مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره نهم، زمستان ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

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، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
[۳] کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

چکیده

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

مواد و روش‌ها: 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 pFPMTMFα اضافه شده و در نهایت با استفاده از الکتروپوریشن به داخل مخمر انتقال یافت.

یافته‌ها: سازه‌ی نوترکیب حاوی ژن فیتاز به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین تولید شد. حضور ژن در داخل باکتری و مخمر با استفاده از روش‌های 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: فیتیک‌اسید، فیتاز، برچسب هیستیدین، کلونینگ، مخمر

مقدمه

فیتات (میو-اینوزیتول هگزافسفات) که فرم اصلی ذخیره‌ی فسفر در دانه‌های غلات، حبوبات، دانه‌ی گرده و دانه‌های روغنی است (۲۸ ، ۲۰)، به علت اتصال به مواد مغذی، آمینواسیدها و چربی‌ها، سبب عدم جذب آن ها شده و همچنین با اتصال به پروتئین‌ها، سبب جلوگیری از عملکرد صحیح آن ها در داخل غذای حیوانات می‌گردد (۱۳،۱۶، ۹). حیوانات تک‌معده‌ای مانند ماکیان و خوک به علت نداشتن آنزیم فیتاز، توانایی تجزیه‌ی این ماده را نداشته و بدین ترتیب مقدار زیادی از فسفر به همراه سایر مواد معدنی و غیره از بدن این جانوران دفع می‌گردد (۹ ، ۲۰). فیتات‌های تجزیه نشده، نه تنها سبب کاهش کیفیت مواد غذایی شده بلکه سبب آلودگی‌های زیست محیطی نیز می‌شوند (۹). فیتاز (میو-اینوزیتول هگزوفسفات فسفوهیدرولاز؛ E.C. ۳.۱.۳.۸ یا E.C. ۳.۱.۳.۲۶) آنزیمی است که توانایی تجزیه‌ی فیتیک‌اسید به میو-اینوزیتول‌هایی با مقدار فسفر کمتر و فسفر معدنی را دارا می‌باشد (۹)؛ بنابراین از این آنزیم به صورت گسترده‌ای در غذاهای حیوانات استفاده می‌شود (۹ ، ۲۰). آنزیم‌های فیتاز همچنین به عنوان یک مکمل برای افزایش جذب آهن در انسان، به عنوان یک مکمل در غذای ماهی کاربرد دارد. این آنزیم‌ها، همچنین در صنعت نانوایی، صنایع غذایی و جداسازی پروتئین‌های گیاهی نیز کاربرد دارند (۱۱، ۱۴ ، ۲۸). چهار کلاس از آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی فسفر که تا به حال گزارش شده اند عبارتند از: هیستیدین اسید فسفاتازها (HAP)، سیستئین فیتازها (CPhy)، اسیدفسفاتازهای ارغوانی (PAP)

آدرس نویسنده مسئول: آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران
E-mail: mtborjian@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۳۰/ ۱۳۹۱/۰۸

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]

و بتا-پروپل 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. 3.1.3.8 و E.C. 3.1.3.26) قرار می‌گیرند (۲۲ ، ۲۸). توالی ژن فیتاز جدا شده از گونه‌ی *Peniophora lycii* با طول bp ۱۲۳۰، دارای فعالیت تخصصی U/mg ۱۰۸۰، 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 پلاسمید در داخل خود و مقاومت دمایی نسبتاً بالایی می‌باشد (۶، ۷، ۱۲ ، ۲۱). در صنعت، یکی از پرهزینه‌ترین مراحل تولید آنزیم، خالص سازی آن ها پس از تولید در میزبان های جدید می‌باشد. روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی آنزیم‌ها پس از تولید تولید مورد استفاده قرار گرفته که از مهم ترین آن ها می‌توان به خالص سازی با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی با ابزارهای HPLC و یا FPLC، کروماتوگرافی تمایلی، استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و یا پلی‌کنونال، 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 ابزارهای 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 آن ها را با استفاده از ستون نیکل به راحتی و با خلوص بالا، خالص‌سازی کرد (۵ ، ۲۵).

در این مطالعه، سازه‌ی نوترکیب 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، پلاسمید، سویه باکتری

آنزیم های 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 پلاسمید 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

سویه	خصوصیات	منبع
اشرشیاکلی $DH_3\alpha\alpha$ NCTC	F- Φ80dlacZΔM15 endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK^- mK^+) relA1 deoR Δ supE44 (lacZYA-argF) U169	Invitrogen Life Technologies

پلاسمید 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. آمپیسلین مورد استفاده به عنوان آنتی بیوتیک از شرکت سیگما خریداری شد.

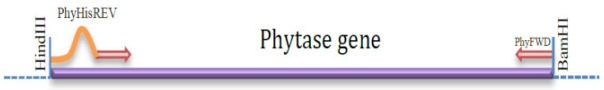
سنتز ژن: توالی پروتئینی آنزیم فیتاز قارچ *P. lycii* (GenBank: CAC48195.1) از بانک های اطلاعاتی پروتئین استخراج و با توجه به ترجیح کدنی مخمر بیانی، توالی ژن طراحی شده و برای سنتز به شرکت ShineGene Molocolar Biotec چین

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]

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 ثانویه‌ی 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 می‌باشد.

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



شکل ۱- ساختار شماتیک اضافه کردن برچسب 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 برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به درون باکتری اشرشیاکلی

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

کلونینگ سازه‌ی 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، سلول‌های 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. باکتری‌ها در محیط LB حاوی ۰٫۵٪ عصاره‌ی 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 باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی پلیت‌های حاوی IPTG,X-gal,amp، به علت وجود ماده‌ی X-gal در داخل این پلیت‌ها، پس از فعال شدن این آنزیم در اثر حضور IPTG، کلنی‌های حاوی حامل تنها به رنگ آبی و کلنی‌های حاوی سازه‌ی ساخته شده به رنگ سفید مشاهده می‌شوند (۱۰ ، ۳۲). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Touchdown-PCR)، پرایمربالا دست (۱۰ pmol/µl) و پرایمر پایین دست (۱۰ pmol/µl)، بافر 10X PCR، dNTPs(1mM)، $Mgso_4$ (50mM) و آنزیم Max-tag استفاده شد. PCR دو مرحله ای به شکل زیر انجام شد: ^0C ۹۵ به مدت ۳ دقیقه (۱ چرخه)، در مرحله ی اول ^0C ۹۵ به مدت ۰٫۵ دقیقه، ^0C ۵۳ به مدت ۰٫۵ دقیقه و ^0C ۷۲ به مدت ۱٫۵ دقیقه (۵ چرخه) و در مرحله ی دوم ^0C ۹۵ به مدت ۰٫۵ دقیقه، ^0C ۶۰ به مدت ۰٫۵ دقیقه و ^0C ۷۲ به مدت ۱٫۵ دقیقه (۲۵ چرخه)، ^0C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه (۱ چرخه).

انتقال سازه‌ی طراحی شده حاوی توالی فیتاز به داخل حامل دوگانه‌ی 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 باکتری‌های تراریخت شده بر روی پلیت‌های انتخابی حاوی آمپی‌سیلین گزینش شدند.

لیگاسیون و کلونینگ سازه‌ی طراحی شده در باکتری *اشرشیاکلی*

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

تهیه ی سلول مستعد مخمر

مقداری از استوک مخمر را در حجم ۱۰ میلی‌لیتر از محیط YPD حاوی ۱٪ عصاره‌ی مخمر، ۲٪ پپتون 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 میلی‌لیتر محیط کشت YPD مایع در ارلن یک

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]

لیتری استفاده گردید. پس از گذشت ۱۴ ساعت در شرایط فوق، OD_{600} 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'GGATCCCTACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTTCAGATGGAAC 3'	پرایمر پایین‌دست ژن فیتاز

انتقال حامل دوگانه‌ی pFPMTMFα حاوی سازه‌ی 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 میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات گرم (۵۰ میلی‌مولار) (pH=۷,۵)، حل گردید؛ سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر 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 نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و این بار، رسوب در ۲۰۰ میلی‌لیتر از بافر SDM حل گردید. در نهایت نیز پس از سانتریفیوژ سلول‌ها، رسوب تشکیل شده در ۱ میلی‌لیتر از بافر SDM حل گردید و مقدار ۸۰ میکرولیتر از آن در داخل ویال‌های 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 سازه‌ی نوترکیب حاوی ژن فیتاز *P. lycii* به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به سلول‌های مستعد اضافه گردیده و با تنظیمات، ۲ kV برای ولتاژ وارده، μF ۲۵ برای خازن و Ω ۲۰۰ برای مقاومت، الکتروپوریت شدند. سپس به سرعت ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت YPD به کوت‌ها اضافه شده، کل مخلوط به یک فالکون کاملاً استریل منتقل گردیده و سلول‌ها برای مدت ۱ ساعت در شیکرانکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند تا مجدداً بازیابی شوند. پس از سانتریفیوژ فالکون‌ها با دور ۱۵۰۰ دور بر دقیقه برای ۲ دقیقه، رسوب تشکیل شده در ۱میلی‌لیتر آب مقطر استریل و پس از تکرار مرحله‌ی فوق در ۲۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل حل گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در محیط کشت انتخابی پخش شد. پلیت‌ها برای مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شدند (۶، ۸ ، ۱۲).

یافته ها

اثبات کلونینگ سازه‌ی ساخته شده در حامل PTG19-T در باکتری *اشرشیاکلی* با استفاده از روش PCR

توالی فیتاز به همراه برچسب 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 سازه‌ی ساخته شده در حامل PTG19-T در باکتری *اشرشیاکلی* با استفاده از روش هضم دو آنزیمی

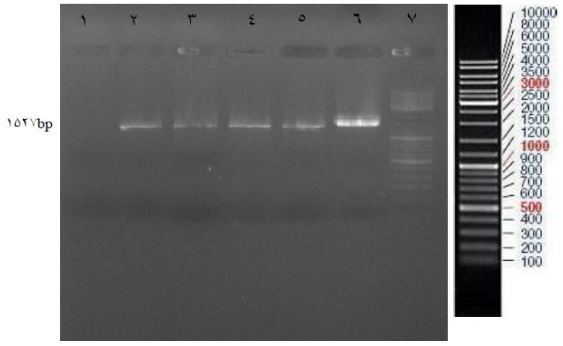
توالی فیتاز به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین اضافه شده به انتهای آن پس از انتقال به حامل PTG19-T با استفاده از آنزیم های محدودگر *EcoRI*، *HindIII* و *BamHI* که به ترتیب ابتدای ژن، ناحیه‌ای در اوایل ژن و انتهای ژن را برش می‌دهند، بریده شده و مقداری از آن بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد (شکل ۳).

اثبات کلونینگ سازه‌ی ساخته شده در حامل دوگانه‌ی pFPMTMFα در باکتری *اشرشیاکلی* با استفاده از روش PCR

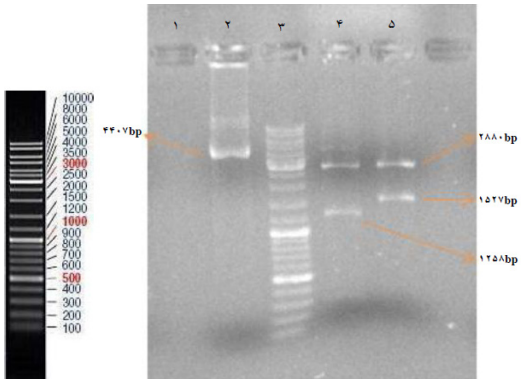
توالی فیتاز به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین پس از انتقال حامل دوگانه‌ی pFPMTMFα با انجام روش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید گردید (شکل ۴).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]



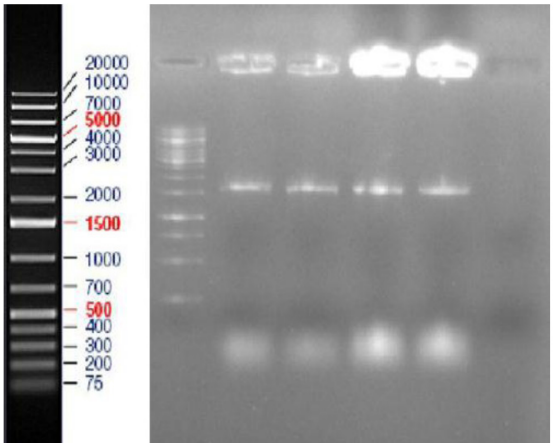
شکل ۲- ژل آگارز نشان‌دهنده‌ی تایید کلونینگ توالی نوترکیب فیتاز به همراه توالی شش آمینواسیدی هیستیدین با استفاده از روش PCR در حامل PTG19-T. چاهک شماره ۱. کنترل منفی. چاهک‌های شماره‌ی ۲-۶ حاوی PhyHis با طول bp۱۵۲۷. چاهک شماره ۷. نشانگر GeneRuler™ #SM 0331.



شکل ۳. ژل آگارز نشان‌دهنده‌ی 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 *HindIII* و *BamHI* که نشان دهنده‌ی توالی‌ای با طول bp۱۲۵۸ می‌باشد (جایگاه برش *HindIII* در ناحیه‌ای در اوایل ژن قرار دارد). چاهک شماره ۵. حامل نوترکیب PTG19-T بریده شده با آنزیم‌های محدودگر *EcoRI* و *BamHI* که نشان دهنده‌ی توالی فیتاز با طول bp ۱۵۲۷ می‌باشد.

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

توالی فیتاز به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدینی اضافه شده به انتهای آن پس از انتقال به حامل دوگانه‌ی pFPMTMFα با استفاده از آنزیم های محدودگر *EcoRI* و *BamHI* 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 نشان‌دهنده‌ی 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 شماره‌ی ۵-۲ 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 برچسب 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).

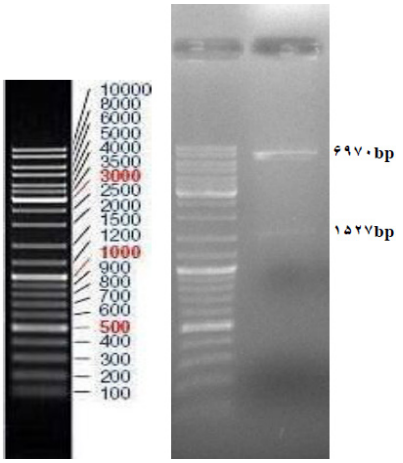
بحث

با توجه به افزایش روز افزون مصرف مرغ و ماهی در ایران و دنیا، مشکلات ناشی از حضور فیتات در دستگاه گوارش جانوران تک‌معده‌ای، پر هزینه 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

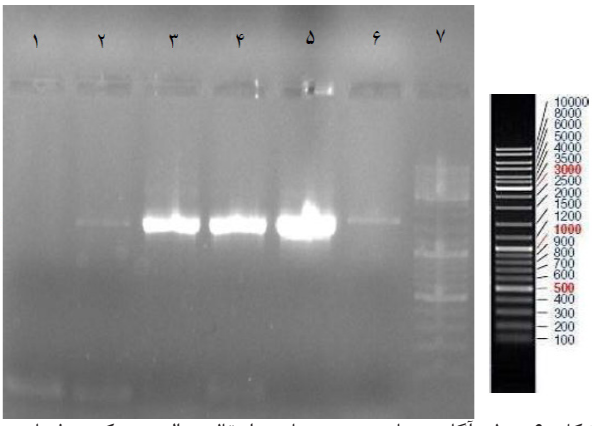
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]

ضروری است. با توجه به اینکه خالص سازی، پرهزینه‌ترین 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 خالص‌سازی کرد، ضروری به نظر می‌رسد (۳، ۹، ۱۱ ، ۲۰).



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



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

سیستم‌های بیان مخمری به علت توانایی تولید خارج از سلولی بسیاری از آنزیم‌ها در سطح بالا، محیط‌های کشت ساده، توانایی تحمل غلظت‌های بالای سلولی، بیان پایدار پروتئین در داخل آن، توانایی گلیکولیزاسیون پروتئین‌ها و سایر تغییرات پس از ترجمه، به عنوان میزبانان مناسبی جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس صنعتی، مطرح می‌باشند (۶ ، ۲۱). مقاومت دمایی بالا، تمایل بالا نسبت به مولکول سوبسترا (فیتیک‌اسید)، فعالیت مناسب در رنج pH بین ۵-۴ (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 نمی‌باشد. 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 خالص‌سازی 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 می‌باشد (۲۱). با توجه به داده‌های به دست آمده از تحقیقات گذشته در مورد ویژگی‌های آنزیم فیتاز *P. lycii* (۱۸ ، ۳۱)، تولید بالا و نسبتا خالص آنزیم‌های نوترکیب در میزبان های مخمری (۲۱ ، ۳۱) و همچنین توجه به این نکته که استفاده از برچسب هیستیدینی سبب افزایش چشم‌گیری در میزان خالص‌سازی و همچنین کاهش مراحل خالص‌سازی آنزیم‌ها نسبت به سایر روش‌های خالص‌سازی می‌شود (۴، ۱۹، ۲۶ ، ۲۷)؛ تولید آنزیم فیتاز *P. lycii* حاوی برچسب هیستیدین در میزبان مخمری، می‌تواند کمک شایانی به تولید ارزان قیمت و بالای آنزیم فیتاز خالص در ایران و جهان بنماید. در این تحقیق برای اولین بار، کلونینگ موفق سازه‌ی نوترکیب حاوی توالی ژن فیتاز *P. lycii* به همراه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]

برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به عنوان یک روش ساده، کم هزینه و با کارایی بالا، برای خالص‌سازی 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 حمایت‌های مالی این آزمایشگاه سپاس گذاری می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]

منابع

(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 Tech nol 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 Pro tocols, 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)Lott1 JNA, Ockenden I, Raboy V, Batten GD. Phytic Acid and Phosphorus in Crop Seeds and Fruits: A Global Esti mate. 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 polymer ic 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]

(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 phos phohydrolases): 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 in teractions. Anal. Biochem, 2010;399(2):237–245.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-12]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.7.1]