زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

اشرشیاکلی: پرکاربردترین میزبان تولید پروتئین‌های نوترکیب

ناهید بختیاری[1*]، محسن واعظ[1]

۱- استادیار، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۱۱-۳۳۵۳۵، تهران، ایران
nbakhtiari@irost.org

دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶

چکیده

باکتری *اشرشیاکلی* یکی از مهمترین میزبان‌های مورد استفاده برای تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد. به عنوان مثال، بیشتر پروتئین‌های دارویی که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا جهت مصرف مورد تایید قرار گرفته‌اند در *اشرشیاکلی* تولید شده‌اند. یکی از مزیت‌هایی که این موجود را به یک کارخانه مناسب جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب تبدیل کرده، شناخت کامل ماهیت زیستی آن می‌باشد. این امر سبب شده است که در سال‌های اخیر امکان ایجاد تغییرات جهت دار برای مبدل ساختن این کارخانه کوچک به سامانه‌ای هوشمند برای ساخت آسان‌تر انواع پروتئین‌های نوترکیب با ویژگی‌های گوناگون فراهم شود. به طوری که هم اکنون سویه‌های مهندسی شده‌ی مختلف و بسیار پرکاربردی برای تولید مقدار بالا و پایدار پروتئین‌های مورد نظر از سویه‌های والد و وحشی به دست آمده است که در آزمایشگاه و صنعت قابل استفاده می‌باشد. در این مقاله مروری به معرفی تعدادی از پرکاربردترین این سویه‌ها پرداخته می‌شود.

کلید واژگان: *اشرشیاکلی*، پروتئین نوترکیب، میزبان

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

۱-مقدمه

پروتئین‌ها به دلیل نقش ســاختاری و عملکردی خود در سلول، از ماکرومولکول‌های دارای اهمیت ویژه به حساب می‌آیند. به علاوه، برای انجام مطالعات جامع مربوط به شـناسـایی سـاختار، اندرکنش‌ها و عملکرد[1] پروتئین‌ها و کاربرد آنها در صنایع مختلف دارویی و زیست‌فناوری به مقادیر کافی از پروتئین مورد نظر نیاز اسـت. دسـتیابی به این هدف به دو صـورت امکان‌پذیر اسـت. اول این که پروتئین مورد نظر را از منبع اصلی آن جدا سازی کنیم که معمولا در این روش مقادیر کافی از آن پروتئین قابل دسـتیابی نخواهد بود. راه دوم و به صـرفه تر، بیان بالای[2] پروتئین مورد نظر به‌صورت نوترکیب در سیستم‌های بیانی موجود می‌باشـد. به علاوه، با توجه به این که در حال حاضـر بسـیاری از پروتئین‌های مورد اسـتفاده در صـنایع دارویی و زیسـت‌فناوری انواع دسـت ورزی شـده از پروتئین اصـلی هسـتند، اسـتخراج آنها از منبع اصـلی امکان‌پذیر نیست [۱].

در میـان میزبـان‌هـای مختلفی کـه برای تولیـد پروتئین نوترکیب موجود هستند باکتری *اشرشیاکلی* به دلیل مزایای خاصـی که دارد اغلب اوقات انتخاب اول اسـت و با این که برخی محدودیت‌ها در اسـتفاده از این میزبان برای تولید انواع خاصـی از پروتئین ها وجود دارد؛ مزایای غیرقابل انکار آن ازجمله تولید بالای محصول، ارزان بودن و سادگی انجام دست‌ورزی این سیستم بیانی سبب ایجاد سـویه‌ها و پلاسـمید های متنوع مهندسـی شـده برای کاربرد های مختلف در طول تاریخ تولید پروتئین های نوترکیب شـده اسـت[۱]. در واقع، پس از کشـف باکتری *اشـرشـیاکلی* توسـط تئودور اشـریچ میکروبیولوژیسـت و پزشک متخصص اطفال آلمانی در سال ۱۸۸٤ ، امروزه سویه *E. coli* Nissle 1917 اغلب به‌عنوان یک سویه مرجع یا میکروارگانیسـم مدل در مطالعات زیسـت پزشـکی تجربی، از جمله دسـتکاری‌های نوترکیب سـویه به منظور ساخت مشتقاتی از سویه‌هایی با ویژگی‌های جدید استفاده می‌شود [۳,۲].

در این مقاله، به معرفی سویه‌های بیانی مختلف *اشرشیاکلی* پرداخته و کاربرد هر یک از آنها را به تفصیل بیان خواهیم کرد.

۲- مرسوم‌ترین سویه‌های بیانی *اشرشیاکلی*: انواع و کاربردها

گونه‌هایی از باکتری *اشـرشـیاکلی* که در حال حاضـر در تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند از دو سـویه اصـلی B و K-12 مشـتق می‌شـوند. علیرغم نزدیکی این دو گونه، تفاوت‌های مشـخصـی در تولید پروتئین نوترکیب بین آنها دیده می‌شود[٤].

در سال ۲۰۱۲ مطالعات جامع و مقایسه‌های کاملی توسط سونگ هو یون و همکارانش در سطح ژنوم تا پروتئوم و به دنبال آن انجام شـبیه‌سـازی رایانه‌ای برای شـناخت متابولومیکس این دو گونه صـورت گرفت. این مطالعات نشان داد که، دلایل مختلفی برای این اختلاف وجود دارد. از جمله این دلایل می‌توان به قابلیت بیشتر سویه‌ی B در انجام فرایندهای ساخت اسیدهای آمینه و وجود آنزیم‌های پروتئازی کمتر که سبب حفظ پروتئین‌های ساخته شـده به‌صورت نوترکیب از اثر هیدرولیتیک آنها می‌شود، اشاره نمود. به علاوه، عدم وجود فلاژل در باکتری *اشرشیاکلی* سـویه B و احتمال کمتر خروج پلاسـمید حاوی ژن نوترکیب نیز می‌تواند دلیل ایجاد این اختلاف شـود. از طرفی، سویه B دارای یک سیستم ترشحی نوع دو اضافی نسبت به سویه K بوده و ساختار غشا و دیواره آن برای ترشـح راحت تر پروتئین نوترکیب بیان شـده مناسـب‌تر اسـت. در مقابل، در سـویه‌ی K ژن‌های مربوط به شـوک حرارتی بیان بیشـتری نسـبت به سـویه‌ی B داشـته و این موضوع آن را نسبت به برخی شرایط استرس‌زای محیطی مقاوم‌تر کرده است [۵].

---

[1] Proteomics

[2] Over-expression

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

گونه‌هایی که از این دو سویه مشتق شده‌اند، در واقع نتیجه ی ایجاد جهش‌های متفاوت م شخ صی ه ستند. به‌عبارت دیگر، با اعمال تغییرات ژنی هدف‌دار یا ت صادفی در ژنوم اولیه باکتری‌های اشـرشـیاکلی B و K و سـپس غربالگری گونه‌های جدید ایجاد شـــده، به انواع کاربردی‌تری از این باکتری‌ها در حوزه‌ی تولید پروتئین نوترکیب دســت یافته شده است [۱].

پرکاربردترین سویه‌های مشتق از اشرشیاکلی K-12 شامل DH5α، W3110، DH1، RV308، MG1655، HMS174 و JM109 هســتند [٦–٨]؛ ولی در مورد *اشــرشــیاکلی* B سویه‌های مهندسی شده بیشتری وجود دارد که هریک به منظور خاصی مورد دست‌ورزی قرار گرفته و اطلاعات آن به‌صورت خلاصه در جدول۱ جمع‌آوری شده است.

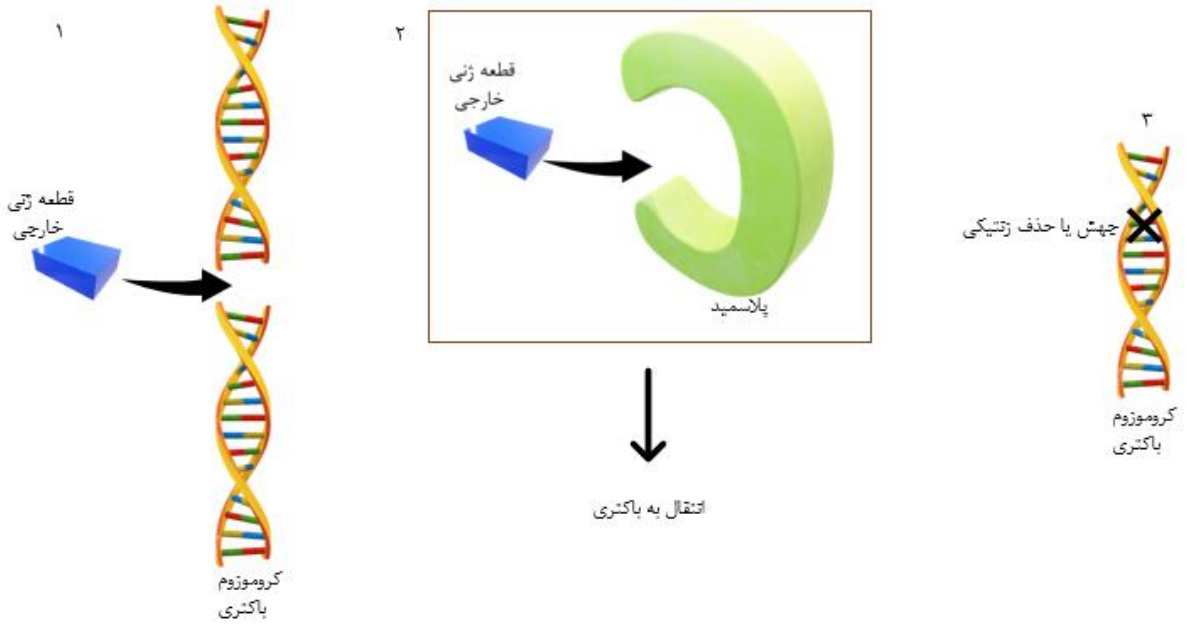
جدول ۱ سویه‌های *اشرشیاکلی* B ی مهندسی شده‌ی موجود جهت بیان پروتئین نوترکیب

نام سویه	**دست‌ورزی انجام شده**	**کاربرد**
BL21(DE3)	وارد کردن ژن *RNAپلی‌مراز* باکتریوفاژ T7 در کروموزوم باکتری *اشرشیاکلی*	بیان بالای پروتئین نوترکیب به علت قوی بودن پروموتر *RNAپلی‌مراز T7*
Bl21 (DE3) pLysS	ایجاد مقادیرکم لیزوزیم T7 برای کاهش *RNAپلی‌مراز T7* توسط پلاسمید pLysS	بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
C41(DE3)	ایجاد جهش‌های تصادفی در ژن *lacI* در باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) که سبب کاهش بیان RNAپلی‌مراز T7 شده	بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
C43(DE3)	ایجاد جهش‌های تصادفی در ژن *lacI* در باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) که سبب کاهش بیان RNAپلی‌مراز T7 شده	بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
Mutant56(DE3)	تغییر در در یکی از اسیدهای آمینه ژن *RNA پلی‌مراز T7*	کاهش اتصال آنزیم RNAپلی‌مراز به پروموتر T7 و کاهش بیان پروتئین نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
RiboTite	قرار دادن توالی ریبونوکلوئیک اسیدی تنظیم شونده در بخش غیر ترجمه شونده انتهای '۵ ژن *RNA پلی‌مراز T7* و بالادست ژن نوترکیب هدف	کنترل بیان پروتئین هدف به منظور افزایش ترشح آن در فضای پری‌پلاسمی میزبان
Bl21(DE3::ara)	جایگزینی پروموتر PlacUV5 در سویه‌ی BL21(DE3) با پروموتر آرابینوز (*ParaBAD*)	افزایش زیست‌توده و مقدار پروتئین نوترکیب بیان شده
Lemo21 (DE3)	ژن *lysY* که مسئول تولید لیزوزیم T7 می‌باشد تحت کنترل یک پروموتر قابل تنظیم به نام *rhaPBAD* قرار گرفته است.	بیان کنترل شده‌ی پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
BL21-AI	تنظیم ثانویه القای بیان با IPTG به وسیله‌ی پروموتر *pBAD* تحت القای قند آرابینوز با اثر بر روی پروموتر ژن آنزیم RNAپلی‌مراز T7 که سبب تنظیم بیان آن می‌شود.	کنترل دوگانه برای بیان پروتئین نوترکیب دارای سمیت در سلول میزبان
BL21-AI<gp2>	مشتقی از BL21-AI که در آن کنترل سیستم بیانی تنها با استفاده از یک ماده‌ی القاکننده که می‌تواند آرابینوز یا IPTG باشد، انجام می‌شود.	بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
Tuner (DE3)	ژن مربوط به لاکتوز پرمه‌آز در آن جهش داده شده و مولکولهای IPTG فقط به‌صورت وابسته به غلظت و نه به شکل انتقال فعال در باکتری‌های	القای یکنواخت بیان پروتئین نوترکیب برای کاهش سمیت آن در سلول میزبان

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

	میزبان وارد شده و عمل القا به‌صورت یکنواخت انجام می‌شود.	
BL21-Codon Plus (DE3)-RI(P)L	ژن مربوط به tRNAهای حامل کدون‌های کمیاب در باکتری، شامل اسید آمینه‌های آرژینین (AGG/AGA)، پرولین (CCC)، لوسین (CUA) و ایزولوسین (AUA) بر روی پلاسمید pRI(P)L	برطرف کردن مساله انحراف کدونی در باکتری *اشرشیاکلی* جهت افزایش بیان پروتئین نوترکیب
Rosetta (DE3)		
Rosetta 2(DE3)	در این سویه ژن‌های tRNAهای حامل کدون های اسیدآمینه‌های گلیسین (GGA)، پرولین (CCC)، آرژینین (AGG/AGA/CGG)، ایزولوسین (AUA) و لوسین (CUA) بر روی پلاسمید pRARE2 حمل می‌شود.	برطرف کردن مساله انحراف کدونی در باکتری برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب هدف
SixPack	ژن مربوط به شش tRNAی دارای فراوانی کم در یک اپرون ریبوزومی در کروموزوم اشرشیاکلی BL21 (DE3) وارد شده است.	با بیان پروتئین نوترکیب، tRNAی آن هم تامین شده و باکتری با کمبود ظرفیت بیانی مواجه نمی‌شود.
origami	ژن‌های مربوط به دو آنزیم ردوکتاز با نام‌های *trxB* و *gor* با ایجاد جهش از کار افتاده‌اند. اکسایشی شدن بیشتر محیط سیتوپلاسم می‌شود و بدین ترتیب شرایط برای تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی فراهم می‌شود.	اکسایشی شدن بیشتر محیط سیتوپلاسم و ایجاد شرایط برای تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی در سیتوپلاسم میزبان
Shuffle T7 Express	وارد کردن ژنی که مربوط به آنزیم DsbC (یک ایزومراز پیوند دی‌سولفیدی) است علاوه بر ناکار کردن ژن‌های *trxB* و *gor*	افزایش شکل‌گیری صحیح پیوندهای دی‌سولفید در سیتوپلاسم باکتری میزبان
CyDisCo	وارد کردن ژن‌های *Erv1p* مربوط به آنزیم سولفیدریل اکسیداز ساکارومیسس سرویزیه و ژن مربوط به آنزیم دی‌سولفید ایزومراز بر روی یک پلاسمید	تشکیل فعال پیوندهای صحیح دی‌سولفیدی و فولد شدن صحیح پروتئین نوترکیب و بیان بالاتر آن
Rosettagami (DE3)	مجموع ویژگی‌های سویه‌ی Rosetta و Origami	رفع مساله انحراف کدونی و تشکیل پیوند دی‌سولفید
ArcticExpress	بیان همزمان دو چاپرونین باکتری سرمادوست Oleispira antarctica به نام‌های Cpn10 و Cpn60 با پروتئین نوترکیب	انجام صحیح فرایند فولدینگ پروتئین نوترکیب
ArcticExpress (DE3)	بیان همزمان دو چاپرونین باکتری سرمادوست Oleispira antarctica به نام‌های Cpn10 و Cpn60 با پروتئین نوترکیب	سازگاری با وکتورهای بیانی تحت کنترل پروموتر T7 مانند وکتورهای pET و pCAL
TatExpress BL21	پروموتر قوی و قابل القای ptac در بالادست اپرون *tatABCD* سویه‌ی BL21 قرار داده شده است.	ترشح مقدار مناسبی از هورمون رشد (۳۰ میلی‌گرم در لیتر) در فضای پری‌پلاسمی باکتری
Marionette	ژن‌های مربوط به ۱۲ ژن تنظیمی در ژنوم باکتری‌های MG1655، DH10B و BL21 کلون شده است.	ایجاد قابلیت تولید همزمان چند پروتئین نوترکیب در یک میزبان

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]



شکل ۱ نحوه‌ی مهندسی سویه جهت تولید پروتئین نوترکیب ۱. ورود مستقیم قطعه ژنتیکی به قسمتی از کروموزوم باکتری ۲. ورود قطعه ژنتیکی به یک پلاسمید و انتقال پلاسمید حاوی ژن جدید به داخل باکتری ۳. ایجاد جهش یا حذف در ماده ژنتیکی کروموزوم باکتری

به‌طور کلی، برای بیان نحوه انجام مهند سی سویه، باید به ۳ حالت ا شاره کنیم. در حالت اول، یک قطعه خارجی در کروموزوم باکتری وارد می‌شـــود؛ اما در حالت دوم، این قطعه یا قطعات به وســـیله‌ی یک پلاســـمید خارجی وارد سلول میزبان می‌شوند. در حالت سوم، تغییر در کروموزوم باکتری به‌صـــورت حذف یا ایجاد جهش ازبین برنده یا کاهنده فعالیت ژن مورد نظر انجام می‌شـــود[۹]. این فرایندها در شکل ۱ به‌صورت شماتیک نشان داده شده‌اند.

مهمترین مشتق سویه B، *اشرشیاکلی* BL21 (DE3) است که در ســـال ۱۹۸۶ میلادی توســـط اشـــتودیر و موفات با اســـتفاده از وارد کردن ژن *RNA*پلی‌*مراز* باکتریوفاژ T7 در کروموزوم باکتری *اشرشیاکلی* به د ست آمد که علاوه بر این که تا کنون اهم یت و کاربرد خود را حفظ کرده سویه‌های متنوع دیگری نیز از آن م شتق شده‌اند. در این ســـو یه، ژن مورد نظر تحت کنترل پروموتر T7 در یک پلاســـمید بیانی قرار گرفته و با اضـــافه کردن غلظت مشـــخصـــی از مـادهی ایـزوپـروپـیـل بـتـا-د-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید که به اختصـــار به آن IPTG گفته می‌شـــود برای تولید پروتئین نوترکیب مورد نظر القا می‌شود. اضافه کردن ماده القا کننده از اواسط فاز لگاریتمی رشد تا انتهای این فاز انجام می‌شود [۱۰].

۳- مهند سی میزبان *اشرشیاکلی* برای رفع م شکل بیان پایه و سمیت پروتئین نوترکیب

ســـیســـتم‌های بیانی القایی که در آنها ژن مورد نظر تحت کنترل پروموتر T7 RNA پلی مراز بیان می شود، در محیط کشـــت‌های پیچیده به علت وجود لاکتوز در محیط، دچار بیان زودهنگام و ناخواســـته قبل از افزودن ماده القا کننده می‌شـــوند. بیان پروتئین مورد نظر قبل از افزودن ماده القا

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

کننده به‌عنوان بیان پایه شناخته می‌شود. یکی از مشکلات سویه‌ی BL21(DE3) جایگزین شدن سویه‌های ضعیف بیانی یا بدون پلاسمید در مقیاس بالای بیان در فرمانتور به‌علت وجود بیان پایه‌ی پروتئین هدف قبل از القا است که با راه حل ارائه شده از سوی خود اشتودیر با استفاده از محیط کشت خود القایی قابل حل می‌باشد [۱۱]. به علاوه، وقتی میزان زیادی از پروتئین نوترکیب توسط اشرشیاکلی در فرمانتور تولید می‌شود، میزان اسیدیته محیط کشت به علت تولید ناخواسته اسید استیک توسط باکتری بالا می‌رود. اسیدی شدن محیط کشت سبب از بین رفتن سریع‌تر باکتری‌ها و خروج آنها از مسیر بیان پروتئین نوترکیب می‌شود. یکی از کارهایی که برای برطرف نمودن این مساله انجام شده، کاهش بیان آنزیم‌های مسیر ساخت اسید استیک در اشرشیاکلی می‌باشد که با استفاده از تکنولوژی RNAی آنتی‌سنس مورد دست‌ورزی قرار گرفته است [۱۳,۱۲]. کاهش بیان آنزیم RNAپلی‌مراز T7 با استفاده از مقادیر کم لیزوزیم T7 در سویه‌ی BL21 (DE3) pLysS راه حل دیگری برای این موضوع است. این سویه دارای پلاسمید pLysS می‌باشد که ژن مقاومت به کلرامفنیکل را با خود حمل می‌کند [۱۴]. دو سویه‌ی C41(DE3) و C43(DE3) هم سویه هایی مشتق از BL21(DE3) هستند که جهش‌های تصادفی در ژن *lacI* در آنها سبب کاهش بیان RNA پلی‌مراز T7 شده و در مورد پروتئین‌های نوترکیبی که اثر سمیت بر روی سلول میزبان دارند قابل استفاده هستند. در این دو سویه می توان از وکتورهای بیانی که بر پایه‌ی اپراتور *lac* هستند و از پروموتر T7 یا *tac* برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده می‌کنند، بهره برد. به علاوه در این سویه‌ها، با استفاده از غلظت های مختلف ماده‌ی القا کننده‌ی بیان رامنوز که برخلاف ماده‌ی القا کننده‌ی IPTG، میزان ورود آن از محیط کشت به داخل سلول باکتری وابسته به غلظت[3] می‌باشد، می‌توان میزان بیان پروتئین نوترکیب را تنظیم کرد [۱۵]. این دو سویه توسط شرکت lucigen عرضه و تجاری سازی شده‌اند. با استفاده از همین استراتژی یعنی غربالگری ژنتیکی گروه دیگری در سال ۲۰۱۷ به سویه‌ای از BL21(DE3) دست یافتند که بازدهی بهتری برای بیان پروتئین‌های غشایی که اکثرا برای اشرشیاکلی سمیت ایجاد می‌کنند، از خود نشان داد. این سویه که تحت عنوان Mutant56(DE3) نامیده شد دارای یک جهش منفرد در یکی از اسیدهای آمینه ژن *RNA پلی‌مراز T7* می‌باشد که اتصال آن را به پروموتر T7 تضعیف می‌کند [۱۶].

در سال ۲۰۱۸، در آزمایشگاه دیکسون، ازدیاد و تجمع پروتئین نوترکیب ترشحی ساخته شده در داخل باکتری جهت خروج از غشای سیتوپلاسمی و ترشح به فضای پری‌پلاسمی آن، منجر به بازگشت ناخواسته‌ی پروتئین‌های جمع شده در فضای پری‌پلاسمی به داخل سیتوپلاسم می شد. به منظور جلوگیری از این مساله، در بخش غیر ترجمه شونده‌ی انتهای '5[4] ژن RNA*پلی‌مراز T7* و بالادست[5] ژن نوترکیب هدف، در پلاسمید pETORS، بخش تنظیمی ریبونوکلوئیک اسیدی با مکانیسم عمل روشن و خاموش[6] قرار داده شد. این سویه که با عنوان RiboTite نامیده شده است، دارای ویژگی بیان کنترل شده ژن نوترکیب هدف می‌باشد [۱۷].

در گزارش دیگری که در سال ۲۰۲۱ ارائه شده، با جایگزین کردن پروموتر PlacUV5 با پروموتر آرابینوز (ParaBAD) در باکتری BL21(DE3)، هم به میزان بیشتر زیست‌توده‌ی باکتری[7] و هم به مقدار بالاتر بیان پروتئین نوترکیب دست یافته شده است. این سویه‌ی دست‌ورزی شده‌ی جدید، Bl21(DE3::ara) نامیده شده است [۱۸].

کاهش بیان پروتئین هدف با قرار دادن مکانی برای اتصال lac repressor بلافاصله بعد ازپروموتر T7 و استفاده از پروموتر های قابل القای دیگر برای کنترل بیان RNA

[3] Concentration dependent
[4] Untranslated 5' region
[5] Upstream
[6] On and off
[7] Biomass

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

پلی‌مراز T7 که بیان پایه کمتری دارند مانند پروموتر pBAD از راه حل‌های دیگری هستند که برای حل این مساله وجود دارند. به‌عنوان مثال، سویه‌ی Lemo21 (DE3) که مشابه سویه‌ی BL21 (DE3) pLysS است تنها با این تفاوت که در این سویه ژن *lysY* که مسئول تولید لیزوزیم T7 می‌باشد تحت کنترل یک پروموتر قابل تنظیم به نام $rhaP_{BAD}$ قرار گرفته است. در این حالت، با افزایش قند رامنوز در محیط، میزان تولید لیزوزیم T7 بالا رفته و در نتیجه آن RNAپلی‌مراز T7 کمتری در محیط برای بیان پروتئین نوترکیب وجود خواهد داشت [۱۹]. در سویه‌ی دیگری به نام BL21-AI که توسط شرکت آمریکایی ترموفیشر ساینتیفیک[8] تجاری‌سازی شده است، قند آرابینوز پروموتر pBAD را القا کرده و با اثر بر روی پروموتر ژن آنزیم RNA پلی‌مراز T7، سبب تنظیم بیان آن می‌شود. به این ترتیب، مقدار بیان پروتین نوترکیب که به وسیله‌ی ماده‌ی IPTG القا می‌شود، برای بار دوم تنظیم می‌شود [۲۰]. با این که اطلاعات ساخت این سویه از سوی شرکت سازنده منتشر نشده است اما این سویه از باکتری اشرشیاکلی BL21 مشتق شده و انتظار می‌رود جز در ژن *araB*، در مورد لوکوس مربوط به *RNA پلی‌مراز T7* و مارکر مقاومت به تتراسایکلین بین این دو مشابهت وجود داشته باشد[۱,۲۱]. اخیرا سویه‌ی دیگری از سویه BL21-AI مشتق شده است که برای رسیدن به این هدف قادر است با مجزا سازی مسیر تولید پروتئین نوترکیب و مسیر رشد باکتری از هم، منابع غذایی را مجددا وارد چرخه‌ی مصرف کند. این کار در سال ۲۰۲۱ توسط استارگارت و همکارانش با استفاده از فناوری enGenes-X-press انجام شد و در سویه‌ی حاصل که به نام BL21-AI<gp2> نامگذاری شد، کنترل سیستم بیانی تنها با استفاده از یک ماده‌ی القاکننده که می‌تواند آرابینوز یا IPTG باشد، در سطح سلولی انجام می‌شود [۲۰].

در مورد سویه‌هایی که بیان پروتئین نوترکیب در آنها به وسیله‌ی IPTG القا می شود، شرایط متفاوت است؛ زیرا مولکول‌های IPTG به دو شکل وارد سلول می‌شوند. یکی به صورت انتقال فعال به وسیله‌ی پروتئین غشایی لاکتوز پرمه‌آز[9] و دیگری مسیرهای غیروابسته به پرمه‌آز که مساله وابستگی بیان به غلظت ماده‌ی القا کننده را در این سویه‌ها کمرنگ و بی اثر می‌کند. بنابراین، در سویه‌ای به نام Tuner (DE3) و مشتقات آن، که به وسیله شرکت نواژن[10] که در حال‌حاضر در گروه شرکت‌های چند ملیتی آلمانی مرک[11] ادغام شده، عرضه شده است؛ ژن مربوط به پروتئین لاکتوز پرمه‌آز با ایجاد جهش، غیرفعال شده و مولکول‌های IPTG فقط به‌صورت وابسته به غلظت در باکتری مذکور وارد شده و عمل القای بیان، به‌صورت یکنواخت انجام می‌شود [۲۲].

٤- سویه‌های مهندسی شده جهت رفع مشکل انحراف کدونی[12] در میزبان

برای هر اسید آمینه طبیعی چند کدون مختلف در طبیعت وجود دارد که در هر موجود زنده استفاده از یک یا دو تا از این کدون‌ها، نسبت به بقیه، دارای ارجحیت می‌باشد. از طرفی، این کدون‌های ترجیحی لزوما در میزبان انتخاب شده برای بیان پروتئین نوترکیب (در این جا باکتری *اشرشیاکلی*) با موجود اولیه و اصلی تولید کننده‌ی آن پروتئین به‌صورت طبیعی، یکسان نمی‌باشند. در حال حاضر، برای رفع این مشکل، سویه‌هایی از مهندسی *اشرشیاکلی* BL21 ساخته شده‌اند که مساله انحراف کدون را برطرف ساخته‌اند. از این جمله سویه‌های BL21-Codon Plus (DE3)-RI(P)L، Rosetta (DE3) و مشتقات آن می باشند که به ترتیب دارای پلاسمید pRI(P)L و pRARE بوده و از این طریق کپی‌های اضافی از ژن‌های tRNA های کمیاب را در سیستم بیانی BL21 ایجاد می‌کنند. در سویه‌ی BL21-Codon Plus (DE3)-RI(P)L

[8] Thermos Fisher Scientific
[9] Lactose permease
[10] Novagen
[11] Merck group
[12] Codon bias

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

ژن مربوط به tRNAهای حامل کدون های کم‌یاب در باکتری، شامل اسید آمینه‌های آرژنینین (AGG/AGA)، پرولین (CCC)، لوسین (CUA) و ایزولوسین (AUA) بر روی پلاسمید pRI(P)L حمل می‌شود. در سویه‌ی Rosetta 2(DE3) این ژن‌ها شامل tRNAهای حامل کدون های اسید آمینه‌های گلیسین (GGA)، پرولین (CCC)، آرژنینین (AGG/AGA/CGG)، ایزولوسین (AUA) و لوسین (CUA) است که بر روی پلاسمید pRARE2 حمل می‌شود [۲۳]. اخیرا لیپینزکی و همکارانش ژن مربوط به شش tRNAی دارای فراوانی کم را در یک اپرون ریبوزومی در کروموزوم *اشرشیاکلی* BL21 (DE3) وارد کردند. به این ترتیب، به موازات بیان پروتئین نوترکیب، tRNAی آن هم تامین شده و باکتری با کمبود ظرفیت بیانی مواجه نمی‌شود. این سویه که به تنهایی دارای قابلیت بیان پروتئین نوترکیب سویه‌های BL21 (DE3) و Rostta2(DE3) می‌باشد، SixPack نام گرفته و به‌صورت تجاری نیز به فروش می‌رسد [۲۴].

۵- سویه‌های مهندسی شده برای بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای پیوندهای دی‌سولفیدی

ایجاد پیوند دی‌سولفید در سیتوپلاسم سویه بیانی *اشرشیاکلی* یکی دیگر از قابلیت‌هایی است که با دست‌ورزی سویه‌های مادر ایجاد شده است تا بتوان از میزبان باکتری برای بیان پروتئین های دارای واحد های متعدد سیستئین و پیوند دی‌سولفید استفاده کرد. از جمله سویه‌های بیانی ایجاد شده به این منظور می‌توان به سویه origami و مشتقاتش، سویه‌ی Shuffle T7 Express و مشتقاتش و نیز سویه‌ی CyDisCo اشاره کرد [۲۵-۲۹]. در سویه‌های Origami و Shuffle ژن‌های مربوط به دو آنزیم ردوکتاز با نام‌های *trxB* و *gor* با ایجاد جهش از کار افتاده‌اند که این موضوع سبب اکسایشی شدن بیشتر محیط سیتوپلاسم می شود و بدین ترتیب شرایط برای تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی فراهم می‌شود. در سویه‌ی Shuffle علاوه بر ایجاد جهش در ژن‌های ذکر شده، ژن دیگری که مربوط به آنزیم *DsbC* (یک ایزومراز پیوند دی‌سولفیدی) است نیز وارد شده است که سبب افزایش شکل‌گیری صحیح پیوندهای دی سولفید می شود. اما در سویه‌ی CyDisCo بدون دستکاری آنزیم‌های مسیر احیا کننده، ژن *Erv1p* مربوط به آنزیم سولفیدریل اکسیداز مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* و ژن آنزیم دی‌سولفید ایزومراز بر روی یک پلاسمید قرار داده شده‌اند. این پلاسمید که، با همه سویه‌های *اشرشیاکلی* سازگاری دارد؛ می‌تواند به تشکیل فعال پیوندهای صحیح دی‌سولفیدی و فولد شدن درست پروتئین نوترکیب و متعاقب آن بیان بالاتر پروتئین فعال کمک کند. این سویه در دانشگاه اولو در کشور فنلاند ساخته شده و قابل خریداری می‌باشد [۲۹]. قابل ذکر است که سویه‌ای به نام Rosetta-gami (DE3) هم در حال حاضر به‌صورت تجاری توسط شرکت نواژن موجود می‌باشد که مجموع ویژگی‌های سویه‌ی Rosetta و Origami را دارد؛ به این معنی که از یک سو مساله انحراف کدونی و از سوی دیگر مشکل شکل‌گیری پیوندهای دی سولفیدی در آن به مقدار زیادی حل شده است.

٦- سویه‌های مهندسی شده جهت تولید پروتئین نوترکیب محلول

با توجه به این که بیان بالای پروتئین نوترکیب در باکتری سبب در هم پیچیدن ساختارهای ناصحیح و توده‌ای شدن آن می شود، ایجاد سویه‌های *اشرشیاکلی* با قابلیت تولید پروتئین محلول اهمیت ویژه‌ای دارد. زیرا، اجسام توده‌ای حاصل با اینکه قابل خالص‌سازی هستند اما برگرداندن ساختار صحیح به پروتئین‌هایی که فاقد ساختار سوم بوده و مانند کلاف در هم پیچیده‌اند کار آسانی نیست. به‌ویژه، رسیدن به پروتئین دارای عملکرد از گلوگاه‌های تولید پروتئین نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* است که دستیابی به آن مستلزم صرف زمان و انجام استراتژی‌های مختلف برای بازسرشت شدن درست پروتئین بیان شده می‌باشد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

یکی از راه حل‌های متداول برای حل این مساله، بیان پروتئین در دمای پایین می‌باشد که با کاهش بیان سبب ایجاد زمان بیشتر برای فولد شدن صحیح پروتئین می‌شود. اما این روش پاسخ گوی خوبی برای رفع مساله تولید پروتئین‌های واسرشته و غیرفعال در باکتری نبوده و علت آن نیز به کاهش عملکرد مولکول‌های چاپرونین[13] *اشرشیاکلی* در دماهای پایین باز می‌گردد. با توجه به نقش مهم چاپرونین‌ها در تصحیح ساختارهایی از پروتئین نوترکیب بیان شده در باکتری، که به شکل نادرست فولد شده‌اند؛ وقتی دمای بیان از ۳۰ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه‌ی عملکرد کمپلکس چاپرونینی GroEL/ES می‌باشد، به دمای ۱۲ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش پیدا می‌کند، تنها ۳۰ درصد از فعالیت چاپرونین حفظ می‌شود. در واقع پایین آوردن دما برای کاهش بیان و به دنبال آن ایجاد ساختار صحیح در پروتئین، با کاهش عملکرد چاپرونین های باکتری بی اثر می‌شود. برای حل این مساله، سویه‌ی جدیدی مهندسی شده است به نام ArcticExpress که در آن از دو چاپرونین باکتری سرمادوست *Oleispira antarctica* به نام‌های Cpn10 و Cpn60 استفاده شده است که دارای فعالیت بالا در دمای ٤ تا ۱۲ درجه سانتی گراد هستند. این دو چاپرونین که به ترتیب دارای ۷٤ و ٥٤ درصد مشابهت توالی اسیدآمینه‌ای با GroEL و GroES/ *شرشیاکلی* هستند همزمان با پروتئین نوترکیب هدف بیان شده و باعث انجام فرایند پردازش صحیح آن می‌شوند.

این سویه با وکتورهای بیانی بر اساس پروموترهای *lac*، *tac* و *trc* سازگار بوده و در صورتی که به‌صورت ArcticExpress (DE3) باشد با وکتورهای بیانی تحت کنترل پروموتر T7 مانند وکتورهای pET و pCAL برای بیان پروتئین نوترکیب به کار می‌رود که در هر دو حالت، القاگر مورد استفاده ماده‌ی IPTG می‌باشد. سویه‌ی مورد نظر به صورت سلول مستعد سازی شده توسط شرکت آمریکایی اجیلنت[14] به فروش می‌رسد [۳۱,۳۰].

TatExpress BL21 سویه‌ی دست‌ورزی شده دیگری از BL21 است که در آن پروموتر قوی و قابل القای *ptac* در بالادست اپرون *tatABCD* قرار داده شده است. نتیجه‌ی حاصل‌تر شح مقدار منا سبی از هورمون رشد (۳۰ میلی گرم در لیتر) در فضای پری‌پلاسمی باکتری مذکور بود[۳۲].

۷- سویه‌های مهندسی شده جهت تولید همزمان و قابل کنترل چند پروتئین نوترکیب

یکی از دست‌ورزی‌های انجام شده بر روی باکتری *اشرشیاکلی* ایجاد قابلیت بیان همزمان چند پروتئین نوترکیب در یک میزبان است. در این سویه که تحت عنوان Marionette نام گرفته و توسط شرکت آمریکایی ادژن[15] عرضه می‌شود، ژن‌های مربوط به ۱۲ ژن تنظیمی در ژنوم باکتری‌های MG1655، DH10B و BL21 کلون شده است که برخی به صورت تنظیم منفی ژن‌های هدف و برخی دیگر به شکل مثبت این تنظیم را انجام می‌دهند. در این سویه تا ۱۲ ژن قابل جای‌گذاری در پلاسمید بیانی خواهد بود [۳۳].

۸- جمع‌بندی

هم اکنون با سویه‌های مختلفی از باکتری *اشرشیاکلی* مهندسی شده روبرو هستیم که کار را برای تهیه پروتئین های مورد نظر به شکل نوترکیب آسان‌تر کرده‌اند. سویه‌هایی که هر کدام مشکلی را که دیگر متعلق به گذشته هستند با خود نداشته و می‌توانند حجم و تنوع بیشتری از پروتئین‌ها را برای فعالان این حوزه تولید کنند. به ویژه، با پیشرفت علوم و علاقه رو به رشد دانشمندان رشته زیست‌فناوری برای ایجاد تغییر در ساختار پروتئین‌های طبیعی و تولید پروتئین‌های جدید با فعالیت متفاوت از پروتئین اصلی؛ ایجاد این سویه‌های دست‌ورزی

[13] Chaperonins
[14] Agilent
[15] Addgene

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

شده بسیار کمک‌کننده بوده است. اما اینجا آخر راه نیست و قطعا سویه‌های جدیدتر *اشرشیاکلی* با ویژگی‌های متفاوت‌تر به این عرصه وارد خواهند شد. به علاوه، باکتری‌های دیگری ازجمله باسیلوس‌ها نیز به این زمینه از علوم در شاخه‌های مختلف از جمله زیست‌فناوری دارویی، غذایی، کشاورزی، محیط زیست و انرژی پیوسته اندکه در جای خود قابل توجه و پراهمیت بوده و افق روشنتری را ترسیم می‌کنند.

۹- منابع

[1] Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5- year update. Protein science. 2019;28(8):1412-22.

[2] Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. Rev Infect Dis. 1988 Nov-Dec;10(6):1220-5. doi: 10.1093/clinids/10.6.1220. PMID: 3060950.

[3] Sonnenborn U. Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: History of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. FEMS Microbiology Letters. 2016;363(19): fnw212. DOI: 10.1093/femsle/fnw212

[4] Studier FW, Daegelen P, Lenski RE, Maslov S, Kim JF . Understanding the Differences between Genome Sequences of Escherichia coli B Strains REL606 and BL21(DE3) and Comparison of the E. coli B and K-12 Genomes. Journal of Molecular Biology. 2009;394:653-680.

[5] Yoon SH, Han M-J, Jeong H, Lee CH, Xia X-X, Lee D-H, et al. Comparative multi-omics systems analysis of Escherichia coli strains B and K-12. Genome biology. 2012;13(5):1-13.

[6] Monk JM, Koza A, Campodonico MA, Machado D, Seoane JM, Palsson BO, et al. Multi-omics quantification of species variation of Escherichia coli links molecular features with strain phenotypes. Cell systems. 2016;3(3):238-51. e12.

[7] Castiñeiras TS, Williams SG, Hitchcock AG, Smith DG .E. coli strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. FEMS Microbiology Letters. 2018; 365(15)

[8] Mairhofer J, Krempl PM, Thallinger GG, Striedner G. Finished Genome Sequence of Escherichia coli K-12 Strain HMS174 (ATCC 47011). Genome Announcements. 2014; 2(6): e00975-14. doi:10.1128/genomeA.00975-14.

[9] Mahalik S, Sharma AK, Mukherjee KJ. Genome engineering for improved recombinant protein expression in Escherichia coli. Microbial Cell Factories. 2014;13(1):1-13.

[10] Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of molecular biology. 1986;189(1):113-30.

[11] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein expression and purification. 2005;41(1):207-34.

[12] Bakhtiari N, Mirshahi M, Babaeipour V, Maghsoudi N, Tahzibi A. Down regulation of ackA-pta pathway in Escherichia coli BL21 (DE3): a step toward optimized recombinant protein expression system. Jundishapur journal of microbiology. 2014;7.(2)

[13] Bakhtiari N, Mirshahi M, Babaeipour V, Maghsoudi N. Inhibition of ackA and pta genes using two specific antisense RNAs reduced acetate accumulation in batch fermentation of E. coli BL21 (DE3). Iranian Journal of Biotechnology. 2010;8(4):243-51.

[14] Dubendorf JW, Studier FW. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. Journal of molecular biology. 1991;219(1):45-59.

[15] Kim SK, Lee D-H, Kim OC, Kim JF, Yoon SH. Tunable control of an Escherichia coli expression system for the overproduction of membrane proteins by titrated expression of a mutant lac repressor. ACS synthetic biology. 2017;6(9):1766-73.

[16] Baumgarten T, Schlegel S, Wagner S, Löw M, Eriksson J, Bonde I, et al. Isolation and characterization of the E. coli membrane protein production strain Mutant56 (DE3) . Scientific reports. 2017;7(1):1-14.

[17] Horga LG, Halliwell S, Castiñeiras TS, Wyre C, Matos CF, Yovcheva DS, et al. Tuning recombinant protein expression to match secretion capacity. Microbial Cell Factories. 2018;17(1):1-18.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

[18] Du F, Liu Y-Q, Xu Y-S, Li Z-J, Wang Y-Z, Zhang Z-X, et al. Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. Microbial cell factories. 2021;20(1):1-10.
[19] Wagner S, Klepsch MM, Schlegel S, Appel A ,Draheim R, Tarry M, et al. Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(38):14371-6.
[20] Stargardt P, Striedner G, Mairhofer J. Tunable expression rate control of a growth-decoupled T7 expression system by L-arabinose only. Microbial cell factories. 2021;20(1):1-17.
[21] Bhawsinghka N, Glenn KF, Schaaper RM. Complete genome sequence of Escherichia coli BL21-AI. Microbiology Resource Announcements. 2020;9(10):e00009-20.
[22] Khlebnikov A, Keasling JD. Effect of lacYExpression on Homogeneity of Induction from the Ptac and Ptrc Promoters by Natural and Synthetic Inducers. Biotechnology progress. 2002;18(3):672-4.
[23] Novy R. Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression. Innovations. 2001;12:1-3.
[24] Lipinszki Z, Vernyik V, Farago N, Sari T, Puskas LG, Blattner FR, et al. Enhancing the translational capacity of E. coli by resolving the codon bias. ACS synthetic biology. 2018;7(11):2656-64.
[25] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in microbiology. 2014;5:172.
[26] Hatahet F, Nguyen VD, Salo KE, Ruddock LW. Disruption of reducing pathways is not essential for efficient disulfide bond formation in the cytoplasm of E. coli. Microbial cell factories. 2010;9(1):1-9.
[27] Nguyen VD, Hatahet F, Salo KE, Enlund E, Zhang C, Ruddock LW. Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of E. coli. Microbial cell factories. 2011;10(1):1-13.
[28] Ruddock LO, FI), inventor; University of Oulu (Oulu, FI), assignee. Method for producing natively folded proteins in a prokaryotic host. 2016.
[29] Ruddock L. CyDisCo - Tool for producing disulphide bonded proteins in bacteria. Finland: University of Oulu; 2016.
[30] Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Chaperonins govern growth of Escherichia coli at low temperatures. Nature biotechnology. 2003.7-1266:(11)21;
[31] Ferrer M, Lünsdorf H, Chernikova TN, Yakimov M, Timmis KN, Golyshin PN. Functional consequences of single: double ring transitions in chaperonins: life in the cold. Molecular microbiology. 2004;53(1):167-82.
[32] Browning DF, Richards KL, Peswani AR, Roobol J, Busby SJ, Robinson C. Escherichia coli "TatExpress" strains super- secrete human growth hormone into the bacterial periplasm by the Tat pathway. Biotechnology and bioengineering. 2017;114(12):2828-36.
[33] Meyer AJ, Segall-Shapiro TH, Glassey E, Zhang J, Voigt CA. Escherichia coli "Marionette" strains with 12 highly optimized small-molecule sensors. Nature chemical biology. 2019;15(2):196-204.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-12-26]

Escherichia Coli: the most useful host for production of recombinant proteins

Nahid Bakhtiari[1*], Mohsen Vaez[1]

1- Assistant professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

nbakhtiari@irost.org

Receipt: 2022/08/23 Accepted: 2023/03/16

Abstract

One of the most important hosts used for production of recombinant proteins is *Escherichia Coli*. For example, the most therapeutic proteins approved by FDA are produced in *Escherichia Coli*. Comprehensive knowledge about biologic nature of *Escherichia Coli* had made this microorganism to a favorable factory for production of recombinant proteins. Accessibility of this information have led to rational manipulation for changing of this small factory to intelligent system can make different recombinant proteins easier. So that, many engineered and useful strains were obtained from wild type and parental strains can produce high amount of diverse and stable recombinant proteins in lab and industrial scale. In this review, we will present some of these strains that are more widely used.

Keywords: *Escherichia Coli*, recombinant protein, host