ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸
صفحه ۲۴۱ - ۲۳۱

مهندسی فیتاز اشرشیا کلی به‌منظور پایدارسازی حرارتی

Engineering of *Escherichia coli* phytase enzyme thermostability

زهرا رضاخانی[۱]، اردشیر حسام‌پور[۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Rezakhani Z[1], Hesampour A[*2]

1. MSc graduate, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Islamic Republic of Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Islamic Republic of Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.hesampour@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

فیتازها آنزیم‌هایی هستند که اسید فیتیک دانه‌های گیاهی را هیدرولیز و فسفات را برای حیوانات قابل دسترس می‌کنند. این امر باعث می‌شود تا فیتاز به‌عنوان افزودنی جیره غذایی دام، طیور و ماهیان کاربری فراوانی داشته باشد. افزودن فیتاز به جیره غذایی باعث حفاظت محیط زیست و ممانعت از اثرات زیان بار افزودن فسفر معدنی و پدیده Eutrophication می‌شود. کاربری وسیع فیتاز در علوم کشاورزی، دامداری و داروسازی نشان از اهمیت تولید طبیعی و نوترکیب فیتاز است. از آنجائی‌که افزودنی جیره غذایی تحت دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد مرحله Food Pelleting قرار می‌گیرد، لذا دستیابی به فیتاز پایدار در برابر حرارت هدف ایده‌ال است که با استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین می‌توان به این هدف دست یافت. در این تحقیق پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی، ژن فیتاز سنتتیک Bac phy-Wild مطابق ترجیح کدونی میزبان طراحی و درون باکتری میزبان *Escherichia coli-DH5α* کلون سازی شد. جهش‌زایی هدفمند با هدف افزایش پیوندهای هیدروفوبی در جایگاه (S392W) انجام شد. ژن طبیعی و جهش‌یافته Bac Phy-Mut به ناقل بیانی pET26b(+) انتقال‌یافته و سازه حاصل به درون *Escherichia coli-BL21* منتقل شد. نتایج الکتروفروز عمودی حضور خارج سلولی فیتاز با وزن مولکولی ۴۲ کیلو دالتون را نشان داد. هم‌چنین بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیتازهای نوترکیب نشان داد که دمای بهینه ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه ۵ می‌باشد. مقایسه پایداری دمایی نمونه جهش‌یافته نسبت به نمونه طبیعی در دماهای ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ۱۸، ۲۴، ۱۹، ۹ و ۶ درصد بهبود را نشان داد. نتایج مطالعه نشان داد که با استفاده از روش جهش‌زایی هدفمند می‌توان از فیتاز جهش‌یافته پایدار در برابر حرارت با کاربری در صنایع کشاورزی، دامپروری و محیط زیست به‌عنوان افزودنی جیره غذایی دام، طیور و ماهیان و هم‌چنین مصارف دارویی بهره برد.

واژه‌های کلیدی

اشرشیا کلی
پایداری دمایی
جهش زایی هدفمند
فیتاز
مهندسی پروتئین

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

مقدمه

آنزیم‌ها دسته مهمی از ترکیبات درون سلولی هستند که در تمامی روندهای متابولیسمی سلول نقش دارند. بهبود خصوصیات آنزیم‌ها یکی از مهم‌ترین اهداف در بیوتکنولوژی نوین می‌باشد. برای استفاده از آنزیم‌های طبیعی در پروسه‌های صنعتی نیاز به مهندسی پروتئین برای بهبود عملکرد آن‌ها ضروری است (Borjian Borujeni and Moradi 2013; Sarikhani et al. 2010). استفاده از علم بیوانفورماتیک در بررسی ساختارهای دوم و سوم پروتئین و هم‌چنین پیش بینی پایداری و فعالیت پروتئین پس از ایجاد تغییرات در پروتئین هدف توانسته گامی بزرگ در تولید پروتئین نوترکیب بردارد (Lehmann et al. 2000a-a).

فیتاز (میواینوزیتول هگزافسفات فسفوهیدرولاز) آنزیمی است که توانایی تجزیه‌ی فیتیک اسید به میواینوزیتو هایی با مقدار فسفات کم‌تر و فسفات معدنی را دارا می‌باشد. بنابراین از این آنزیم به‌صورت گسترده‌ای به‌عنوان یک افزودنی در غذاهای حیوانات استفاده می‌شود (Hesampour et al. 2015). فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفاتازها می‌باشند که هیدرولیز مرحله به مرحله فسفات را از مولکول فیتات که منبع اصلی ذخیره فسفات در دانه گیاهان است را انجام می‌دهند (Kim and Lei 2008).

این دسته از آنزیم‌ها در بین گیاهان، ریزسازواره‌ها و حیوانات پراکندگی و گستردگی دارند ولی از این میان فیتازهای میکروبی مورد توجه می‌باشند. آنزیم فیتاز به جیره غذایی حیوانات تک معده‌ای از قبیل خوک، پرندگان و ماهی‌ها به منظور افزایش جذب فسفات موجود در جیره غذایی و هم‌چنین کاهش آلودگی فسفات در محیط اضافه می‌شود (Zhao et al. 2007). به‌علت pH بهینه اسیدی، مقاومت بالا نسبت به هیدرولیز پپسین معده جانوران و هم‌چنین فعالیت ویژه بالا بر روی اسید فیتیک (Wyss et al. 1999) این آنزیم نقش موثرتری بر روی آزادسازی گروه‌های فسفات از مولکول اسید فیتیک در رژیم‌های غذایی خوک و ماکیان نسبت به فیتاز جدا شده از سویه‌های *A.niger* دارد (Kerovuo et al. 1998)، (Kim et al. 1998) و (Idriss et al. 2002). با توجه به نقش فیتازها در تغذیه دام و اینکه این آنزیم بایستی درون سیستم گوارشی با pH اسیدی حاکم بر آن فعال باشد، غالب تحقیقات بر روی فسفاتازهای اسیدی متمرکز است (Lei and Porres 2003) مقاومت فیتاز به پروتئازها جنبه دیگری از مطالعات بهینه‌سازی فیتازها برای مصارف تجاری است زیرا پروتئازهای داخل معده دام و طیور می‌تواند باعث غیرفعال شدن فیتاز افزودنی جیره غذایی دام و طیور شود. بررسی‌های صورت گرفته بر پایداری در مقابل پروتئازها نشان می‌دهند که فیتاز *A.niger* در مقایسه با فیتاز *E.coli* به پپسین حساس‌تر می‌باشد (Lei et al. 2007).

مهندسی پروتئین راهی برای بهینه نمودن آنزیم‌ها با توجه به معیارهای صنعتی هدف می‌باشد به طوری‌که می‌توان فعالیت آنزیم در pHهای متفاوت، پایداری به دماهای بالاتر و فعالیت ویژه آن را تغییر و بهینه نمود. یکی از راه‌های بهینه نمودن فیتازها برای مصارف کاربردی، استفاده از مهندسی پروتئین به‌منظور پایدارسازی در برابر حرارت می‌باشد. در این راستا آنزیم فیتاز جهش یافته‌ای که دارای پایداری دمایی و محدوده فعالیت وسیع pH در مقایسه با آنزیم‌های فیتاز طبیعی بود طراحی و با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی ساختار پروتئین جهش‌یافته و شبکه پیوند و پیوندهای هیدروفوب فی مابین اسید آمینه در جایگاه هدف مورد بررسی قرارگرفت (Lei et al. 2007; Tomschy et al. 2002). فیتاز تولید شده توسط باکتری *Escherichia coli* (AppA) با وزن مولکولی ٤٢ کیلودالتون، با pH بهینه اسیدی، مقاومت بالا نسبت به هیدرولیز پپسین معده جانوران و هم‌چنین فعالیت تخصصی بالا بر روی اسید فیتیک است. (Wyss et al. 1999)

با مطالعه بررسی‌های انجام شده به‌نظر می‌رسد با ایجاد موتاسیون در ژن‌های ایجادکننده پایداری به حرارت و pH، فعالیت آنزیم مورد نظر را می‌توان بهبود بخشید. به‌نظر می‌رسد با تغییر pH بهینه و افزایش پایداری دمایی در جهش یافته‌های مذکور، فعالیت آنزیم فیتاز بهینه شود (Hesampour et al. 2014; Lehmann et al. 2000a-a; Zhang and Lei. 2008).

در این تحقیق با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی نسبت به همه فیتازهای مورد آزمایش قرارگرفته (Greiner et al. 1993)، هم‌چنین pH بهینه اسیدی گسترده نسبت به آسپرژیلوس که پیش از این به‌عنوان منبع اصلی تولید فیتاز نوترکیب، فیتاز حاصل از ژن *phyA* قارچ آسپرژیلوس نایجر را می‌دانستند (Zhao et al. 2007)،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

Escherichia coli به‌عنوان کاندیدی مناسب جهت بررسی و دستورزی ژنتیکی انتخاب شد (Igbasan 2000). از این‌رو مطالعه فوق بر پایه امکان و اساس ساختاری برای بهینه‌سازی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم فیتاز با تمرکز بر پایدارسازی حرارتی فیتاز باکتریایی توسط ایجاد جهش‌زایی هدفمند طراحی شد.

مواد و روش‌ها

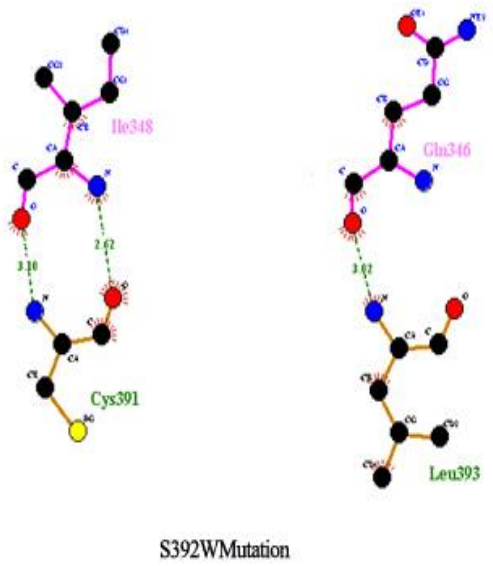
در این تحقیق از باکتری اشرشیاکلی، سویه‌های DH5α و BL21(DE3) استفاده شد. سویه DH5α به‌عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر و از سویه BL21 (DE3) جهت بیان ژن فیتاز نوترکیب استفاده شد. هم‌چنین از ناقل‌های PUC57 (2710bp, Amp marker) و pET-26b (5360bp, Kan marker) به‌ترتیب به‌عنوان ناقل کلون سازی و بیانی استفاده شد.

ژن فیتاز سنتتیک *Bac Phy* طبیعی[1] مطابق با ترجیح کدونی میزبان توسط نرم‌افزار (Thermo fisher) GeneArt™ GeneOptimizer™ طراحی و با حذف پپتید نشانه به‌صورت کلون شده در ناقل pUC57 با کد دسترسی در بانک جهانی ژن KR149292 تهیه شد و به سلول‌های مستعد *E.coli* $DH_5\alpha$ کشت و در محیط مایع Luria Broth حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین، ترانسفورم شد. جهت تایید صحت ترانسفورماسیون از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط انتخابی LB حاوی آمپی سیلین کلونی PCR شد و برای تایید حضور ژن فیتاز *Bac phy*، محصول کلونی PCR بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. از کلونی‌هایی که بر روی محیط انتخابی حاوی آمپی‌سیلین رشد کرده بودند و پس از تایید کلونی PCR، استخراج پلاسمید و کشت مسترپلیت[2] تهیه شد.

پس از کلونی PCR و تایید آن بر روی ژل آگارز، استخراج پلاسمید Puc57-*Bac Phy* توسط کیت استخراج پلاسمید شرکت سیناژن (BP-152) انجام شد. برای تایید حضور ژن Bac phy در پلاسمید PUC57 محصول استخراج پلاسمید بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد و PCR تایید نیز برای آن انجام شد.

[1] pUC57-Bac Phy-Wild
[2] Master Plate

ساختار سوم فیتاز طبیعی *E.coli* از بانک داده پروتئین PDB به شماره دسترسی 1dkq تهیه و با استفاده از نرم‌افزار YASARA (http://www.yasara.org) بررسی شد. با استفاده از DSSP ساختار دوم، خصوصیات ژئومتریک، سطوح دسترس و پیوندهای بین اسیدهای آمینه‌های قطبی با تمایل داخلی ساختار پروتئین بررسی شد (Kabsch and Sander 1983). با استفاده از نرم‌افزارهای CLUSTAL (EMBL-EBI) و MEGA4(www.megasoftware.net) هم‌ردیفی Pairwise و Multiple بین توالی فیتاز سنتیک با سایر فیتازهای هم‌خانواده پایدار در برابر حرارت انجام شد و اسید آمینه جایگزین هدف تعیین شد. در نهایت ساختار فیتاز طبیعی و جهش‌یافته S392W، سطح دسترس و پیوندهای هیدروفوب بین اسید آمینه هدف در فیتاز جهش‌یافته و طبیعی مقایسه شد (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار فیتاز طبیعی و جهش‌زایی شده را نشان می‌دهد. سمت راست فیتاز طبیعی (WT) می‌باشد که در جایگاه ۳۹۲ سرین یک پیوند به‌طولÅ ۳,۰۲ دارد. سمت چپ فیتاز جهش‌یافته را نشان می‌دهد که جایگزینی سرین به تریپتوفان باعث تشکیل پیوند هیدروفوبی اضافه بین تریپتوفان ۳۹۲ و تریپتوفان جایگاه ۳٤۷ می‌شود که در نتیجه دو پیوند به‌طول Å ۳,۱۰ و Å ۲,٦۲ تشکیل می‌شود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

به‌منظور جهش زایی هدفمند پرایمرهای نقطه جهش، اسید آمینه سرین۳۹۲ به تریپتوفان (S392W)، به‌صورت تک جهشی مطابق با توالی اسیدهای آمینه طراحی و ناقل نوترکیب PUC57-Bac phy که در مرحله قبل تایید و استخراج شده بود به‌عنوان الگو قرار گرفت ومطابق روش جهش‌زایی هدفمند QuikChange واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون از ناقل پلاسمیدی به‌علاوه ژن انجام شد. به‌منظور ایجاد جهش‌زایی هدفمند ناقل‌های پلاسمیدی نوترکیب حاوی ژن *Bac phy* به‌عنوان الگو قرار گرفت و کل ناقل پلاسمیدی حامل ژن، توسط آنزیم *PFU* DNA polymerase مطابق برنامه دمایی (جدول۱) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حاوی نقاط جهش (جدول۲) تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفتند. پس از صحت انجام واکنش PCR، محصول نهایی به‌منظور حذف DNA الگو توسط آنزیم *Dpn*I مورد تیمار قرار گرفت و پس از بارگذاری بر روی ژل الکتروفورز یک درصد خالص‌سازی شد. محصول خالص‌سازی شده به باکتری مستعد *E.coli DH5α* ترانسفورم شد تا باکتری با استفاده از سیستم ترمیمی nick excision repair محصول DNA خطی را به حلقوی ترمیم نماید و پس از آن پلاسمید نوترکیب جهش‌یافته حلقوی را تکثیر نماید .QuikChange II Site-.Agilent technologies Directed Mutagenesis پس از ترانسفورماسیون، با استفاده از کلونی PCR توسط پرایمرهای اختصاصی غربالگری پلاسیمدهای نوترکیب انجام و پس از استخراج پلاسمیدهای نوترکیب تعیین توالی صورت گرفت. نمونه استخراج شده از *E.coli* $DH_5\alpha$ که حامل پلاسمید نوترکیب PUC57-Bac phy جهش‌یافته[1] بود با استفاده از پرایمرهای استاندارد یونیورسال M13 Forward, M13 reverse به روش اتومات تعیین توالی شد و به جهت بررسی نتایج تعیین توالی و صحت جهش‌های هدف گذاری شده و مقایسه آن با توالی سویه طبیعی[2] از نرم‌افزارهای CLC Sequence viewer 6(Qiagen) و Chromas Pro 2(Technelysium) استفاده شد.

[1] pUC57-Bac Phy-Mut
[2] Wild Type

جدول ۱- برنامه ی PCR جهت ایجاد جهش های هدفمند

زمان	دمای PCR	مرحله‌ی PCR	تعداد سیکل‌ها
۳min	۹۵ °C	دناتوراسیون اولیه	۱
۳۰s	۹۵ °C	دناتوراسیون	۱۵
۵۰ s	٦٦ °C	اتصال	
٦ min	۷۲ °C	طویل شدن	
٤ min	۷۲ °C	طویل شدن نهایی	۱

جدول ۲- جدول پرایمرها جهت واکنش PCR به‌منظور ایجاد جهش‌زایی هدفمند

نام پرایمر	توالی پرایمر
S392W -Forward	5′GTATGTGCTGGCTGGCTGGTTTCACCCAG3′
S392W Reverse	5′CAGCCAGCCAGCACATACCCTGAGCGTTAC3′

پس از انجام استخراج پلاسمید، به‌منظور جداسازی ژن‌های طبیعی و جهش‌یافته از ناقل بیانی PUC57 به‌وسیله دو آنزیم محدودالاثر *Bam*HI و *Nco*I هضم آنزیمی انجام شد. از آنجائی‌که در ناقل بیانی PET-26b(+) نیز جایگاه‌های برش برای آنزیم‌های ذکرشده وجود دارد، لذا به‌کمک این آنزیم‌ها، هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرکت سازنده (شرکت سیناژن) صورت گرفت.پس از انجام هضم آنزیمی ژن‌های جهش یافته و طبیعی در جایگاه باند اختصاصی مشخص و جداسازی و سپس به کمک کیت شرکت سیناژن با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شد. هم‌چنین جهت تایید خطی شدن ناقل بیانی و بریده شدن آن و ایجاد دو سمت دارای انتهای چسبنده[3] بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد و سپس درجایگاه باند اختصاصی جداسازی و خالص‌سازی شد. ناقل‌های نوترکیب حامل ژن‌های جهش‌یافته و طبیعی به سلول مستعد *E.coli* BL21 انتقال و غربال گری به‌منظور بررسی دارا بودن پلاسمید نوترکیب توسط انجام شد. (Sambrook et al. 1989).

استخراج پلاسمید pET-26b(+)-*Bac Phy-Wild* و pET-26b(+)-*Bac Phy-Mut* با استفاده از کیت Plasmid Isolation Kit شرکت سیناژن بر اساس دستورالعمل انجام شد.

[3] Sticky end

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

جدول ۳- جدول دمایی واکنش PCR جهت تائید حضور ژن‌های فیتاز Bac Phy-Wild و Bac Phy-Mut

سیکل	زمان (دقیقه)	دما
۱	۵ min	۹۵ °C
۱۵	۵۰ s	۹۵ °C
	۴۵ s	۴۲ °C
	۸۰ s	۷۲ °C
۱	۲ min	۷۲ °C

به‌منظور تایید حضور ژن‌های *Bac Phy* جهش‌یافته و طبیعی در نمونه استخراج شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر طبق برنامه دمایی مشخص (جدول۳) انجام گرفت و سپس محصول PCR ژل-الکتروفورز شد.جهت بررسی بیان پروتئین نوترکیب، از ژل الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) استفاده شد. کلونی‌های باکتری طبیعی و جهش یافته در محیط LB مایع به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰ rpm کشت داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت جداسازی شد و پس از رسوب دهی پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری شد.

جهت سنجش فعالیت آنزیمی، از اسید سولفوریک ۵ نرمال، آمونیوم مولیبدات ۵ درصد، استون ۱۰۰ درصد و سدیم استات استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر سدیم فیتات به‌عنوان سوبسترا و ۴۷۵ میکرولیتر بافر (سدیم استات) و ۲۵ میکرولیتر آنزیم فیتاز با هم مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه درون ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس برای اطمینان از انجام واکنش و سنجش میزان بیان به مخلوط فوق محلول رنگ سنجی CRS[1] اضافه شد. بدین منظور به ازای هر یک میلی‌لیتر از واکنش ۲ میلی‌لیتر CRS اضافه شد و در نهایت OD نمونه‌ها در ۳۸۰nm خوانده شد (Hesampour et al. 2015).

به‌منظور تعیین میزان فسفر موجود در نمونه و رسم نمودار استاندارد، رقت‌هایی سریالی از دی‌هیدروژن فسفات ۱۰mM تهیه شد و تمامی رقت‌ها در آزمون سنجش فعالیت آنزیمی به جای نمونه مورد سنجش قرار گرفت و جذب نوری در ۳۸۰nm (حداقل ۳ بار تکرار خوانش برای هر رقت) خوانده شد و در نهایت نمودار جذب نوری در مقابل (میکرومول/ میلی لیتر) رسم شد که در سنجش فعالیت فیتازهای نوترکیب و تعیین میزان فسفات آزاد شده مورد استفاده قرار گرفت.

به‌منظور تعیین فعالیت ویژه آنزیم بر حسب U/mg و به جهت تعیین میزان غلظت پروتئین بیان شده با روش برادفورد از کیت Smart BCA شرکت اینترون (iNtRON) استفاده شد. و میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر به‌دست آمد و منحنی استاندارد با استفاده از پروتئین BSA رسم شد.

دمای بهینه آنزیم در محدوده دماهایی ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد و با فاصله۱۰ درجه سانتی‌گراد در بافر استات سدیم ۰/۲ مولار با pH ۵، به مدت ۳۰ دقیقه با انجام حداقل ۳ تکرار و احتساب میانگین تعیین و پس از محاسبه فعالیت ویژه هر نمونه نمودار مربوطه که نمایانگر پروفایل دمایی آنزیم فیتاز طبیعی و جهش‌یافته بود رسم شد.

پروفایل و pH بهینه آنزیم فیتاز نوترکیب و وحشی در محدوده pHهای بافری (۴ تا ۸) در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تعیین شد. کلیه سنجش‌های آنزیمی حداقل ۳ تکرار و احتساب میانگین و پس از محاسبه فعالیت ویژه هر نمونه، نمودار مربوطه که نمایانگر پروفایل pH آنزیم فیتاز نوترکیب بود رسم شد.

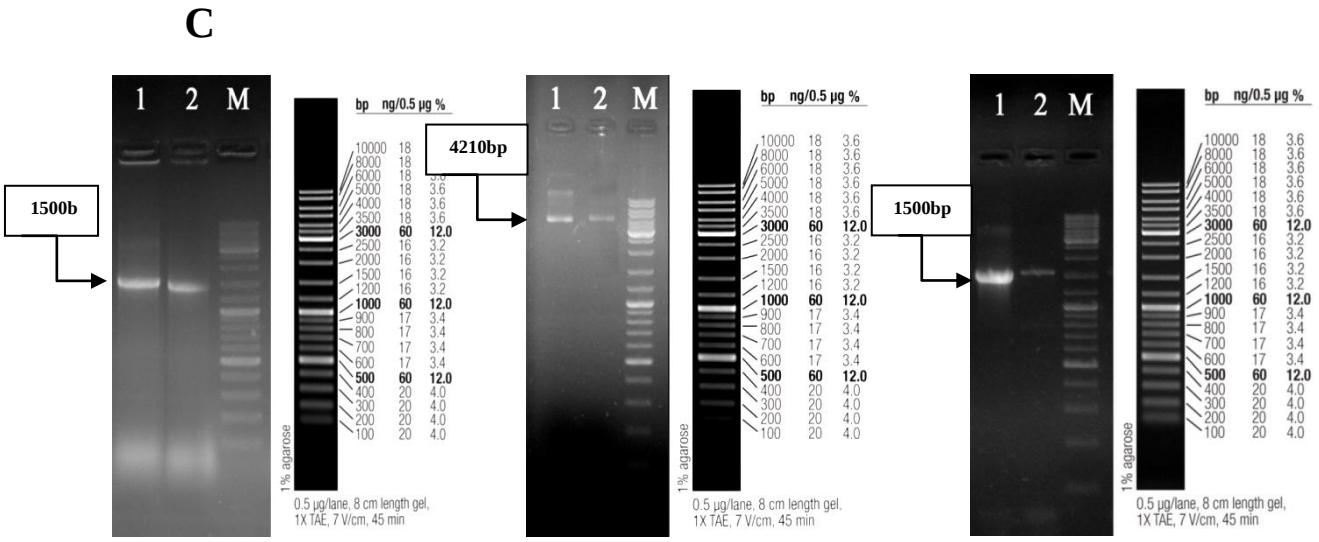
پایداری دمایی در دمای ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد در فواصل ۱۰ درجه سانتی‌گراد سنجش شد. نمونه‌ها در ترموبلاک در محدوده دمایی ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار حرارتی شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری و در نهایت سنجش فعالیت آنزیمی بر روی آن‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه و در بافر استات سدیم ۰/۲ مولار در pH ۵ انجام گرفت و بر این اساس میزان بقای فعالیت آنزیمی پس از گذشت زمان‌های مختلف محاسبه شد (Hesampour et al. 2015). کلیه سنجش های آنزیمی حداقل ۳ تکرار و احتساب میانگین نمودار پایداری دمایی بر اساس Residual activity در برابر دامنه دمایی برای هر آنزیم رسم شد (Hesampour et al. 2015).

[1] Color Reagent Solution (CRS)

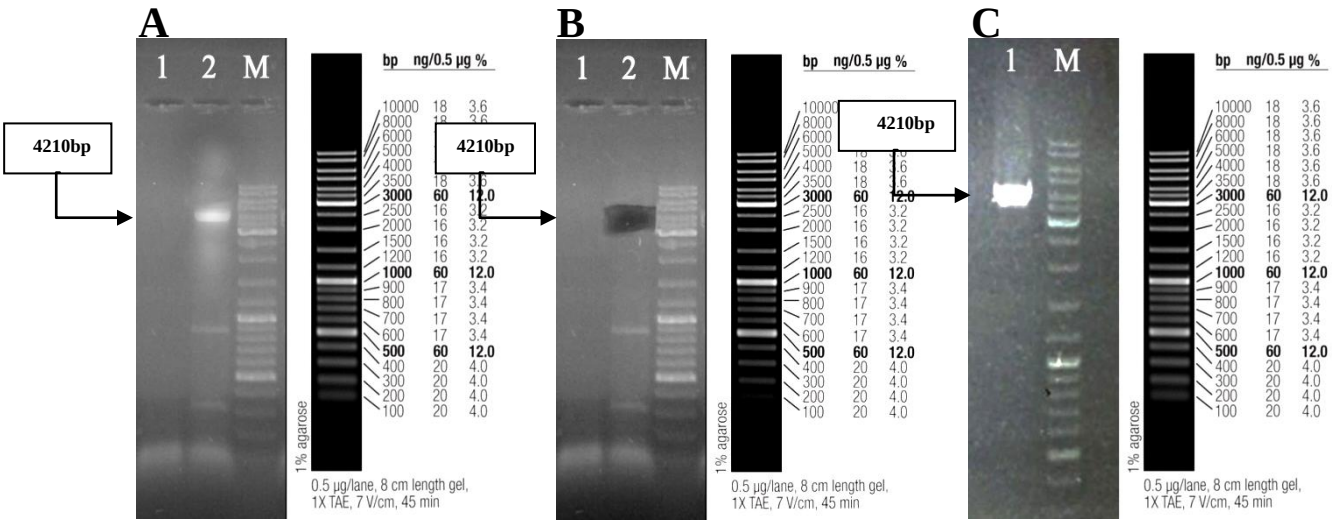
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

نتایج و بحث

پس از انتقال ناقل پلاسمیدی PUC57 حامل ژن سنتتیک *Bac Phy* با ترجیح کدونی *E.coli* به سلولهای مستعد باکتری *E.coli* $DH_5\alpha$ و تایید تست کلونی PCR،از کلون‌هایی حاوی ژن *Bac phy* با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13 ، قطعه‌ای به‌طول ۱۵۰۰ جفت‌باز تکثیر شد (شکل۲-A). کلونی‌های نوترکیب *E.coli*-DH5α حاوی پلاسمیدهایPUC57 حامل ژن *Bac Phy* کشت و پلاسمید نوترکیب استخراج شد (شکل ۲-B). پس از آن به‌منظور تایید حضور ژن *Bac Phy* از نمونه استخراج پلاسمید شده واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13 انجام گرفت و محصول PCR قطعه‌ای به‌طول ۱۵۰۰ جفت‌باز بود (شکل۲-C).



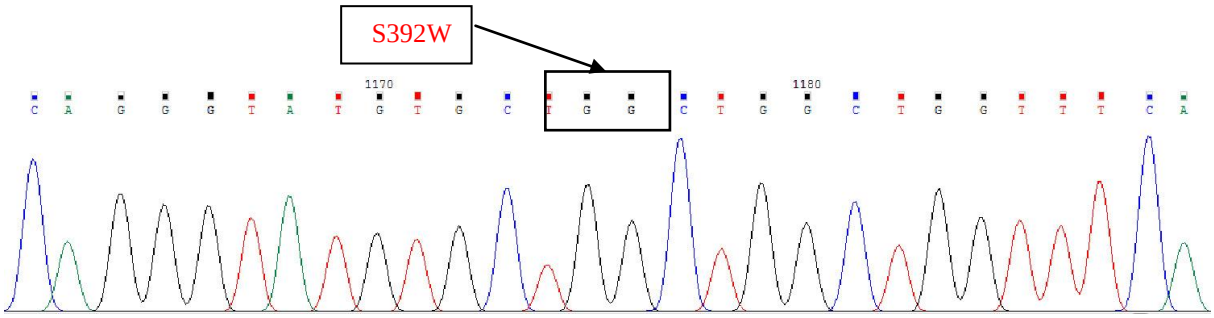
شکل ۲- (A) ژل آگارز نشان‌دهنده تایید کلونی PCR بر روی کلونی‌های حاوی ژن *Bac phy* در چاهک‌های شماره ۱ و ۲، و چاهک شماره M نشانگر مارکر.(B) ژل آگارز نشان‌دهنده‌ی استخراج پلاسمید از نمونه‌هایpUC57-*Bac Phy*. (C) ژل آگارز نشان‌دهنده تایید PCR بر روی محصول استخراج پلاسمید حاوی ژن *Bac phy* چاهک‌های ۱ و ۲ نشانگر به‌ترتیب محصول استخراج پلاسمید و محصول PCR و چاهک شماره M نشانگر مارکر.



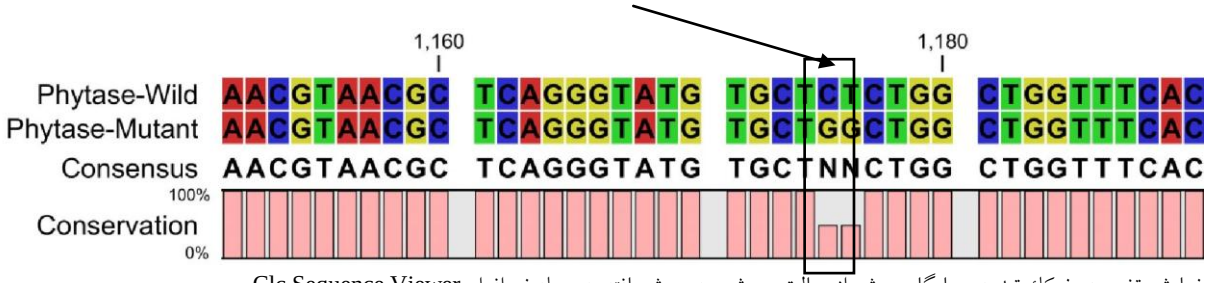
شکل ۳- (A) ژل آگارز یک درصد نشان‌دهنده واکنش PCR، (B) جایگاه برش و ریکاوری واکنش PCR بر روی ناقل حامل ژن فیتاز سنتتیک جهش‌یافته. چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ محصول PCR باند bp ٤٢١٠ و چاهک M نشانگر مارکر. (C) ژل آگارز یک درصد نشان‌دهنده واکنش هضم آنزیمی توسط *DpnI* بر روی محصول PCR که جهش‌زایی هدفمند را نشان می‌دهد. چاهک شماره ۱ سازه pUC57-Bac Phy-Mut، چاهکM نشانگر مارکر .

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

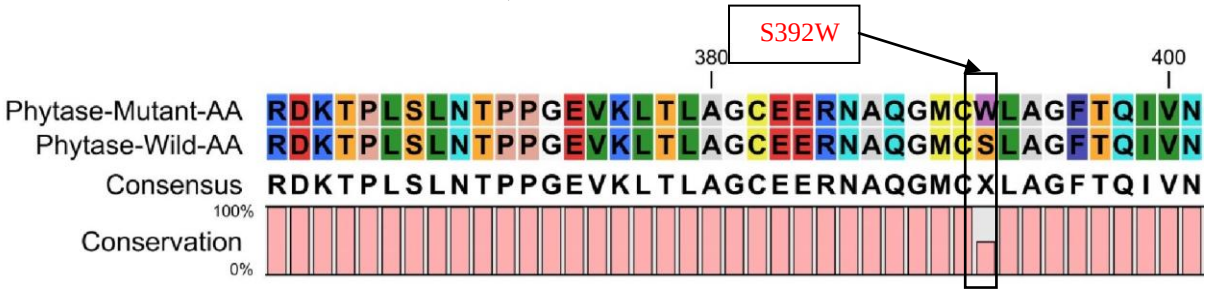
جهش‌زایی هدفمند در جایگاه S392W توسط پرایمرهای اختصاصی به روش QuikChange انجام شد و قطعات حاصل از واکنش PCR با استفاده از آنزیم *PFU* DNA polymerase تکثیر شدند (شکل۳). ناقل پلاسمیدی PUC57 حامل ژن جهش‌یافته *Bac Phy-Mut* به سلول‌های مستعد *E.coli* $DH_5\alpha$ انتقال و پلاسمید نوترکیب استخراج شد. جهت کنترل صحت توالی تکثیر شده نمونه حاوی پلاسمید نوترکیب PUC57-Bac Phy-Mut توسط پرایمرهای یونیورسال از دو جهت تعیین توالی شد و صحت توالی تایید شد و توالی جهش‌یافته در NCBI با شماره دستیابی KY497778 ثبت شد. نتایج نشان داد در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۱۷۵ و ۱۱۷٦ تک نوکلئوتید عوض شده به طوری‌که کدون TCT به TGG تغییر پیدا نموده است که حاصل آن تغییر در جایگاه اسید آمینه ۳۹۲، سرین به تریپتوفان است (شکل‌های ٦-٤).



شکل ٤- کروماتوگرام جایگاه تعویض نوکلئوتید دو مکان ۱۱۷۵ و ۱۱۷٦.



شکل ٥- نمایش تغییر دو نوکلئوتید در جایگاه جهش از حالت وحشی به جهش‌یافته به‌وسیله نرم‌افزار Clc Sequence Viewer.



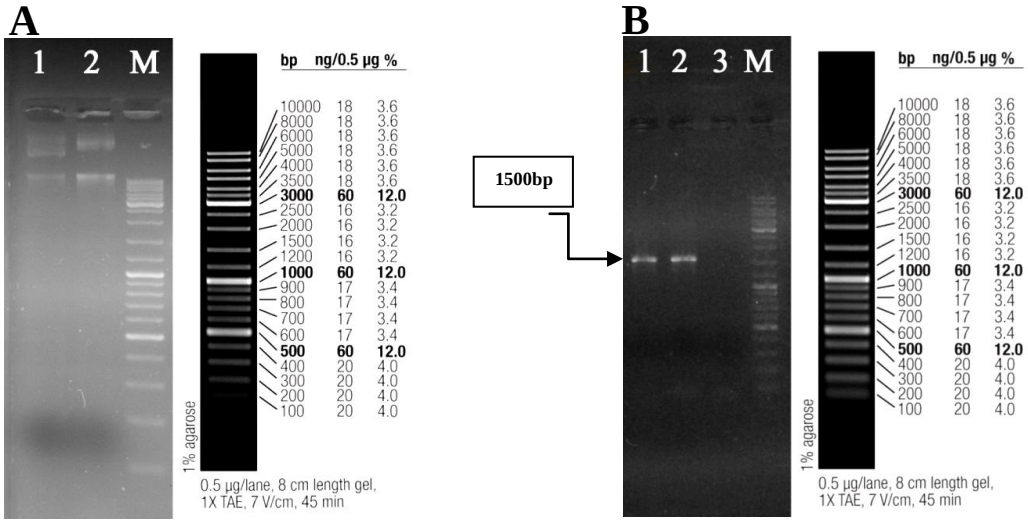
شکل ٦- نمایش تعویض اسید آمینه در جایگاه جهش ۳۹۲ از سرین به تریپتوفان به‌وسیله نرم‌افزار Clc Sequence Viewer.

سازه‌های PUC57-Bac Phy-Wild و PUC57-Bac Phy-Mut پس از ساب کلون در ناقل بیانی pET-26b(+) به میزبان *E.coli* BL21 ترانسفورم شدند و کلونی‌های حامل pET-26b(+)-*Bac Phy-Wild* و pET-26b(+)-*Bac Phy-Mut* در محیط انتخابی LB حاوی کانامایسین مایع کشت و پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شد (شکل A-۷) و حضور ژن‌های *Bac Phy-Wild* و *Bac Phy-Mut* با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13-F و M13-R تایید شد (شکل B-۷). *E.coli*های ترانسفورم شده حامل فیتاز وحشی و جهش‌یافته در محیط LB مایع کشت و القاء توسط IPTG انجام شد. نمونه‌های سوپرناتانت دارای فعالیت فیتازی بر روی ژل SDS-PAGE بررسی شدند. وزن مولکولی آنزیم فیتاز بیان شده از ژن وحشی و جهش‌یافته ٤۲ کیلودالتون بود که در شکل ۸ نمایش

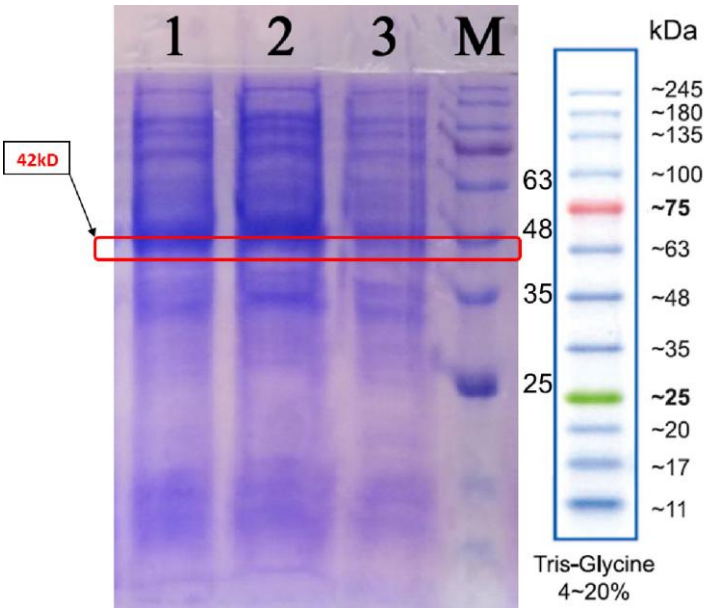
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

داده شده‌است. مطالعات در مورد محدوده فعالیت دمایی فیتاز جهش‌یافته نشان داد که فیتاز جهش‌یافته همانند فیتاز طبیعی دارای دمای بهینه ۵۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (شکل۹). نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد که فیتاز جهش‌یافته دارای محدوده pH وسیع با تمایل و پایداری بسیار در pHهای اسیدی است که pH بهینه فیتاز جهش‌یافته با الگوی همسان با فیتاز طبیعی دارای pH بهینه ۵ است (شکل۱۰).

بر اساس نتایج به‌دست آمده پایداری دمایی فیتاز جهش‌یافته در دماهای ٤٠، ٥٠، ٦٠، ٧٠ و ٨٠ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب ٢٤، ١٨، ١٩، ٩ و ٦ درصد بهبود یافته است که تفاوت معنی‌داری دارد (P *value*<5 %) (شکل۱۱).

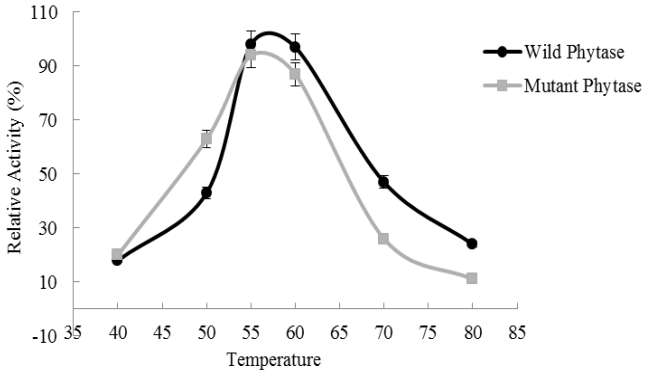


شکل ۷- (A) ژل آگارز نشان‌دهنده‌ی استخراج پلاسمید حاوی ژن‌های *Bac phy* وحشی و جهش‌یافته، (B) محصول PCR تائیدی. چاهک ۱ نشانگر ژن Bac Phy-Wild و چاهک ۲ نشانگر ژن Bac Phy-Mut و چاهک ۳ کنترل منفی و چاهک شماره M نشانگر مارکر.

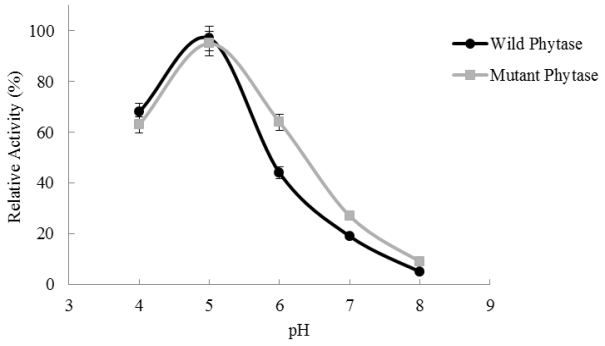


شکل ۸- ژل SDS-PAGE الکتروفورز عمودی از سوپرناتانت نمونه‌ها جهت بررسی بیان آنزیم فیتاز. چاهک شماره ۱ سوپرناتانت جدا شده از آنزیم فیتاز بیان شده از ژن طبیعی، چاهک شماره ۲ سوپرناتانت جداشده از آنزیم فیتاز بیان شده از ژن جهش‌یافته و چاهک شماره ۳ کنترل منفی.

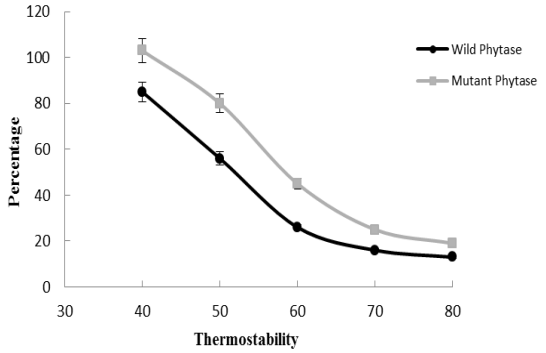
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]



شکل ۹- پروفایل فعالیت فیتازی در دماهای متغییر



شکل۱۰- پروفایل فعالیت فیتازی در pH های مختلف



شکل۱۱- پایداری حرارتی فیتاز جهش‌یافته و وحشی در دماهای متغییر

با توجه به فعالیت ویژه فیتاز باکتری *Escherichia coli*، فیتاز انتخاب شده دارای فعالیت آنزیمی بالایی نسبت به فیتازهای بررسی شده تاکنون (Greiner et al. 1993) بود و pH بهینه اسیدی گسترده *Escherichia coli* در مقایسه با به آسپرژیلوس (Zhao et al. 2007) باعث شد را به‌عنوان کاندیدی مناسب جهت بررسی و دستورزی ژنتیکی انتخاب شود (Igbasan 2000).

توالی ٤١٠ اسید آمینه‌ای ژن *Bac phy-Wild* با طراحی هدفمند پرایمر در جایگاه مورد نظر اسید آمینه سرین ۳۹۲ جهش‌زایی شد.

پس از کلون‌سازی ژن جهش‌یافته *Bac phy-Mut* و تعیین توالی، فیتاز طبیعی و جهش‌یافته به‌طور موفقیت‌آمیز به شکل خارج سلولی بیان شد. خصوصیات فیزیکو شیمیایی فیتاز جهش‌یافته و طبیعی نوترکیب تعیین شد. وزن مولکولی آنزیم روی SDS-PAGE، ٤٢ kDa را نشان داد که مؤید بیان خارج سلولی ژن فیتاز نوترکیب در باکتری بود. نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد که فیتاز نوترکیب دارای محدوده pH وسیع با تمایل و پایداری بسیار در pHهای اسیدی است که با توجه به کاربری در جیره غذایی دام و طیور می‌تواند پایدار در برابر اسید معده باشد. به‌علاوه نتایج نشان می‌داد که pH بهینه فیتاز نوترکیب مشابه فیتاز طبیعی دارای pH بهینه ۵ است. مطالعات در مورد محدوده فعالیت دمایی فیتاز نوترکیب نشان داد که فیتاز نوترکیب تولید شده نیز همانند فیتاز طبیعی دارای بهینه دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

Hesampour et al. (2015) نشان دادند با بررسی خصوصیات بیوشیمیایی در آسپرژیلوس نشان دادند که فیتاز نوترکیب دارای محدوده pH وسیع با تمایل و پایداری بسیار در pHهای اسیدی و دارای دو pH بهینه در ۲/۵ و ۵/۵ است که حداکثر فعالیت در pH=۵/۵ مشاهده می‌شود (Hesampour et al. 2015).

تحقیقات در سال ٢٠١٤ با بیان فیتاز باکتری *Escherichia coli* در *P. pastoris* نشان داد که بیان ژن appA نوترکیب در *P. pastoris* به‌طور معناداری افزایش یافته است اما با مقایسه فیتاز نوترکیب و Wild نشان داده شد که pH و دمای بهینه در هر دو بدون تغییر باقی‌مانده است و به‌ترتیب ٤/٥ و ٦٠ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. با مطالعه بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد با ایجاد جهش می‌توان پایداری به حرارت و pH، فعالیت آنزیم هدف را مطابق با معیارها با کاربری صنعتی بهینه نمود (Hesampour et al. 2014; Lehmann et al. 2000a-a; Zhang and Lei 2008).

فیتاز مورد استفاده در افزودنی جیره غذایی در مرحله feed pelleting در محدوده دمایی ۸۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد تیمار حرارتی می‌شود (Oh et al. 2004; Spring et al. 1996). نتایج مطالعه نشان داد که فیتاز جهش‌یافته نوترکیب به‌ترتیب ۲۵ و ۱۹ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود که این در حالی است که فیتاز طبیعی (WT) در دماهای ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

۱۶ و ۱۳ درصد فعالیت داشتند که نشان‌دهنده بهبود پایداری دمایی فیتاز جهش‌یافته در مقایسه با طبیعی می‌باشد.

نتایج بررسی ساختاری بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که همیشه تمام اسیدهای آمینه که در داخل پروتئین قرار می‌گیرند غیر قطبی نیستند و در مواردی پس از تا خوردگی نهایی پروتئین برخی از اسیدهای آمینه قطبی در داخل قرار می‌گیرند. لذا با استفاده از مهندسی پروتئین می‌توان با جایگزین کردن اسیدهای آمینه‌های قطبی داخلی با اسید آمینه غیر قطبی باعث میانکنش هیدروفوب مازاد بین اسید آمینه‌های داخل پروتئین شد که افزایش تعداد پیوند هیدروفوب در نتیجه باعث محکم شدن ساختار پروتئین و پایداری بیش‌تر پروتئین در برابر عوامل فیزیکوشیمیایی مانند حرارت شود. در مطالعه حاضر نیز سرین هیدروفیل به تریپتوفان حایگزین شد که حاصل آن افزایش تعداد پیوند هیدورفوب بود به طوری‌که بررسی دقیق بیوانفورماتیکی و مقایسه ساختار فیتاز طبیعی و جهش‌یافته نشان داد که در فیتاز طبیعی سرین جایگاه ۳۹۲ یک پیوند به‌طول A ۳/۰۲ و فیتاز جهش یافته که جایگزینی سرین قطبی به تریپتوفان با زنجیره جانبی هیدروفوب شده باعث تشکیل پیوند هیدروفوبی اضافه بین تریپتوفان ۳۹۲ و تریپتوفان جایگاه ۳۴۷ می‌شود که در نتیجه دو پیوند به‌طول A ۳/۱۰ و A ۲/۶۲ تشکیل می‌شود. ایجاد پیوند هیدروفوب اضافه احتمالا می‌تواند دلیلی بر پایداری دمایی بیشتر فیتاز جهش‌یافته در مقایسه با فیتازطبیعی باشد (شکل ۱). مطالعاتی در مورد جهش‌زایی تکی فیتاز انجام شده که جایگزینی اسیدهای آمینه قطبی به غیر قطبی باعث پایداری حرارتی شد (Lehmann et al. 2000a-b). در تحقیقی که (Kim et al. (2008 بر روی ژن *app A* فیتاز باکتری اشرشیاکلی انجام دادند، نشان دادند که با جهش K46E و K65E، ۲۰ درصد مقاومت حرارتی افزایش می‌یابد (Kim and Lei 2008). در مطالعه‌ای که توسط (Liao et al. (2013 انجام شد، جهش‌زایی نشان داد که جهش‌ها باعث بهینه نمودن پایداری دمایی از طریق گسترش واکنش‌های یونی و پیوندهای هیدروژنی شد، به طوری‌که جهش‌یافته دوتایی ترکیبی نسبت به فیتاز WT، ۲۰ درصد افزایش پایداری در دمای $80^{o}C$ را نشان داد (Mullaney et al. 2010). در مطالعه انجام شده توسط (2015) Wang et al. بر روی ژن *app A* فیتاز باکتری اشرشیاکلی انجام شد ۱۰ جهش مورد بررسی قرارگرفت و نتایج نشان می‌داد که Q349N باعث پایداری حرارتی به‌میزان ۷/۵ درجه سانتی‌گراد می‌شود (Wang et al. 2015).

نتایج بررسی بر روی ژن *Phy A* در سال ۲۰۱۴ با جهش‌زایی هدفمند چندگانه بر روی ۱۴ گروه نشان دادند که در دو گروه (T314S, Q315R ,V62N) و (S205N, S206A T151A,T314S, Q315R) به‌ترتیب ۲۴ و ۲۲/۶ درصد افزایش مقاومت حرارتی ایجاد شد (Hesampour et al. 2014).

مشکلات ناشی از حضور فیتات در دستگاه گوارش جانوران تک معده‌ای، پر هزینه بودن تولید فسفر به روش صنعتی و همچنین آلودگی‌های ناشی از استفاده‌ی فسفات آلی به‌عنوان مکمل‌های دامی بر روی آب‌های زیر زمینی، استفاده از یک آنزیم مناسب به‌عنوان مکمل در جیره‌ی غذایی این حیوانات ضروری است. نتایج مطالعه انجام شده نشان داده شد که با توجه به بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم فیتاز طبیعیWT و جهش‌یافته، فیتاز بیان شده به شکل خارج سلولی دارای محدوه pH وسیعی می‌باشد که می‌تواند با توجه به بهینه pH اسیدی در معده دام وطیور در مقابل اسید معده پایدار بماند. از طرفی پایداری فیتاز جهش‌یافته در دماهای ۶۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند گزینه مناسبی جهت افزودنی جیره غذایی دام و طیور به‌منظور کاربری در صنایع کشاورزی و دامپروری و هم‌چنین صنایع دارویی باشد.

سپاسگزاری

از تمامی همکارانی که در اجرای این پژوهش همکاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

Borjian Borujeni M, Moradi S (2013) Cloning, expression and culture optimization of gene encoding *Aspergillus niger* NRRL3135 phytase in *Hansenula polymorpha* host. Koomesh 15: 17-21.

Greiner R, Konietzny U, Jany KD (1993) Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys 303: 107-113.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]

Hesampour A, Ranaei O, Malboobi MA, Harati J, Mohandesi N (2014) Comparison of biochemical properties of recombinant phytase expression in the favorable methylotrophic platforms of *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*. Progress in Biological Sciences 4: 97-111.

Hesampour A, Siadat SER, Malboobi MA, Mohandesi N, Arab SS, Ghahremanpour MM (2015) Enhancement of thermostability and kinetic efficiency of *Aspergillus niger PhyA* phytase by site-directed mutagenesis. Applied Biochemistry and Biotechnology 175: 2528-2541.

Kim MS, Lei XG (2008) Enhancing thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA2 by error-prone PCR. Applied Microbiology and Biotechnology 79: 69-75.

Kabsch W and C Sander, Dictionary of protein secondary structure (1983) pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers 22: 2577-637.

Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, Brugger R, D'Arcy A, Pasamontes L, van Loon AP (2000a) From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. Protein Engineering 13: 49-57.

Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, Brugger R, D'Arcy A, Pasamontes L, van Loon AP (2000b) From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. Protein Engineering. 13: 49-57.

Lei XG, Porres JM (2003) Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnology Letters 25: 1787-1794.

Lei XG, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H (2007) Phytase: source, structure and application. Industrial enzymes. Springer press,Netherland 505-529.

Liao Y, Li CM, Chen H, Wu Q, Shan Z, Han XY (2013) Site-Directed Mutagenesis Improves the Thermostability and Catalytic Efficiency of *Aspergillus niger* N25 Phytase Mutated by I44E and T252R. Applied Biochemistry and Biotechnology 171:900-1

Mullaney EJ, Locovare H, Sethumadhavan K, Boone S, Lei XG, Ullah AH (2010) Site-directed mutagenesis of disulfide bridges in *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase (PhyA), their expression in *Pichia pastoris* and catalytic characterization. Applied Microbiology and Biotechnology 87: 1367-1372.

Oh BC, Choi WC, Park S, Kim YO, Oh TK (2004) Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 362-372.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press. ISBN 10: 1936113422.

Sarikhani MR, Malboobi MA, Aliasgharzad N, Greiner R, Yakhchali B (2010) Functional screening of phosphatase-encoding genes from bacterial sources. Iranian Journal of Biotechnology 8: 275-279.

Spring P, Newman K, Wenk C, Messikommer R, Vranjes MV (1996). Effect of pelleting temperature on the activity of different enzymes. Poultry Science 75: 357-361.

Tomschy A, Brugger R, Lehmann M, Svendsen A, Vogel K, Kostrewa D, Lassen SF, Burger D, Kronenberger A, van Loon AP (2002). Engineering of phytase for improved activity at low pH. Applied Environment Microbiology 68: 1907-1913.

Wang X, Yao M, Yang B, Fu Y, Hu F, Liang A (2015) Enzymology and thermal stability of phytase *appA* mutants. RSC Advances 5: 43863-43872.

Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, Remy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M, van Loon AP (1999) Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. Applied and Enviromental Microbiology 65: 367-73.

Zhang W, Lei XG (2008) Cumulative improvements of thermostability and pH-activity profile of *Aspergillus niger PhyA* phytase by site-directed mutagenesis. Applied Microbiology and Biotechnology 77: 1033-1040.

Zhao DM, Wang M, Mu XJ, Sun ML, Wang XY (2007) Screening, cloning and overexpression of *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. Letters in Applied Microbiology 45: 522-8.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.3.9.7]