

همسانه‌سازی، بیش بیان و بررسی خصوصیات آنزیم قلیایی فیتاز (*phyC*) در باکتری *اشرشیا کلی*

حمید آریان نژاد^۱، محمد رضا نصیری^{۲*}، علی اصغر اسلمی نژاد^۳، احمد آسوده^۴، حسام دهقانی^۶

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۲ دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۳ دانشیار، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی و دامی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۴ استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۵ استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد.

^۶ دانشیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۷/۲۶

چکیده

فیتاز (مایوانوزیتول هگزا کیس فسفات فسفو هیدرولاز) آنزیمی هیدرولیزی است که فسفات معدنی تولید می‌کند. ژن کد کننده فیتاز *phyC* از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* ATCC12711 جداسازی و توالی یابی شد. توالی نوکلوتیدی ژن فیتاز حاوی ناحیه کدکننده به طول ۱۰۸۹ جفت باز است که ۹۰ نوکلوتید ابتدایی آن، مربوط به سیگنال پپتید ژن می‌باشد. به منظور تولید آنزیم فیتاز نو ترکیب، ژن هدف به وکتور بیانی (+) pET32a وارد شد و وکتور نو ترکیب پس از تکثیر در باکتری *اشرشیا کلی* DH5 α به باکتری *اشرشیا کلی* BL21(DE3) به عنوان میزبان بیان منتقل شد. تحریک بیان ژن با استفاده از IPTG در غلظت نهایی ۱ میلی مولار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و حضور کلرید کلسیم ۱۰ میلی مولار صورت گرفت. نمونه‌گیری در زمان‌های صفر تا پنج ساعت انجام شد و میزان تولید پروتئین نو ترکیب با استفاده از الکتروفورز بررسی گردید. فیتاز محلول حاصل از ژن *phyC-Trx* با موفقیت به شکل درون سلولی در باکتری *اشرشیا کلی* بیان شد. وزن مولکولی فیتاز نو ترکیب تولید شده در حدود ۶۴ کیلو دالتون تخمین زده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از روش استاندارد فسفاتاز، فعالیت آنزیم نو ترکیب تولید شده را ۷/۴۴ واحد در میلی‌لیتر نشان داد. همچنین pH بهینه برای فعالیت آنزیم فیتاز قلیایی نو ترکیب در حدود ۷ برآورد شد. نتایج نشان داد که فیتاز بدست آمده از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* به جهت پایداری حرارتی و همچنین هزینه پایین تولیدی گزینه مطلوبی جهت استفاده در صنعت می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم فیتاز، اسید فایتیک، بیش بیان، *باسیلوس سابتیلیس*.

حیوانات اهلی ارزشمند است. هرچند که فعالیت فیتازی در سلول‌های حیوانی (Craxton *et al.*, 1997)، گیاهی (Reddy *et al.*, 1982; Gibson *et al.*, 1988) و میکروارگانسیم‌های مختلف (Greiner *et al.*, 1993; Pasamontes *et al.*, 1998; Berka *et al.*, 1997) گزارش شده است. اما، ژن‌های تولیدکننده آنزیم فیتاز در میکروارگانسیم‌ها بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. هزینه پایین‌تر و فعالیت بیشتر آنزیمی از مهمترین دلایل استفاده از این دسته فیتازها می‌باشد.

در سال‌های اخیر فیتازهای قارچی و باکتریایی بسیاری مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آنزیم فیتاز تولید شده توسط باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها خارج سلولی می‌باشد (Powar and Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992). گونه‌های قارچی از جنس *آسپرژیلوس*^۱ تولید هیستیدین اسید فیتاز (HAP) می‌کنند که در pH پایین و اسیدی فعال است اما پایداری حرارتی کمی دارند (Dvorakova *et al.*, 1997). در نقطه مقابل، گروه دیگری از فیتازها که به فیتازهای قلیایی مشهور هستند، فیتات را در pH قلیایی تخریب می‌کنند. این گروهی از فیتازها در گونه‌هایی از جنس *باسیلوس* (Choi *et al.*, 2001; Gulati *et al.*, 2007; Tye *et al.*, 2002)، دانه‌های گیاهی، گرده تیغ^۲ (Hara *et al.*, 1985) و لیلیوم

فیتات (مایو اینوزیتول هگزاکسی فسفات) یکی از شکل‌های اصلی فسفر در دانه‌ها، لگوم‌ها و دانه‌های روغنی می‌باشد (Harland and Morris, 1995). اسید فیتیک ۱ تا ۳ درصد وزن بسیاری از غلات و دانه‌های روغنی را تشکیل می‌دهد و به طور معمول ۶۰ تا ۸۰ درصد فسفر در این گیاهان به این شکل می‌باشد (Graf, 1987). فیتاز (مایواینوزیتول هگزاکسی فسفات فسفوهیدرولاز) آنزیم هیدرولیز کننده فیتات به مایواینوزیتول‌های پایین‌تر و در بعضی موارد مایو اینوزیتول آزاد و فسفر معدنی می‌باشد (Oh *et al.*, 2004). اسید فایتیک عامل کلات کننده چند یونی است که اثرات ضد تغذیه‌ای خود را به وسیله کلات کردن کاتیون‌های همچون مس، روی، آهن، منیزیم و کلسیم نشان می‌دهد (Kerovuo *et al.*, 1998). این عمل سبب غیرقابل دسترس شدن و عدم جذب مواد معدنی در روده حیوانات تک‌معهده از قبیل طیور، خوک و ماهیان می‌شود (Cheryan, 1980). تامین جیره حیوانات اهلی با استفاده از فسفر معدنی نه تنها سبب کاهش اثر ضد تغذیه‌ای اسید فایتیک نمی‌شود، بلکه به سبب دفع آنها باعث آلودگی آب‌های سطحی می‌گردد (Nasi, 1990). علاوه بر این، اسید فایتیک با اثرگذاری بر جذب پروتئین‌ها، نشاسته و لیپیدها کیفیت خوراک مصرف شده را کاهش می‌دهد (Liu *et al.*, 2006). از این رو، استفاده از فیتازها در صنعت به خصوص در تغذیه

¹ *Aspergillus spp.*

² *Typha latifolia*

فعالیت و بازده آنزیمی آن به منظور استفاده در صنعت، نیازمند افزایش است. بنابراین، جداسازی فیتاز از میکروارگانیسم‌های مختلف و بررسی ویژگی‌های آنزیمی آن‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد (Choi *et al.*, 2001). همچنین استفاده از سیستم‌های بیانی مختلف می‌تواند به انتخاب بهترین راه جهت تولید آنزیم‌های هیدرولیزی کمک کند. در *اشرشیا کلی* دو سیستم بیانی بر پایه استفاده از پروموتور T7 پلی‌مراز (سیستم pET) و پروموتور Ptac (سیستم pFLAG) به منظور تولید آنزیم‌های نوترکیب استفاده گردیده است. در وکتورهای pET، ژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی T7 باکتريوفاژ کلون می‌شود اما وکتورهای Ptac نسخه جهش داده شده از پروموتورهای lac هستند و فعالیت پایه آنها کم می‌باشد. سیستم pET به منظور خاصیت انتخابی بالا و تنظیم بیان ژن طراحی گردیده است. در حالی که سیستم Ptac برای کنترل بیان ژن در سطح بالا مفید خواهد بود (Yamabhai *et al.*, 2011).

در گزارش قبلی، همسانه‌سازی، بررسی خصوصیات مولکولی و پیش‌بینی بیان مجازی ژن فیتاز در وکتور pTZ57R/T بیان شد (Ariannejad *et al.*, 2012). در این مطالعه، ژن هدف، به وکتور بیانی pET32a(+) انتقال داده شده و سپس بیش بیان آن در باکتری *اشرشیا کلی* BL21(DE3) انجام گردیده است. همچنین اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و تعیین pH مطلوب برای فعالیت صورت گرفت.

لانگیزوریوم^۱ (Scott *et al.*, 1986) گزارش شده است. هیستیدین اسید فیتازها (HAP) تنها قادرند فیتات‌های بدون یون‌های فلزی را بشکنند اما فیتازهای قلیایی به شکل ویژه‌ای بر کمپلکس فیتات و کلسیم تاثیرگذار هستند (Oh *et al.*, 2004). زمانی که مقدار زیادی از کلسیم در جیره حضور دارد، تنها فیتازهای قلیایی برای فعالیت در روده کوچک پیشنهاد می‌شوند (Van der Klis *et al.*, 1997). از این‌رو، *phyC* دارای ویژگی‌های بیوتکنولوژی مهمی همچون پایداری حرارتی است که در پلت‌سازی مواد خوراکی و فرآیندهای دماهی و ویژگی بسیار ضروری به نظر می‌رسد. همچنین پروفایل pH، اختصاصی عمل کردن و وضعیت فیزیولوژیکی فیتات در روده کوچک از دیگر ویژگی‌های آنزیم فیتاز قلیایی می‌باشد. علاوه براین، فیتاز قلیایی می‌تواند فیتات را به دو مایواینوزیتول تری فسفات (Ins(2,4,6)P3) و Ins(1,3,5)P3 بسیار کمیاب هیدرولیز کند (Kerovuo *et al.*, 1998). این ترکیبات کمیاب در صنعت داروسازی کاربرد بسیاری دارند.

باکتری *باسیلوس سابتیلیس* دارای وضعیت GRAS^۲ می‌باشد و استفاده از آن در تولید مواد غذایی و دارویی توسط سازمان امنیت دارو و غذا تایید شده است. اگرچه فیتاز تولید شده توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس* پتانسیل مناسبی را برای تخریب کمپلکس فیتات از خود نشان داده است، اما

¹ *Lilium longiXorum*

² Generally Recognized As Safe

3' TTGCATGTTTATTTTCCGCTTCT تکثیر شد. این آغازگرها بر اساس ناحیه محافظت شده توالی 16sRNA باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس ثبت شده در بانک جهانی ژن طراحی شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم *Pfu* (Fermentas)، ۱/۲۵ واحد از آنزیم *Pfu* پلی‌مراز (Fermentas)، ۱ میکروگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر dNTP و ۰/۲۵ میکرومول از آغازگرها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن فیتاز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (T- Personal) ساخت آلمان به صورت زیر انجام شد: واسرشت‌سازی ۶۰ ثانیه در ۹۴ °C، اتصال ۴۵ ثانیه در ۶۱ °C و بسط ۴۵ ثانیه در ۷۲ °C برای ۳۵ سیکل. یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C برای ۳ دقیقه و یک مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C نیز انجام گردید. محصول PCR به وکتور کلونینگ pTZ57R/T وارد و سپس به *DH5α* منتقل شد.

ساختار وکتور بیانی فیتاز

استخراج پلاسمید pTz57R/T+phyC با استفاده از کیت Miniprep، شرکت Fermentas صورت گرفت. ناحیه کدکننده ژن فیتاز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی لینکردار رفت 5' AGCGGGATCCCGCATGAATCATTCAA 3' و برگشت 5' AAACAATT و برگشت 5' GCCCAAGCTTGGGTATTTTCCGCTTC

این اولین گزارش رسمی از تولید آنزیم نوترکیب فیتاز در ایران می‌باشد.

مواد و روشها

سویه‌های باکتری، پلاسمیدها و محیط کشت‌ها

باکتری باسیلوس سابتیلیس سویه ATCC12711 از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ ایران خریداری شد. باکتری‌های *اشرشیا کلی* DH5α و BL21(DE3) به عنوان میزبان استفاده شدند. پلاسمیدهای *pTZ57 R/T* (Fermentas) و *pET32a(+)* (Novagen) به عنوان وکتورهای کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفتند. *اشرشیا کلی* حاوی وکتور دست‌ورزی شده بر روی محیط کشت مایع Luria Broth (۱درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ کلرید سدیم) حاوی ۱۰۰ μg/ml آمپی‌سیلین کشت داده شد. pH محیط کشت ۷/۵ تنظیم و سلول‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به شکل هوازی کشت داده شدند.

تکثیر ژن فیتاز

استخراج DNA ژنومی از باکتری باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 با استفاده از کیت استخراج (Bioneer، کره جنوبی) انجام شد. ژن فیتاز *phyC* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت 5' _____ 3' GTGCACGTTTCATAAAAAGGAGGAAG و برگشت 5' _____

شدند و بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

به منظور تعیین میزان فعالیت آنزیم نوترکیب تولید شده، باکتری‌های *اشرشیا کلی* BL21(DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب القا شده با IPTG در غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۱۰۰۰ g سانتیفریوژ شدند. سپس با استفاده از دستگاه الٹراسونیک (میزونیکس، آمریکا) با ۳۰ پالس ۵ ثانیه‌ای دیواره باکتری‌ها بر روی یخ شکسته شد. مطابق دستورالعمل سیستم pET (آلمان، Novagen) آنالیز فعالیت آنزیمی بر روی محصول سیتوپلاسمی صورت گرفت. محلول سوبسترا به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محلول سوبسترا شامل ۰/۲ درصد وزن به حجم سدیم فیتات (آمریکا، Sigma) در بافر استات سدیم ۰/۱ مولار و کلرید کلسیم در غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مولار در دامنه‌های مختلف pH تهیه شد (Shimizu, 1992). واکنش با اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید ۵ درصد متوقف و ارتوفسفات آزاد شده در محلول اندازه‌گیری شد (Bae et al., 1999). محلول رنگی به وسیله مخلوط چهار حجم از آمونیوم مولیدات ۱/۵ درصد در محلول سولفوریک اسید ۵/۵ درصد و یک حجم از سولفات فرئوس ۲/۷ درصد تهیه و

3' TGTCGGTTCAGT تکثیر شد. محصول PCR حاوی ناحیه کدکننده ژن فیتاز به همراه جایگاه برشی آنزیم‌های *BamHI* در انتهای 5' و *HindIII* در انتهای 3' بود. محصول PCR تخلیص شده و وکتور بیانی pET32a(+) با استفاده از آنزیم‌های برشی *BamHI* و *HindIII* هضم شدند و سپس واکنش الحاق با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز (Fermentas) صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب حاصل از الحاق به منظور تکثیر به باکتری *اشرشیا کلی* DH5 α و پس از استخراج پلاسمید به میزبان بیان *اشرشیا کلی* BL21(DE3) منتقل گردید و بر روی محیط کشت LB-Agar حاوی ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ آمپی‌سیلین کشت داده شد. غربالگری و انتخاب کلنی حاوی ژن هدف با استفاده از روش کلنی PCR انجام گردید. سپس تک کلنی دست‌ورزی شده به مدت ۱۶ ساعت در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت تهیه شده به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی آمپی‌سیلین اضافه و تا رسیدن به OD₆₂₀ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. در این مرحله، نمونه صفر برداشته و سپس IPTG در غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه شد. نمونه‌برداری در ساعت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به منظور مشخص کردن بیان فیتاز نوترکیب صورت گرفت. سلول‌ها با استفاده از بافر 2x SDS شکسته

درصد محلول در TBS بلوکه گردید. سپس غشا در محلول آنتی‌بادی اولیه آنتی His-tag در TBST (TBS همراه با ۱ درصد Tween20) با رقت ۱ به ۱۰۰۰ برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سه بار شستشو با TBST انجام گرفت و غشا در محلول آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰۰ برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از شستشو آنتی‌بادی ثانویه، غشا با استفاده از محلول رنگ‌زای DAB (امریکا، Sigma) رنگ آمیزی شد.

۷۵۰ میلی‌لیتر از آن به نمونه اضافه شد. رنگ تولید شده در نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (امریکا، Genray) اندازه‌گیری شد. محلول استاندارد از محلول پایه ۹ میلی‌مولار فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم به نسبت‌های مختلف ساخته و رنگ تولید شده در آن‌ها نیز با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد آن‌ها رسم شد. فعالیت یک واحد فیتاز برابر با ۱ میکرومول فسفر معدنی آزاد شده در ۱ دقیقه مورد محاسبه قرار گرفت.

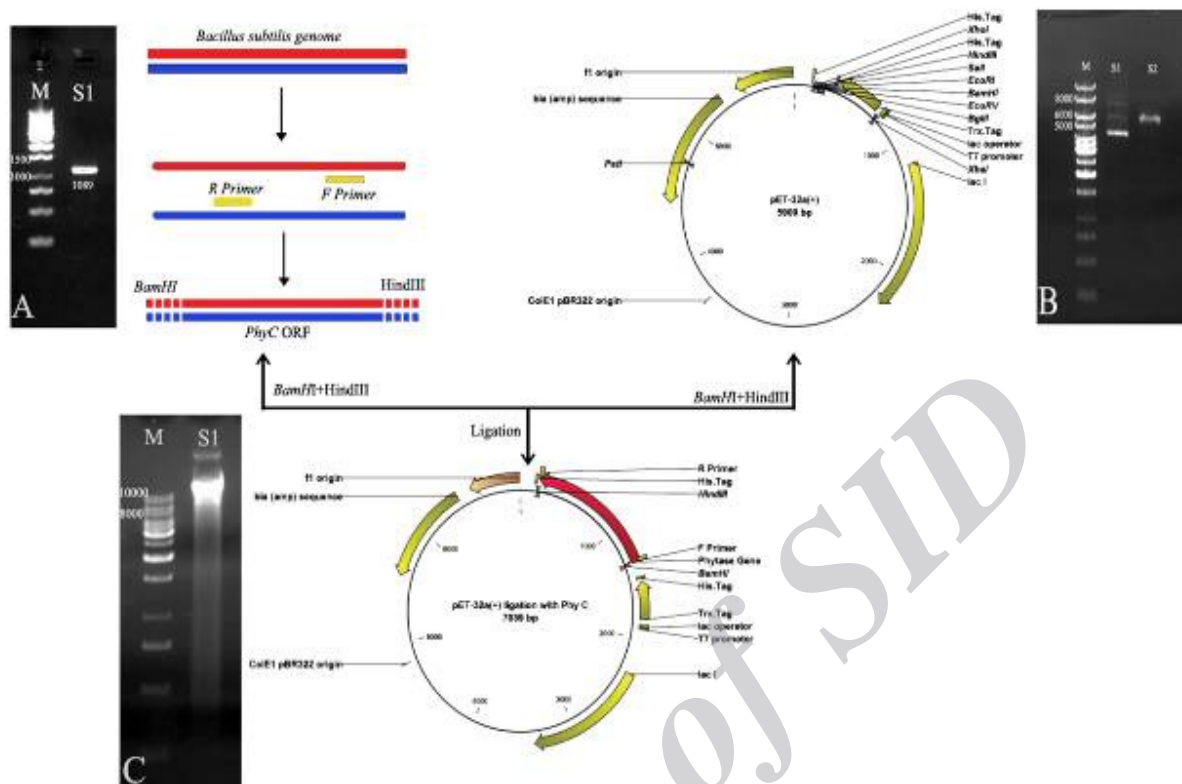
نتایج

واکنش زنجیره ای پلی‌مراز

ژن فیتاز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی تکثیر شد. ناحیه کدکننده آنزیم فیتاز به طرز مطلوبی از روی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T+phyC تکثیر و از ژل تخلیص شد. فراورده تکثیر خالص‌سازی شده حاوی جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های BamHI و HindIII بود به خوبی هضم و در جایگاه همسانه‌سازی وکتور pET32a(+) الحاق شد. ساختار پلاسمید نوترکیب pET32-PhyC در شکل ۱ نشان داده شده است.

ایمنوبلاتینگ

دات بلات از روش‌هایی است که در آن نمونه پروتئین به شکل مستقیم بر روی یک غشای خاص لکه‌گذاری می‌شود. این روش نسبت به روش‌های دیگر ایمنوبلاتینگ سریع‌تر بوده و برای کار با تعداد نمونه‌های زیاد بسیار مناسب است. از این رو، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های جمع‌آوری شده از باکتری نوترکیب القا شده در زمان‌های مختلف پس از شکستن دیواره سلولی بدون اضافه کردن بافر 2xSDS بر روی کاغذ نیتروسولوز لود شد. پس از خشک شدن نمونه، جایگاه‌های آزاد موجود روی غشا با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) ۵

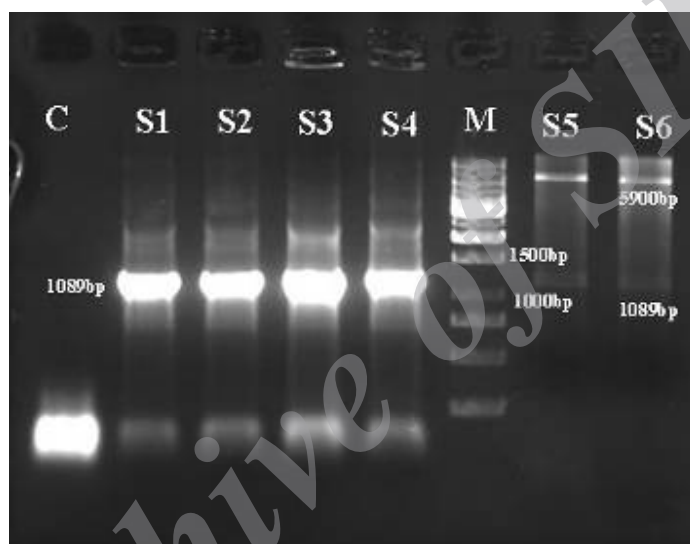


شکل ۱- کلونینگ ژن فیتاز در وکتور pET32a(+). A: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: ناحیه کدکننده فیتاز (۱۰۸۹ جفت باز)، M: نشانگر وزنی ۱ کیلو جفت باز). B: الکتروفورز pET32a(+) بر روی ژل آگارز (ستون ۱: pET32a(+) طبیعی، ستون ۲: pET32a(+) هضم شده با آنزیم های BamHI و HindIII (۵۹۰۰ جفت باز)، M: نشانگر وزنی ۱ کیلو جفت باز). C: الکتروفورز pET32a(+)+phyC بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: pET32a(+) نو ترکیب حاوی ژن هدف (۷۰۳۹ جفت باز)، M: نشانگر ۱ کیلو جفت باز).

Figure 1- Cloning strategy for inserting PCR amplified *PhyC* gene in pET32a(+) vector. A: Electrophoresis of PCR products on 1% agarose gel (lane S1: phytase ORF (1089), M = 1 kb DNA Ladder). B: Electrophoresis of pET32a(+) on 1% agarose gel (lane S1: native pET32a(+), lane S2: *BamHI* and *HindIII* digested pET32a(+) (5900bp), M = 1 kb DNA Ladder). C: Electrophoresis of pET32a+ *PhyC* on 1% agarose gel (lane S1: recombinant pET32 contain *PhyC* (7039bp), M = 1 kb DNA Ladder).

و استفاده از این آنزیم سبب حذف قطعه ۲۰ کیلودالتونی اضافه شده توسط Trx و His₆ می‌گردد. محصول الحاق به شکل موفقی به اشرشیا کالی BL21(DE3) منتقل گردید و نتیجه کلنی PCR و هضم آنزیمی با آنزیم های BamHI و HindIII صحت انجام واکنش را تایید کرد (شکل ۲).

ژن Trx سبب بیش بیان پپتیدها و کاهش سمیت پروتئین‌ها نوترکیب تولید شده در اشرشیا کالی میزبان می‌گردد (Yamabhai et al., 2011). در بین ژن Trx و ناحیه کدکننده فیتاز، ۶ اسید آمینه هیستیدین قرار گرفته که به منظور شناسایی و تخلیص پروتئین از آن استفاده می‌گردد. سایت شناسایی انتروکیناز در نزدیکی ژن هدف قرار دارد



شکل ۲- کلنی PCR و هضم دو آنزیمی وکتور بیانی نوترکیب. C: کنترل منفی، S1 تا S4: نتیجه کلنی PCR (۱۰۸۹ جفت باز)، M: ۱ نشانگر وزنی ۱ کیلو جفت باز و S5 و S6 محصول هضم آنزیمی. pET32a (قطعه ۵۹۰۰ جفت بازی) و *phyC* (قطعه ۱۰۸۹ جفت بازی).

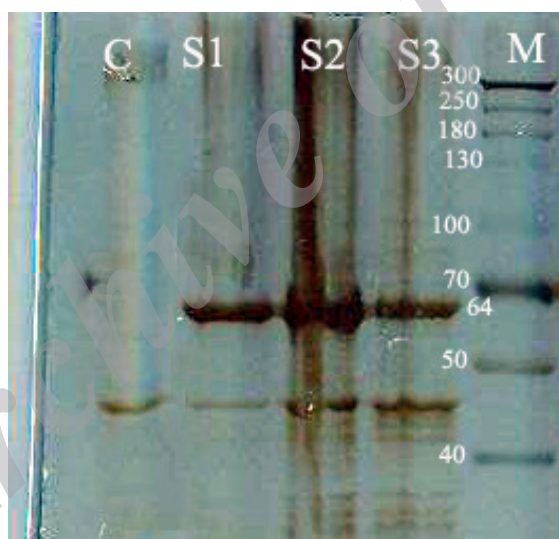
Figure 2- Electrophoresis of colony PCR and double digestion of cloning construct (pET32a with *PhyC*). C: negative control, S1-S4: Presence of *PhyC* in Vector (1089 bp), M: 1 kb DNA Ladder and S5,S6: Product of double digestion of pET32a (5900 bp, upper band), *PhyC* (lower band).

می‌گردد (Tran et al., 2010). بعد از ۵ ساعت القای بیان ژن مقدار زیادی از پروتئین نوترکیب در درون سلول تولید شد. اما بعد از ۱۶ ساعت القای بیان ژن افزایش پیدا نکرد. افزایش دمای انکوباسیون

القای بیان ژن با استفاده ۱ میلی‌مولار به خوبی صورت گرفت. ترن و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که اضافه کردن CaCl₂ در طول القای بیان ژن سبب افزایش فعالیت فیتازی

نو ترکیب و فیتاز طبیعی ناشی از توالی‌های نشانگری موجود در وکتور pET32a(+) است که به پروتئین نو ترکیب نهایی اضافه گردیده است. وزن مولکولی نشانگرهای His₆ Taq، S Taq، Trx با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench5 در حدود ۲۱ کیلودالتون تخمین زده شد. از این رو انتظار می‌رود خالص سازی پروتئین با استفاده از ستون های کروماتوگرافی تمایلی نیکل (Ni-NTA) و برش آن با آنزیم انتروکیناز سبب افزایش فعالیت آنزیمی شود.

بیشتر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش سطح بیان ژن گردید. بیشترین فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده در حضور یون کلسیم ۷/۴۴U/ml بود. وزن مولکولی آنزیم نو ترکیب تولید شده با الکتروفورز پروتئین بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد ۶۴ کیلودالتون تخمین زده شد که با برآورد انجام شده در نرم افزار CLC Workbench 5 همخوانی داشت (شکل ۳). چوی و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که وزن مولکولی آنزیم طبیعی فیتاز در حدود ۴۴ کیلودالتون می‌باشد (Choi et., al 2001). تفاوت موجود بین فیتاز



شکل ۳- الکتروفورز پروتئین فیتاز نو ترکیب تولید شده در اشرشیا کلی BL21(DE3). لاین C: کنترل منفی؛ لاین های S1 تا S3: سلول‌های اشرشیا کلی استخراج شده در زمان‌های ۱، ۳ و ۵ ساعت القا شده با IPTG ۱ میلی مولار؛ M: نشانگر وزن مولکولی.

Figure 3- SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the recombinant phytase in *E. coli* BL21 (DE3). Lane C, negative control; lane S1, S2, S3 cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1, 3, and 5 h after 1 mM IPTG induction and lane M, molecular mass markers.

آنالیز بلاتینگ

آنتی‌بادی اولیه آنتی His استفاده گردید. حضور نقاط رنگی بر روی کاغذ نیتروسولوز نشان داد که پروتئین نوترکیب در باکتری حامل پلاسمید طراحی شده با موفقیت بیان شده است.

روش دات بلات روش مناسبی است که مشکلات انتقال در وسترن بلات را حذف می‌کند. محلول رویی در زمان‌های ۱، ۳ و ۵ لود شده و به منظور تایید پروتئین نوترکیب تولید شده از



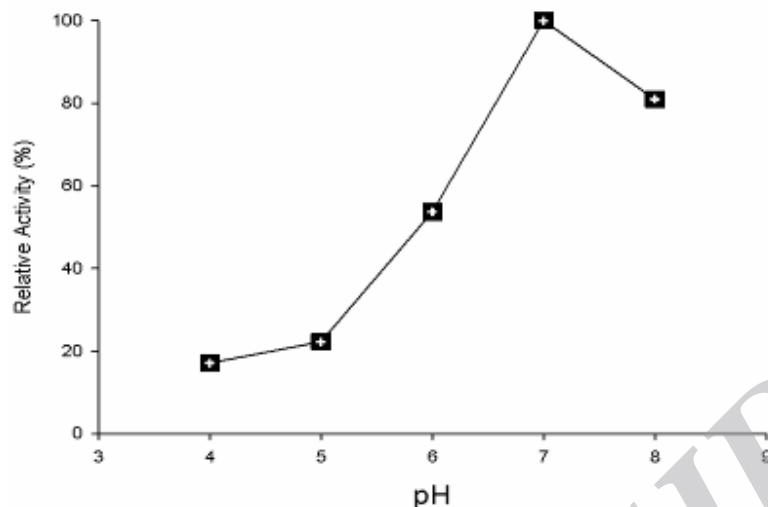
شکل ۴- آنالیز دات بلات پروتئین نوترکیب بیان شده در *اشرشیا کلی* BL21(DE3). ستون S1، S2 و S3 عصاره سلولی *اشرشیا کلی* BL21(DE3) نوترکیب کشت داده شده در زمان‌های ۱، ۳ و ۵ ساعت بعد از القا با IPTG ۱ میلی مولار.

Figure 4- Dot blot analysis of the phytase protein expressed in *E. Coli* BL21(DE3). Lane S1, S2, S3 cell extracts from *E. coli* BL21 (DE3) cultured for 1, 3, and 5 h after 1 mM IPTG induction.

اثر pH بر روی فعالیت آنزیمی

نتایج این بررسی نشان داد که pH بهینه جهت فعالیت آنزیم فیتاز بدست آمده از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* ATCC12711 در دامنه pH ۶ تا ۸/۵ قرار دارد و بیشترین فعالیت آن در pH=۷ بود (شکل ۵).

اثر دامنه‌های مختلف pH بر روی فیتاز قلیایی طبیعی توسط کراوو و همکاران تعیین شد (Kerovuo *et al.*, 1998). آن‌ها گزارش کردند که pH بهینه برای فعالیت آنزیم فیتاز قلیایی ۷ می‌باشد.



شکل ۵- فعالیت فیتاز بیان شده در دامنه‌های مختلف pH.

Figure 5- The activity of expressed phytase was determined at different pH.

باکتری باسیلوس سابیتیلیس نسبت به حرارت پایدارتر می‌باشد. متأسفانه فعالیت فیتاز آنزیم‌های قلیایی نسبت به آنزیم‌های اسیدی کمتر می‌باشد که ضرورت انجام کارهای تحقیقاتی بیشتر بر روی این دسته از آنزیم‌ها را ایجاب می‌کند.

فعالیت فیتاز تولید شده در این مطالعه، مانند اکثر فیتازهای تولید شده در جنس باسیلوس در pH=۷ بهینه بود. فیتات هضم نشده در روده کوچک اثر منفی بر جذب مواد معدنی دارد. انتظار می‌رود تنها فیتازهای قلیایی برای هضم فیتات در روده کوچک مفید باشند. فیتازهای قلیایی دارای بیشترین فعالیت در دامنه pH ۶ تا ۹ در حضور یون کلسیم هستند (Choi et al., 2001). حضور یون کلسیم با غلظت ۲ تا ۵ میلی‌مولار برای فعالیت آنزیم فیتاز قلیایی ضروری است. در حضور کلریدکلسیم ۵ میلی‌مولار در pH=۷، حدود ۴۰

بحث

فیتازهای مورد استفاده در جیره حیوانات اهلی بایستی در برابر حرارت، فرآیندهای آماده‌سازی و انبار مقاوم باشد. همچنین، هزینه پایین تولید و موثر بودن در آزادسازی فسفر در روده باریک از دیگر ویژگی‌های مهم آنزیم‌های هیدرولیزی محسوب می‌شود. مقاومت حرارتی فیتاز تولید شده از جنس باسیلوس در دامنه ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است. از این رو تحقیقات گسترده‌ای برای تولید آنزیم فیتاز از باکتری باسیلوس سابیتیلیس صورت گرفته است (Kim et al., 1998، Tran et al., 2010). در مقایسه با فیتازهای تجاری تولید شده توسط اسپرئیلوس نایجر و اشرشیا کلی، آنزیم نوترکیب تولید شده توسط

دارای مزیت‌های خاصی جهت استفاده در صنعت خوراک حیوانات اهلی است (Kim *et al.*, 1998; Tran *et al.*, 2010; Olazaran *et al.*, 2010). همچنین می‌توان از این آنزیم در صنعت داروسازی استفاده کرد (Kerovuo *et al.*, 1998). با توجه به اینکه این اولین گزارش رسمی تولید آنزیم نو ترکیب فعال فیتاز در ایران بوده، آنزیم فیتاز قلیایی تولید شده در باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در این مطالعه با شماره دسترسی ۷۶۱۱۱ در اداره ثبت مالکیت صنعتی به عنوان اختراع ثبت گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پروژه پژوهشی به شماره ۱۰۰۳۱۵ مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد که بدین وسیله از آن معاونت محترم تقدیر و تشکر می‌گردد. تصویب این پروژه از محل حمایت‌های مالی ستاد سلول های بنیادی می‌باشد که مراتب تشکر و قدردانی را از آن ستاد محترم داریم. پروژه در آزمایشگاه‌های دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفته و بدین ترتیب از مسئولان مربوطه کمال تشکر را داریم.

درصد از فعالیت آنزیمی بعد از ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است (Tran *et al.*, 2010). فیتاز US417 در غیاب یون کلسیم پایدار و در ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعال بوده است (Farhat *et al.*, 2008). همچنین این گروه گزارش کردند که اسید آمینه پرولین در موقعیت ۲۵۷ در پایداری حرارتی آنزیم فیتاز تاثیرگذار است. در بیان ژن فیتاز *باسیلوس سابتیلیس* در مخمر *پیشیا پاستوریس*، فعالیت آنزیمی در حضور $CaCl_2$ ۵ میلی‌مولار و $pH=5/5$ در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه مشاهده شد (Olazaran *et al.*, 2010). به منظور استفاده از وکتور بیانی pET در تولید نیمه صنعتی آنزیم‌ها، استفاده از لاکتوز به جای IPTG پیشنهاد شده است. گزارش‌ها نشان می‌دهد که بیشترین میزان القای بیان بعد از ۴ ساعت با لاکتوز بدست می‌آید (Olazaran *et al.*, 2010). تاخیر در تولید آنزیم هنگام استفاده از لاکتوز به جای IPTG می‌تواند ناشی از فرآیند تبدیل لاکتوز به آلولاکتوز باشد (Tran *et al.*, 2010).

نتایج این مطالعه همانند دیگر تحقیقات در زمینه تولید فیتاز قلیایی از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* نشان داد که ژن *phyC* در مقایسه با فیتازهای تجاری *آسپرژیلوس نایجر* و *اشرشیا کلی*

منابع

Ariannejad H, Nassiri M R, Aslaminejad A, Tahmoorespour M, Valizadeh R, Asoodeh A, Ghovvati S (2012). Cloning, nucleotide characterization and modeling expression of phytase gene *PhyC* from *Bacillus subtilis*. Journal of Agriculture Biotechnology (In Farsi) 7: 19-33.

- Bae H D, Yanke L J, Cheng KJ, Selinger LB (1999). A novel staining method for detecting phytase activity. *Journal of Microbiological Methods* 39: 17–22.
- Cheryan M (1980). Phytic acid interaction in food systems. *CRC critical reviews in food science and nutrition* 13:297–335.
- Choi Y M, Suh HJ, Kim JM (2001). Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry* 20:287–292
- Craxton A, Caffrey JJ, Burkhart W, Safrany ST, Shears SB (1997). Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochemical Journal*. 328: 75-81.
- Dvorakova J, Volfova O, Kopecky J (1997). Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica* 42: 349-352.
- Farhat A, Chouayekh H, Farhat MB, Bouchaala K, Bejar S (2008). Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. *Molecular Biotechnology* 40:127–135.
- Gibson DM, Ullah AHJ (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 260: 503-513.
- Greiner R, Konietzny U, Jany KD (1993). Purification and characterization of twophytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303: 107-113.
- Gulati HK, Chadha BS, Saini HS (2007). Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34:91–98.
- Hara A, Ebina S, Kondo A, Funagua T (1985) A new type of phytase from *Typha latifolia*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49:3539–3544.
- Harland BF, Morris ER (1995) Phytate: A good or a bad food component? *Nutrition Research* 15:733–737.
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J (1998) Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2079–2085.
- Lavallie E R, Diblasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel P F, McCoy JM (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Nature Biotechnology* 11, 187–193.
- Liu QQ, Li QF, Jiang L, Zhang DJ, Wang HM, Gu MH, Yao QH (2006). Transgenic Expression of the Recombinant Phytase in Rice (*Oryza sativa*). *Rice Science* 13: 79-84.
- Nasi M (1990). Microbial phytase supplementation for improving availability of plants phosphorus in the diets of growing pigs. *Journal of Agricultural Science* 62: 435-442.
- Oh BC, Choi WC, Park S, Kim YO, Oh TK (2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 362–372.
- Olazaran MG, Blanco LR, Trevin JGC, Lopez JAG, Salvado JMV (2010). Expression of a bacillus phytase c gene in *Pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. *applied and environmental. Microbiology* 76: 5601–5608.
- Pasamontes L, Haiker M, Henriquez-Huecas M, Mitchell DB, van Loon APGP (1997). Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1353: 217-223.
- Powar VK, Jagannathan V (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 151: 1102–1108.

- Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989). Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Scott JJ, Loewus FA (1986). A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. Plant Physiology 82:333–335.
- Shimizu M (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (nato) N-77. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 56:1266–1269.
- Tran TT, Mamo G, Mattiasson B, Hatti-Kaul R (2010). A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 37: 279–287.
- Tye AJ, Siu FK, Leung TY, Lim BL (2002). Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. Applied Microbiology and Biotechnology 59:190–197.
- Van der Klis JD, Versteegh HA, Simons PC, Kies AK (1997) The efficacy of phytase in corn-soybean meal-based diets for laying hens. Poultry Science 76:1535–1542.
- Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, van Loon APGP (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphorhydrolases): catalytic properties. Applied and Environmental Microbiology 65:367–373.
- Yamabhai M, Buranabanyat B, Jaruseranee N, Songsirithigul C (2011). Efficient *Escherichia coli* expression systems for the production of recombinant β -mannanases and other bacterial extracellular enzymes. Bioengineered Bugs 2: 45-49.

Cloning, over Expression and Characterization of Alkaline Phytase Enzyme in *Escherichia Coli*

Ariannejad H.¹, Nassiri M.R.^{*2,3}, Aslaminejad A.⁴, Asoodeh A.⁵, Dehghani H.⁶

¹MSc Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

²Associate Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

³Associate Professor, Department of Agricultural and Animal Biotechnology, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

⁴Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

⁵Assistant Professor, Faculty of Science, Biochemistry Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

⁶Associate Professor, Faculty of Veterinary, Department of Animal Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

Phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate) is the hydrolysis enzyme of phytic acid that produces inorganic phosphate. The gene *phyC* encoding phytase was isolated from *Bacillus subtilis* ATCC12711 genomic library and sequenced. The nucleotide sequence of the phytase gene contained an open reading frame of 1089 bp, which codes for 90 bp signal peptide and a mature protein with a deduced molecular mass of 42 kDa. Target gene was inserted in pET32a (+) as expression vector and transformed to *Escherichia coli* BL21 (DE3) as host expression. The fusion phytase *phyC*-Trx gene was successfully overexpressed in *E. coli* as an active and cytoplasmic phytase. Recombinant protein production was induced with 1mM IPTG in shaking flasks at 30°C in presence of 10 mM calcium. Samples were taken at 0-5 h after induction by 1 hour time intervals, and then protein electrophoresis was done. *phyC*-Trx protein was expressed in the cytoplasm of *E. coli* successfully. Molecular weight of recombinant phytase was estimated about 64 kDa. Phytase activity was 7.44 U/ml with using standard phosphates method. Optimum pH for the degradation of phytate was 7. The results of current study showed that thermal stability and cost effective production make this enzyme attractive for using in feed supplements.

Keywords: *Phytase, Phytic acid, Overexpression, Bacillus subtilis.*

* Corresponding Author: Nassiri M.R.

Tel: 05118795618

Email: nassiry@gmail.com