

مهندسی فیتاز اشرشیا کلی به منظور پایداری 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 Z¹, 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 به عنوان 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 نو ترکیب فیتاز است. از آنجائی که افزودنی جیره غذایی تحت دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد مرحله Food Pelleting قرار می‌گیرد، لذا دستیابی به فیتاز پایدار در برابر حرارت هدف ایده‌آل 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*-DH5a 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(+) انتقال یافته و سازه حاصل به درون *Escherichia coli*-BL21 منتقل شد. نتایج الکتروفوروز عمودی حضور خارج سلولی فیتاز با وزن مولکولی ۴۲ کیلو دالتون را نشان داد. هم‌چنین بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیتازهای نو ترکیب 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 به ترتیب 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

جهش‌زایی هدفمند

فیتاز

مهندسی پروتئین

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 نو ترکیب بردارد (Lehmann et al. 2000a-a).

فیتاز (میواینوزیتول هگزافسفات فسفوهیدرولاز) آنزیمی است که توانایی تجزیه ی فیتیک اسید به میواینوزیتو هابی با مقدار فسفات کم تر و فسفات معدنی را دارا می‌باشد. بنابراین از این آنزیم به صورت گسترده ای به عنوان یک افزودنی در غذاهای حیوانات استفاده می‌شود (Hesampour et al. 2015). فیتازها گروه ویژه ای 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 معده ای 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). به علت 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

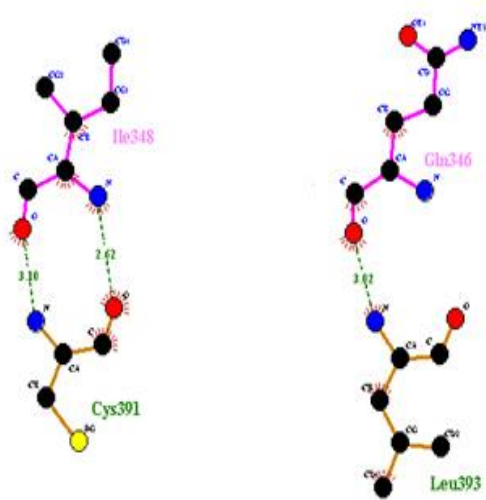
(Lei and Porres 2003) مقاومت فیتاز به پروتئازها جنبه دیگری از مطالعات بهینه سازی فیتازها برای مصارف تجاری است زیرا پروتئازهای داخل معده دام و طیور می‌تواند باعث غیرفعال شدن فیتاز افزودنی جیره غذایی دام و طیور شود. بررسی‌های صورت گرفته بر پایداری در مقابل پروتئازها نشان می‌دهند که فیتاز *A.niger* در مقایسه با فیتاز *E.coli* به پپسین حساس تر می‌باشد (Lei et al. 2007).

مهندسی پروتئین راهی برای بهینه نمودن آنزیم‌ها با توجه به معیارهای صنعتی هدف می‌باشد به طوری که 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 به منظور پایداری سازی در برابر حرارت می‌باشد. در این راستا آنزیم فیتاز جهش یافته ای که دارای پایداری دمایی و محدوده فعالیت وسیع pH در مقایسه با آنزیم‌های فیتاز طبیعی بود طراحی و با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی ساختار پروتئین جهش یافته و شبکه پیوند و پیوندهای هیدروفوب فی مابین اسید آمینه در جایگاه هدف مورد بررسی قرار گرفت (Lei et al. 2007; Tomschy et al. 2002). فیتاز تولید شده توسط باکتری *Escherichia coli* (AppA) با وزن مولکولی ۴۲ 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 به نظر می‌رسد با ایجاد موتاسیون در ژن‌های ایجادکننده پایداری به حرارت و pH فعالیت آنزیم مورد نظر را می‌توان بهبود بخشید. به نظر 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)، هم چنین pH بهینه اسیدی گسترده نسبت به آسپرژیلوس که پیش از این به عنوان منبع اصلی تولید فیتاز نو ترکیب، فیتاز حاصل از ژن *phyA* قارچ آسپرژیلوس نایجر را می‌دانستند (Zhao et al. 2007)،

ساختار سوم فیتاز طبیعی *E.coli* از بانک داده پروتئین PDB به شماره دسترسی 1dkq تهیه و با استفاده از نرم افزار 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 نرم افزارهای (EMBL-EBI) CLUSTAL و (www.megasoftware.net) MEGA4 هم‌ردیفی Pairwise و Multiple بین توالی فیتاز سنتتیک با سایر فیتازهای هم‌خانواده پایدار در برابر حرارت انجام شد و اسید آمینه جایگزین هدف تعیین شد. در نهایت ساختار فیتاز طبیعی و جهش یافته S392W، سطح دسترس و پیوندهای هیدروفوب بین اسید آمینه هدف در فیتاز جهش یافته و طبیعی مقایسه شد (شکل ۱).



S392W Mutation

شکل ۱- ساختار فیتاز طبیعی و جهش‌زایی شده را نشان می‌دهد. سمت راست فیتاز طبیعی (WT) می‌باشد که در جایگاه ۳۹۲ سرین یک پیوند به طول ۳,۰۲ Å دارد. سمت چپ فیتاز جهش یافته را نشان می‌دهد که جایگزینی سرین به تریپتوفان باعث تشکیل پیوند هیدروفوبی اضافه بین تریپتوفان ۳۹۲ و تریپتوفان جایگاه ۳۴۷ می‌شود که در نتیجه دو پیوند به طول ۳,۱۰ Å و ۲,۶۲ Å تشکیل می‌شود.

Escherichia coli به عنوان 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 پایداری سازی 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 به عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر و از سویه BL21 (DE3) جهت بیان ژن فیتاز نو ترکیب استفاده شد. هم‌چنین از ناقل‌های PUC57 (2710bp, Amp marker) و pET-26b (5360bp, Kan marker) به ترتیب به عنوان ناقل کلون سازی و بیانی استفاده شد.

ژن فیتاز سنتتیک *Bac Phy* طبیعی^۱ مطابق با ترجیح کدونی میزبان توسط نرم افزار Thermo GeneArt™ GeneOptimizer™ (fisher) طراحی و با حذف پپتید نشانه به صورت کلون شده در ناقل pUC57 با کد دسترسی در بانک جهانی ژن KR149292 تهیه شد و به سلول‌های مستعد *E.coli* DH5α کشت و در محیط مایع Luria Broth حاوی ۱۰۰ μg/ml آمپی‌سیلین، ترانسفورم شد. جهت تایید صحت ترانسفورماسیون از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط انتخابی LB حاوی آمپی‌سیلین 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^۲ 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.

^۱ pUC57-Bac Phy-Wild

^۲ Master Plate

جدول ۱- برنامه ی PCR جهت ایجاد جهش های هدفمند

زمان	دمای PCR	مرحله ی PCR	تعداد سیکل ها
۳ min	۹۵ °C	دناتوراسیون اولیه	۱
۳۰ s	۹۵ °C	دناتوراسیون	۱۵
۵۰ s	۶۶ °C	اتصال	
۶ min	۷۲ °C	طویل شدن	
۴ min	۷۲ °C	طویل شدن نهایی	۱

جدول ۲- جدول پرایمرها جهت واکنش PCR به منظور ایجاد جهش زایی هدفمند

توالی پرایمر	نام پرایمر
5'GTATGTGCTGGCTGGCTGGTTTCACCC AG3'	S392W -Forward
5'CAGCCAGCCAGCACATACCCTGAGCGT TAC3'	S392W Reverse

پس از انجام استخراج پلاسمید، به منظور جداسازی ژن های طبیعی و جهش یافته از ناقل بیانی PUC57 به وسیله دو آنزیم محدودالثر *Bam*HI و *Nco*I هضم آنزیمی انجام شد. از آنجائی که در ناقل بیانی PET-26b(+) نیز جایگاه های برش برای آنزیم های ذکر شده وجود دارد، لذا به کمک این آنزیم ها، هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرکت سازنده (شرکت سیناژن) صورت گرفت. پس از انجام هضم آنزیمی ژن های جهش یافته و طبیعی در جایگاه باند اختصاصی مشخص و جداسازی و سپس به کمک کیت شرکت سیناژن با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده خالص سازی شد. هم چنین جهت تایید خطی شدن ناقل بیانی و بریده شدن آن و ایجاد دو سمت دارای انتهای چسبنده^۳ بر روی ژل آگارزیک درصد بارگذاری شد و سپس در جایگاه باند اختصاصی جداسازی و خالص سازی شد. ناقل های نو ترکیب حامل ژن های جهش یافته و طبیعی به سلول مستعد *E.coli* BL21 انتقال و غربال گری به منظور بررسی دارا بودن پلاسمید نو ترکیب توسط انجام شد. (Sambrook et al. 1989).

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

به منظور جهش زایی هدفمند پرایمرهای نقطه جهش، اسید آمینه سرین^{۳۹۲} به تریپتوفان (S392W)، به صورت تک جهشی مطابق با توالی اسیدهای آمینه طراحی و ناقل نو ترکیب PUC57-Bac phy که در مرحله قبل تایید و استخراج شده بود به عنوان الگو قرار گرفت و مطابق روش جهش زایی هدفمند QuikChange واکنش زنجیره ای پلیمریزاسیون از ناقل پلاسمیدی به علاوه ژن انجام شد. به منظور ایجاد جهش زایی هدفمند ناقل های پلاسمیدی نو ترکیب حاوی ژن *Bac phy* به عنوان الگو قرار گرفت و کل ناقل پلاسمیدی حامل ژن، توسط آنزیم *DNA polymerase* مطابق برنامه دمایی (جدول ۱) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی حاوی نقاط جهش (جدول ۲) تحت واکنش زنجیره ای پلیمرز قرار گرفتند. پس از صحت انجام واکنش PCR، محصول نهایی به منظور حذف DNA الگو توسط آنزیم *Dpn*I مورد تیمار قرار گرفت و پس از بارگذاری بر روی ژل الکتروفورز یک درصد خالص سازی شد. محصول خالص سازی شده به باکتری مستعد *E.coli DH5a* 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 نو ترکیب جهش یافته حلقوی را تکثیر نماید. QuikChange II Site-Agilent technologies. Directed Mutagenesis پس از ترانسفورماسیون، با استفاده از کلونی PCR توسط پرایمرهای اختصاصی غربالگری پلاسمیدهای نو ترکیب انجام و پس از استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب تعیین توالی صورت گرفت. نمونه استخراج شده از *E.coli DH5a* که حامل پلاسمید نو ترکیب PUC57-Bac phy جهش یافته^۱ 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 جهش های هدف گذاری شده و مقایسه آن با توالی سویه طبیعی^۲ از نرم افزارهای CLC Sequence viewer 6 (Qiagen) و Chromas Pro 2 (Technelysium) استفاده شد.

^۱ pUC57-Bac Phy-Mut

^۲ Wild Type

^۳ Sticky end

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

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

به منظور تایید حضور ژن‌های *Bac Phy* جهش یافته و طبیعی در نمونه استخراج شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بر طبق برنامه دمایی مشخص (جدول ۳) انجام گرفت و سپس محصول PCR ژل-الکتروفورز شد. جهت بررسی بیان پروتئین نو ترکیب، 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 به عنوان 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^۱ 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).

به منظور 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

¹ Color Reagent Solution (CRS)

(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 نو ترکیب و تعیین میزان فسفات آزاد شده مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور 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 ایترون (iNtRON) استفاده شد. و میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر به دست آمد و منحنی استاندارد با استفاده از پروتئین BSA رسم شد.

دمای بهینه آنزیم در محدوده دماهایی ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد و با فاصله ۱۰ 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 جهش یافته بود رسم شد.

پروفایل و pH بهینه آنزیم فیتاز نو ترکیب 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 نو ترکیب بود رسم شد.

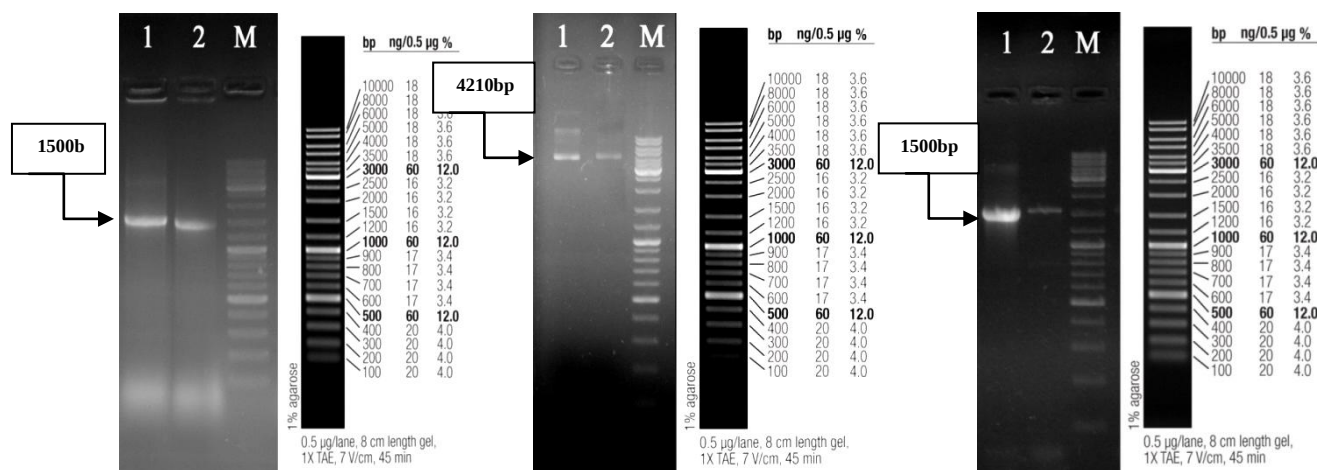
پایداری دمایی در دمای ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد در فواصل ۱۰ درجه سانتی‌گراد سنجش شد. نمونه‌ها در ترموبلاک در محدوده دمایی ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار حرارتی شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ در دمای صفر درجه سانتی‌گراد نگهداری و در نهایت سنجش فعالیت آنزیمی بر روی آن‌ها در 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 سنجش‌های 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).

نتایج و بحث

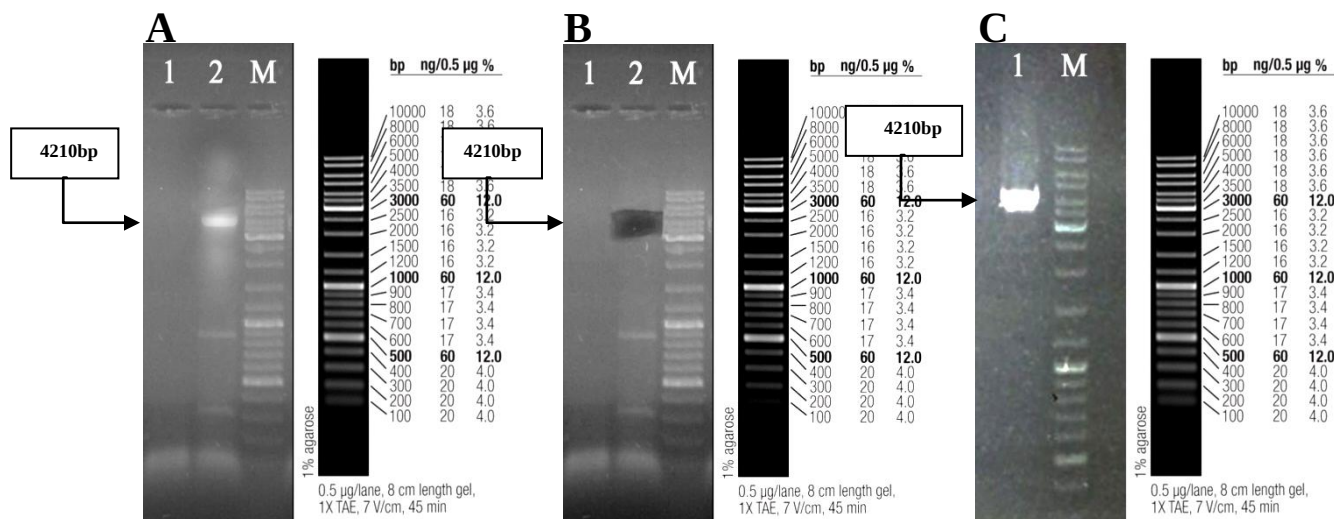
پس از انتقال ناقل پلاسمیدی PUC57 حامل ژن سنتتیک *Bac Phy* با ترجیح کدونی *E.coli* به سلولهای مستعد باکتری *E.coli* DH₅α و تایید تست کلونی PCR، از کلون‌هایی حاوی ژن *Bac phy* با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13، قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت‌باز تکثیر شد (شکل ۲-آ). کلونی‌های

نوترکیب *E.coli*-DH₅α حاوی پلاسمیدهای PUC57 حامل ژن *Bac Phy* کشت و پلاسمید نوترکیب استخراج شد (شکل ۲-ب). پس از آن به منظور تایید حضور ژن *Bac Phy* از نمونه استخراج پلاسمید شده واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال M13 انجام گرفت و محصول PCR قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت‌باز بود (شکل ۲-ج).

C



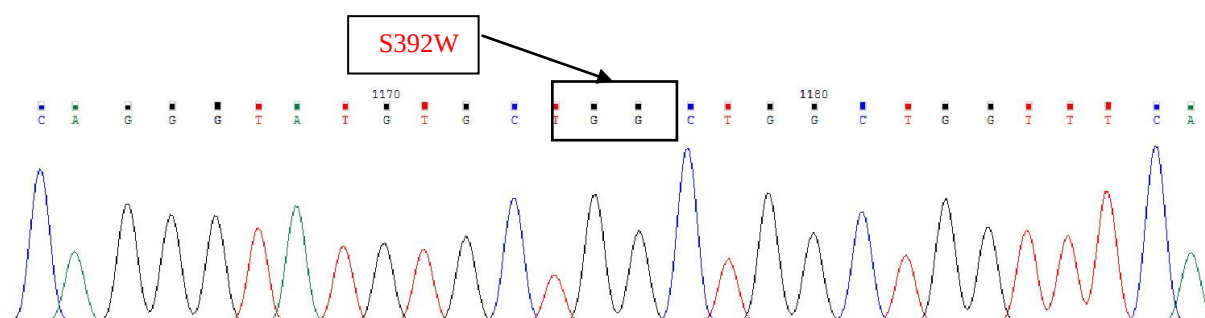
شکل ۲- (A) ژل آگارز نشان‌دهنده تایید کلونی PCR بر روی کلونی‌های حاوی ژن *Bac phy* در چاهک‌های شماره ۱ و ۲، و چاهک شماره M نشانگر مارکر. (B) ژل آگارز نشان‌دهنده استخراج پلاسمید از نمونه‌های *pUC57-Bac Phy*. (C) ژل آگارز نشان‌دهنده تایید PCR بر روی محصول استخراج پلاسمید حاوی ژن *Bac phy* چاهک‌های ۱ و ۲ نشانگر به ترتیب محصول استخراج پلاسمید و محصول PCR و چاهک شماره M نشانگر مارکر.



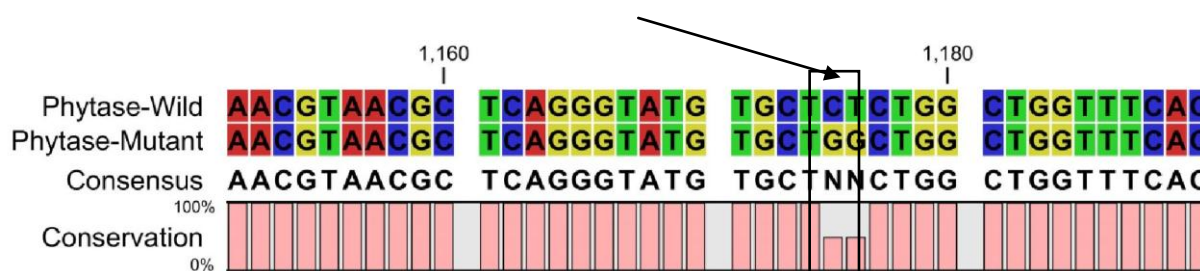
شکل ۳- (A) ژل آگارز یک درصد نشان‌دهنده واکنش PCR. (B) جایگاه برش و ریکآوری واکنش PCR بر روی ناقل حامل ژن فیتاز سنتتیک جهش‌یافته. چاهک شماره ۱ کنترل منفی، چاهک شماره ۲ محصول PCR باند ۴۲۱۰ bp و چاهک M نشانگر مارکر. (C) ژل آگارز یک درصد نشان‌دهنده واکنش هضم آنزیمی توسط *DpnI* بر روی محصول PCR که جهش‌زایی هدفمند را نشان می‌دهد. چاهک شماره ۱ سازه *pUC57-Bac Phy-Mut*، چاهک M نشانگر مارکر.

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 ۱۱۷۶ تک نوکلئوتید عوض شده به طوری که کدون TCT به TGG تغییر پیدا نموده است که حاصل آن تغییر در جایگاه اسید آمینه ۳۹۲، سرین به تریپتوفان است (شکل‌های ۴-۶).

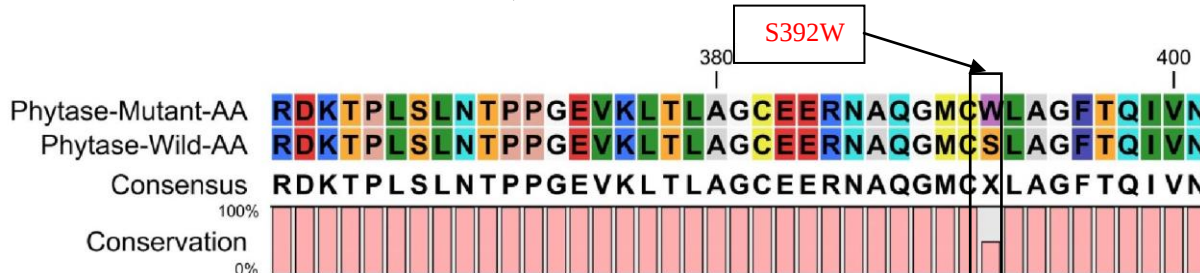
جهش‌زایی هدفمند در جایگاه S392W توسط پرایمرهای اختصاصی به روش QuikChange انجام شد و قطعات حاصل از واکنش PCR با استفاده از آنزیم *PFU* DNA polymerase تکثیر شدند (شکل ۳). ناقل پلاسمیدی PUC57 حامل ژن جهش‌یافته *Bac Phy-Mut* به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5 α انتقال و پلاسمید نو ترکیب استخراج شد. جهت کنترل صحت توالی تکثیر شده نمونه حاوی پلاسمید نو ترکیب PUC57-Bac Phy-Mut



شکل ۴- کروماتوگرام جایگاه تعویض نوکلئوتید دو مکان ۱۱۷۵ و ۱۱۷۶.



شکل ۵- نمایش تغییر دو نوکلئوتید در جایگاه جهش از حالت وحشی به جهش‌یافته به وسیله نرم‌افزار Clc Sequence Viewer.



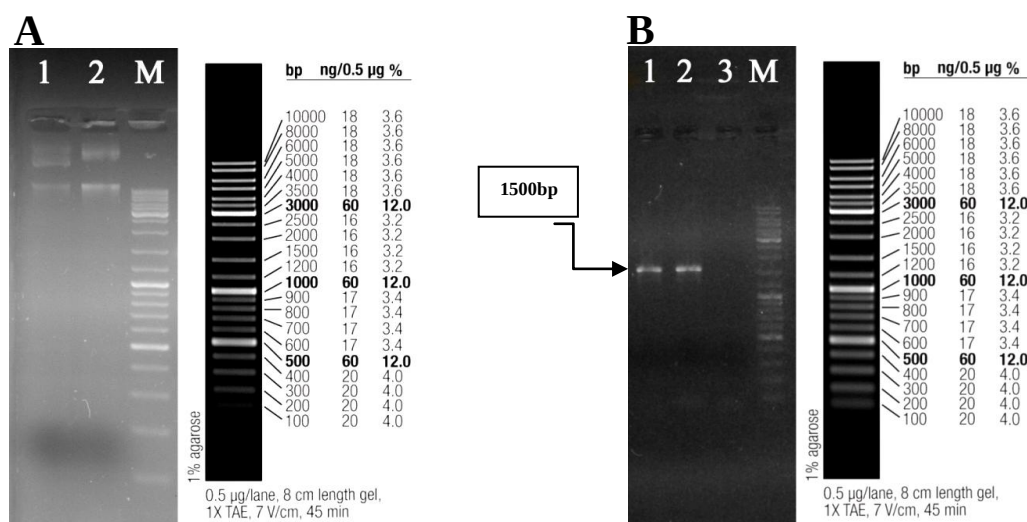
شکل ۶- نمایش تعویض اسید آمینه در جایگاه جهش ۳۹۲ از سرین به تریپتوفان به وسیله نرم‌افزار Clc Sequence Viewer.

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 ۴۲ کیلو دالتون بود که در شکل ۸ نمایش

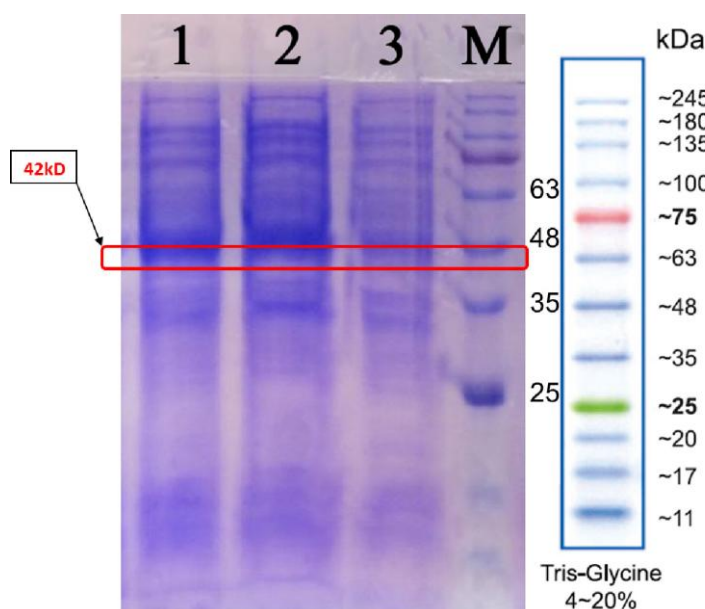
سازه‌های PUC57-Bac Phy-Wild و PUC57-Bac Phy-Mut پس از ساب کلون در ناقل بیانی pET-26b(+) به میزبان *E. coli* BL21 ترانسفورم شدند و کلونی‌های حامل pET-26b(+)-Bac *Phy-Mut* و *Phy-Wild* در محیط انتخابی LB حاوی کانامایسین مایع کشت و پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شد (شکل A-۷) و حضور ژن‌های *Bac Phy-Wild* و *Bac Phy-*

است که pH بهینه فیتاز جهش یافته با الگوی همسان با فیتاز طبیعی دارای pH بهینه ۵ است (شکل ۱۰). بر اساس نتایج به دست آمده پایداری دمایی فیتاز جهش یافته در دماهای ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد به ترتیب ۱۸، ۱۹، ۹ و ۶ درصد بهبود یافته است که تفاوت معنی داری دارد ($P < 5\%$) (شکل ۱۱).

داده شده است. مطالعات در مورد محدوده فعالیت دمایی فیتاز جهش یافته نشان داد که فیتاز جهش یافته همانند فیتاز طبیعی دارای دمای بهینه ۵۵ درجه سانتی گراد می باشد (شکل ۹). نتایج بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد که فیتاز جهش یافته دارای محدوده pH وسیع با تمایل و پایداری بسیار در pH های اسیدی



شکل ۷- (A) ژل آگارز نشان دهنده استخراج پلاسمید حاوی ژن های *Bac phy* وحشی و جهش یافته، (B) محصول PCR تاییدی. 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.



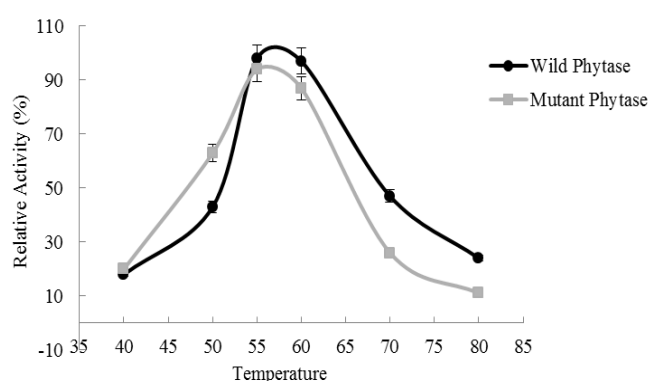
شکل ۸- ژل SDS-PAGE الکتروفورز عمودی از سوپرناتانت نمونه ها جهت بررسی بیان آنزیم فیتاز. چاهک شماره ۱ سوپرناتانت جدا شده از آنزیم فیتاز بیان شده از ژن طبیعی، چاهک شماره ۲ سوپرناتانت جدا شده از آنزیم فیتاز بیان شده از ژن جهش یافته و چاهک شماره ۳ کنترل منفی.

پس از کلون‌سازی ژن جهش‌یافته *Bac phy-Mut* و تعیین توالی، فیتاز طبیعی و جهش‌یافته به‌طور موفقیت‌آمیز به شکل خارج سلولی بیان شد. خصوصیات فیزیکی شیمیایی فیتاز جهش‌یافته و طبیعی نوترکیب تعیین شد. وزن مولکولی آنزیم روی SDS-PAGE، ۴۲ 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.

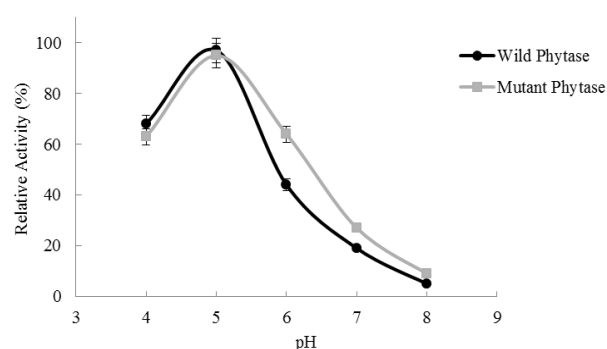
(Hesampour et al. 2015) نشان دادند با بررسی خصوصیات بیوشیمیایی در آسپرژیلوس نشان دادند که فیتاز نوترکیب دارای محدوده pH وسیع با تمایل و پایداری بسیار در pHهای اسیدی و دارای دو pH بهینه در ۲/۵ و ۵/۵ است که حداکثر فعالیت در pH=۵/۵ مشاهده می‌شود (Hesampour et al. 2015).

تحقیقات در سال ۲۰۱۴ 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 ۴/۵ و ۶۰ 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).

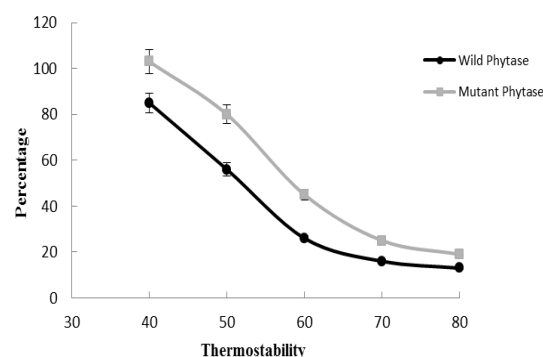
فیتاز مورد استفاده در افزودنی جیره غذایی در مرحله feed pelleting در محدوده دمایی ۷۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد تیمار حرارتی می‌شود (Oh et al. 2004; Spring et al. 1996). نتایج مطالعه نشان داد که فیتاز جهش‌یافته نوترکیب به‌ترتیب ۲۵ و ۱۹ درصد از فعالیت خود را حفظ نمود که این در حالی است که فیتاز طبیعی (WT) در دماهای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



شکل ۹- پروفایل فعالیت فیتازی در دماهای متغیر



شکل ۱۰- پروفایل فعالیت فیتازی در pH های مختلف



شکل ۱۱- پایداری حرارتی فیتاز جهش‌یافته و وحشی در دماهای متغیر

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

۱۶ و ۱۳ درصد فعالیت داشتند که نشان دهنده بهبود پایداری دمایی فیتاز جهش یافته در مقایسه با طبیعی می باشد. نتایج بررسی ساختاری بیوانفورماتیکی نشان می دهد که همیشه تمام اسیدهای آمینه که در داخل پروتئین قرار می گیرند غیر قطبی نیستند و در مواردی پس از تا خوردگی نهایی پروتئین برخی از اسیدهای آمینه قطبی در داخل قرار می گیرند. لذا با استفاده از مهندسی پروتئین می توان با جایگزین کردن اسیدهای آمینه های قطبی داخلی با اسید آمینه غیر قطبی باعث میانکنش هیدروفوب مازاد بین اسید آمینه های داخل پروتئین شد که افزایش تعداد پیوند هیدروفوب در نتیجه باعث محکم شدن ساختار پروتئین و پایداری بیش تر پروتئین در برابر عوامل فیزیکوشیمیایی مانند حرارت شود. در مطالعه حاضر نیز سرین هیدروفیل به تریپتوفان جایگزین شد که حاصل آن افزایش تعداد پیوند هیدروفوب بود به طوری که بررسی دقیق بیوانفورماتیکی و مقایسه ساختار فیتاز طبیعی و جهش یافته نشان داد که در فیتاز طبیعی سرین جایگاه ۳۹۲ یک پیوند به طول $3.02 \text{ \AA}$ 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 می شود که در نتیجه دو پیوند به طول $3.10 \text{ \AA}$ و $2.62 \text{ \AA}$ تشکیل می شود. ایجاد پیوند هیدروفوب اضافه احتمالا می تواند دلیلی بر پایداری دمایی بیشتر فیتاز جهش یافته در مقایسه با فیتاز طبیعی باشد (شکل ۱). مطالعاتی در مورد جهش زایی 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 K65E و K46E، ۲۰ درصد مقاومت حرارتی افزایش می یابد (Kim and Lei 2008). در مطالعه ای که توسط Liao et al. (2013) انجام شد، جهش زایی نشان داد که جهش ها باعث بهینه نمودن پایداری دمایی از طریق گسترش واکنش های یونی و پیوندهای هیدروژنی

شد، به طوری که جهش یافته دوتایی ترکیبی نسبت به فیتاز WT، ۲۰ درصد افزایش پایداری در دمای 80°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 می داد که Q349N باعث پایداری حرارتی به میزان ۷/۵ درجه سانتی گراد می شود (Wang et al. 2015).

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

مشکلات ناشی از حضور فیتات در دستگاه گوارش جانوران تک معده ای، پر هزینه بودن تولید فسفر به روش صنعتی و همچنین آلودگی های ناشی از استفاده ی فسفات آلی به عنوان مکمل های دامی بر روی آب های زیر زمینی، استفاده از یک آنزیم مناسب به عنوان مکمل در جیره ی غذایی این حیوانات ضروری است. نتایج مطالعه انجام شده نشان داده شد که با توجه به بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم فیتاز طبیعی WT و جهش یافته، فیتاز بیان شده به شکل خارج سلولی دارای محدوده pH وسیعی می باشد که می تواند با توجه به بهینه pH اسیدی در معده دام و طیور در مقابل اسید معده پایدار بماند. از طرفی پایداری فیتاز جهش یافته در دماهای ۶۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد می تواند گزینه مناسبی جهت افزودنی جیره غذایی دام و طیور به منظور 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.

- 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 Environmental 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.