	KBS34-K	agtattictcctctttctctagaaggctcataattictggtgattit
RBS35-Fagattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact gttcaccggtRBS35-Ragtattetcetetttaatetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeeRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgegtataggtgaagaac tgttcaceggtRBS64-Ragtattteceetetttetetagaaggeteataatttetggtgattt atgeegeGFP-Fattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaac tgegtgaOFP-Ratgetagaactggeatgeatetttaacagttegteetaaagggagaagaagagaa aatatggetatOFP-Ratgetagaactggeatgeatgeatettatacagttegteetaace ggtgetOFP-Ratgetagaactggeatgeatettatacagtteateetaecaec ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettatacagtteateetaecaec ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettatacagtteateetaecaecae ggtgetRFP-Ratgetagaactggeatgeatettatacagtteateetaecaecae ggtgetYFP-Ratgetagaactggeatgeatetttgtaeaaaggagaagagagagagagag		atgeege
gttcaccggtRBS35-Ragtattctcctctttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt ttatgccRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS64-Ragtatttccctctttctctagaaggctcataatttctggtgattt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatcttgtacagttcgtccataccgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagaagaac aatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccac ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctagga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagag gttcacagggYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag ggtgctYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag ggtgga	RBS35-F	agattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaact
RBS35-Ragtatteteetetttaatetetagaaggeteataatttetggtgatt ttatgeeRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgegtataggtgaagaac tgtteaceggtRBS64-Ragtattteeetettetetagaaggeteataatttetggtgattt atgeegeGFP-Fattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaactgtt caceggtgttgttGFP-Ratgetagaactggeatgeatetttgtacagttegteeataecgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgteaaaaggagaagagaa		gttcaccggt
ttatgccRBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS64-Ragtatttcccctctttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaa aatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctagga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagaga ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag ggtggtYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag ggtggt	RBS35-R	agtattctcctctttaatctctagaaggctcataatttctggtgatt
RBS64-Fagagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac tgttcaccggtRBS64-Ragtatttcccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaa aatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccac ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctagga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagaga ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag ggtggtYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag ggtggt		ttatgcc
tgttcaccggtRBS64-Ragtatttccccttttctctagaaggctcataatttctggtgatttt atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtgaOFP-Ratgctagaactggcatgcatctaggtgaagaagagaa aatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatctataccgtcataccgt ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatctataccgtcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatctataccgttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagagag	RBS64-F	agagaaagaggggaaatactagatgcgtataggtgaagaac
RBS64-Ragtatttecectetttetetagaaggeteataatttetggtgatttt atgeegeGFP-Fattaaagaggagaatactagatgegtataggtgaagaactgtt caceggtgttgttGFP-Ratgetagaactggeatgeatgeatetttgtacagttegteeataecgt gggtgaOFP-Ratgetagaactggeatgeatettgteeataecgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgteaaaaggagaagagaa		tgttcaccggt
atgccgcGFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtgaOFP-Ratgctagaaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaac aatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatctgtcatccagttgctaggaa ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatgtatcaaaaggagaagagaa ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcatttgtatacaaaaggagaagaga ggtggtYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat	RBS64-R	agtatttcccctctttctctagaaggctcataatttctggtgatttt
GFP-Fattaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt caccggtgttgttGFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtgaOFP-Ratgctagaaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaa caatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccagga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagaga ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtggtYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat		atgeege
Conception of the termination of ter	GFP-F	attaaagaggagaatactagatgcgtataggtgaagaactgtt
GFP-Ratgctagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt gggtgaOFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaac aatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctagga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagaga ggtcgcaYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactagtgatacaaaggagaagag ggtggtYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat		caccggtgttgtt
OFP-Fattaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaa caatatggctatOFP-Ratgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctagga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagaga ggtgctYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagaga ggtggtYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactactaccacc ggtgtYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactacaccac ggtg	GFP-R	atgetagaactggcatgcatctttgtacagttcgtccataccgt
OFP-F attaaagaggagaatactagatgtcaaaaggagaagagaac aatatggctat attaaggcatgcatgcatctatacagttcatccataccacc OFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-F Atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgca ggtcgca YFP-F attacaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tatttacaggg YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat Cgtgat	011 11	ocotog
OFP-R attatagaggagatactagatgagagagagagagagagag	OFP_F	acteneneneneneeestatenetateneneneette
OFP-R atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-F atgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgca ggtcgca YFP-F attacagggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tattacaggg YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat	011-1	attatagatgagagaatactagatgicaaaaggagaagaagagaa
OFP-R algetagaaetggeatgeatettataeagtteateeataeeaee ggtgct RFP-F atgetagaaetggeatgeatettataeagtteateeataeeaee ggtgct RFP-R atgetagaaetggeatgeatettataeagtteateeataeeagga ggtcgca YFP-F attaaagaggagaataetagatggtateaaaaggagaagaga tatttaeaggg YFP-R atgetagaaetggeatgeattttgtataaeteateeaagagagaagag	OED D	
ggigciRFP-Fatgctagaactggcatgcatcttatacagttcatccataccacc ggtgctRFP-Ratgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgcaYFP-Fattaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tatttacagggYFP-Ratgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat	OFF-K	aigetagaaciggeaigeaictiataeagticateeataeeaee
RFP-F atgctagaactggcatgcatgcattcttatacagttcatccataccacc ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgca ggtcgca YFP-F attaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tatttacaggg yFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat cgtgat		ggigei
ggtgct RFP-R atgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgca YFP-F attaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tatttacaggg YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat	RFP-F	atgetagaactggcatgcatettatacagttcatecataccacc
RFP-R atgctagaactggcatgcattctgtgccccagtttgctaggga ggtcgca ggtcgca YFP-F attaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tatttacaggg ggtcgcatgcattttgtataactcatccatgccaag YFP-R atgctagaactggcatgcatttgtataactcatccatgccaag cgtgat cgtgat		ggtgct
ggtcgca YFP-F attaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tatttacaggg YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat	RFP-R	atgetagaactggcatgcattetgtgccccagtttgctaggga
YFP-F attaaagaggagaatactagatggtatcaaaaggagaagagc tatttacaggg YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat		ggtcgca
YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat	YFP-F	attaa ag ag ga ga at acta gat gg tat caa aag ga ga ag ag c
YFP-R atgctagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag cgtgat		tatttacaggg
cgtgat	YFP-R	atgetagaactggcatgcattttgtataactcatccatgccaag
		cgtgat

T7-GFP, 以此方法分别获得 pCDF-T7-OFP、 pCDF-T7-RFP、pCDF-T7-YFP 等质粒。以上述质 粒为模板, 更换 P₁₇为 P_{BAD}, 分别获得 pCDF-P_{BAD}-GFP 、 pCDF-P_{BAD}-OFP 、 pCDF-P_{BAD}-RFP 、 pCDF-P_{BAD}-YFP。

1.2.2 孔板筛选方法

将构建成功的重组质粒转化至 E. coli XL1-Blue (ΔcusSΔcusR)菌株中,在37 ℃条件 下于 LB 固体平板上过夜培养。随后,挑取单菌 落接种于 LB 液体培养基中,在37 ℃、250 r/min 条件下培养过夜,制备种子液。将种子液以 4% (体积比)的接种量转接至装有适量 LB 液体 培养基的 48 深孔板中,在37 ℃、250 r/min 条 件下培养。待培养液 OD₆₀₀达到 0.4–0.6 时,每 孔添加 20 μL 诱导剂 Cu²⁺、Ni²⁺,使体系的最终 体积为1 mL。诱导12 h后,测定重组细胞的荧光 强度。将终浓度为33 μg/mL 的氯霉素和50 μg/mL 的链霉素根据需求添加至培养基中。

1.2.3 荧光强度分析

将诱导后的菌液使用质量分数为 0.85%的 氯化钠溶液清洗 3 遍,并稀释清洗后的菌液至 *OD*₆₀₀ 为 0.4–0.8。荧光强度(a.u.)和细胞密度 (*OD*₆₀₀)采用BioTek HT平板阅读器(伯腾仪器有 限公司)测量。测定GFP、OFP、RFP和YFP在 不同波长激发光和发射光下的荧光强度(GFP,激 发/发射: 485/528 nm; OFP,激发/发射: 530/560 nm; RFP,激发/发射: 588/633 nm; YFP,激发/发射: 500/530 nm)。相对荧光强 度为荧光强度与 *OD*₆₀₀ 的比值。

1.2.4 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况

将诱导 12 h 后的重组细胞浓缩至 *OD*₆₀₀= 2.0,取20μL 菌液并加入 5×Loading buffer,混 匀后 98 ℃加热处理 10 min。利用 12% SDS-PAGE 分析蛋白表达情况,上样量为 10 μL。电 泳结束后使用考马斯亮蓝 G-250 染液染色,脱 色后分析蛋白质表达水平。

2 结果与分析

2.1 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统的构建与 结构优化

微生物基因组上的天然双组分系统大多以操 纵子结构存在,即HK和RR共用一个启动子和终 止子。本研究首先将 E. coli XL1-Blue 基因组上的 天然 cusS/cusR 基因簇克隆至 pCDFDuet-1 质粒,进 一步替换启动子 P₁₇为 P_{BAD} (图 1A),使 cusS-cusR 的 表达水平受到阿拉伯糖浓度控制。在不同浓度的 Cu²⁺和 2 mmol/L 阿拉伯糖诱导下,传感器的绿色 荧光输出随着 Cu²⁺浓度的增加呈现上升趋势(图 1B)。 然而,在未添加 Cu²⁺诱导时,传感器仍表现出较 高的本底表达水平,动态范围仅为 1.2 倍。通过调 节阿拉伯糖诱导浓度,从而优化 cusS/cusR 的表达 水平依然无法显著降低传感器的本底表达(图 1C)。



图 1 不同回路结构对 Cu²⁺、Ni²⁺诱导表达系统影响

Figure 1 Effect of different loop structures on Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system. A: Schematic representation of the structure of the operon structure of the Cu^{2+} induced expression system and the monocistron structure of Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system; B: Fluorescence expression of Cu^{2+} induced expression system of operon structure co-induced by 2 mmol/L L-arabinose and different concentrations of Cu^{2+} ; C: Fluorescence expression of Cu^{2+} induced expression system of operon structure co-induced by 600 µmol/L Cu^{2+} and different concentrations of L-arabinose; D: Fluorescence expression of Cu^{2+} induced expression system of monocistron structure induced by different concentration of Cu^{2+} ; E: Fluorescence expression of Ni^{2+} induced expression system of monocistron structure induced by different concentration of Ni^{2+} . Error bars indicate standard deviation from the mean (n=3). 为了进一步降低本底表达水平,利用弱组 成型启动子 BBa_J23109 和强组成型启动子 BBa_J23100 分别调控 cusR 和 cusS 的表达,构 建了单顺反子结构的 Cu²⁺诱导表达系统(图 1A)。 在不同浓度的 Cu²⁺诱导下,测定传感器的荧光 输出情况(图 1D)。结果表明,与操纵子结构相 比,降低 cusR 的表达水平后,单顺反子结构的 Cu²⁺传感器本底表达荧光强度由 2 400 a.u.降 低至 852 a.u.,最大荧光强度由 2 800 a.u.提升 至 7 400 a.u.,动态范围由 1.2 倍提高至 8.7 倍。

Ni²⁺诱导表达系统是通过将 Cu²⁺诱导表达 系统中的 HK (CusS)跨膜结构域和周质感知结 构域与集胞藻属(*Synechocystis* sp.) PCC 6803 中 的镍感知双组分系统^[19]的 HK (NrsS)交换获得 的。尽管两者在感知金属离子的方式上有所不 同,但交换后的结构域组合具有相同的调控机 制,均通过同一响应调节蛋白 CusR 与下游启动 子 P_{cusC}调控目标基因表达。因此,将 Cu²⁺诱导表 达系统最佳的表达结构应用到 Ni²⁺诱导表达系统 (图 1A)。在不同浓度的 Ni²⁺诱导下,传感器的本 底表达荧光强度为 2 711 a.u.,最大诱导表达荧光 强度为 15 243 a.u.,动态范围为 5.6 倍(图 1E)。

2.2 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统拆分与 RBS 优化

TCS 系统的信号输出不仅与 HK 和 RR 的 表达水平密切相关,还受到目标基因拷贝数和 上游 RBS 强度的影响。使用高拷贝质粒和强 RBS 表达目标基因,将更有助于提高诱导系统 的输出水平。因此,为了进一步优化 Cu²⁺和 Ni²⁺ 诱导表达系统,将 P_{cusC}-RBS-sfGFP 克隆至拷贝 数更高的 pCDFDuet-1 质粒上,从而将诱导表 达系统拆分为传感质粒和报告质粒这 2 个部分 (图 2A)。研究发现,拆分 Cu²⁺诱导表达系统后, 相比未拆分前(图 1D),本底表达荧光强度从 852 a.u.提高至 1 050 a.u., 1 000 µmol/L Cu²⁺诱 导下荧光强度从 2 853 a.u.增加至 18 111 a.u. (图 2B),响应倍数由 3.3 倍提升至 17.2 倍。拆分 Ni²⁺诱导表达系统后,相比未拆分前(图 1E),本 底表达荧光强度从 2 711 a.u.增加至 6 669 a.u., 1 000 μmol/L Ni²⁺诱导下荧光强度从 9 939 a.u. 增加至 28 003 a.u. (图 2C),响应倍数由 3.7 倍 提升至 4.2 倍。这些结果表明,提高报告质粒 的拷贝数可以显著放大 TCS 系统的信号输出, 从而增强本底表达和最大诱导表达水平。

此外,通过优化 RBS 强度,进一步提高了 GFP 的翻译效率。与 2.1 节中使用的强 RBS G10 相比,当 RBS 强度较低时,Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表 达系统在未添加诱导剂或添加 1 000 µmol/L Cu²⁺和 Ni²⁺诱导剂后,荧光强度显著降低。随 着 RBS 强度的增强,本底表达和诱导后的荧光 强度逐渐增加(图 2D、2E)。当 sfGFP 的 RBS 强度最高时,Cu²⁺诱导表达系统的本底表达荧 光强度和 1 000 µmol/L Cu²⁺诱导下的荧光强度 分别由 1 050 a.u.和 18 111 a.u.提高至 1 154 a.u. 和 50 454 a.u.,响应倍数由 17.2 倍提升至 43.7 倍。Ni²⁺诱导表达系统的本底表达荧光强度 和 1 000 µmol/L Ni²⁺诱导下的荧光强度分别由 6 669 a.u.和 28 003 a.u.分别提升至 7 990 a.u.和 33 628 a.u.,响应倍数无明显变化。

2.3 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统的诱导性 能表征

理想的基因诱导表达系统应具备低本底表 达、较高的最高诱导水平、较广动态范围、良好 的梯度诱导效果以及使用成本低廉的诱导剂等 特点。为评估 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统的性能, 本研究以 sfgfp 作为报告基因,系统分析了诱导 剂浓度和诱导时间对 Cu2+ (图 3A)和 Ni2+ (图 3B) 诱导表达系统的影响,并与传统的 T7 表达系统 (图 3C)和 PBAD 表达系统(图 3D)进行了对比。过高 的本底表达会导致目标基因在未添加诱导剂的 情况下发生渗漏表达,从而影响系统的可调性和 响应性。低本底表达能够确保目标基因仅在存在 诱导剂时得到充分表达,避免非特异性表达。结 果显示, T7 表达系统的本底表达最低, 其荧光强 度仅为 102 a.u., 而 Ni²⁺诱导表达系统的本底表达 最高,荧光强度为7990 a.u.。Cu²⁺诱导表达系统 和 PBAD 表达系统的本底荧光强度分别为 1 106 a.u. 和1291 a.u., 表现出相似的性能。



图 2 Cu²⁺、Ni²⁺诱导表达系统报告质粒优化

Figure 2 Optimisation of reporter plasmids for Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression systems. A: Schematic representation of the structure of the sensor plasmid expressed on the pACYCDuet-1 plasmid and the reporter plasmid expressed on the pCDFDuet-1 plasmid of the Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system; B: The fluorescence expression of the Cu^{2+} induced expression system with separated sensor and reporter plasmids under different concentrations of Cu^{2+} ; C: The fluorescence expression of the Ni^{2+} induced expression system with separated sensor and reporter plasmids under different concentrations of Ni^{2+} ; D: Fluorescence expression of the Cu^{2+} induced expression system under gradient intensity RBS regulation of the target gene *sfgfp* under none inducers and 1 000 µmol/L Cu^{2+} induction; E: Fluorescence expression of the Ni^{2+} induced appreciated sensor and reporter plasmids regulation of the target gene *sfgfp* under none inducers and 1 000 µmol/L Cu^{2+} induction; E: Fluorescence expression of the Ni^{2+} induced appreciated sensor and reporter plasmidy regulation of the target gene *sfgfp* under none inducers and 1 000 µmol/L Ni^{2+} induction. Error bars indicate standard deviation from the mean (*n*=3).

最高诱导水平反映了在诱导后系统所能产 生的最高目标蛋白量,对于蛋白质生产和酶类合 成等应用具有重要意义。在各系统的最大诱导水 平对比中,P_{BAD}表达系统表现最佳,在 5.0 mmol/L 阿拉伯糖诱导 12 h 后,达到了最高的荧光强 度 181 542 a.u.。Cu²⁺诱导系统则表现较弱,在 5.0 mmol/L Cu²⁺诱导 8 h 后,荧光强度为 60 614 a.u.。T7 系统和 Ni²⁺诱导系统分别在 0.2 mmol/L IPTG 诱导 8 h 和 4 mmol/L Ni²⁺诱导 12 h 后,达到最高的荧光强度,分别为 97 908 a.u. 和 114 414 a.u.。在性能表征方面,Cu²⁺诱导系 统和 Ni²⁺诱导系统动态范围最高,分别达到 50.0 倍 和 14.3 倍。此外,4.0 mmol/L Ni²⁺和 5.0 mmol/L Cu²⁺已接近 *E. coli* XL1-Blue 正常生长可耐受的 最大胁迫浓度,更高浓度的金属离子将严重抑 制菌株生长,从而降低诱导系统的性能。

在诱导后最高表达时间点下,诱导梯度效 应的线性化水平决定了是否能通过调控诱导剂 浓度以精确调节蛋白表达水平。高线性化水平 对于高效的蛋白生产和基因功能研究至关重 要。为此,本研究分析了 Cu²⁺(图 3E)、Ni²⁺(图 3F)、T7(图 3G)和 P_{BAD}(图 3H)系统在最高表达时间点下,诱导剂浓度与蛋白表达量之间的线性关系。结果表明,相较于 T7 和 P_{BAD}系统,Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统在诱导剂浓度与基因表达水平之间表现出更优越的线性关系。

2.4 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统在表达不 同蛋白质时的应用普适性

为了进一步评估 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统 在不同蛋白质表达中的普适性,选择了 4 种不 同类型的荧光蛋白(GFP、OFP、RFP 和 YFP), 并使用 Cu²⁺(图 4A)、Ni²⁺(图 4B)、T7 (图 4C)和



图 3 基因诱导表达系统性能表征

Figure 3 Performance characterisation of gene-induced expression systems. Effect of induction time and inducer concentration on the Cu²⁺ (A), Ni²⁺ (B), T7 (C) and P_{BAD} (D) induced expression system. Analysis of linear relationship between inducer concentration and gene expression level at time of maximum expression in Cu²⁺ (E), Ni²⁺ (F), T7 (G) and P_{BAD} (H) gene expression systems. Error bars represent the standard deviation from the mean (n=3).

窗: 010-64807509





Figure 4 Effect of protein type on gene induction system. The induction of GFP, OFP, RFP and YFP by T7 (A), P_{BAD} (B), Cu^{2+} (C) and Ni^{2+} (D) induced expression systems under the control of gradient inducers. Linear level analysis of gradient induction of OFP (E), RFP (F) and YFP (G) by Cu^{2+} induced expression system. Linear level analysis of gradient induction of OFP (H), RFP (I) and YFP (J) by Ni^{2+} induced expression system Error bars represent the standard deviation from the mean (*n*=3).

P_{BAD} (图 4D)诱导表达系统进行表达。测定不同 浓度诱导剂诱导 12 h 后的蛋白质表达水平,发 现在本底表达方面,T7 诱导表达系统表现出显 著的优势,4 种荧光蛋白的本底表达均最低。 相比之下,其他3 种诱导表达系统中,P_{BAD}系

统对 OFP 的本底表达最低,其本底荧光强度为 985 a.u.。在最大表达水平方面,T7 系统对 OFP、 RFP 和 YFP 的诱导表达最为优越,最大表达荧 光强度分别为 43 722、126 568 和 142 352 a.u.; 而 P_{BAD}诱导系统在表达 GFP 时表现最优,最大荧

光强度为 181 542 a.u.。

为了探究 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统在梯度 诱导的线性化水平上的优势,分析了 Cu²⁺诱导 表达系统对 OFP (图 4E)、RFP (图 4F)、YFP (图 4G)以及 Ni²⁺诱导表达系统对 OFP (图 4H)、RFP (图 4I)、YFP (图 4J)在最大诱导水平下与诱导剂 浓度之间的线性关系。结果表明,Cu²⁺和 Ni²⁺ 诱导表达系统对这 3 种蛋白的梯度诱导曲线的 R²值均大于 0.900,表明这 2 种系统在诱导剂浓度和诱导水平上具有较强的线性相关性,并且这种线性相关性具有良好的普适性。

为了进一步探讨 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统 在梯度诱导方面的优势,对其在不同浓度诱导剂 条件下 GFP (图 5A)、OFP (图 5B)、RFP (图 5C) 和 YFP (图 5D)这 4 种蛋白的诱导表达情况进行了 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 结果显示,与 Ni²⁺





Figure 5 SDS-PAGE and gray scale analysis of protein expression in Cu^{2+} and Ni^{2+} induced expression system. SDS-PAGE analysis of GFP (A), OFP (B), RFP (C) and YFP (D) expression by Cu^{2+} and Ni^{2+} induction system under the control of gradient concentration inducer. M: Protein marker. E: Gray analysis of Cu^{2+} induced expression system SDS-PAGE. F: Gray analysis of Ni^{2+} induced expression system SDS-PAGE. The direction of the arrow is the location of the target protein band.

诱导表达系统相比, Cu²⁺诱导系统在最大蛋白表达 量上存在一定劣势, 但在低浓度诱导下, Ni²⁺诱导 表达系统蛋白表达量的差异较小。随着 Cu²⁺和 Ni²⁺ 浓度的提高, GFP、OFP、RFP 和 YFP 这 4 种蛋白 的表达量均呈上升趋势。进一步使用 ImageJ 得到 的灰度分析结果(图 5E、5F)与 SDS-PAGE 结果一 致。以上结果进一步表明通过荧光强度分析不同 诱导系统的表达性能的结果是可靠的。

3 讨论与结论

双组分系统是原核生物中广泛存在的一类重 要信号传递机制,主要负责胞内外环境信号的感 知与响应,在细菌的多种生命活动中发挥关键作 用。目前,对于双组分系统的研究主要集中于离 子和小分子化合物传感器开发与应用^[20-21]。近年 来,随着合成生物学的快速发展,双组分系统在 动态调控代谢过程和环境信号响应等领域的潜力 逐渐显现。一些研究者利用双组分系统组氨酸激 酶和响应调节蛋白在接受外界信号后的互作特 性,尝试开发更复杂的动态调控网络^[22-24]。尽管 如此,双组分系统作为一种新型蛋白表达系统的 潜力仍未得到充分挖掘。

本研究成功开发了 2 种基于双组分系统的 由 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导的基因表达系统。有研究显 示,当 CusR 表达水平过高时,大肠杆菌内源 性双组分系统 HprS-HprR 可磷酸化 CusR,进而 与 Pcusc 结合激活下游基因的表达。然而,在外 源 Cu²⁺存在时, CusS 在胞内发生聚集, CusS-CusR 系统占据主导地位,从而解除 HprS-HprR 系统的干扰^[25]通过使用弱组成型启 动子和强组成型启动子分别调控 RR 和 HK 表 达, 使 Cu²⁺诱导表达系统动态范围由 1.2 倍提 升至 8.7 倍。具有该结构的 Ni²⁺诱导表达系统的 动态范围达到 5.6 倍,有效地解决了细菌自身 不同双组分系统间的信号串扰问题。进一步通 过提高报告质粒拷贝数和优化目的基因 RBS, 将 Cu²⁺、Ni²⁺诱导表达系统动态范围分别提升 至 50.0 倍和 14.3 倍。与传统的 T7 和 PBAD 诱导 表达系统相比, Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统具有 更好的梯度诱导线性水平和更低的诱导成本, 且在不同蛋白表达过程中具有普适性。

大肠杆菌的传统基因表达系统主要包括 T7和 PBAD 诱导表达系统。尽管二者在生物技术 领域得到了广泛应用,但仍存在一定局限性。 例如, IPTG 成本较高, 不适用于需要低成本操 作的应用场景; PBAD 表达系统中阿拉伯糖价格 则相对较低,但由于会被细胞利用导致诱导浓 度降低等缺陷,限制了其在高精度调控和复杂 基因回路中的应用。本研究开发的 Cu2+和 Ni2+ 诱导基因表达系统在成本控制方面表现出显著 优势。其中,氯化铜和氯化镍的价格较低,且 不被细胞代谢利用,从而提高了诱导的稳定性。 然而,该系统仍存在一定局限性,即仅在较高 浓度的诱导剂条件下才能有效启动基因表达, 可能导致培养基中重金属离子累积,从而引发 生物废水中重金属含量超标的问题。双组分系 统的功能主要受组氨酸激酶(HK)和响应调节蛋 白(RR)的影响,因此,可通过蛋白质工程手段 提高 HK 和 RR 的活性,或通过分子生物学策 略优化报告基因的输出强度,以降低有效诱导 剂的使用浓度,进一步改善系统的适用性。

总之,本研究的优化策略不仅有效解决了 Cu²⁺和 Ni²⁺诱导表达系统的本底表达高和动态 范围低的问题,还为其他双组分系统的工程化 开发提供了新的思路。未来,随着对双组分系 统调控机制的更深入理解以及更多调控技术的 创新,Cu²⁺和 Ni²⁺基因诱导表达系统有望发展 成为一种高效、灵活且具有广普适性的蛋白表 达工具,进一步拓宽生物技术与工业应用的边 界,为合成生物学和环境工程领域的创新提供 更多可能。

作者贡献声明

丁文骏:方案设计、实验操作、初稿写作、 数据管理、实验操作、提供材料;周胜虎:数 据管理、方案设计、经费支持、稿件润色修改、 监督指导;邓禹:监督指导、稿件润色修改、 经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告 工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- AFFANDI T, McEVOY MM. Mechanism of metal ion-induced activation of a two-component sensor kinase[J]. Biochemical Journal, 2019, 476(1): 115-135.
- [2] MIZUNO T, MIZUSHIMA S. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes[J]. Molecular Microbiology, 1990, 4(7): 1077-1082.
- [3] AKERLEY BJ, MONACK DM, FALKOW S, MILLER JF. The bvgAS locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(3): 980-990.
- [4] DARZINS A. The pilG gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa Pilus* production and twitching motility, is homologous to the enteric, single-domain response regulator CheY[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(18): 5934-5944.
- [5] DERETIC V, MOHR CD, MARTIN DW. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: signal transduction and histone-like elements in the regulation of bacterial virulence[J]. Molecular Microbiology, 1991, 5(7): 1577-1583.
- [6] STOCK AM, ROBINSON VL, GOUDREAU PN. Two-component signal transduction[J]. Annual Review of Biochemistry, 2000, 69: 183-215.
- [7] BI SY, POLLARD AM, YANG YL, JIN F, SOURJIK V. Engineering hybrid chemotaxis receptors in bacteria[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(9): 989-1001.
- [8] FUNG DKC, MA YZ, XIA TY, LUK JCH, YAN AX. Signaling by the heavy-metal sensor CusS involves rearranged helical interactions in specific transmembrane regions[J]. Molecular Microbiology, 2016, 100(5): 774-787.
- [9] GIEDROC DP, ARUNKUMAR AI. Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches[J]. Dalton Transactions, 2007(29): 3107-3120.
- [10] RAVIKUMAR S, GANESH I, YOO IK, HONG SH. Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(5): 758-765.
- [11] PECA L, KÓS PB, MÁTÉ Z, FARSANG A, VASS I. Construction of bioluminescent cyanobacterial reporter strains for detection of nickel, cobalt and zinc[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 289(2): 258-264.
- [12] GANESH I, RAVIKUMAR S, LEE SH, PARK SJ, HONG SH. Engineered fumarate sensing *Escherichia coli* based on novel chimeric two-component system[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4):

560-566.

- [13] ZHAO JY, SUN HH, WANG GG, WANG Q, WANG YP, LI QB, BI SY, QI QS, WANG Q. Engineering chimeric chemoreceptors and two-component systems for orthogonal and leakless biosensing of extracellular γ-aminobutyric acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(25): 14216-14228.
- [14] RAVIKUMAR S, DAVID Y, PARK SJ, CHOI JI. A chimeric two-component regulatory system-based *Escherichia coli* biosensor engineered to detect glutamate[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 186(2): 335-349.
- [15] DÍAZ E, PRIETO MA. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11(5): 467-475.
- [16] LIANG HH, DENG X, BOSSCHER M, JI QJ, JENSEN MP, HE C. Engineering bacterial two-component system PmrA/PmrB to sense lanthanide ions[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(6): 2037-2039.
- [17] NELSON MD, FITCH DHA. Overlap extension PCR: an efficient method for transgene construction[J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 772: 459-470.
- [18] PRYOR JM, POTAPOV V, KUCERA RB, BILOTTI K, CANTOR EJ, LOHMAN GJS. Enabling one-pot Golden Gate assemblies of unprecedented complexity using data-optimized assembly design[J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0238592.
- [19] LÓPEZ-MAURY L, GARCÍA-DOMÍNGUEZ M, FLORENCIO FJ, REYES JC. A two-component signal transduction system involved in nickel sensing in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC 6803[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(1): 247-256.
- [20] WANG JF, ZHANG C, SETH CHILDERS W. A biosensor for detection of indole metabolites[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(7): 1605-1614.
- [21] SELVAMANI V, MARUTHAMUTHU MK, ARULSAMY K, EOM GT, HONG SH. Construction of methanol sensing *Escherichia coli* by the introduction of novel chimeric MxcQZ/OmpR two-component system from *Methylobacterium organophilum* XX[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2017, 34(6): 1734-1739.
- [22] RUTTER JW, DEKKER L, FEDOREC GONZALES DT, WEN KY, TANNER AJH. LES, DONOVAN E. OZDEMIR T. THOMAS GM. BARNES CP. Engineered acetoacetate-inducible whole-cell based biosensors on the AtoSC two-component Biotechnology system[J]. and Bioengineering, 2021, 118(11): 4278-4289.
- [23] GANESH I, RAVIKUMAR S, YOO IK, HONG SH. Construction of malate-sensing *Escherichia coli* by introduction of a novel chimeric two-component system[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(4): 797-804.
- [24] STEIN V, ALEXANDROV K. Synthetic protein switches: design principles and applications[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(2): 101-110.
- [25] URANO H, YOSHIDA M, OGAWA A, YAMAMOTO K, ISHIHAMA A, OGASAWARA H. Cross-regulation between two common ancestral response regulators, HprR and CusR, in *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 2017, 163(2): 243-252.

窗: 010-64807509