



Biological Journal of Microorganism
Year 11, No.43, Autumn 2022
Received: 2021-10-11
Accepted: 2021-11-30

(Research Paper)

Production of Recombinant Polyepitopic HPV16-E6 Antigen: the Effects of various Strains and Expression Conditions

Bahareh Bahmani

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, bahareh.bahmani3456@gmail.com

Zahra Aminibayat*

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, amini-bayat@irost.org

Mohammad Mehdi Ranjbar

Department of Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute (AREEO), Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran, mm.ranjbar.phd@gmail.com

Nahid Bakhtiari

Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, nahidbakhtiari@yahoo.com

Amir-Hassan Zarnani

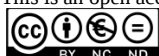
Department of Immunology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran/ Reproductive Immunology Research Center, Avicenna Research Institute (ACECR), Tehran, Iran, zarnania@gmail.com

Abstract

Introduction: Cervical cancer is the leading cause of morbidity and cancer mortality in women throughout the world and persistent infection with human papillomavirus (HPV) is the main etiology for the development of this cancer. Peptide vaccines derived from E6 and E7 oncogenes are promising candidates for HPV vaccine production due to their safety, high stability, and ease of production. In the current study, expression strains such as *Escherichia coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3)-AI, Rosetta, C41 (DE3), and BL21 (DE3)-pLysS were applied for poly epitopic E6 expression and the effects of temperature, induction time, and inducer concentration on the expression level of recombinant HPV16-E6 polypeptide protein were examined in the mentioned strains.

*Corresponding Author

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



10.22108/BJM.2021.130943.1420



20.1001.1.23225173.1401.11.43.4.5

Materials and Methods: In the present study, the optimized gene of E6 recombinant protein was cloned into pET28a vector under the control of T7 promoter and the resulting plasmid was successfully transformed into *Escherichia coli* strains BL21 (DE3), BL21 (DE3)-AI, Rosetta, C41 (DE3), and BL21 (DE3)-pLysS. Then, the ability of these strains to express the desired recombinant protein in different conditions was compared. Two temperatures of 25 ° C and 37 ° C, IPTG concentrations between 0.1 and 1.0 mM, and different incubation times were selected to examine the expression level of recombinant E6 protein in these strains.

Results: The highest level of expression was obtained in *Escherichia coli* BL21 (DE3) -AI strain inducing at Optical Density (OD) of 0.9, 0.1 mM IPTG, and 16 hours induction at 25 °C.

Discussion and Conclusion: The results of this study can be used to produce E6 protein as a vaccine candidate in the treatment of HPV-related cancers.

Key words: *Escherichia coli*, Recombinant Protein, HPV16-E6 Protein, Expression Optimization



فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال یازدهم، شماره ۴۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحه ۳۱-۴۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۹

مقاله پژوهشی

تولید آنتی‌ژن پلی‌ای‌توپی نو ترکیب HPV16-E6: بررسی اثر سویه‌ها و شرایط محیطی متفاوت

- بهاره بهمنی:** دانشجوی دکتری زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، bahareh.bahmani3456@gmail.com
- زهرا امینی بیات*:** استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی و دارویی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، amini-bayat@irost.org
- محمد مهدی رنجبر:** استادیار گروه ویروس‌شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی (AREEO)، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج، تهران، ایران، mm.ranjbar.phd@gmail.com
- ناهید بختیاری:** استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی و دارویی، پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، nahidbakhtiary@yahoo.com
- امیرحسین زرنانی:** استاد گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران - مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولیدمثل، موسسه تحقیقاتی ابن‌سینا (ACECR)، تهران، ایران، zamania@gmail.com

چکیده

مقدمه: سرطان دهانه رحم با حدود ۵۲۸۰۰۰ مورد بیمار و ۲۶۶۰۰۰ مرگ در سال، یکی از سرطان‌های رایج در بین زنان جهان به شمار می‌رود و عفونت پایدار با ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV) عامل اصلی آن است. واکسن‌های مبتنی بر پپتید مشتق شده از دو پروتئین انکوژن E6 و E7 به علت ایمنی و پایداری بالا و سهولت در تولید، پتانسیل بالایی برای تولید واکسن درمانی HPV نشان داده‌اند. در این مطالعه اثر سویه‌های مختلف/شرشیاکلی در کنار پارامترهای محیطی از جمله دما، زمان القایی و غلظت القاکننده بر میزان بیان پروتئین پلی‌ای‌توپی نو ترکیب HPV16-E6 بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ژن بهینه‌شده پروتئین نو ترکیب E6، در درون وکتور دارای پروموتور T7 کلون شد. وکتور نو ترکیب به سویه‌های/شرشیاکلی BL21(DE3)-AI، BL21(DE3)، Rosetta، C41(DE3) و BL21(DE3)-T7 کلون شد. pLysS ترانسفورم شد و توانایی این سویه‌ها برای بیان پروتئین نو ترکیب مدنظر در شرایط مختلف محیطی مقایسه شد.

* نویسنده مسئول مکاتبات



This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2021.130943.1420](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.130943.1420) [20.1001.1.23225173.1401.11.43.4.5](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.130943.1420)

بیان پروتئین نوترکیب E6 در سویه‌های ذکر شده، در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت‌های ۱/۰ و ۰/۱ میلی‌مولار از IPTG و زمان‌های مختلف انکوباسیون بررسی شدند.

نتایج: پس از انجام بهینه‌سازی بیان، شرایط بهینه برای بیان پروتئین نوترکیب E6 به دست آمد. بیشترین میزان بیان در سویه/شرشیاکلی BL21(DE3)-AI و در شرایط OD=0.9، غلظت ۰/۱ میلی‌مولار IPTG و مدت زمان القای ۱۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌تواند برای تولید پروتئین E6، به عنوان کاندید واکسن درمانی در درمان سرطان‌های مرتبط با HPV استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: شرشیاکلی، پروتئین نوترکیب، پروتئین HPV16-E6، بهینه‌سازی بیان

مقدمه

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع بین زنان جهان و دومین سرطان شایع در زنان کشورهای در حال توسعه است. طبق گزارش WHO عفونت پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های منتقل جنسی است که به طور کلی بدون علامت است. HPV یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده سرطان دهانه رحم محسوب می‌شود بیش از ۱۰۰ نوع HPV شناسایی و طبقه شده است که از مهم‌ترین آنها می‌توان به تایپ‌های ۱۶ و ۱۸ اشاره کرد. در انواع پرخطر HPV، E6 و E7 به طور کامل چرخه سلولی را بلوکه می‌کند و سلول هیچ‌گاه مسیر تمایزی را طی نمی‌کند. سلول در مسیر تکثیر سلولی به طور فعال باقی می‌ماند و آپوپتوز نیز متوقف می‌شود؛ در نتیجه، ناپایداری‌های ژنومی به تجمع تغییرات ژنتیکی و بدخیم‌شدن سلول آلوده به HPV منجر می‌شود. فعالیت اصلی پروتئین E6، تحریک تخریب پروتئین P53 با واسطه یویی کوئیتنه‌شدن است. در نبود P53، E6 باعث فعال‌شدن مسیر رونویسی از ژن‌های مربوط به آپوپتوز و در نتیجه، مرگ سلول آلوده قبل از تکثیر ویروس می‌شود. بازدارندگی P53 توسط E6 به کامل‌شدن چرخه عفونت ویروسی منجر می‌شود (۱-۳).

واکسن‌های درمانی متعددی با هدف ایجاد یا تقویت ایمنی سازگار با سلول‌های لنفوسیت T ایجاد شده‌اند که از جمله آنها طیف وسیعی از وکتورهای ویروسی، نوترکیب، پروتئین‌های نوترکیب، DNA عریان، سلول‌های دندریتیک (DC) antigen-pulsed، آنتی‌ژن‌های لکوسیتی انسانی کلاس I (HLA) و اپی‌توپ‌های پپتیدی برای درمان بیماری‌های مشتق شده از HPV16 آزمایش شده‌اند. از این میان، واکسن‌های پپتیدی و اپی‌تویی به عنوان ابزارهای مؤثری برای تقویت ایمنی سلول‌های لنفوسیت T در روش‌های پیشگیرانه و درمانی در برابر اختلالات سرطانی و عفونت‌های ویروسی استفاده می‌شوند. در کنار مزایای مختلف، واکسن‌های پپتیدی درمانی دارای ایمنی‌زایی ضعیفی‌اند و به روش‌های کمکی مانند استفاده از ساختارهای پلی‌اپی‌تویی یا افزودن لیپید و سایر آدجوانت‌ها برای افزایش قدرت واکسن نیاز دارند. طراحی پپتیدهای منتخب به صورت ساختار پلی‌اپی‌تویی، توانایی واکسن برای تحریک ایمنی ذاتی و افزایش پاسخ سلولی لنفوسیت‌های $CD8^+$ T را از طریق محافظت پپتیدها در برابر پروتئازها بهبود می‌بخشد (۴-۶).

برای بیان پروتئین‌های نوترکیب پلی‌اپی‌تویی،

مواد و روش ها

سویه های باکتریایی و پلاسمید: /شرشیاکلی DH5α

به عنوان میزبان همسانه سازی برای تولید و حفظ و کتور بیانی استفاده می شود. پنج سویه بیانی مختلف از /شرشیاکلی، BL21 (DE3)-pLysS، BL21 (DE3)، Rosetta، BL21(DE3)-AI و C41(DE3) تهیه شده و طبق پروتکل های استاندارد ترانسفورم شده اند. و کتور pET-28a به عنوان و کتور بیانی انتخاب شد. ژن کد کننده پروتئین نو ترکیب E6 (rpE6) توسط شرکت Generay (چین) ساخته شد؛ به صورتی که محل برش برای آنزیم های محدود گر XhoI و NcoI (Thermo Fisher, USA) برای دو انتهای ژن پیش بینی شده بود.

ساخت و کتور بیانی: برای ساخت و کتور بیانی pET-

28a حاوی ژن rpE6 و کتور pET-28a و ژن rpE6 به صورت جداگانه توسط NcoI و XhoI هضم دو گانه آنزیمی شدند. باندهای هضم شده توسط کیت استخراج از ژل (یکتاتجهیز، ایران) تخلیص شدند. سپس با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز، الحاق ژن rpE6 درون و کتور pET-28a انجام شد تا و کتور بیانی مدنظر ایجاد شود. پلاسمید pET28a-rpE6 برای تکثیر و نگهداری به داخل /شرشیاکلی DH5α ترانسفورم شد و کلونی های رشد کرده در محیط LB آگار حاوی 50 µg/ml کانامیسین توسط Colony PCR و توالی یابی بررسی شدند. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از مسترمیکس (یکتاتجهیز، ایران) و پرایمرهای عمومی پیش رو و معکوس پروموتور T7 انجام شد. شرایط PCR شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل هر سیکل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه بود. سپس مرحله نهایی ۱۰ دقیقه در

/شرشیاکلی به عنوان پرکاربردترین میزبان استفاده می شود که می تواند پروتئین هترولوگ را با موفقیت در شرایط بهینه بیان کند. /شرشیاکلی به علت ژنوم شناخته شده، سرعت بالای رشد، محیط رشد ارزان و طیف های گسترده و کتورها و سویه های بیانی هنوز هم محبوب ترین ارگانسم میزبان برای تولید پروتئین های هترولوگ است (۷). تولید پروتئین نو ترکیب همیشه باعث اختلال در متابولیسم سلول میزبان می شود و استفاده از منابع سلولی برای تکثیر پلاسمیدها و رونویسی ژن های هدف، به کاهش مقدار بیوماس منجر می شود؛ به ویژه تکثیر پلاسمید با قابلیت تکثیر بالا می تواند منجر به اختلال متابولیکی در سلول میزبان، بازده پایین محصول یا حتی مرگ سلولی شود. به همین دلیل برای دستیابی به بهره وری بالا، باید تعادل خوبی بین رشد بیوماس و تولید محصول وجود داشته باشد؛ بنابراین، بسیاری از پارامترهای مختلف باید بررسی و بهینه شوند که علاوه بر و کتور بیانی و سویه های مختلف، شامل دمای کشت، شرایط القایی و ... است. یکی از پرکاربردترین سیستم های بیانی در /شرشیاکلی، سیستم T7 است که در کنترل اپرون lac است و در و کتورهای pET و pRhot وجود دارد و بیان پروتئین هدف می تواند توسط لاکتوز یا β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) القا شود. چنین سیستم های بیان توسط القاگر، امکان جداسازی دقیق و قابل تنظیم مراحل رشد و تولید را با تغییر غلظت القاکننده و زمان القا فراهم می کنند (۸).

در این مطالعه بیان پروتئین پلی اپی توپی E6 در چند سویه مختلف /شرشیاکلی و تحت پارامترهای محیطی مختلف از جمله دمای کشت، غلظت القاکننده، مدت زمان انکوباسیون قبل و بعد از القا بررسی شد.

دقیقه که نمونه به دمای مدنظر رسید، IPTG اضافه شد و القای بیان به مدت ۱۶ ساعت ادامه یافت. برای بهینه‌سازی غلظت IPTG، IPTG با غلظت نهایی ۱ و ۰/۱ میلی‌مولار اضافه شد و بیان به مدت ۱۶ ساعت ادامه یافت و نمونه‌گیری در فواصل منظم زمانی انجام شد (۱۱).

ارزیابی میزان پروتئین پلی‌آپی‌توپ E6 تولیدشده توسط الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE): به‌منظور تجزیه و تحلیل تولید پروتئین مدنظر، باکتری حاصل از هر کشت با ساترifiوژ در ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۷ دقیقه رسوب داده و جداسازی شد. رسوب باکتری در بافر لیز (Tris-HCl, 50 mM؛ pH=8.5؛ EDTA, 5 mM)، معلق و سونیکاسیون انجام شد. سونیکاسیون به روش ۲۰ ثانیه پالس با فواصل ۱۰ ثانیه‌ای استراحت و به تعداد ۱۵ سیکل و روی یخ انجام شد. محلول رویی توسط ساترifiوژ با دور ۲۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه از بقایای سلولی جداسازی شد.

در این تحقیق ژل متراکم‌کننده (stacking or spacer gel) به‌صورت ۴ درصد و ژل جداکننده (Resolving or separating gel) با توجه به وزن مولکولی پروتئین‌ها به‌صورت ۱۲/۵ درصد تهیه شدند. ژل‌ها با رنگ Coomassie Blue R-250 به مدت یک ساعت، رنگ‌آمیزی و با محلول رنگ‌بر طی ۱۶ ساعت رنگ‌بری شدند و در ادامه برای تأیید و سترن بلاکینگ صورت گرفت (۱۲).

نتایج

ساخت وکتور بیانی: پروتئین نوترکیب E6 از چندین پپتید ایمونوژنیک ایجاد شده است که توسط لینکر به هم متصل شده‌اند. برای انتهای C ترمینال آن توالی شش‌تایی

۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول PCR به همراه لدر 1kb DNA روی ژل آگارز ۱ درصد ران شدند. همچنین توالی‌یابی با استفاده از پرایمرهای عمومی پیش‌رو و معکوس پروموتور T7 توسط شرکت Bioneer (Korea) صورت گرفت (۹).

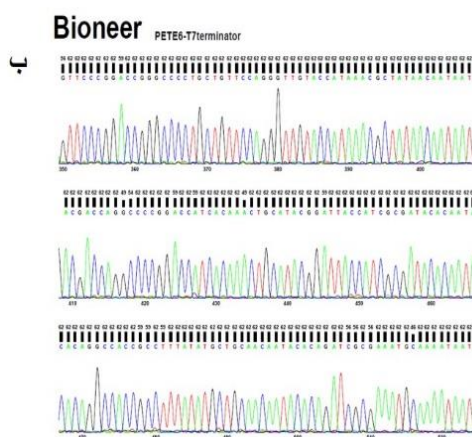
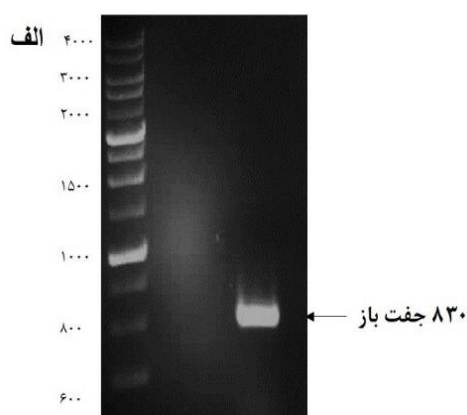
بیان پروتئین نوترکیب E6 در سویه‌های مختلف اشرشیاکلی: پلاسمید pET28a-rpE6 به داخل سویه‌های میزبان ((BL21 (DE3)-pLysS, BL21 (DE3)، Rosetta, BL21(DE3)-AI ترانسفورم شد که به روش شیمیایی مستعد شده بودند. تک کلونی‌های هر سویه برای کشت شبانه در ۵ سی سی محیط Terrific Broth (TB) تلقیح شد و در دمای مناسب و دور ۱۸۰ rpm انکوبه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه هر سویه در ۲۰ میلی‌لیتر TB تازه و حاوی کانامایسین تلقیح شد و تا رسیدن به OD₆₀₀ (Optical Density) مدنظر، انکوبه و سپس با IPTG القا شد. در فواصل دلخواه مقداری از محتوای هر ارلن برداشته و از نظر میزان OD₆₀₀ و میزان بیان پروتئین rpE6 بررسی شد.

به‌منظور تعیین میزان باکتری (OD) از دستگاه اسپکتوفتومتری و برای بررسی میزان بیان پروتئین، تکنیک (Sodium dodecyl sulphate- SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis) استفاده شد (۱۰).

بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در بیان: برای بهینه‌سازی دما، سلول‌ها به نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط کشت TB، تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ rpm انکوبه شدند تا زمانی که کدورت به ۰/۹ OD₆₀₀ رسید. سپس نمونه‌ها به انکوباتورهای با دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از انکوباسیون به مدت ۳۰

پلاسمید pET28a کلون شد؛ بنابراین، در کنترل پروموتور T7 قابل القا با IPTG قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب pET28a-rpE6 از داخل /شرشیاکلی DH5 α ، استخراج و توالی سازه با استفاده از توالی یابی و colony PCR تأیید شد (شکل ۱).

از His-tag طراحی شد. توالی اسید نوکلئیک به صورت بهینه برای بیان در سیستم پروکاریوتی /شرشیاکلی طراحی و سنتز شد و در وکتور pGH از شرکت تحویل گرفته شد. توالی rpE6 با آنزیم های XhoI و NcoI از pGH خارج و در ناحیه برش شده توسط دو آنزیم فوق در



شکل ۱- الف) الکتروفورز ژل محصول PCR، سایز ژن پروتئین نوترکیب E6 حدوداً ۸۳۰ جفت باز است. ب) نتیجه توالی یابی ژن پروتئین نوترکیب

مشاهده نشد. با کاهش دما تا ۲۲ درجه سانتی گراد نیز بیانی مشاهده نشد (داده ها آورده نشده است). با توجه به اینکه احتمال سمی بودن rpE6 برای سویه BL21(DE3) وجود داشت، طبق دستورالعمل های موجود (۱۴)، علاوه بر دماهای پایین، غلظت پایین IPTG، OD₆₀₀ بالاتر و سویه های دیگر نیز بررسی شدند.

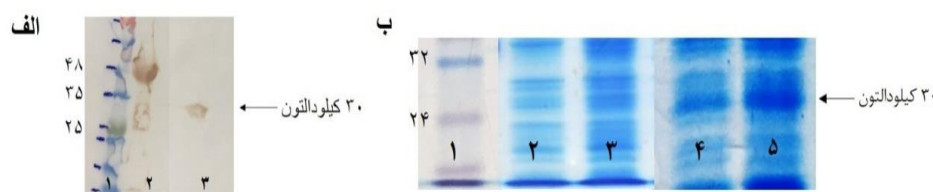
در ابتدا با OD₆₀₀ حدود ۰/۹ و ۰/۱ میلی مولار IPTG، میزان بیان در سه دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد بررسی شد و بیان با وزن مولکولی ۳۰ کیلودالتون در ۲۵ و ۲۰ درجه سانتی گراد مشاهده و با وسترن بلات تأیید شد (شکل ۲)؛ با این تفاوت که مقدار بیان در ۲۵ درجه سانتی گراد بیشتر از ۲۰ درجه سانتی گراد بود. نتایج حاصل از سونیکاسیون نشان دادند

بیان pET28a-rpE6 در سویه /شرشیاکلی BL21

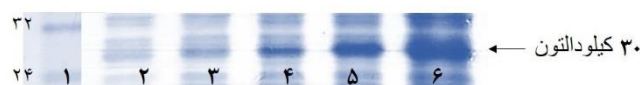
(DE3): /شرشیاکلی BL21 (DE3) یکی از پرکاربردترین سیستم های پروکاریوتی به عنوان میزبان بیانی است که به دلیل فقدان دو پروتئاز OmpT و Lon در این سیستم بیانی می تواند گزینه مناسبی برای بیان پروتئین های نوترکیب باشد. با تجاری سازی سویه های مختلف هنوز یکی از سویه های پرکاربرد و معتبر برای بیان پروتئین های هترولوگ محسوب می شود (۱۳)؛ بنابراین، در ابتدا پلاسمید pET28a-rpE6 به داخل این سویه، ترانسفورم و بیان در آن بررسی شد. هنگامی که با کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، دانسیته سلولی در OD₆₀₀ به ۰/۵ رسید، IPTG به محیط اضافه شد تا غلظت نهایی آن به ۱ میلی مولار برسد؛ پس از ۱۶ ساعت هیچ بیانی

تمام پروتئین مدنظر در بخش نامحلول وجود دارد و کاهش دمای بیان از ۲۵ به ۲۰ درجه سانتی‌گراد فقط باعث کاهش میزان بیان شده است و و اثری بر حلالیت rp-E6 ندارد (شکل ۲). رسوب به دست آمده از بیان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۰/۱ میلی‌مولار IPTG و

OD₆₀₀ حدود ۰/۹، بعد از ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۶ ساعت جمع‌آوری شد و همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، بیشترین میزان بیان مربوط به ۱۶ ساعت است (شکل ۳).



شکل ۲- الف) وسترن بلات E6. ۱: مارکر؛ ۲: کنترل مثبت ۴۵ کیلوالتونی؛ ۳: E6. ب) تأثیر دمای مختلف بر سطح بیان rpE6 در سویه BL21(DE3). ستون ۱: مارکر؛ ستون ۲: BL21/pET28- E6 بدون القای IPTG؛ ستون ۳: القای بیان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد؛ ستون ۴: القای بیان در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد؛ ستون ۵: القای بیان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. (غلظت القاکننده IPTG در تمامی دماها ۰/۱ میلی‌مولار بود). بیشترین میزان بیان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.



شکل ۳- تأثیر زمان انکوباسیون بر بیان پروتئین نو ترکیب E6. ستون ۱: BL21(DE3)-rpE6 بدون القای IPTG. ستون ۲: یک ساعت پس از القا با IPTG. ستون ۳: دو ساعت پس از القا؛ ستون ۴: چهار ساعت پس از القا؛ ستون ۵: ۱۶ ساعت پس از القا. بیشترین میزان بیان ۱۶ ساعت پس از القا مشاهده شد.

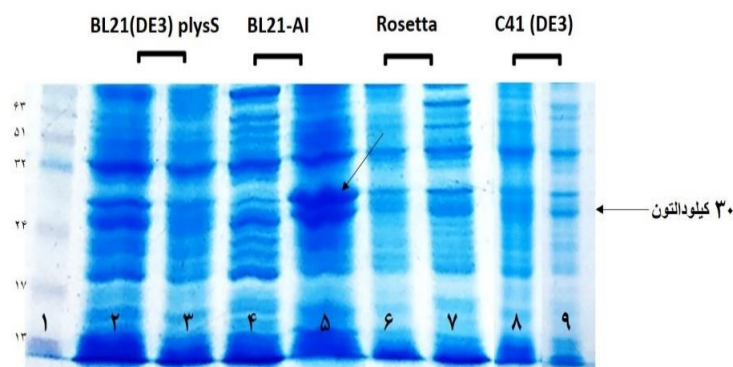
لیزوزیم T7، بازدارنده فعالیت RNA پلیمراز T7 است؛ بنابراین، بیان پایه ژن‌های هدف در کنترل پروموتور T7 را کاهش می‌دهد (۱۵، ۱۶). میزان بیان rpE6 در دو شرایط ۱ میلی‌مولار IPTG و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و همچنین ۰/۱ میلی‌مولار IPTG و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های جمع‌آوری مختلف بررسی شد (OD₆₀₀ در هر دو حالت حدوداً ۰/۹ بود) و هیچ بیانی مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشده‌اند).

بیان pET28a-rpE6 در اشرشیاکلی BL21(DE3)-AI
اشرشیاکلی BL21(DE3)-AI یک نوع سویه تجاری است که سیستم بیان پروتئین مبتنی بر RNA پلیمراز فاژ

بیان pET28a-rpE6 در سویه اشرشیاکلی BL21 (DE3)-pLysS
به علت احتمال سمی بودن rp-E6، نظر بر این شد که علاوه بر تغییر پارامترهای محیطی مختلف، سویه‌های مناسب برای تولید پروتئین‌های سمی نیز بررسی شوند. یکی از سویه‌ها BL21 (DE3)-pLysS است که امکان بیان پروتئین با راندمان بالا برای هر ژنی را فراهم می‌کند که در کنترل پروموتور T7 بوده است. BL21 (DE3)-pLysS حاوی لیزوژن DE3- λ در کروموزوم خود است و RNA پلیمراز T7 را در کنترل پروموتور lac UV5 رمزگذاری می‌کند. این سویه همچنین حاوی یک پلاسمید، pLysS است که ژن لیزوزیم T7 را کد می‌کند.

T7 دارد. ترکیبی از تنظیمات دقیق و بازدهی بالا باعث شده است که به طور گسترده ای برای بیان با مقادیر بالای پروتئین نو ترکیب و سمی استفاده شود. در این سویه T7 RNA پلیمرز (T7-RNAP) کروموزومی در کنترل pBAD رمز گذاری می شود که پروموتور pBAD با آرایینوز، القا و به شدت کنترل می شود و تنها سویه ای است که بیان پایه به شدت کنترل می شود و بازده تولید بالایی دارد و برای بیان بالای پروتئین های سمی عالی است (۱۷، ۱۸).

میزان بیان rpE6 در دو شرایط ۱ میلی مولار IPTG و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و همچنین ۰/۱ میلی مولار IPTG و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در زمان های جمع آوری مختلف بررسی شد (OD_{600} در هر دو حالت حدوداً ۰/۹ بود). در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱ میلی مولار IPTG در هیچ زمانی پس از القا بیانی مشاهده نشد؛ اما در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۰/۱ میلی مولار IPTG، بیشترین بیان، ۱۶ ساعت پس از القا مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- بررسی بیان در سویه های مختلف / شرشیا کلی. ستون ۱: مارکر پروتئینی؛ ستون ۲، ۴، ۶ و ۸: نمونه های قبل از القا با IPTG، ستون ۳، ۵، ۷ و ۹: نمونه های بعد از القا با ۰/۱ میلی مولار IPTG در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، $OD_{600}=0/9$. فقط در سویه BL21-AI بیان بعد از ۱۶ ساعت مشاهده شد.

بیان pET28a-rpE6 در Rosetta: سویه های Rosetta

مشتقات BL21 lacZY هستند که برای افزایش بیان پروتئین های یوکاریوتی طراحی شده اند که حاوی کدون هایی اند که به ندرت در شرشیا کلی استفاده می شوند. این سویه ها tRNA های کدون های AUA، AGA، AGG، CUA، CCC و GGA را روی یک پلاسمید حاوی ژن مقاومت کلرامفنیکول تأمین می کنند. ژن های tRNA در کنترل پروتئین های اصلی خود باکتری اند (۱۹، ۲۰).

میزان بیان rpE6 در دو شرایط ۱ میلی مولار IPTG و

دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و همچنین ۰/۱ میلی مولار IPTG و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در زمان های جمع آوری مختلف بررسی شد (OD_{600} در هر دو حالت حدوداً ۰/۹ بود) و هیچ بیانی مشاهده نشد (شکل ۴).

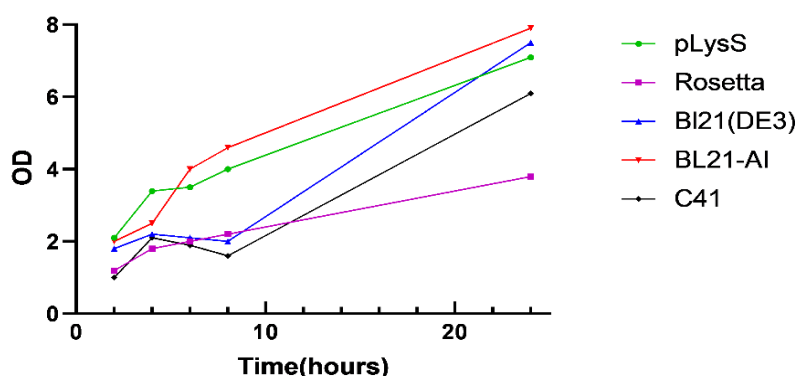
بیان pET28a-rpE6 در C41(DE3): سویه های جهش یافته C41 (DE3) توسط Miroux و Walker طراحی شدند. این سویه های جهش یافته *E. coli* BL21 (DE3) می توانند از مرگ سلولی و بی ثباتی پلاسمید های مرتبط با بیان پروتئین های نو ترکیب سمی جلوگیری کنند. این سویه ها همچنین در بیان

پروتئین‌های سمی از همه گروه‌های مختلف موجودات از جمله یوباکتیریا، مخمرها، گیاهان، ویروس‌ها و پستانداران مؤثرند. میزان بیان rpE6 در دو شرایط ۱ میلی‌مولار IPTG و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و همچنین ۰/۱ میلی‌مولار IPTG و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های جمع‌آوری مختلف بررسی شد (OD₆₀₀ در هر دو حالت حدوداً ۰/۹ بود) و هیچ بیانی مشاهده نشد (شکل ۴) (۲۱، ۲۲).

مقایسه میزان رشد سویه‌های مختلف دارای پلاسمید

نو ترکیب pET28a-rpE6: یکی از روش‌های بررسی سمی بودن پروتئین برای سلول میزبان، بررسی نمودار رشد باکتری قبل از القا و مقایسه آن با نمودار رشد

باکتری بدون وکتور نو ترکیب است. اثر بیان rpE6 حتی به میزان کم (حتی قبل از القا با IPTG) در رشد سویه‌های مختلف/شرشیاکلی بررسی شد. میزان رشد توسط اسپکتوفتومتری و سنجش OD₆₀₀ اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، میزان رشد سویه‌های مختلف (به استثنای BL21(DE3)-AI) در ۸ ساعت اولیه بعد القا سرعت کمی داشته است یا متوقف می‌شود؛ اما بعد از آن، رشد صعودی یکنواخت تا ۲۲ ساعت بعد از القا مشاهده می‌شود. در سویه BL21(DE3)-AI تقریباً در تمام ساعات بعد از القا، رشد صعودی بوده است؛ با اینکه میزان رشد در ساعات اولیه شیب کمتری دارد (شکل ۵) (۷).



شکل ۵- مقایسه میزان رشد سویه‌های مختلف دارای پلاسمید نو ترکیب pET28-rpE6 بدون القا به مدت ۲۴ ساعت

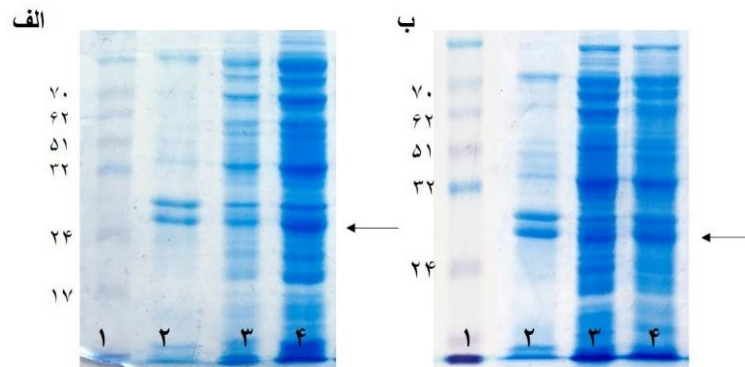
مقایسه میزان بیان rpE6 در سویه‌های مختلف: در

این آزمایش، سویه‌های/شرشیاکلی BL21(DE3)، BL21(DE3)-pLysS، BL21(DE3)-AI و Rosetta به‌طور همزمان با ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد القا شدند و بیان به مدت ۱۶ ساعت ادامه یافت. پس از سونیکاسیون، رسوب از محلول رویی، جدا و مقدار مساوی پروتئین کل در SDS-PAGE بارگذاری شد. هیچ بیانی در هیچ کدام از

سویه‌ها مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشده‌اند). سپس هر پنج سویه ذکر شده به‌طور همزمان با ۰/۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد القا شد و بیان به مدت ۱۶ ساعت ادامه یافت. پس از سونیکاسیون، رسوب از محلول رویی، جدا و مقدار مساوی پروتئین کل در SDS-PAGE بارگذاری شد؛ فقط بیان سویه‌های BL21(DE3)-AI و BL21(DE3) مشاهده شد (شکل ۶). در هر دو سویه بیشترین مقدار پروتئین نو ترکیب

تولیدی به صورت رسوب دیده شد و میزان بیان به صورت محلول ناچیز بود. میزان پروتئین تولیدی به صورت کمی با استفاده از نرم افزار ImageJ تعیین شد.

درصد باند پروتئین نو ترکیب به کل پروتئین ها در بخش نامحلول در هر دو سویه حدودا ۳۰ درصد بود.



شکل ۶- بررسی بیان پروتئین نو ترکیب E6 در دو سوش (الف. BL21-AI و BL21(DD3). الف) بیان پروتئین rpE6 در BL21(DE3): ۱ پروتئین توتال ۱۶ ساعت پس از القا؛ ۲: محلول رویی پس از سونیکاسیون؛ ۳: رسوب پس از سونیکاسیون. ب) بیان پروتئین rpE6 در BL21: ۱ پروتئین توتال ۱۶ ساعت پس از القا؛ ۲: محلول رویی پس از سونیکاسیون؛ ۳: رسوب پس از سونیکاسیون

بحث و نتیجه گیری

اشرشیاکلی یکی از ارگانیسیم های انتخابی برای تولید پروتئین های نو ترکیب است. استفاده از آن به عنوان کارخانه تولید پروتئین کاملا تثبیت شده و به محبوب ترین بستر بیان تبدیل شده است. به همین دلیل، ابزارها و پروتکل های مولکولی زیادی همچون فهرست گسترده ای از پلاسمیدهای بیانی، سویه های مهندسی شده و استراتژی های کشت متعددی برای تولید سطح بالای پروتئین های هترولوگ در دسترس اند (۲۳). یکی از مشکلات پیش رو برای تولید پروتئین های نو ترکیب، سمی بودن آنها برای میزبان پروکاریوتی است. مشکل سمیت پروتئین ممکن است زمانی ایجاد شود که پروتئین نو ترکیب عملکرد غیرضروری و مضر در سلول میزبان داشته باشد. این عملکرد با تکثیر و هموستازی طبیعی میکروارگانیسیم

تداخل دارد و نتیجه آن سرعت رشد کندتر، بیوماس پایین سلولی و مرگ است. بدین منظور میزان رشد سویه ها قبل از القا، در دو حالت (۱) با وکتور حاوی ژن پروتئین نو ترکیب و (۲) بدون وکتور بررسی و مقایسه می شود. اگر سرعت رشد سویه نو ترکیب در مقایسه با سویه بدون وکتور کندتر باشد، دو علت این فنوتیپ را توضیح می دهد: سمیت ژن و بیان پایه mRNA / پروتئین سمی. برای بیان پروتئین سمی می توان از چندین روش استفاده کرد: i) وکتور بیانی با تعداد کپی کم، ii) سویه های مختلف بیان و iii) کاهش سرعت تولید (دمای پایین تر، غلظت IPTG کمتر، نقطه OD600 بالا و غیره) (۲۴).

به عنوان میزبان برای بیان، اشرشیاکلی شامل سویه های متعدد است؛ بنابراین، انتخاب مناسب میزبان های بیان می تواند به افزایش کارایی بیان پروتئین

منجر شود؛ هرچند چنین میزبان‌هایی می‌توانند مزایا و معایب خاص خود را داشته باشند (جدول ۱). BL21 (DE3) از سویه‌های *E. coli* B است که فاقد ژن‌های Lon protease (سیتوپلاسم) و OmpT پروتئاز (خارج از غشا) است. BL21 (DE3) دارای لیزوژن λ DE3 است که حاوی ژن T7 RNA پلیمراز در کنترل پروموتور LacUV5 است و برای بیان پروتئین‌هایی با

پروموتور T7 در بالادست ژن‌های خود به کار می‌رود. با اینکه در این سویه بیان نشستی قبل از القا مشاهده می‌شود، برای رفع این مشکل می‌توان از ۱ درصد گلوکز در محیط استفاده کرد؛ با این حال، هنوز به عنوان یکی از مهم‌ترین سویه‌ها برای بیان پروتئین نوترکیب به شمار می‌رود (۲۵).

جدول ۱- خصوصیات سویه‌های اشرشیاکلی مختلف استفاده‌شده در بیان پروتئین نوترکیب E6

سویه باکتریایی	ویژگی‌ها	مزایا	شرایط رشد
BL21(DE3)	- دارای لیزوژن DE3 بیان‌کننده T7 RNA پلیمراز - فاقد پروتئازهای lon و ompT - القا شونده توسط IPTG	مناسب برای بیان ژن‌های غیرسمی	کنترل شدیدی بر بیان وجود ندارد؛ بنابراین، افزودن ۱ درصد گلوکز به محیط رشد باید در نظر گرفته شود.
BL21(D3)-pLysS	- دارای لیزوژن DE3 که بیان‌کننده T7 RNA پلیمراز است. - دارای لیزوژیم T7 برای تجزیه آنزیم T7 پلیمراز قبل از القا	- جلوگیری از بیان نشستی (Leaky expression) - مناسب برای بیان پروتئین‌های سمی	آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (34µgr/ml)
B21(DE3)-AI	- دارای نسخه کروموزومی از ژن T7 RNA پلیمراز در کنترل پروموتور araBAD - القا شونده توسط آرابینوز	- جلوگیری از بیان نشستی (Leaky expression) - مناسب برای بیان پروتئین‌های سمی	آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (12.5ug/ml)
Rosetta	- مشتقات BL21 lacZY - دارای نسخه‌های اضافی از ژن‌های کدکننده tRNA برای کدون‌های کمیاب CUA، AGA، AGG، AUA، GGA، CCC	مناسب برای بیان پروتئین‌های هترولوگ	آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (34µgr/ml)
C41(DE3)	- سویه‌های جهش‌یافته BL21 (DE3) - جلوگیری از مرگ سلولی مرتبط با بیان پروتئین‌های نوترکیب سمی	مناسب برای بیان پروتئین‌های سمی یا غشایی از تمام کلاس‌های مختلف موجودات	-

در این مطالعه سویه BL21(DE3) برای بیان پروتئین نوترکیب rpE6 استفاده شد. بیان قابل ملاحظه‌ای از فرم نامحلول پروتئین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ میلی‌مولار IPTG و $OD=0.9$ به دست آمد. همچنین

در این شرایط (۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ میلی‌مولار IPTG و $OD=0.9$)، در سویه BL21(DE3)-AI نیز بیان چشمگیری در بخش نامحلول وجود دارد. انتخاب این سویه از آنجایی صورت گرفت که برای تولید

بالای پروتئین‌های با بیان کم و سمی (برای مثال پروتئین‌هایی غنی از پیوندهای دی سولفیدی) به کار می‌رود. در این سویه برای کاهش اثرات سمی بیان بیش از حد پروتئین نو ترکیب از سیستم کنترل دوگانه استفاده می‌شود؛ به صورتی که در آن تولید T7 RNAP توسط پروموتور آرایینوز (ParaBAD) با دقت کنترل می‌شود؛ در حالی که ژن هدف توسط پروموتور (PT7lac) کنترل می‌شود (۱۵).

علاوه بر دو سویه فوق، سه سویه دیگر نیز در این تحقیق بررسی شدند (با توجه به ویژگی‌های پروتئین نو ترکیب مدنظر و سویه‌ها). سویه Rosetta با توجه به داشتن tRNAهای نایاب برای بیان پروتئین‌های یوکاریوتی، سویه Bl21(DE3)-pLysS با داشتن پروتومور با تنظیم دقیق‌تری از بیان پروتئین نو ترکیب و سویه C41(DE3) با افزایش پایداری پلاسمیدها و کاهش قابلیت تکثیر آنها انتخاب شدند که هیچ کدام بیان مناسبی نداشتند. گفتنی است بیان پروتئین rpE6 با روش وسترن بلات بررسی شد که در سه سویه فوق بیانی مشاهده نشد (اطلاعات آورده نشده است).

تأثیر عوامل محیطی همچون دمای مناسب برای القای بیان، غلظت عامل القاگر، OD₆₀₀ و ... می‌توانند بر بیان پروتئین مؤثر باشند؛ به‌خصوص شرایط سیتوپلاسمی مطلوب‌تری را برای بیان محلول پروتئین‌های دارای پل دی سولفید و یا سمی فراهم می‌کنند.

مدت زمان و دمایی که القا در آن صورت می‌گیرد، دو عامل مهم در بیان یا حلالیت‌اند. از این نظر، کاهش دمای پس از القا می‌تواند سرعت سنتز پروتئین را کاهش دهد و در نتیجه از تشکیل اجسام نامحلول^۱ جلوگیری کند. این روش برای برخی از پروتئین‌های

پیچیده مؤثر است؛ بنابراین، متداول‌ترین دماهای استفاده شده برای القای پروتئین‌های نامحلول ۱۸، ۲۴ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد است. در دماهای بالا می‌توان رشد سلولی را افزایش داد؛ اما برای بیان پروتئین مضر است؛ زیرا سرعت رشد بیشتر می‌تواند احتمال از بین رفتن پلاسمید را افزایش دهد که در تولید پروتئین‌های نو ترکیب در محیط کشت‌های پیوسته^۲ درخور توجه است. به‌طور کلی، واکنش‌هایی که باعث تشکیل اجسام نامحلول می‌شوند در دماهای بالاتر ایجاد می‌شوند؛ زیرا واکنش‌های آبگریز به شدت به دما بستگی دارند. علاوه بر این، سطوح پایین تقسیم سلولی، رونویسی و ترجمه و همچنین کاهش تجمع پروتئین در اثر کند شدن فرایندهای سلولی در دماهای پایین ایجاد می‌شوند. در این راستا، دمای پایین، تخریب پروتئین‌های حساس به پروتئولیز را کاهش می‌دهد؛ زیرا بیشتر پروتئازها در دماهای پایین فعالیت کمتری دارند؛ بنابراین، با کاهش دما (یا کاهش غلظت IPTG) و افزایش مدت زمان القا، حلالیت پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. با وجود این، ترکیب بهینه مدت القا و دمای پس از القا هنوز با آزمایش و خطا به دست می‌آید (۷، ۲۳، ۲۶). در این پژوهش، حتی در کمترین دمای آزمایش شده (۲۰ درجه سانتی‌گراد)، هیچ باند محلولی مشاهده نشد و پروتئین نو ترکیب کامل به‌صورت رسوب انباشته شد؛ اما کاهش دما از ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ۲۵ درجه سانتی‌گراد باعث مشاهده بیان در ژل شد. در دمای ۳۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد نیز مشابه ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیانی مشاهده نشد و میزان بیان کل در ۲۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد کمتر بود.

یکی دیگر از استراتژی‌های شناخته شده برای

نو ترکیب مؤثر باشد. نتایج ما نشان دادند القای بهینه در مرحله نمایی انتهایی ($OD=0.9$) سطح بالایی از پروتئین نو ترکیب با تراکم سلولی بالا را تولید می کند؛ جایی که بیشترین تعداد سلول ایجاد شده است. این نتیجه با مطالعات قبلی مطابقت دارد؛ به طوری که گزارش شده است میزان القای پروتئین نو ترکیب تا مرحله انتهایی رشد لگاریتمی افزایش و در مرحله رشد ثابت کاهش می یابد (۲۷).

در این مطالعه پروتئین نو ترکیب E6 از دو سویه BL21-AI و BL21(DE3) به صورت رسوب به دست آمد؛ اما بیان پروتئین به صورت اجسام نامحلول مزایایی همچون تخلیص راحت تر و میزان تولید بالاتر دارد و از آنجایی که این آنتی ژن پلی اپی توپی تولید شده کاندید واکسن درمانی است، خلوص نهایی و میزان تولید، پارامترهای کلیدی اند؛ بنابراین، پس از خالص سازی اجسام نامحلول تولید شده، آنها به روش های مرسوم محلول می شوند و برای ارزیابی به عنوان واکسن درمانی استفاده خواهند شد.

سپاسگزاری

این پروژه توسط مرکز تحقیقات کنترل سرطان طرح شماره (CCF-97087) و همچنین سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (IROST) طرح ۱۰۱۲۱۹۷۰۰۲ حمایت مالی شده است.

References

- (1) Bahmani, B., Amini Bayat, Z., Ranjbar, M. M., Bakhtiari, N., & Zarnani, A. H. (2021). HPV16-E7 Protein T cell epitope prediction

کاهش رسوب و افزایش بیان در طول تولید پروتئین نو ترکیب، بهینه سازی غلظت القاگر است. در غلظت های بالای القا کننده، بیان پروتئین به طور کامل القا می شود و با توجه به ظرفیت محدود محیط سلولی برای فولد صحیح، میزان رسوب پروتئین های نو ترکیب افزایش می یابد. غلظت های کم القا کننده می تواند به القای ناکافی بیان پروتئین و در نتیجه بازده کمتر منجر شود. غلظت بالای القاگر علاوه بر داشتن هزینه های بالا می تواند سلول ها را از بین ببرد یا باعث بیان پروتئین به صورت اجسام نامحلول شود؛ بنابراین، تنظیم غلظت القا کننده اهمیت زیادی دارد. در چندین مطالعه نشان داده شده است نمونه هایی با غلظت IPTG بین ۰ تا ۱ میلی مولار نمی توانند اثرات سمی بر رشد *E. coli* داشته باشند. علاوه بر این، استفاده از غلظت کمتر القاگر (برای مثال، ۰/۰۵ میلی مولار برای IPTG) به بیان پروتئین به شکل محلول کمک می کند و استفاده از غلظت بیشتر القا کننده می تواند حلالیت پروتئین را کاهش دهد؛ در نهایت، توجه به این نکته ضروری است که برای تعیین غلظت مناسب القاگر باید به هر سه عامل وکتور، میزبان و پروتئین توجه شود. در اینجا از دو غلظت مختلف القا کننده استفاده شده است؛ اما کاهش غلظت IPTG به ۰/۱ میلی مولار باعث افزایش حلالیت نشد؛ اما میزان بیان پروتئین تام را نسبت به غلظت ۱ میلی مولار IPTG افزایش داد (۷، ۲۳، ۲۷).

پارامتر سوم میزان رشد باکتری قبل از القا یا به عبارتی OD_{600} در زمان القا است. القا در فاز لگاریتمی (ابتدا، میانه و انتها) یا فاز رشد می تواند بر بیان پروتئین

and global therapeutic peptide vaccine design based on human leukocyte antigen frequency: An in-silico study. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 365-378.

- (2) de Oliveira, L. M. F., Morale, M. G., Chaves, A. A. M., Cavalher, A. M., Lopes, A. S., Diniz, M. D. O., ... & Ho, P. L. (2015). Design, immune responses and anti-tumor potential of an HPV16 E6E7 multi-epitope vaccine. *PloS One*, 10(9):e0138686.
- (3) Martinez Zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., ... & Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, 529(7587), 541-545.
- (4) Li, W., Joshi, M. D., Singhania, S., Ramsey, K. H., & Murthy, A. K. (2014). Peptide vaccine: Progress and challenges. *Vaccines*, 2(3), 515-536.
- (5) Skwarczynski, M., & Toth, I. (2016). Peptide-based synthetic vaccines. *Journal of Chemical Science*, 7(2), 842-854.
- (6) Park, E., Kim, J. Y., Choi, S., Kim, D. S., & Oh, Y. L. (2019). Carcinogenic risk of human papillomavirus (HPV) genotypes and potential effects of HPV vaccines in Korea. *Journal of Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- (7) Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Journal of Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
- (8) Van Noi, N., & Chung, Y. C. (2017). Optimization of expression and purification of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike (PEDV-S1) protein in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 619-629.
- (9) Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- (10) Berrow, N. S., Büssow, K., Coutard, B., Diprose, J., Ekberg, M., Folkers, G. E., ... & Busso, D. (2006). Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: A comparative study. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(10), 1218-1226.
- (11) Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2021). Expression of cloned genes in *E. coli* using IPTG-inducible promoters. *Journal of Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(2), 102-137.
- (12) Al-Tubuly, A. A. (2000). SDS-PAGE and western blotting. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies: Springer*, 391-405.
- (13) Casali, N., & Preston, A. E. (2003). *Coli plasmid vectors: Methods and applications*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- (14) Hayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What we need to know. *Journal of Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718-725.
- (15) Nozach, H., Fruchart-Gaillard, C., Fenaille, F., Beau, F., Ramos, O. H. P., Douzi, B., ... & Dive, V. (2013). High throughput screening identifies disulfide isomerase DsbC as a very efficient partner for recombinant expression of small disulfide-rich proteins in *E. coli*. *Journal of Microbial Cell Factories*, 12(1), 1-16.
- (16) Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 37-44.
- (17) Narayanan, A., Ridilla, M., & Yernool, D. A. (2011). Restrained expression, a method to overproduce toxic membrane proteins by exploiting operator-repressor interactions. *Journal of Protein Science*, 20(1), 51-61.
- (18) Stargardt, P., Striedner, G., & Mairhofer, J. (2021). Tunable expression rate control of a growth-decoupled T7 expression system by L-arabinose only. *Journal of Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-17.
- (19) Manual I. BL21-CodonPlus® Competent Cells.
- (20) McNulty, D. E., Claffee, B. A., Huddleston, M. J., & Kane, J. F. (2003). Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia*

- coli. *Journal of Protein Expression and Purification*, 27(2), 365-374.
- (21) Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., & Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: A comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). *Journal of Protein Expression and Purification*, 37(1), 203-206.
- (22) Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289-298.
- (23) Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113-128.
- (24) Mühlmann, M., Forsten, E., Noack, S., & Büchs, J. (2017). Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Journal of Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-12.
- (25) Chart, H., Smith, H. R., La Ragione, R. M., & Woodward, M. J. (2000). An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5α and EQ1. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 1048-1058.
- (26) Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Journal of Current Protocols in Protein Science*, 61(1), 5-24.
- (27) Joseph, B. C., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan, M., & Manjunath, S. R. (2015). An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*, 6(5), 221.

¹- Inclusion bodies

²- Continuous cultures