

کلونینگ، بیان و تخلیص فیتاز تغییر یافته اشرشیاکلی

ملیحه حلاجی^۱ (M.Sc)، مریم پرهام فر^۱ (M.Sc)، احسان رئوفی^۲ (M.Sc)، حمید ابطی^{۳*} (Ph.D)

۱- گروه زیست فناوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

چکیده

هدف: فیتازها گروهی از فسفاتازها هستند که قادر به هیدرولیز فیتیک اسید می‌باشند. فیتازها با تجزیه‌ی فیتات قادر به کاهش یا حذف اثرات مخرب فیتات هستند. فیتاز اسیدی و مقاوم دمایی همراه با تولید بالا و خالص و البته یک سیستم نسبتاً ارزان دارای کاربرد در مقیاس وسیع می‌باشد. لذا در این مطالعه با تغییراتی در توالی آنزیم، تولید فیتاز نو ترکیب با طول کم‌تر و میزان بیان بیش‌تر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: توالی ژن فیتاز از پایگاه NCBI گرفته شد. پس از مطالعات بیوانفورماتیکی و اعمال تغییرات مورد نظر به منظور افزایش بیان پروتئین، تکثیر ژن با استفاده از PCR انجام شد. از سویه E.coli BL21 (DE3) برای بیان پروتئین استفاده شد. تخلیص پروتئین با کیت Ni-NTA انجام شد و نهایتاً فعالیت آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: فیتاز با موفقیت بیان و تخلیص گردید. سنجش فعالیت آنزیم نشان‌دهنده‌ی فعالیت قابل توجهی بود. نتیجه‌گیری: فیتاز نو ترکیب تولید شده علی‌رغم حذف بخش‌هایی از آنزیم فعالیت بالایی داشت.

واژه‌های کلیدی: همانند سازی ملکولی، اسید فیتیک، فیتاز

مقدمه

فیتیک اسید (میواینوزیتول ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶-هگزاکسی فسفات) فرم اصلی ذخیره‌ی فسفر در غلات، لگوم‌ها و دانه‌های روغنی است که ۶۰ تا ۹۰ درصد کل فسفر موجود در این گیاهان را تشکیل می‌دهد [۱، ۲]. فیتات به عنوان یک ماده‌ی ضد تغذیه‌ای قوی که به مواد معدنی مختلف، پروتئین‌ها و آنزیم‌های گوارشی متصل شده و مانع جذب آن‌ها شده، شناخته می‌شود و در نتیجه اثرات مخربی بر سلامت انسان و حیوانات مونوگاستریک می‌گذارد [۳].

آنزیم تجزیه‌کننده فیتات، که تحت عنوان فیتاز شناخته شده جز کلاس فسفاتازها بوده که آزاد کردن فسفات از فیتات

را انجام می‌دهد. مطالعات نشان داده که استفاده از مکمل فیتاز سبب افزایش توانایی بدن در جذب مواد معدنی ضروری هم‌چون منیزیم، آهن و کلسیم می‌شود. طبق مطالعات، بهبود جذب آهن از ۱ تا ۱۱/۶ برابر و بهبود جذب روی از ۱/۴ تا ۲ برابر از طریق استفاده از فیتاز در رژیم غذایی به دست می‌آید [۴].

فیتاز هم‌چنین قادر به کاهش آلودگی فسفری ناشی از ضایعات حیوانی بوده که این ضایعات می‌توانند منجر به رشد ارگانسیم‌های آبی و تولید نوروکسین مضر برای انسان گردد. فیتاز هم‌چنین منجر به حفظ منابع گران‌قیمت و تجدیدناپذیر فسفر می‌شود [۵-۷]. نتایج نشان داده، استفاده از

آنالیزهای بیش تر توسط نرم افزار BLAST انجام گرفت. با توجه به ناحیه آنزیمی مشخص شده، پرایمر رفت شامل ناحیه برش BamHI و پرایمر برگشت شامل ناحیه برش XhoI طراحی گشت.

پرایمر رفت: 5'CGGGATCCCAATCTGCATTCGCTCAG3'

پرایمر برگشت: 5'CCGCTCGAGAAGCGTCCAGTTGAGCTC3'

جداسازی و تخلیص DNA ژنومی. برای تخلیص DNA ژنومی از باکتری اشریشیاکلی سویه K-12 استفاده شد. اساس تخلیص طبق روش NaCl/CTAB انجام شد [۱۵، ۱۴]. ۱۸ ساعت قبل، باکتری E coli در محیط NB استریل فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شد. پس از سانتریفیوژ کشت باکتری، رسوب حاصل در بافر TE حل گردید. باکتری با استفاده از SDS و پروتئیناز K لیز شد. DNA ژنومی باکتری با استفاده از محلول NaCl/CTAB استخراج شد. پروتئین ها و سایر اجزای سلولی با استفاده از فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل و سانتریفیوژ حذف گردید. DNA حاصل با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد و پس از شستشو در اتانول ۷۰ درصد در بافر TE حل گردید.

تکثیر ژن. ناحیه آنزیمی تعیین شده با استفاده از PCR تکثیر گردید. PCR با ۵ نانوگرم DNA ژنومی به عنوان الگو، پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول، dNTP 10 میلی مولار، ۰/۵ واحد آنزیم Pfu پلیمراز (vivantis، مالزی)، منیزیم کلراید ۱ میلی مولار و PCR بافر ۱۰X در حجم ۱۱۲۵ انجام شد. شرایط تکثیر به این صورت دنبال شد: واسرشت کردن اولیه ۹۵ درجه ۵ دقیقه، واسرشت کردن ۹۵ درجه یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها به الگو ۵۸ درجه یک دقیقه، تکثیر ژن هدف ۷۲ درجه یک دقیقه و تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. فرایند PCR35 سیکل با دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) صورت پذیرفت. بررسی نهایی محصول PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد صورت گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم برمایید و مشاهده آن با دستگاه ترانس

فیتاز به عنوان مکمل غذایی در رژیم غذایی حیوانات مونوگاستریک (ماکیان، خوک و ...) منجر به کاهش ۵۰ درصدی دفع فسفر از طریق فضولات آنها شده و به دنبال آن کاربرد بیوتکنولوژی فیتاز در صنعت غذا مورد توجه قرار گرفته است [۸].

از بین فیتازهای شناخته شده، فیتاز اشریشیاکلی با توجه به خصوصیات مطلوبی که دارد بیش تر مورد توجه قرار گرفته است زیرا فعالیتی چندین برابر فیتاز جدا شده از قارچ اسپرژیلوس نایجر داشته و در نتیجه برای تولید صنعتی و با میزان بالا مطلوب تر است [۹]. این فیتاز جز دسته هیستیدین اسید فسفاتازها بوده که قادر به تجزیه فیتات در pH اسیدی معده است و فعالیت اختصاصی بالاتری هم نسبت به فیتازهای دیگر دارد [۱۰].

امروزه تولید این آنزیم بر اساس تولید پروتئین های نوترکیب می باشد. مطالعات پیشین در رابطه با پروتئین ها مشخص نموده که پروتئین های کوچک تر در مقایسه با پروتئین های بزرگ تر بیان بالاتری دارند به طوری که ۸۰ درصد پروتئین های کوچک تر از ۳۵۰ اسید آمینه با موفقیت بیان می شوند. علاوه بر این مشخص شده کوتاه کردن طول پروتئین به عنوان یک مکانیسم موثر در کاهش هزینه های تولید به کار گرفته می شود [۱۱-۱۳]. لذا در این مطالعه سعی شده با جداسازی و تولید ناحیه آنزیمی فیتاز، میزان تولید را افزایش داده و به بررسی میزان فعالیت آنزیم کوتاه شده پرداخت.

مواد و روش ها

تعیین ناحیه دخیل در فعالیت آنزیمی. توالی ژن آنزیم فیتاز اشریشیاکلی از پایگاه NCBI با شماره دسترسی AF537219.1 تهیه شد. برای تعیین ناحیه آنزیمی از چندین سایت از جمله PDB، PDBsum و UniProt استفاده شد. نتایج حاصل از هر سه پایگاه مورد مقایسه قرار گرفته و ناحیه مورد توافق هر سه پایگاه به عنوان ناحیه آنزیمی تعیین شد. طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار AlleleID و

میکرولیتر سوستر) مخلوط شده و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید سپس ۴۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) به عنوان مهارکننده آنزیم و بعد ۴۰۰ میکرولیتر محلول رنگی اضافه شد. نهایتاً OD نمونه در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. ایجاد رنگ آبی نشان‌دهنده آزاد شدن فسفات و فعالیت فیتاز می‌باشد. یک واحد فعالیت آنزیم به صورت مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول فسفات را در ۱ دقیقه و تحت شرایط آزمایش آزاد کند، تعریف می‌گردد.

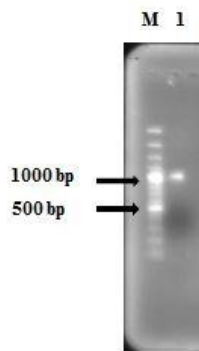
نتایج

تعیین ناحیه آنزیمی ژن فیتاز. با توجه به اطلاعات به دست آمده از هر سه پایگاه، توالی اسید آمینه‌ای ۲۷ تا ۳۳۷ با در نظر گرفتن تمام عوامل موثر در فعالیت آنزیمی به عنوان تاثیرگذارترین بخش پروتئین در فعالیت آنزیمی شناخته شد.

ELKLESVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTPTDAWPTWPKLWGLTPRGELIAYLGHYQRQLVADGLLAKKGPQSG
QVAIIADVDERTRKTGEFAAGLAGLPDCAITVHTQADTSSPDLFNLKGTGVCQLDNANVTDAILSRAGGSIADFTGHRQ
TAFRELERLVNFPQSNLCKREKQDESCLTQALPSELKVSADNVSLTGAVALASMLTKIFLLQQAQGMPEPGWGRITDS
HQWNTLLSHNAQFYLLQRTPEVARSRATPLLDLTKALTTPHPQKQAYGVTLPTSVLFIAGHDTNLANLGGALE

شکل ۱. توالی آمینواسیدی موثر در فعالیت آنزیم فیتاز اشرشیاکلی

تکنیک ژن. DNA ژنومی اشرشیاکلی برای تکثیر ژن فیتاز استخراج شد. تکثیر ناحیه آنزیمی با موفقیت انجام شد و نتیجه روی ژل آگارز ۸/۰ درصد مشاهده شد (شکل ۲). نتایج PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی پلاسمید نوترکیب، نشان‌دهنده تشابه توالی تکثیر یافته با توالی نوکلئوتیدی ناحیه آنزیمی ژن فیتاز بود



شکل ۲. ژل الکتروفورز محصول PCR. M. مارکر DNA. چاهک ۱. PCR ناحیه آنزیمی ژن فیتاز

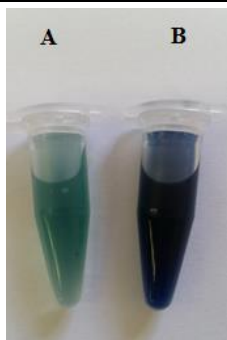
لومیناتور UV انجام گرفت. سپس محصول PCR با استفاده از کیت Roche (آلمان) تخلیص شد.

کلونینگ. برای کلون‌سازی ژن مورد نظر در پلاسمید pET-32a بدین صورت عمل شد: هضم آنزیمی بر روی محصول PCR و وکتور pET-32a با استفاده از آنزیم‌های BamHI و XhoI انجام شد. سپس اتصال بین قطعات (ligation) با استفاده از آنزیم T4 Ligase (فرمنتاز، لیتوانی) صورت پذیرفت. ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب در سلول‌های مستعد E. coli DH5α و به دنبال آن برای بیان پروتئین، ترانسفورماسیون به سلول‌های مستعد E. coli BL21 (DE3) انجام شد. برای تایید کلونینگ از روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن، هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد.

تولید و تخلیص پروتئین E. coli BL21 (DE3). حاوی پلاسمید نوترکیب، به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط نوترین براث حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ μg/ml تلقیح گردید. سپس در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه و ۲۲۰ دور در دقیقه گذاشته شد تا زمانی که کدورت باکتری در OD ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ رسید. تولید پروتئین با اضافه کردن IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار انجام شد. نمونه‌های قبل از القا، دو و چهار ساعت پس از القا جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از ژل-SDS PAGE ۱۲٪ تولید پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص پروتئین القا شده توسط کیت تخلیص Ni-NTA (کیاژن، آمریکا) بر اساس کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت. آنالیز کمی و کیفی تخلیص پروتئین با استفاده از سنجش برادفورد و ژل SDS-PAGE ۱۲٪ انجام شد [۱۶-۱۸].

سنجش فعالیت. به منظور ریفولدینگ و افزایش فعالیت از تکنیک دیالیز استفاده شد. از بافر PBS به همراه اسید آمینه‌های سیستئین، آرژنین، گلیسین و پرولین استفاده گردید. نهایتاً تعیین فعالیت، طبق روش سولفات آهن-مولیبدات بلو تغییر یافته انجام شد [۱۹]. در این روش مقدار مشخصی از آنزیم و سوستر (۱۰۰ میکرولیتر آنزیم و ۳۰۰



شکل ۵. سنجش فعالیت ناحیه ی آنزیماتیک فیتاز. A بلانک، B ناحیه ی آنزیمی فیتاز

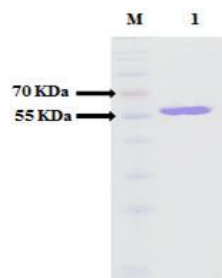
بحث و نتیجه گیری

اهمیت آنزیم فیتاز در زمینه ی تغذیه و سلامت انسان، حفاظت از محیط زیست، صنعت دام و طیور و بیوتکنولوژی اثبات شده است. هم چنین مشخص شده که استفاده از فیتاز، باعث کاهش آزاد شدن فیتات تجزیه نشده به محیط، کاهش آلودگی فسفری و در نتیجه عدم استفاده از منابع حیاتی فسفر می شود [۶].

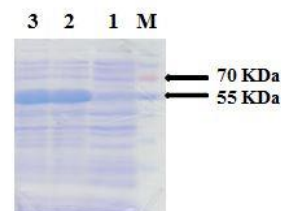
در این مطالعه به منظور افزایش بیان پروتئین و کاهش هزینه های تولید، ناحیه آنزیماتیک فیتاز، تولید و تخلیص گشت. نتایج به دست آمده نشان داد که ناحیه ی آنزیماتیک فیتاز به درستی تولید و تخلیص شده است و وکتور بیانی pET32a یک سیستم کارآمد در بیان پروتئین مورد نظر می باشد. سنجش فعالیت ناحیه ی آنزیمی نیز نشان دهنده فعالیت بالای آنزیم (۷۳ U/mg) بوده که منطبق بر گزارشات پیشین می باشد.

Rao و همکارانش توالی کامل آنزیم باسیلوس را به صورت انکلوژن بادی تولید نموده و روشی بسیار مشابه را برای ریفلود آنزیم به کار برده و نهایتاً فعالیت آنزیم را ۱۶ U/mg گزارش کردند [۲۰]. Eric Rodriguez و همکارانش توالی کامل و ناحیه ی کدکننده ی ژن فیتاز E. coli را کلون نموده و فعالیت اختصاصی این نواحی را به ترتیب ۳۰/۷ U/mg و ۲۸/۹ U/mg گزارش کردند [۲۱]. آن ها هم چنین در دو مطالعه ی جداگانه ی دیگر از کلونینگ فیتاز E. coli، فعالیت آنزیم را به ترتیب ۸/۱ U/mg و ۴۱ U/mg گزارش کردند [۲۲، ۲۳].

تولید پروتئین. بیان پروتئین به وسیله ی IPTG به مدت ۴ ساعت دنبال شد و نتیجه ی آن روی ژل SDS-PAGE ۱۲٪ بررسی شد. باند ضخیمی در محدوده ۵۶ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۳). بعد از بیان پروتئین، تخلیص با استفاده از کیت Ni-NTA و طبق پروتکل انجام شده و آنزیم فیتاز با خلوص بالایی تخلیص گشت (شکل ۴). غلظت پروتئین نو ترکیب تولید شده ۲/۵ mg/ml بود.

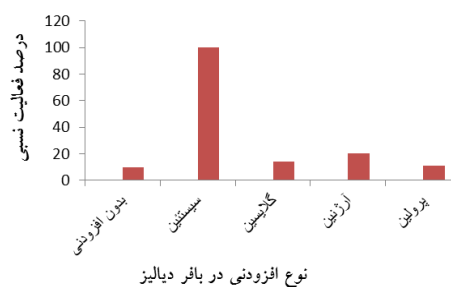


شکل ۳. القا پروتئین. M. مارکر پروتئین. ستون ۱. پیش از القا. ستون ۲. دو ساعت بعد از القا. ستون ۳. چهار ساعت بعد از القا



شکل ۴. تخلیص پروتئین. M مارکر پروتئین. ستون ۱. تخلیص پروتئین

سنجش فعالیت. نتایج حاصل از دیالیز نشان داد بهترین ریفلودینگ در حضور اسید آمینه سیستئین در بافر دیالیز حاصل می شود (شکل ۵). فعالیت آنزیم فیتاز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تعیین شد (شکل ۶). فعالیت ویژه ناحیه آنزیماتیک فیتاز ۷۳ U/mg محاسبه شد که این میزان فعالیت به دست آمده قابل قبول و کاربردی می باشد.



شکل ۵. اثر افزودنی های مختلف در بافر دیالیز بر ریفلودینگ پروتئین

NB 1.5X به همراه عصاره مخمر بیش تر از محیط‌های NB 1.5X فاقد مخمر، NB 2X و LB بود.

در مطالعه ما ناحیه‌ی آنزیمی فیتاز نوترکیب به دلیل بیان بالا در سلول میزبان به صورت نامحلول درآمد. برای باز کردن رشته‌های پروتئینی در فرم انکلوژن بادی از غلظت بالای اوره استفاده شد. بازآرایی صحیح پروتئین‌ها با حذف عوامل دناتوره‌کننده آغاز می‌شود. یکی از روش‌هایی که برای حذف این عوامل استفاده می‌شود دیالیز پروتئین با استفاده از یک کیسه نیمه تراوا می‌باشد [۲۸].

در این مطالعه، تکنیک دیالیز استفاده شده و بازآرایی پروتئین با استفاده از بافر PBS به عنوان بافر پایه انجام شد (دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت). به منظور افزایش میزان ریفلدینگ، این بافرها به همراه ترکیباتی مانند انواع اسیدآمینها استفاده گردید و تأثیر آن‌ها بر روند دیالیز بررسی شد. اسیدآمین‌هایی مانند آرژنین، گلیسین و پرولین به منظور مهار تجمع پروتئین و افزایش میزان ریفلدینگ پروتئین‌ها استفاده می‌شوند [۲۹، ۳۰]. سیستمین نیز برای تشکیل باندهای دی سولفیدی به کار برده می‌شود [۳۱]. در این مطالعه بهترین ریفلدینگ و عمل‌کرد زمانی به دست آمد که اسیدآمین سیستمین در بافر دیالیز استفاده شد و با افزایش غلظت آن میزان ریفلد و فعالیت نیز افزایش می‌یافت. بعد از سیستمین به ترتیب آرژنین و گلیسین که هم در تسریع ریفلدینگ و هم جلوگیری از تجمع پروتئین به هنگام ریفلدینگ نقش دارند بیش‌ترین بازایی فعالیت آنزیم را در پی داشتند. پرولین تقریباً هیچ‌گونه اثری بر ریفلدینگ فیتاز نداشت. افزودنی‌های تسریع‌کننده فولدینگ پروتئین اینتراکشن‌های پروتئین را افزایش می‌دهند در حالی که افزودنی‌های کاهنده تجمع پروتئین مانع اینتراکشن‌های جانبی بین حد واسط‌های ایجاد شده در هنگام فولدینگ پروتئین می‌شوند.

به دست آوردن مقدار قابل قبولی از پروتئین فعال با هزینه پایین، هدف اصلی تولید پروتئین نوترکیب به فرم انکلوژن بادی است. اما یک روش یا تکنیک خاصی که همه پروتئین‌ها

از جمله قوی‌ترین سیستم‌ها برای بیان ژن و تولید پروتئین نوترکیب در میزبان E.coli سیستم pET می‌باشد. در این سیستم، بیان ژن هدف تحت کنترل پروموتور قوی باکتریوفاز T7 می‌باشد که تحت کنترل اپرون Lac بوده و در میزبان E.coli، رونویسی از ژن هدف تحت کنترل این پروموتور توسط RNA پلیمرز باکتریوفاز T7 که در کروموزوم باکتری کلون شده، انجام می‌شود. تولید محصول در این سیستم بیش‌تر از سیستم‌هایی است که در آن‌ها رونویسی وابسته به RNA پلیمرزهای سلول میزبان است [۲۴].

پلاسمید apET32 دارای ترادف ویژه مربوط به ۶ اسید آمینه هیستیدین (His.tag6) می‌باشد که در ناحیه ۵' مکان کلونینگ ژن قرار گرفته و به انتهای آمینی پروتئین اضافه می‌شود. این ترادف برای خالص‌سازی پروتئین تولید شده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی به‌کار می‌رود. این وکتور هم چنین دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است که در غربالگری نقش مهمی ایفا می‌کند [۲۵]. بنابراین از apET32 به عنوان وکتور کلونینگ و بیانی استفاده گردید.

در این مطالعه از باکتری E.coli سویه‌ی DH5α که با ایجاد چندین جهش برای ترانسفورماسیون کارایی بالایی پیدا کرده است، به عنوان میزبان کلونینگ استفاده شد. سویه‌ی E.coli DH5α به دلیل دارا بودن پروتئاز، باعث شکسته شدن پروتئین نوترکیب می‌شود. بنابراین نمی‌توان از آن برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده کرد، اما از آن‌جا که هیچ‌گونه پلاسمیدی ندارد، برای تکثیر و نگهداری پلاسمیدها از آن استفاده شد. از E.coli BL21 جهت بیان پروتئین نوترکیب استفاده گردید. این سویه غیر بیماری‌زا بوده، توانایی بقا در بافت‌های میزبان را نداشته و در ساده‌ترین محیط کشت‌ها رشد می‌کند [۲۶]. به همین جهت در این مطالعه برای افزایش تولید پروتئین و جلوگیری از تخریب آنزیمی از سویه BL21 (DE3) استفاده شد که فاقد پروتئازهای متصل به غشاء از جمله DegP, HtpR, OmpT, Lon می‌باشد، بنابراین تخریب پروتئین نوترکیب در آن صورت نمی‌گیرد [۲۷]. در بین محیط‌های القا استفاده شده، بیان پروتئین در محیط

منابع

- [1] Kerovu J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2079-85.
- [2] Zinin NV, Serkina AV, Gelfand MS, Shevelev AB, Sineoky SP. Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 283-290.
- [3] Puhl AA. Expanding our knowledge of protein tyrosine phosphatase-like phytases: mechanism, substrate specificity and pathways of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation: Lethbridge, Alta.: University of Lethbridge, Faculty of Arts and Science, 2006; 2006.
- [4] Troesch B, Jing H, Laillou A, Fowler A. Absorption studies show that phytase from *Aspergillus niger* significantly increases iron and zinc bioavailability from phytate-rich foods. *Food Nutr Bull* 2013; 34: S90-S101.
- [5] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, Han PL, Cheng ZM, Li Y. High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 418-428.
- [6] Lei XG, Porres JM. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 1787-1794.
- [7] Dai F, Qiu L, Ye L, Wu D, Zhou M, Zhang G. Identification of a phytase gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *PLoS one* 2011; 6: e18829.
- [8] El-Toukhy NM, Youssef AS, Mikhail MG. Isolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. *African J Biotechnol* 2013; 12.
- [9] Yao MZ, Zhang YH, Lu WL, Hu MQ, Wang W, Liang AH. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J Appl Microbiol* 2012; 112: 1-14.
- [10] Wu TH, Chen CC, Cheng YS, Ko TP, Lin CY, Lai HL, Huang TY, Liu JR, Guo RT. Improving specific activity and thermostability of *Escherichia coli* phytase by structure-based rational design. *J Biotechnol* 2014; 175: 1-6.
- [11] Quevillon-Cheruel S, Collinet B, Trésaugues L, Minard P, Henckes G, Aufrère R, et al. Cloning, production, and purification of proteins for a medium-scale structural genomics project. *Methods Mol Biol* 2007; 363: 21-37.
- [12] Warringer J, Blomberg A. Evolutionary constraints on yeast protein size. *BMC Evol Biol* 2006; 6: 61.
- [13] Brocchieri L, Karlin S. Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucl Acids Res* 2005; 33: 3390-3400.
- [14] Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari MR, Soufian S, Hasanzadeh L. Expression, purification and evaluation of antigenicity of CagA antigenic fragment of *helicobacter pylori*. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6. (Persian).
- [15] Abbasian SS, Ghaznavi Rad E, Akbari N, Zolfaghari MR, Pakzad I, Abtahi H. Overexpression and enzymatic assessment of antigenic fragments of hyaluronidase recombinant protein fom *streptococcus pyogenes*. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8.
- [16] Mirjamali NA-S, Soufian S, Molaee N, Abbasian SS, Abtahi H. Cloning and expression of the enzymatic region of *Streptococcal hyaluronidase*. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17: 667-672.
- [17] Hasanzadeh L, Ghaznavi-Rad E, Soufian S, Farjadi V, Abtahi H. Expression and antigenic evaluation of *vacA* antigenic fragment of *helicobacter pylori*. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16: 835-840.

را ریفولد کند وجود ندارد. وقتی که شرایط مناسب برای ریفولدینگ پروتئین شناسایی شد بعد از طی زمان مطلوب، فولدینگ صورت می‌گیرد. علاوه بر شرایط بافری فراهم شده، دمای یک فاکتور بسیار مهم در فرایند ریفولدینگ می‌باشد. دماهای پایین به فولدینگ پروتئین کمک نموده، ضمن این که تمایل به تجمع پروتئین را کاهش می‌دهند. البته دمای پایین سرعت ریفولدینگ را کاهش داده و زمان مورد نیاز برای ریفولدینگ را افزایش می‌دهد. لذا در این مطالعه تمام دیالیزها در دمای مطلوب ۴ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفته است. با توجه به این که آنزیم فیتاز حاوی پیوندهای دی سولفیدی بوده، اسید آمینه سیستئین با احیا باندهای دی سولفیدی موجود در توالی آنزیمی سبب بازآرایی فیتاز گردیده و نهایتاً بیش‌ترین فعالیت آنزیم را نیز به دنبال داشته است. اما افزودنی‌های دیگر با توجه به عدم توانایی در کمک به تشکیل باندهای دی سولفیدی، قادر به ریفولدینگ پروتئین نبودند.

این مطالعه اولین گزارش از کلونینگ، بیان و بررسی فعالیت ناحیه‌ی آنزیماتیک فیتاز می‌باشد. نتایج این تحقیق، نشان‌دهنده‌ی تولید موفق این ناحیه به صورت نو ترکیب بوده است. علاوه بر این فعالیت این ناحیه در مقایسه با مطالعات قبلی قابل قبول و کاربردی می‌باشد. بنابراین تولید ناحیه آنزیماتیک فیتاز اشرشیاکلی با فعالیت بالا امکان‌پذیر است.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در بردارنده بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ملیحه حلاجی در دانشگاه علوم پزشکی اراک بوده که هزینه آن به وسیله معاونت تحقیقات و فناوری تأمین گردیده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم در آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی و آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک اعلان می‌دارند.

phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. Arch Biochem Biophys 2000; 382: 105-112.

[24] Sambrook J, Russell DW. Preparation of genomic DNA from mouse tails and other small samples. CSH Protoc 2006; 2006: prot4038.

[25] Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol 1998; 16: 54-60.

[26] Khoo O, Suntrarachun S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. Asian Pac J Trop Biomed 2012; 2: 159-162.

[27] Sugimura K, Higashi N. A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1988; 170: 3650-3654.

[28] Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. Biomolecules 2014; 4: 235-251.

[29] Matsuoka T, Hamada H, Matsumoto K, Shiraki K. Indispensable structure of solution additives to prevent inactivation of lysozyme for heating and refolding. Biotechnol Prog 2009; 25: 1515-1524.

[30] Samuel D, Ganesh G, Yang PW, Chang MM, Wang SL, Hwang KC, et al. Proline inhibits aggregation during protein refolding. Protein Sci 2000; 9: 344-352.

[31] De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. Methods Enzymol 1999; 309: 217-236.

[18] Farhangnia L, Ghaznavi Rad E, Molaei N, Abtahi H. Cloning, expression and purification of recombinant prollystaphin protein and evaluating its in vitro antistaphylococcal activity. Koomesh 2014; 15: 441-448. (Persian).

[19] Shao N, Huang H, Meng K, Luo H, Wang Y, Yang P, Yao B. Cloning, expression, and characterization of a new phytase from the phytopathogenic bacterium *Pectobacterium wasabiae* DSMZ 18074. J Microbiol Biotechnol 2008; 18: 1221-1226.

[20] Rao D, Rao K, Reddy V. Cloning and expression of *Bacillus* phytase gene (phy) in *Escherichia coli* and recovery of active enzyme from the inclusion bodies. J Appl Microbiol 2008; 105: 1128-1137.

[21] Rodriguez E, Han Y, Lei XG. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* Acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. Biochem Biophys Res Commun 1999; 257: 117-123.

[22] Rodriguez E, Porres JM, Han Y, Lei XG. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* Phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro. Arch Biochem Biophys 1999; 365: 262-267.

[23] Rodriguez E, Wood ZA, Karplus PA, Lei XG. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid

Cloning, expression and purification of *Escherichia coli* modified phytase

Malihe Hallaji (M.Sc)¹, Maryam Parhamfar (M.Sc)¹, Ehsan Raoufi (M.Sc)², Hamid Abtahi (Ph.D)^{*3}

1. Dept. of Medical Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2. Dept. of Medical Biotechnology, School of Allied medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Molecular and Medicine Research Center, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 3 Mar 2017; Accepted: 15 Nov 2017)

Introduction: Phytases are the class of phosphatases, which are capable of hydrolyzing phytic acid. Phytases with the phytate degradation are able to reduce or eliminate the harmful effects of phytate. Acidic and thermal stable phytase with high yield and purity by a relatively inexpensive system had extensive application. So, in this study, by modification in enzyme sequence, recombinant phytase production with the shorter length and high expression level was assessed.

Materials and Methods: The phytase gene sequence was obtained from the NCBI database. After bioinformatics studies and doing the noted modification for increasing protein expression, gene proliferation was done by using PCR. *E. coli* BL21 (DE3) was used to express the protein. Protein purification was performed by Ni-NTA kit and finally, enzyme activity was assessed.

Results: Phytase was successfully expressed and purified. Enzyme activity assay showed a significant activity.

Conclusion: Produced recombinant phytase had high activity in spite of eliminating parts of the enzyme.

Keywords: Molecular Cloning, Phytic Acid, 6-Phytase.

* Corresponding author. Tel: +98 8634173502

abtahi@arakmu.ac.ir