

اشرشیاکلی: پرکاربردترین میزبان تولید پروتئین‌های نو ترکیب

ناهید بختیاری^{۱*}، محسن واعظ^۱

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

*صندوق پستی ۱۱۱-۳۳۵۳۵، تهران، ایران

nbakhtiari@irost.org

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶

دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱

چکیده

باکتری اشرشیاکلی یکی از مهمترین میزبان‌های مورد استفاده برای تولید پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب، میزبان

۱-مقدمه

پروتئین‌ها به دلیل نقش ساختاری و عملکردی خود در سلول، از ماکرومولکول‌های دارای اهمیت ویژه به حساب می‌آیند. به علاوه، برای انجام مطالعات جامع مربوط به شناسایی ساختار، اندرکنش‌ها و عملکرد^۱ پروتئین‌ها و کاربرد آنها در صنایع مختلف دارویی و زیست‌فناوری به مقادیر کافی از پروتئین مورد نظر نیاز است. دستیابی به این هدف به دو صورت امکان‌پذیر است. اول این که پروتئین مورد نظر را از منبع اصلی آن جدا سازی کنیم که معمولاً در این روش مقادیر کافی از آن پروتئین قابل دستیابی نخواهد بود. راه دوم و به صرفه تر، بیان بالای^۲ پروتئین مورد نظر به صورت نوترکیب در سیستم‌های بیانی موجود می‌باشد. به علاوه، با توجه به این که در حال حاضر بسیاری از پروتئین‌های مورد استفاده در صنایع دارویی و زیست‌فناوری انواع دست ورزی شده از پروتئین اصلی هستند، استخراج آنها از منبع اصلی امکان‌پذیر نیست [۱].

در میان میزبان‌های مختلفی که برای تولید پروتئین نوترکیب موجود هستند باکتری /شرشیاکلی به دلیل مزایای خاصی که دارد اغلب اوقات انتخاب اول است و با این که برخی محدودیت‌ها در استفاده از این میزبان برای تولید انواع خاصی از پروتئین‌ها وجود دارد؛ مزایای غیرقابل انکار آن از جمله تولید بالای محصول، ارزان بودن و سادگی انجام دست‌ورزی این سیستم بیانی سبب ایجاد سویه‌ها و پلاسمیدهای متنوع مهندسی شده برای کاربردهای مختلف در طول تاریخ تولید پروتئین‌های نوترکیب شده است [۱]. در واقع، پس از کشف باکتری /شرشیاکلی توسط تئودور اشریچ میکروبیولوژیست و پزشک متخصص اطفال آلمانی در سال ۱۸۸۴، امروزه سویه *E. coli* Nissle 1917 اغلب به عنوان یک سویه مرجع یا میکروارگانیسم مدل در مطالعات زیست پزشکی تجربی، از جمله دستکاری‌های نوترکیب سویه به منظور

ساخت مشتقاتی از سویه‌هایی با ویژگی‌های جدید استفاده می‌شود [۲،۳].

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

۲- مر سوم‌ترین سویه‌های بیانی / شرشیاکلی: انواع و کاربردها

گونه‌هایی از باکتری /شرشیاکلی که در حال حاضر در تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرند از دو سویه اصلی B و K-12 مشتق می‌شوند. علیرغم نزدیکی این دو گونه، تفاوت‌های مشخصی در تولید پروتئین نوترکیب بین آنها دیده می‌شود [۴].

در سال ۲۰۱۲ مطالعات جامع و مقایسه‌های کاملی توسط سونگ هو یون و همکارانش در سطح ژنوم تا پروتئوم و به دنبال آن انجام شبیه‌سازی رایانه‌ای برای شناخت متابولومیکس این دو گونه صورت 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 پروتئاز کمیتر که سبب حفظ پروتئین‌های ساخته شده به صورت نوترکیب از اثر هیدرولیتیک آنها می‌شود، اشاره نمود. به علاوه، عدم وجود فلاژل در باکتری / شرشیاکلی سویه B و احتمال کمتر خروج پلاسمید حاوی ژن نوترکیب نیز می‌تواند دلیل ایجاد این اختلاف شود. از طرفی، سویه B دارای یک سیستم ترشحی نوع دو اضافی نسبت به سویه K بوده و ساختار غشا و دیواره آن برای ترشح راحت تر پروتئین نوترکیب بیان شده مناسب‌تر است. در مقابل، در سویه‌ی K ژن‌های مربوط به شوک حرارتی بیان بیشتری نسبت به سویه‌ی B داشته و این موضوع آن را نسبت به برخی شرایط استرس‌زای محیطی مقاوم‌تر کرده است [۵].

² Over-expression

¹ Proteomics

اشرشیاکلی: پرکاربردترین میزبان ...

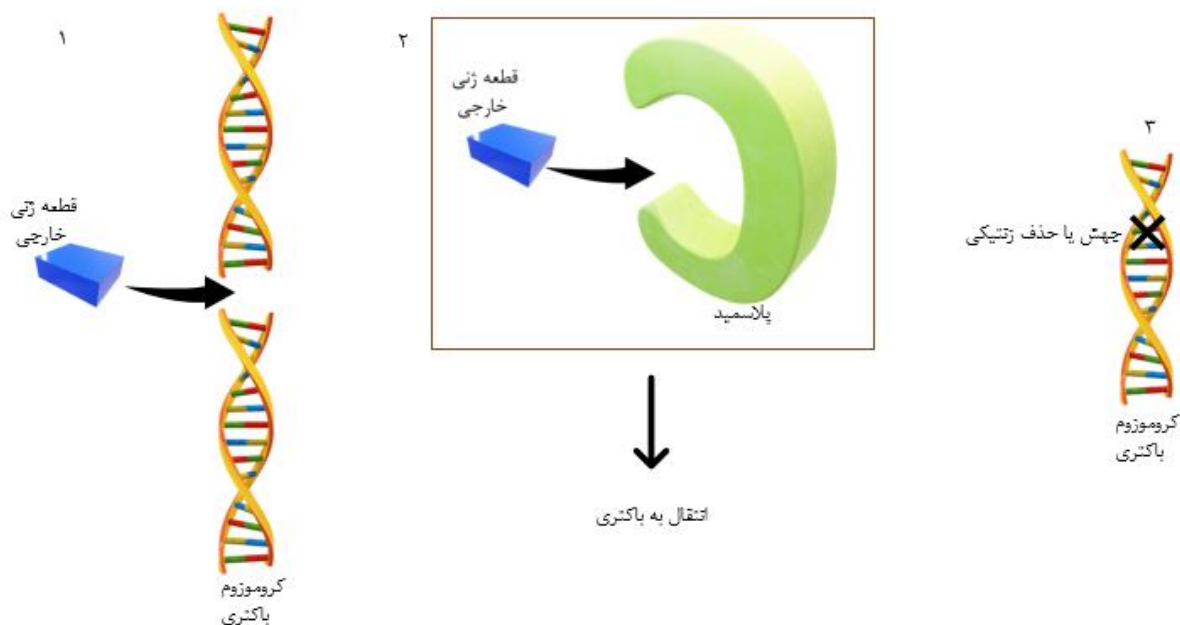
پرکاربردترین سویه‌های مشتق از اشرشیاکلی K-12 شامل HMS174, MG1655, RV308, DH1, W3110, DH5 α و JM109 هستند [۶-۸]؛ ولی در مورد اشرشیاکلی B سویه‌های مهندسی شده بیشتری وجود دارد که هر یک به منظور خاصی مورد دست‌ورزی قرار گرفته و اطلاعات آن به صورت خلاصه در جدول ۱ جمع‌آوری شده است.

گونه‌هایی که از این دو سویه مشتق شده‌اند، در واقع نتیجه‌ی ایجاد جهش‌های متفاوت مشخصی هستند. به عبارت دیگر، با اعمال تغییرات ژنی هدف‌دار یا تصادفی در ژنوم اولیه باکتری‌های اشرشیاکلی B و K و سپس غربالگری گونه‌های جدید ایجاد شده، به انواع کاربردی‌تری از این باکتری‌ها در حوزه‌ی تولید پروتئین نوترکیب دست یافته شده است [۱].

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

نام سویه	دست‌ورزی انجام شده	کاربرد
BL21(DE3)	وارد کردن ژن <i>rRNA</i> پلی‌مراز باکتریوفاژ T7 در کروموزوم باکتری اشرشیاکلی	بیان بالای پروتئین نوترکیب به علت قوی بودن پروموتور <i>rRNA</i> پلی‌مراز T7
BL21 (DE3) pLysS	ایجاد مقادیر کم لیزوزیم T7 برای کاهش <i>rRNA</i> پلی‌مراز T7 توسط پلاسمید pLysS	بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
C41(DE3)	ایجاد جهش‌های تصادفی در ژن <i>lacI</i> در باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) که سبب کاهش بیان <i>rRNA</i> پلی‌مراز T7 شده	بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
C43(DE3)	ایجاد جهش‌های تصادفی در ژن <i>lacI</i> در باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) که سبب کاهش بیان <i>rRNA</i> پلی‌مراز T7 شده	بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
Mutant56(DE3)	تغییر در در یکی از اسیدهای آمینه ژن <i>rRNA</i> پلی‌مراز T7	کاهش اتصال آنزیم <i>rRNA</i> پلی‌مراز به پروموتور T7 و کاهش بیان پروتئین نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
RiboTite	قرار دادن توالی ریبونوکلوئیک اسیدی تنظیم شونده در بخش غیر ترجمه شونده انتهای ژن <i>rRNA</i> پلی‌مراز T7 و بالادست ژن نوترکیب هدف	کنترل بیان پروتئین هدف به منظور افزایش ترشح آن در فضای پری‌پلاسمی میزبان
BL21(DE3::ara)	جایگزینی پروموتور PlacUV5 در سویه‌ی BL21(DE3) با پروموتور آرابینوز (<i>ParaBAD</i>)	افزایش زیست‌توده و مقدار پروتئین نوترکیب بیان شده
Lemo21 (DE3)	ژن <i>lysY</i> که مسئول تولید لیزوزیم T7 می‌باشد تحت کنترل یک پروموتور قابل تنظیم به نام <i>rhaPBAD</i> قرار گرفته است.	بیان کنترل شده‌ی پروتئین‌های نوترکیب دارای سمیت برای میزبان
BL21-AI	تنظیم ثانویه القای بیان با IPTG به وسیله‌ی پروموتور <i>pBAD</i> تحت القای قند آرابینوز با اثر بر روی پروموتور ژن آنزیم <i>rRNA</i> پلی‌مراز 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 به صورت وابسته به غلظت و نه به شکل انتقال فعال در باکتری‌های	القای یکنواخت بیان پروتئین نوترکیب برای کاهش سمیت آن در سلول میزبان

	میزبان وارد شده و عمل القا به صورت یکنواخت انجام می شود.	
برطرف کردن مساله انحراف کدوننی در باکتری اشرشیاکلی جهت افزایش بیان پروتئین نوترکیب	ژن مربوط به tRNAهای حامل کدونهای کمیاب در باکتری، شامل اسید آمینه های آرژینین (AGG/AGA)، پرولین (CCC)، لوسین (CUA) و ایزولوسین (AUA) بر روی پلاسمید pRI(P)L	BL21-Codon Plus (DE3)-RI(P)L
		Rosetta (DE3)
برطرف کردن مساله انحراف کدوننی در باکتری برای افزایش بیان پروتئین نوترکیب هدف	در این سویه ژن های tRNAهای حامل کدون های اسید آمینه های گلیسین (GGA)، پرولین (CCC)، آرژینین (AGG/AGA/CGG)، ایزولوسین (AUA) و لوسین (CUA) بر روی پلاسمید pRARE2 حمل می شود.	Rosetta 2(DE3)
با بیان پروتئین نوترکیب، tRNA آن هم تامین شده و باکتری با کمبود ظرفیت بیانی مواجه نمی شود.	ژن مربوط به شش tRNAی دارای فراوانی کم در یک اپرون ریبوزومی در کروموزوم اشرشیاکلی BL21 (DE3) وارد شده است.	SixPack
اکسایشی شدن بیشتر محیط سیتوپلاسم و ایجاد شرایط برای تشکیل پیوندهای دی سولفیدی در سیتوپلاسم میزبان	ژن های مربوط به دو آنزیم ردوکتاز با نام های <i>trxB</i> و <i>gor</i> با ایجاد جهش از کار افتاده اند. اکسایشی شدن بیشتر محیط سیتوپلاسم می شود و بدین ترتیب شرایط برای تشکیل پیوندهای دی سولفیدی فراهم می شود.	origami
افزایش شکل گیری صحیح پیوندهای دی سولفیدی در سیتوپلاسم باکتری میزبان	وارد کردن ژنی که مربوط به آنزیم DsbC (یک ایزومراز پیوند دی سولفیدی) است علاوه بر ناکار کردن ژن های <i>gor</i> و <i>trxB</i>	Shuffle T7 Express
تشکیل فعال پیوندهای صحیح دی سولفیدی و فولد شدن صحیح پروتئین نوترکیب و بیان بالاتر آن	وارد کردن ژن های <i>ErviP</i> مربوط به آنزیم سولفیدریل اکسیداز ساکارومیسس سرویزیه و ژن مربوط به آنزیم دی سولفید ایزومراز بر روی یک پلاسمید	CyDisCo
رفع مساله انحراف کدوننی و تشکیل پیوند دی سولفیدی	مجموع ویژگی های سویه های Rosetta و Origami	RosettaGami (DE3)
انجام صحیح فرایند فولدینگ پروتئین نوترکیب	بیان همزمان دو چاپرونین باکتری سرمدوست <i>Oleispira antarctica</i> به نام های Cpn10 و Cpn60 با پروتئین نوترکیب	ArcticExpress
سازگاری با وکتورهای بیانی تحت کنترل پروموتور T7 مانند pCAL و pET	بیان همزمان دو چاپرونین باکتری سرمدوست <i>Oleispira antarctica</i> به نام های Cpn10 و Cpn60 با پروتئین نوترکیب	ArcticExpress (DE3)
ترشح مقدار مناسبی از هورمون رشد (۳۰ میلی گرم در لیتر) در فضای پری پلاسمی باکتری	پروموتور قوی و قابل القای ptac در بالادست اپرون <i>tatABC</i> سویه BL21 قرار داده شده است.	TatExpress BL21
ایجاد قابلیت تولید همزمان چند پروتئین نوترکیب در یک میزبان	ژن های مربوط به ۱۲ ژن تنظیمی در ژنوم باکتری های DH10B, MG1655 و BL21 کلون شده است.	Marionette



شکل ۱ نحوه‌ی مهندسی سویه جهت تولید پروتئین نو ترکیب 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

سویه، ژن مورد نظر تحت کنترل پروموتور T7 در یک پلاسمید بیانی قرار گرفته و با اضافه کردن غلظت مشخصی از ماده‌ی ایزوپروپیل بتا-د-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید که به اختصار به آن IPTG گفته می‌شود برای تولید پروتئین نو ترکیب مورد نظر القا می‌شود. اضافه کردن ماده القا کننده از اواسط فاز لگاریتمی رشد تا انتهای این فاز انجام می‌شود [۱۰].

۳- مهندسی میزبان / اشرشیاکلی برای رفع مشکل بیان پایه و سمیت پروتئین نو ترکیب

سیستم‌های بیانی القایی که در آنها ژن مورد نظر تحت کنترل پروموتور T7 RNA پلی مرز باکتریوفاژ T7 در محیط کشت‌های پیچیده به علت وجود لاکتوز در محیط، دچار بیان زودهنگام و ناخواسته قبل از افزودن ماده القا کننده می‌شوند. بیان پروتئین مورد نظر قبل از افزودن ماده القا

به‌طور کلی، برای بیان نحوه انجام مهندسی سویه، باید به حالت ۳ اشاره کنیم. در حالت اول، یک قطعه خارجی در کروموزوم باکتری وارد می‌شود؛ اما در حالت دوم، این قطعه یا قطعات به وسیله‌ی یک پلاسمید خارجی وارد سلول میزبان می‌شوند. در حالت سوم، تغییر در کروموزوم باکتری به‌صورت حذف یا ایجاد جهش از بین برنده یا کاهش‌دهنده فعالیت ژن مورد نظر انجام می‌شود [۹]. این فرایندها در شکل ۱ به‌صورت شماتیک نشان داده شده‌اند.

مهمترین مشتق سویه B، اشرشیاکلی BL21 (DE3) است که در سال ۱۹۸۶ میلادی توسط اشتودیر و موفات با استفاده از وارد کردن ژن RNA پلی مرز باکتریوفاژ T7 در کروموزوم باکتری / اشرشیاکلی به دست آمد که علاوه بر این که تا کنون اهمیت و کاربرد خود را حفظ کرده سویه‌های متنوع دیگری نیز از آن مشتق شده‌اند. در این

می باشد، می توان میزان بیان پروتئین نوترکیب را تنظیم کرد [۱۵]. این دو سویه توسط شرکت lucigen عرضه و تجاری سازی شده اند. با استفاده از همین استراتژی یعنی غربالگری ژنتیکی گروه دیگری در سال ۲۰۱۷ به سویه ای از BL21(DE3) دست یافتند که بازدهی بهتری برای بیان پروتئین های غشایی که اکثرا برای اشرشیاکلی سمیت ایجاد می کنند، از خود نشان داد. این سویه که تحت عنوان Mutant56(DE3) نامیده شد دارای یک جهش منفرد در یکی از اسیدهای آمینه ژن *RNA پلی مرز T7* می باشد که اتصال آن را به پروموتور T7 تضعیف می کند [۱۶].

در سال ۲۰۱۸، در آزمایشگاه دیکسون، ازدیاد و تجمع پروتئین نوترکیب تر شحی ساخته شده در داخل باکتری جهت خروج از غشای سیتوپلاسمی و ترشح به فضای پری پلاسمی آن، منجر به بازگشت ناخواسته ی پروتئین های جمع شده در فضای پری پلاسمی به داخل سیتوپلاسم می شد. به منظور جلوگیری از این مساله، در بخش غیر ترجمه شونده ی انتهای^۴ ژن *RNA پلی مرز T7* و بالادست^۵ ژن نوترکیب هدف، در پلاسمید pETORS، بخش تنظیمی ریونوکلوئیک اسیدی با مکانیسم عمل روشن و خاموش^۶ قرار داده شد. این سویه که با عنوان RiboTite نامیده شده است، دارای ویژگی بیان کنترل شده ژن نوترکیب هدف می باشد [۱۷].

در گزارش دیگری که در سال ۲۰۲۱ ارائه شده، با جایگزین کردن پروموتور PlacUV5 با پروموتور آرابینوز (ParaBAD) در باکتری BL21(DE3)، هم به میزان بیشتر زیست توده ی باکتری^۷ و هم به مقدار بالاتر بیان پروتئین نوترکیب دست یافته شده است. این سویه ی دست ورزی شده ی جدید، BI21(DE3::ara) نامیده شده است [۱۸].

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

کننده به عنوان بیان پایه شناخته می شود. یکی از مشکلات سویه ی BL21(DE3) جایگزین شدن سویه های ضعیف بیانی یا بدون پلاسمید در مقیاس بالای بیان در فرمانتور به علت وجود بیان پایه ی 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 می باشد [۱۱]. به علاوه، وقتی میزان زیدی از پروتئین نوترکیب توسط اشرشیاکلی در فرمانتور تولید می شود، میزان اسیدیته محیط کشت به علت تولید ناخواسته اسید استیک توسط باکتری بالا می رود. اسیدی شدن محیط کشت سبب از بین رفتن سریع تر باکتری ها و خروج آنها از مسیر بیان پروتئین نوترکیب می شود. یکی از کارهایی که برای برطرف نمودن این مساله انجام شده، کاهش بیان آنزیم های مسیر ساخت اسید استیک در اشرشیاکلی می باشد که با استفاده از تکنولوژی RNA آنتی سنس مورد دست ورزی قرار گرفته است [۱۲، ۱۳]. کاهش بیان آنزیم *RNA پلی مرز T7* با استفاده از مقادیر کم لیزوزیم T7 در سویه ی BL21 pLysS (DE3) راه حل دیگری برای این موضوع است. این سویه دارای پلاسمید pLysS می باشد که ژن مقاومت به کلرامفنیکل را با خود حمل می کند [۱۴]. دو سویه ی C41(DE3) و C43(DE3) هم سویه هایی مشتق از BL21(DE3) هستند که جهش های تصادفی در ژن *lacI* در آنها سبب کاهش بیان RNA پلی مرز T7 شده و در مورد پروتئین های نوترکیبی که اثر سمیت بر روی سلول میزبان دارند قابل استفاده هستند. در این دو سویه می توان از وکتورهای بیانی که بر پایه ی اپراتور *lac* هستند و از پروموتور T7 یا *tac* برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده می کنند، بهره برد. به علاوه در این سویه ها، با استفاده از غلظت های مختلف ماده ی القا کننده ی بیان رامنوز که برخلاف ماده ی القا کننده ی IPTG، میزان ورود آن از محیط کشت به داخل سلول باکتری وابسته به غلظت^۳

^۶ On and off

^۷ Biomass

^۳ Concentration dependent

^۴ Untranslated 5' region

^۵ Upstream

در مورد سویه‌هایی که بیان پروتئین نوترکیب در آنها به وسیله IPTG القا می‌شود، شرایط متفاوت است؛ زیرا مولکول‌های IPTG به دو شکل وارد سلول می‌شوند. یکی به صورت انتقال فعال به وسیله پروتئین غشایی لاکتوز پرمه‌آز^۹ و دیگری مسیرهای غیروابسته به پرمه‌آز که مساله وابستگی بیان به غلظت ماده‌ی القاکننده را در این سویه‌ها کم‌رنگ و بی‌اثر می‌کند. بنابراین، در سویه‌ای به نام Tuner (DE3) و مشتقات آن، که به وسیله شرکت نواژن^{۱۰} که در حال حاضر در گروه شرکت‌های چندملیتی آلمانی مرک^{۱۱} ادغام شده، عرضه شده است؛ ژن مربوط به پروتئین لاکتوز پرمه‌آز با ایجاد جهش، غیرفعال شده و مولکول‌های IPTG فقط به صورت وابسته به غلظت در باکتری مذکور وارد شده و عمل القای بیان، به صورت یکنواخت انجام می‌شود [۲۲].

۴- سویه‌های مهندسی شده جهت رفع مشکل انحراف کدونی^{۱۲} 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 لزوماً در میزبان انتخاب شده برای بیان پروتئین نوترکیب (در این جا باکتری اشرشیاکلی) با موجود اولیه و اصلی تولیدکننده آن پروتئین به صورت 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 می‌باشند 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

پلی‌مراز T7 که بیان پایه کمتری دارند مانند پروموتور pBAD از راه حل‌های دیگری هستند که برای حل این مساله وجود دارند. به‌عنوان مثال، سویه‌ی Lemo21 (DE3) که مشابه سویه‌ی pLysS (DE3) BL21 است تنها با این تفاوت که در این سویه ژن *lysY* که مسئول تولید لیزوزیم T7 می‌باشد تحت کنترل یک پروموتور 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 RNA پلی‌مراز 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^۸ تجاری‌سازی شده است، قند آرابینوز پروموتور pBAD ر القا کرده و با اثر بر روی پروموتور ژن آنزیم RNA پلی‌مراز T7، سبب تنظیم بیان آن می‌شود. به این ترتیب، مقدار بیان پروتئین نوترکیب که به وسیله 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]. اخیراً 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 مجدداً 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].

¹¹ Merck group

¹² Codon bias

⁸ Thermo Fisher Scientific

⁹ Lactose permease

¹⁰ Novagen

دیگری که مربوط به آنزیم *DsbC* (یک ایزومراز پیوند دی سولفیدی) است نیز وارد شده است که سبب افزایش شکل‌گیری صحیح پیوندهای دی سولفید می‌شود. اما در سویه‌ی CyDisCo بدون دستکاری آنزیم‌های مسیر احیا کننده، ژن *ErvIp* مربوط به آنزیم سولفیدریل اکسیداز مخمر ساکارومیسس سرویزیه و ژن آنزیم دی سولفید ایزومراز بر روی یک پلاسمید قرار داده شده‌اند. این پلاسمید که، با همه سویه‌های /شرشیاکلی سازگاری دارد؛ می‌تواند به تشکیل فعال پیوندهای صحیح دی سولفیدی 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 به صورت 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.

۶- 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 می‌شود، ایجاد سویه‌های /شرشیاکلی 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 /شرشیاکلی است که دستیابی به آن مستلزم صرف زمان و انجام استراتژی‌های مختلف برای بازسرشت شدن درست پروتئین بیان شده می‌باشد.

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 حمل می‌شود. در سویه‌ی Rosetta 2 (DE3) این ژن‌ها شامل tRNAهای حامل کدون‌های اسید آمینه‌های گلیسین (GGA)، پرولین (CCC)، آرژینین (AGG/AGA/CGG)، ایزولوسین (AUA) و لوسین (CUA) است که بر روی پلاسمید pRARE2 حمل می‌شود [۲۳]. اخیراً لیپینزکی و همکارانش ژن مربوط به شش tRNA دارای فراوانی کم را در یک اپرون ریپوزومی در کروموزوم /شرشیاکلی BL21 (DE3) وارد کرد. 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 به صورت تجاری نیز به فروش می‌رسد [۲۴].

۵- سویه‌های مهندسی شده برای بیان پروتئین‌های

نوترکیب دارای پیوندهای دی سولفیدی

ایجاد پیوند دی سولفید در سیتوپلاسم سویه بیانی /شرشیاکلی یکی دیگر از قابلیت‌هایی است که با دست‌ورزی سویه‌های مادر ایجاد شده است تا بتوان از میزان باکتری برای بیان پروتئین‌های دارای واحدهای متعدد سیستئین و پیوند دی سولفید 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 *gor* و *trxB* با ایجاد جهش از کار افتاده‌اند که این موضوع سبب اکسایشی شدن بیشتر محیط سیتوپلاسم می‌شود و بدین ترتیب شرایط برای تشکیل پیوندهای دی سولفیدی فراهم می‌شود. در سویه‌ی Shuffle علاوه بر ایجاد جهش در ژن‌های ذکر شده، ژن

نظر به صورت سلول مستعد سازی شده توسط شرکت آمریکایی اجیلنت^{۱۴} به فروش می‌رسد [۳۱,۳۰].
TatExpress BL21 سویه‌ی دست‌ورزی شده دیگری از BL21 است که در آن پروموتور قوی و قابل القای *ptac* در بالادست اپرون *tatABCD* قرار داده شده است. نتیجه‌ی حاصل ترشح مقدار مناسبی 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 نو ترکیب

یکی از دست‌ورزی‌های انجام شده بر روی باکتری اشرشیاکلی ایجاد قابلیت بیان همزمان چند پروتئین نو ترکیب در یک میزبان است. در این سویه که تحت عنوان *Marionette* نام گرفته و توسط شرکت آمریکایی ادژن^{۱۵} عرضه می‌شود، ژن‌های مربوط به ۱۲ ژن تنظیمی در ژنوم باکتری‌های *DH10B*، *MG1655* 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 پلاسמיד بیانی خواهد بود [۳۳].

۸- جمع‌بندی

هم اکنون با سویه‌های مختلفی از باکتری اشرشیاکلی مهندسی شده روبرو هستیم که کار را برای تهیه پروتئین‌های مورد نظر به شکل نو ترکیب 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

یکی از راه‌حل‌های متداول برای حل این مسأله، بیان پروتئین در دمای پایین می‌باشد که با کاهش بیان سبب ایجاد زمان بیشتر برای فولد شدن صحیح پروتئین می‌شود. اما این روش پاسخ‌گوی خوبی برای رفع مسأله تولید پروتئین‌های واسرشته و غیرفعال در باکتری نبوده و علت آن نیز به کاهش عملکرد مولکول‌های چاپرونین^{۱۳} اشرشیاکلی در دماهای پایین باز می‌گردد. با توجه به نقش مهم چاپرونین‌ها در تصحیح ساختارهایی از پروتئین نو ترکیب 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 چاپرونین‌های باکتری بی‌اثر می‌شود. برای حل این مسأله، 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 ۴ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد هستند. این دو چاپرونین که به ترتیب دارای ۷۴ و ۵۴ درصد مشابهت توالی اسید آمینه‌ای با *GroEL* و *GroES* اشرشیاکلی هستند همزمان با پروتئین نو ترکیب هدف بیان شده و باعث انجام فرایند پردازش صحیح آن می‌شوند.

این سویه با وکتورهای بیانی بر اساس پروموتورهای *lac*، *tac* و *trc* سازگار بوده و در صورتی که به صورت *ArcticExpress (DE3)* باشد با وکتورهای بیانی تحت کنترل پروموتور *T7* مانند وکتورهای *pET* و *pCAL* برای بیان پروتئین نو ترکیب به کار می‌رود که در هر دو حالت، القاگر مورد استفاده ماده‌ی *IPTG* می‌باشد. سویه‌ی مورد

¹⁵ Addgene

¹³ Chaperonins

¹⁴ Agilent

[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.

شده بسیار کمک کننده بوده است. اما اینجا آخر راه نیست و قطعاً سویه‌های جدیدتر *اشرشیاکلی* با ویژگی‌های متفاوت‌تر به این عرصه وارد خواهند شد. به علاوه، باکتری‌های دیگری از جمله *باسیلوس*‌ها نیز به این زمینه از علوم در شاخه‌های مختلف از جمله زیست‌فناوری دارویی، غذایی، کشاورزی، محیط زیست و انرژی پیوسته اند که 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)

- 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.
- [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 lacY Expression 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

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

Nahid Bakhtiari^{1*}, Mohsen Vaez¹

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