

کلونینگ آنزیم فیتاز پنیوفورا لایسی حاوی برچسب هیستیدین در مخمر

محمدتقی برجیان بروجنی^{۱*}، سیدامیدرعنایی سیادت^۲، شیرین یوسفیان^۱، فرناز نیکزاد جمنانی^{۱،۳}

^۱ کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

^۲ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

^۳ کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: فیتیک اسید، یکی از ترکیبات معدنی بسیار مهمی است که در درون گیاهان ذخیره می شود. فیتاز (E.C. 3.1.3.8) یا (E.C. 3.1.3.26) به صورت گسترده ای به عنوان یک افزودنی جهت افزایش جذب فسفر و سایر عناصر در حیوانات تکمعه ای به غذای آن ها اضافه شده و بدین ترتیب سبب کاهش دفع فسفات به داخل محیط می گردد. در این تحقیق، کلونینگ و افزودن برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به ژن نوترکیب فیتاز در باکتری اشرشیاکلی و سپس مخمر، به منظور خالص سازی آنزیم تولید شده در مقادیر بالا در این میزبان، انجام شد.

مواد و روش ها: توالی پروتئینی آنزیم فیتاز قارچ *P. lycii* از بانک های اطلاعاتی پروتئین استخراج شده و با توجه به ترجیح کدنی مخمر، توالی ژن طراحی و سنتز گردید. با طراحی پرایمرهای مناسب توالی حاوی شش هیستیدین به ژن مورد نظر داخل حامل دوگانه pFPMTMF اضافه شده و در نهایت با استفاده از الکتروپوریشن به داخل مخمر انتقال یافت.

یافته ها: سازه ی نوترکیب حاوی ژن فیتاز به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین تولید شد. حضور ژن در داخل باکتری و مخمر با استفاده از روش های هضم آنزیمی و PCR تایید گردید.

نتیجه گیری: کلونینگ موفق ژن فیتاز قارچی حاوی برچسب شش هیستیدین، در باکتری اشرشیاکلی و مخمر به منظور بیان بالا و سپس خالص سازی این آنزیم، انجام شد.

کلمات کلیدی: فیتیک اسید، فیتاز، برچسب هیستیدین، کلونینگ، مخمر

مقدمه

(۹، ۲۰). فیتات های تجزیه نشده، نه تنها سبب کاهش کیفیت مواد غذایی شده بلکه سبب آلودگی های زیست محیطی نیز می شوند (۹). فیتاز (ميو-اينوزيتول هگزوفسفات فسفوهیدرولاز؛ E.C. ۳.۱.۳.۸ یا E.C. ۳.۱.۳.۲۶) آنزیمی است که توانایی تجزیه ی فیتیک اسید به ميو-اينوزيتول هایی با مقدار فسفر کمتر و فسفر معدنی را دارا می باشد (۹)؛ بنابراین از این آنزیم به صورت گسترده ای در غذاهای حیوانات استفاده می شود (۹، ۲۰). آنزیم های فیتاز همچنین به عنوان یک مکمل برای افزایش جذب آهن در انسان، به عنوان یک مکمل در غذای ماهی کاربرد دارد. این آنزیم ها، همچنین در صنعت نانوائی، صنایع غذایی و جداسازی پروتئین های گیاهی نیز کاربرد دارند (۱۱، ۱۴، ۲۸). چهار کلاس از آنزیم های تجزیه کننده ی فسفر که تا به حال گزارش شده اند عبارتند از: هیستیدین اسید فسفاتازها (HAP)، سیستئین فیتازها (CPhy)، اسیدفسفاتازهای ارغوانی (PAP)

فیتات (ميو-اينوزيتول هگزافسفات) که فرم اصلی ذخیره ی فسفر در دانه های غلات، حبوبات، دانه ی گرده و دانه های روغنی است (۲۸، ۲۰)، به علت اتصال به مواد مغذی، آمینواسیدها و چربی ها، سبب عدم جذب آن ها شده و همچنین با اتصال به پروتئین ها، سبب جلوگیری از عملکرد صحیح آن ها در داخل غذای حیوانات می گردد (۱۶، ۹). حیوانات تکمعه ای مانند ماکیان و خوک به علت نداشتن آنزیم فیتاز، توانایی تجزیه ی این ماده را نداشته و بدین ترتیب مقدار زیادی از فسفر به همراه سایر مواد معدنی و غیره از بدن این جانوران دفع می گردد

آدرس نویسنده مسئول: آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

E-mail: mtborjian@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۳۰

و بتا-پروپیل فیتازها (BPP)؛ اما اکثر فیتازهایی که با فعالیت تخصصی بالا و ویژگی‌های کاتالیتیکی مناسب گزارش شده‌اند، متعلق به خانواده‌ی هیستیدین اسید فیتازها می‌باشند (۱، ۱۴، ۲۸). اکثر فیتازهای شناخته شده از این گروه بر اساس موقعیت اولین گروه فسفومونواستری که از فیتات جدا می‌کنند، در یکی از دو گروه ۳-فیتاز و یا ۶-فیتاز (به ترتیب E.C. 3.1.3.26 و E.C. 3.1.3.8) قرار می‌گیرند (۲۲، ۲۸). توالی ژن فیتاز جدا شده از گونه‌ی *Peniophora lycii* با طول ۱۲۳۰ bp دارای فعالیت تخصصی ۱۰۸۰ U/mg، تمایل بالا نسبت به فیتات، مقاومت بالا در دستگاه گوارش حیوانات مصرف کننده و همچنین مقاومت دمایی بالا (پس از گذشت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد مقدار ۶۲٪ از فعالیت آنزیم باقی می‌ماند) می‌باشد (۱۸، ۲۳، ۲۹، ۳۰، ۳۱)؛ اما به علت سطح پایین تولید آنزیم در میزبان اولیه نمی‌توان از این میزبان برای تولید آنزیم در مقیاس صنعتی استفاده کرد. مخمرها موجودات تک سلولی ساده‌ای بوده که دارای توانایی رشد در محیط‌های ساده، سرعت رشد بالا، توانایی ترشح پروتئین به خارج از سلول، تحمل غلظت‌های بسیار بالای سلولی، توانایی تکثیر پلاسמיד در داخل خود و مقاومت دمایی نسبتاً بالایی می‌باشد (۶، ۷، ۱۲، ۲۱). در صنعت، یکی از پرهزینه‌ترین مراحل تولید آنزیم، خالص سازی آن‌ها پس از تولید در میزبان‌های جدید می‌باشد. روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی آنزیم‌ها پس از تولید تولید مورد استفاده قرار گرفته که از مهم ترین آن‌ها می‌توان به خالص سازی با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی با ابرارهای HPLC و یا FPLC، کروماتوگرافی تمایلی، استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و یا پلی‌کلونال، استفاده از اولترا سانتریفیوژ و غیره، اشاره کرد (۳، ۱۱، ۱۷، ۱۸، ۲۴). یکی از بهترین روش‌ها که امروزه برای خالص‌سازی آنزیم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی با ابرارهای HPLC و یا FPLC برای دستیابی به آنزیم‌هایی با درجه خلوص بالا، می‌باشد (۲). با اضافه کردن برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به توالی‌های پروتئین نه تنها می‌توان پروتئین‌ها را با استفاده از آنتی-هیستیدین جداسازی کرد بلکه می‌توان آن‌ها را با استفاده از ستون نیکل به راحتی و با خلوص بالا، خالص‌سازی کرد (۵، ۲۵).

در این مطالعه، سازه‌ی نو ترکیب حاوی ژن فیتاز *P. lycii* به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین، جهت دستیابی به سطح بالایی از پروتئین فیتاز خالص پس از بیان پروتئین در مخمر، با استفاده از تکنیک الکتروپوریشن به داخل مخمر انتقال یافت. توالی ژن فیتاز *P. lycii* جهت دستیابی به حداکثر سطح تولید آنزیم، بر طبق ترجیح کدنی مخمر، بهینه‌سازی شده و سپس به میزبان بیانی انتقال داده شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی، آنزیم، پلاسמיד، سویه باکتری

آنزیم‌های محدودگر *EcoRI*، *HindIII* و *BamHI*، آنزیم DNA پلی‌مراز Taq، Max-tag، تمام مواد به کار رفته در واکنش PCR، T4 DNA لیگاز، حامل PTG19-T و کیت استخراج پلاسמיד از شرکت Vivantis خریداری شده و طبق شرایط توصیه شده استفاده گردید. سویه‌ی باکتری مورد استفاده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک خریداری شد که مشخصات آن در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- سویه ی باکتری مورد استفاده در این تحقیق

منبع	خصوصیات	سویه
Invitrogen Life Technologies	F- Φ80dlacZΔM15 endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK ⁻ mK ⁺) relA1 deoR Δ supE44 (lacZYA-argF) U169	اشرشیاکلی DH _{5α} NCTC

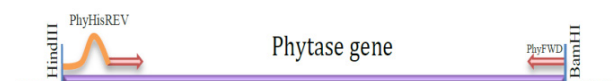
پلاسמיד مورد استفاده: حامل PUC57 برای انجام کلونینگ اولیه در باکتری و حامل دوگانه ی pFPMTMFα در این آزمایش استفاده گردید.

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها: از محیط های LB و LB-Agar حاوی ۰.۵ میکروگرم بر میلیلیتر آنتی بیوتیک جهت کلونینگ باکتریایی و محیط‌های YPD و YPD-Agar برای کشت مخمر استفاده گردید. آمپیسیلین مورد استفاده به عنوان آنتی بیوتیک از شرکت سیگما خریداری شد.

سنتز ژن: توالی پروتئینی آنزیم فیتاز قارچ *P. lycii* (GenBank: CAC48195.1) از بانک های اطلاعاتی پروتئین استخراج و با توجه به ترجیح کدنی مخمر بیانی، توالی ژن طراحی شده و برای سنتز به شرکت ShineGene Molocolar Biotech چین

فرستاده شد. شرکت مذکور پیش از سنتز توالی فیتاز، با استفاده از نرم افزار GeneOptimizer اقدام به بهینه سازی آن از نظر محتوای GC، ساختارهای ثانویه ی mRNA ژن و همچنین تشکیل لوپ در ساختار آن، نمود. پس از بررسی کمی و کیفی در مورد صحت سنتز، هر یک از ژن های مورد نظر به صورت کلون شده در حامل PUC57 بین دو جایگاه برش *EcoRI* و *BamHI* به آزمایشگاه تحویل داده شد. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین به عنوان مارکر انتخابی می باشد.

طراحی پرایمرها: پرایمرهای بالادست و پایین دست با استفاده از نرم افزار اولیگو ۷، طراحی و توسط شرکت سیناکلون سنتز شد (جدول ۲). این دو پرایمر برای افزودن برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین به ژن نوترکیب فیتاز طراحی گردید (شکل ۱). برای ساختن این سازه ی نوترکیب در شرایط آزمایشگاهی، واکنش Touchdown-PCR انجام شد (۱۵).



شکل ۱- ساختار شماتیک اضافه کردن برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین به ژن نوترکیب فیتاز. توالی ژن فیتاز بهینه شده بین دو جایگاه برش *EcoRI* و *BamHI* قرار گرفت.

لیگاسیون توالی حاوی توالی فیتاز به همراه برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین به درون باکتری اشرشیاکلی
پس از انجام مراحل Touchdown-PCR، برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین به انتهای توالی فیتاز اضافه شده و پس از انجام لیگاسیون، سازه ی ساخته شده به داخل حامل PTG19-T که در ابتدا و انتهای خود حاوی نوکلئوتیدهای A و T است، انتقال یافت (۱۵).

کلونینگ سازه ی طراحی شده در باکتری اشرشیاکلی

پس از تهیه ی سلول های مستعد باکتری (۲۴)، محصول لیگاسیون با استفاده از روش شوک حرارتی به درون سلول های باکتری انتقال یافت. در طی این روش، سلول های مستعد باکتری را برای ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده؛ سپس آن ها را برای ۲ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و دوباره آن ها را به روی یخ انتقال داده شدند. باکتری ها در محیط LB حاوی ۰.۵٪ عصاره ی مخمر، ۱٪ تریپتون و ۱٪ سدیم کلرید، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شیکرانکوباتور با دور ۳۰۰ دور بر دقیقه رشد داده شد و بدین

ترتیب مقدار زیادی از پلاسمید به دست آمد. پس از انتقال باکتری های ترانسفورم شده بر روی پلیت های حاوی IPTG، X-gal، به علت وجود ماده ی X-gal در داخل این پلیت ها، پس از فعال شدن این آنزیم در اثر حضور IPTG، کلنی های حاوی حامل تنها به رنگ آبی و کلنی های حاوی سازه ی ساخته شده به رنگ سفید مشاهده می شوند (۱۰، ۳۲). برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز (Touchdown-PCR)، پرایمر بالا دست (۱۰ pmol/μl) و پرایمر پایین دست (۱۰ pmol/μl)، بافر Max-PCR، 10X PCR، 1mM dNTPs، 50mM Mgso₄ و آنزیم tag استفاده شد. PCR دو مرحله ای به شکل زیر انجام شد: ۹۵ به مدت ۳ دقیقه (۱ چرخه)، در مرحله ی اول ۹۵ °C به مدت ۰.۵ دقیقه، ۵۳ °C به مدت ۰.۵ دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۱.۵ دقیقه (۵ چرخه) و در مرحله ی دوم ۹۵ °C به مدت ۰.۵ دقیقه، ۶۰ °C به مدت ۰.۵ دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۱.۵ دقیقه (۲۵ چرخه)، ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه (۱ چرخه).

انتقال سازه ی طراحی شده حاوی توالی فیتاز به داخل حامل دوگانه ی pFPMTMFα

پس از استخراج پلاسمیدهای PTG19-T که حاوی توالی فیتاز ساخته شده از روی ژل آگارز بودند، تمام مراحل کلونینگ همانند انتقال حامل PTG19-T به باکتری اشرشیاکلی انجام و باکتری های تراریخت شده بر روی پلیت های انتخابی حاوی آمپی سیلین گزینش شدند.

لیگاسیون و کلونینگ سازه ی طراحی شده در باکتری اشرشیاکلی

پس از برش سازه ساخته شده در حامل PTG19-T با استفاده از آنزیم های برشی *HindIII* و *BamHI*، این سازه به داخل حامل دوگانه ی pFPMTMFα که آن هم با استفاده از همین دو آنزیم برش یافته بود، انتقال یافته و سپس همانند حامل PTG19-T، در داخل باکتری های مستعد اشرشیاکلی کلون شد.

تهیه ی سلول مستعد مخمر

مقداری از استوک مخمر را در حجم ۱۰ میلی لیتر از محیط YPD حاوی ۱٪ عصاره ی مخمر، ۲٪ پیتون و ۲٪ گلوکز، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۲۷۰ دور بر دقیقه در داخل فالکون برای مدت یک شبانه روز انکوبه شد. از این کشت برای تلقیح ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت YPD مایع در ارلن یک

لیتری استفاده گردید. پس از گذشت ۱۴ ساعت در شرایط فوق، OD₆₀₀ کشت مخمر به ۰,۹۵ رسید. از این کشت برای تهیه سلول های مستعد و انجام الکتروپوریشن استفاده شد.

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و توالی آن ها

نام	توالی	توضیحات
PhyFWD	5'GAATTCATGAGATTCCCATCTATCTTCACTG 3'	پرایمر بالادست ژن فیتاز
PhyHisREV	5'GGATCCCTACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTTCAGATGGAAC 3'	پرایمر پایین دست ژن فیتاز

۳۷ درجه قرار داده شدند (۶، ۸، ۱۲).

یافته ها

اثبات کلونینگ سازی ساخته شده در حامل PTG19-T

در باکتری/اشرشیاکلی با استفاده از روش PCR

توالی فیتاز به همراه برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین پس از انتقال به حامل PTG19-T با انجام روش PCR و با پرایمرهای طراحی شده، بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید شد (شکل ۲).

اثبات کلونینگ سازی ساخته شده در حامل PTG19-T

در باکتری/اشرشیاکلی با استفاده از روش هضم دو آنزیمی

توالی فیتاز به همراه برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین اضافه شده به انتهای آن پس از انتقال به حامل PTG19-T با استفاده از آنزیم های محدودگر *EcoRI*، *HindIII* و *BamHI* که به ترتیب ابتدای ژن، ناحیه ای در اوایل ژن و انتهای ژن را برش می دهند، بریده شده و مقداری از آن بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد (شکل ۳).

اثبات کلونینگ سازی ساخته شده در حامل دوگانه ای

pFPMTMFα در باکتری/اشرشیاکلی با استفاده از روش

PCR

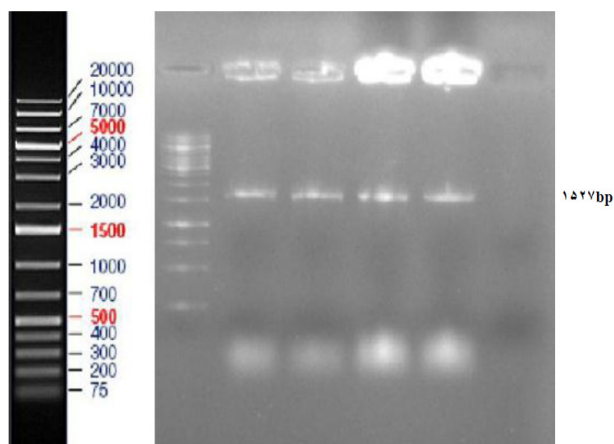
توالی فیتاز به همراه برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین پس از انتقال حامل دوگانه ای pFPMTMFα با انجام روش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید گردید (شکل ۴).

انتقال حامل دوگانه ای pFPMTMFα حاوی سازی

نوترکیب ساخته شده به مخمر با استفاده از روش الکتروپوریشن

محیط کشت تهیه شده با دور ۲۷۰ دور بر دقیقه برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب تشکیل شده در ۴۰ میلی لیتر از بافر پتاسیم فسفات گرم (۵۰ میلی مولار) (pH=۷,۵)، حل گردید؛ سپس مقدار ۱ میلی لیتر از DTT (۱ مولار) به آن اضافه شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد (بدون حرکت) قرار داده شد. دوباره نمونه ها سانتریفیوژ شده و این بار، رسوب در ۲۰۰ میلی لیتر از بافر SDM حل گردید. در نهایت نیز پس از سانتریفیوژ سلول ها، رسوب تشکیل شده در ۱ میلی لیتر از بافر SDM حل گردید و مقدار ۸۰ میکرولیتر از آن در داخل ویال های استریل تقسیم شده تا از آن ها در دمای ۸۰- نگهداری شود (۶، ۱۲). پس از گذشت حداقل ۳ ساعت، مقدار ۲۰۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم از سازی نوترکیب حاوی ژن فیتاز *P. lypii* به همراه برجسب شش آمینواسیدی هیستیدین به سلول های مستعد اضافه گردیده و با تنظیمات، ۲ kV برای ولتاژ وارده، ۲۵ μF برای خازن و ۲۰۰ Ω برای مقاومت، الکتروپوریت شدند. سپس به سرعت ۱ میلی لیتر از محیط کشت YPD به کوت ها اضافه شده، کل مخلوط به یک فالدون کاملاً استریل منتقل گردیده و سلول ها برای مدت ۱ ساعت در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند تا مجدداً بازیابی شوند. پس از سانتریفیوژ فالدون ها با دور ۱۵۰۰ دور بر دقیقه برای ۲ دقیقه، رسوب تشکیل شده در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل و پس از تکرار مرحله ی فوق در ۲۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل حل گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در محیط کشت انتخابی پخش شد. پلیت ها برای مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای

*Bam*HI که به ترتیب ابتدا و انتهای ژن را برش می‌دهند، بریده شده و مقداری از آن برای اثبات برش، بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد (شکل ۵).



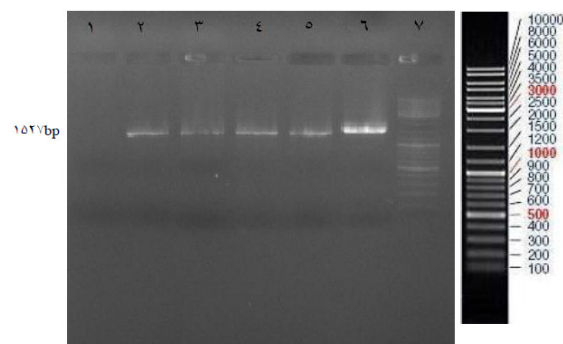
شکل ۴- ژل آگارز نشان‌دهنده تایید کلونینگ توالی نوترکیب فیتاز به همراه توالی شش آمینواسیدی هیستیدین با استفاده از روش PCR در حامل *pFPMTMFα*. چاهک شماره ۱. نشانگر *GeneRuler™* #SM 0331. چاهک‌های شماره ۲-۵ حاوی *PhyHis* با طول ۱۵۲۷ bp.

ترانسفورماسیون سلول‌های مخمر: پس از انتقال ژن با استفاده از روش الکتروپوریشن به داخل مخمر، تعداد بیش از ۱۰۰ کلون به ازای هر پلیت انتخابی به دست آمد.

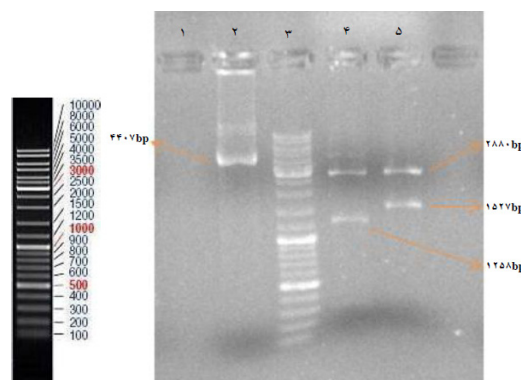
تایید ترانسفورماسیون سلول‌های مخمر: سازه‌ی طراحی شده حاوی توالی فیتاز به همراه برجسب شش آمینواسیدی هیستیدینی اضافه شده به انتهای آن در حامل دوگانه‌ی *pFPMTMFα* پس از انتقال از طریق الکتروپوریشن به داخل سلول‌های مخمر با استفاده از روش کلنی PCR با پرایمرهای طراحی شده، بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید شد (شکل ۶).

بحث

با توجه به افزایش روز افزون مصرف مرغ و ماهی در ایران و دنیا، مشکلات ناشی از حضور فیتات در دستگاه گوارش جانوران تک‌معدده‌ای، پرهزینه بودن تولید فسفر به روش صنعتی و همچنین آلودگی‌های ناشی از استفاده‌ی فسفر به عنوان مکمل‌های دامی بر روی آب‌های زیر زمینی، استفاده از یک آنزیم مناسب به عنوان مکمل در جیره‌ی غذایی این حیوانات



شکل ۲- ژل آگارز نشان‌دهنده تایید کلونینگ توالی نوترکیب فیتاز به همراه توالی شش آمینواسیدی هیستیدین با استفاده از روش PCR حامل *PTG19-T*. چاهک شماره ۱. کنترل منفی. چاهک‌های شماره ۲-۶ حاوی *PhyHis* با طول ۱۵۲۷ bp. چاهک شماره ۷. نشانگر *GeneRuler™* #SM 0331.

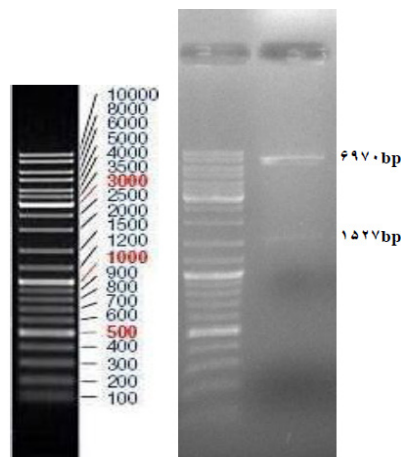


شکل ۳. ژل آگارز نشان‌دهنده تایید کلونینگ توالی نوترکیب فیتاز به همراه توالی شش آمینواسیدی هیستیدین با استفاده از روش هضم دوآنزیمی در حامل *PTG19-T*. چاهک شماره ۱. کنترل منفی. چاهک شماره ۲. حامل *PTG19-T* حاوی توالی *PhyHis*. چاهک شماره ۳. نشانگر *GeneRuler™* #SM 0331. چاهک شماره ۴. حامل نوترکیب *PTG19-T* بریده شده با آنزیم‌های محدودگر *Bam*HI و *Hind*III که نشان‌دهنده توالی‌ای با طول ۱۲۵۸ bp می‌باشد (جایگاه برش *Hind*III در ناحیه‌ای در اوایل ژن قرار دارد). چاهک شماره ۵. حامل نوترکیب *PTG19-T* بریده شده با آنزیم‌های محدودگر *Bam*HI و *Eco*RI که نشان‌دهنده توالی فیتاز با طول ۱۵۲۷ bp می‌باشد.

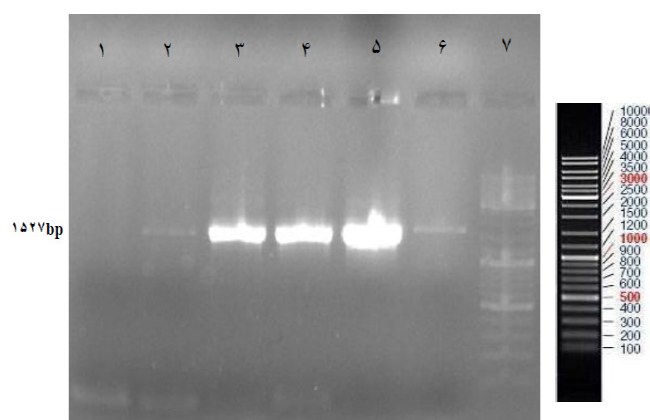
اثبات کلونینگ سازه‌ی ساخته شده در حامل دوگانه‌ی *pFPMTMFα* در باکتری/شرشیاکلی با استفاده از هضم دو آنزیمی

توالی فیتاز به همراه برجسب شش آمینواسیدی هیستیدینی اضافه شده به انتهای آن پس از انتقال به حامل دوگانه‌ی *pFPMTMFα* با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *Eco*RI و

ضروری است. با توجه به اینکه خالص سازی، پرهزینه ترین مرحله در تولید آنزیم های صنعتی است، یافتن راه حلی که بتوان با استفاده از آن با کمترین هزینه، حداقل تغییر در ساختار پروتئین و بالاترین درصد خلوص، حداکثر مقدار آنزیم را از میزبان جدید خالص سازی کرد، ضروری به نظر می رسد (۳، ۹، ۱۱، ۲۰).



شکل ۵- ژل آگارز نشان دهنده تایید کلونینگ توالی نوترکیب فیتاز به همراه توالی شش آمینواسیدی هیستیدین با استفاده از روش هضم دوآنزیمی در حامل دوگانهی α pFPMTMF. چاهک شماره ۱. نشانگر GeneRuler™ #SM 0331. چاهک شماره ۲. حامل نوترکیب α pFPMTMF بریده شده با آنزیم های محدودگر *EcoRI* و *BamHI* که نشان دهندهی توالی فیتاز با طول ۱۵۲۷ bp می باشد.



شکل ۶- ژل آگارز نشان دهندهی تایید انتقال توالی نوترکیب فیتاز به همراه توالی شش آمینواسیدی هیستیدین با استفاده از روش کلنی PCR در مخمر. چاهک شماره ۱. کنترل منفی. چاهک های شماره ۲-۵. حاوی PhyHis با طول ۱۵۲۷ bp. چاهک شماره ۶. کنترل مثبت. چاهک شماره ۷. نشانگر GeneRuler™ #SM 0331.

سیستم های بیان مخمری به علت توانایی تولید خارج از سلولی

بسیاری از آنزیم ها در سطح بالا، محیط های کشت ساده، توانایی تحمل غلظت های بالای سلولی، بیان پایدار پروتئین در داخل آن، توانایی گلیکولیزاسیون پروتئین ها و سایر تغییرات پس از ترجمه، به عنوان میزبانان مناسبی جهت بیان پروتئین های نوترکیب در مقیاس صنعتی، مطرح می باشند (۶، ۲۱). مقاومت دمایی بالا، تمایل بالا نسبت به مولکول سوبسترا (فیتیک اسید)، فعالیت مناسب در رنج pH بین ۴-۵ (مناسب برای فعالیت در درستگاه گوارش) و مقاومت بالای آنزیم فیتاز *P. lycii* در دستگاه گوارش حیوانات مصرف کننده، نشان دهندهی ارزش بالای این منبع آنزیمی جهت تولید در سطح تجاری است (۱۸، ۲۳، ۳۱). جداسازی و تعیین خصوصیات آنزیم فیتاز قارچ *P. lycii* برای اولین بار توسط لاسن و همکارانش در ۲۰۰۰ انجام شد (۱۸). آن ها اعلام کردند آنزیم فیتاز قارچ *P. lycii* مناسب برای استفاده در سطح تجاری است (۱۸)، اما به علت سطح پایین تولید آنزیم و همچنین نیاز به شرایط خاص برای القای آنزیم در این قارچ، تولید تجاری آنزیم فیتاز *P. lycii* در میزبان اولیه مقرون به صرفه نمی باشد. ژانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۶ آنزیم فیتاز سویه *P. lycii* را در میزبان بیانی *Pichia pastoris* بیان کرده و توانستند به تولید بالای ۱۲،۲ گرم بر لیتر از آنزیم فیتاز نوترکیب در مخمر *P. pastoris* برسند (۳۱)؛ اما آن ها هیچ اقدامی برای خالص سازی آنزیم پس از تولید انجام ندادند. مایر در سال ۱۹۹۸ نشان داد که مخمر *H. polymorpha* توانایی تولید آنزیم فیتاز *A. niger* را به مقدار ۱۳،۵ g/L در محیط بیانی با منبع کربن گلوکز، دارا می باشد (۲۱). با توجه به داده های به دست آمده از تحقیقات گذشته در مورد ویژگی های آنزیم فیتاز *P. lycii* (۱۸، ۳۱)، تولید بالا و نسبتا خالص آنزیم های نوترکیب در میزبان های مخمری (۲۱، ۳۱) و همچنین توجه به این نکته که استفاده از برچسب هیستیدینی سبب افزایش چشم گیری در میزان خالص سازی و همچنین کاهش مراحل خالص سازی آنزیم ها نسبت به سایر روش های خالص سازی می شود (۴، ۱۹، ۲۶، ۲۷)؛ تولید آنزیم فیتاز *P. lycii* حاوی برچسب هیستیدین در میزبان مخمری، می تواند کمک شایانی به تولید ارزان قیمت و بالای آنزیم فیتاز خالص در ایران و جهان بنماید. در این تحقیق برای اولین بار، کلونینگ موفق سازی نوترکیب حاوی توالی ژن فیتاز *P. lycii* به همراه

برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به عنوان یک روش ساده، کم هزینه و با کارایی بالا، برای خالص سازی و تولید بالای آنزیم فیتاز در میزبان مخمری، انجام شد.

تشکر و قدر دانی

تمام مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شد، که بدین وسیله از زحمات و حمایت های مالی این آزمایشگاه سپاس گذاری می شود.

- (1) Bozzo GG, Raghothama KG, Plaxton WC. Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Biochem J*, 2004;377(Pt 2):419–428.
- (2) Casey A, Walsh G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour Technol*, 2003;86(2):183–188.
- (3) Fassina G, Verdoliva A, Odierna MR, Ruvo M, Cassini G. Protein A mimetic peptide ligand for affinity purification of antibodies *J Mol Recognit*, 1996;9(5-6):564–569.
- (4) Gao J, Li Z, Russell T, Li Z. Antibody affinity purification using metallic nickel particles *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012;895-896:89–93.
- (5) Gehrmann M, Doss BT, Wagner M, et al. A novel expression and purification system for the production of enzymatic and biologically active human granzyme B *J Immunol Methods*, 2011;371(1-2):8–17.
- (6) Gellissen G ed. *Hansenula polymorpha: Biology and Applications*, 1st ed. Wiley-VCH; 2002.
- (7) Gellissen G. *Production of Recombinant Proteins*. John Wiley & Sons; 2006.
- (8) Ghareib M. Biosynthesis, purification and some properties of extracellular phytase from *Aspergillus carneus*. *Acta Microbiologica Hungarica*, 1990;37(2):159–164.
- (9) Greiner R, Konietzny U. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2):125–140.
- (10) Haefner S, Knietsch A, Scholten E, et al. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005;68(5):588–597.
- (11) Haros M, Rosell CM, Benedito C. Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread *J Agric Food Chem*, 2001;49(11):5450–5454.
- (12) Higgins DR, Cregg J eds. *Pichia Protocols*, 1st ed. Humana Press; 1998.
- (13) Kerovuo J. A Novel Phytase from *Bacillus*: Characterization and Production of the Enzyme. University of Helsinki; 2000.
- (14) Konietzny U. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science & Technology*, 2002; 37: 791–812.
- (15) Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 2008;3(9):1452–1456.
- (16) Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 2010;120(4):945–959.
- (17) Labrou NE. Dye-ligand affinity adsorbents for enzyme purification. *Mol Biotechnol*, 2002;20(1):77–84.
- (18) Lassen SF, Breinholt J, Østergaard PR, et al. Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl Environ Microbiol*, 2001;67(10):4701–4707.
- (19) Loo TW, Clarke DM. Rapid Purification of Human P-glycoprotein Mutants Expressed Transiently in HEK 293 Cells by Nickel-Chelate Chromatography and Characterization of their Drug-stimulated ATPase Activities *J Biol Chem*, 1995;270(37):21449–21452.
- (20) Lott JNA, Ockenden I, Raboy V, Batten GD. Phytic Acid and Phosphorus in Crop Seeds and Fruits: A Global Estimate. *Seed Science Research*, 2000;10(01):11–33.
- (21) Mayer AF, Hellmuth K, Schlieker H, et al. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Bioeng*, 1999;63(3):373–381.
- (22) Oh B-C, Choi W-C, Park S, Kim Y -o., Oh T-K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004;63(4):362–372.
- (23) Pontoppidan K, Pettersson D, Sandberg A-S. *Peniophora lycii* phytase is stable and degrades phytate and solubilises minerals in vitro during simulation of gastrointestinal digestion in the pig. *J Sci Food Agric*, 2007;87(14):2700–2708.
- (24) Pope B, Kent HM. High Efficiency 5 Min Transformation of *Escherichia Coli*. *Nucl. Acids Res*, 1996;24(3):536–537.
- (25) Ribeiro CW, Soares-Costa A, Falco MC, et al. Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. *Biotechnol Prog*, 2008;24(5):1060–1066.
- (26) Sriwanthana B, Island MD, Maneval D, Mobley HL. Single-step purification of *Proteus mirabilis* urease accessory protein UreE, a protein with a naturally occurring histidine tail, by nickel chelate affinity chromatography. *J Bacteriol*, 1994;176(22):6836–6841.
- (27) Tishchenko G, Dybal J, Mészárosová K, Sedláková Z, Bleha M. Purification of the specific immunoglobulin G1 by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters): Effect of polymer structure. *J Chromatography A*, 2002;954(1–2):115–126.
- (28) Turner BL, Richardson AE, Mullaney E. *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*. First. CABI; 2006.

- (29)Ullah AHJ, Sethumadhavan K. PhyA gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. *Biochem. Biophys Res Commun*, 2003;303(2):463–468.
- (30)Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004;35(1):3–14.
- (31)Xiong A-S, Yao Q-H, Peng R-H, et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006;72(5):1039–1047.
- (32)Zhao C, Hellman LM, Zhan X, et al. Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. *Anal. Biochem*, 2010;399(2):237–245.