

کلونینگ، بررسی خصوصیات ملکولی و پیش‌بینی بیان مجازی ژن فیتاز *phyC* از باسیلوس سابتیلیس

حمید آریان نژاد<sup>1\*</sup>، محمد رضا نصیری<sup>2,3</sup>، علی اصغر اسلمی نژاد<sup>4</sup>، مجتبی طهمورث پور<sup>5</sup>، رضا ولی زاده<sup>6</sup>، احمد آسوده<sup>7</sup>، شاهرخ قوتی<sup>8</sup>

<sup>1</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>2</sup> دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>3</sup> دانشیار، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی و دامی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>4</sup> استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>5</sup> دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>6</sup> استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>7</sup> استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>8</sup> دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: 1391/01/07، تاریخ پذیرش: 1391/02/20

## چکیده

فیتاز آنزیمی است که اسید فایتیک را هیدرولیز و فسفر معدنی تولید می‌کند. یکی از منابع بیان‌کننده آنزیم فیتاز، باکتری‌ها هستند که در این میان جنس باسیلوس مهم‌ترین باکتری تولیدکننده فیتاز قلیایی مقاوم به حرارت می‌باشد. ژن فیتاز خارج سلولی باکتری باسیلوس سابتیلیس *phyC* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و لینکر دار حاوی سایت‌های برشی *BamHI* و *HindIII* جداسازی شد. به منظور انجام توالی‌یابی و بررسی خصوصیات، ژن تکثیر شده *phyC* به ناقل pTZ57R/T انتقال داده شد. حضور ژن هدف در ناقل کلونینگ pTZ57R/T با استفاده از روش کلونی PCR و هضم آنزیمی تایید شد. ساختارهای نوکلئوتیدی و پیش‌بینی ساختار پروتئینی آنزیم فیتاز با استفاده از آنالیز توالی یابی مشخص گردید. وزن مولکولی آنزیم فیتاز 42 کیلو دالتون تخمین زده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که به خوبی می‌توان نسبت به کلونینگ ژن فیتاز در وکتور کلونینگ اقدام کرد. از طرف دیگر پیش‌بینی مجازی آنزیم فیتاز با استفاده از توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه، پتانسیل تولید آنزیم مقاوم به حرارت را نشان داد.

**کلمات کلیدی:** آنزیم فیتاز، کلونینگ ژن، باسیلوس سابتیلیس، اسید فایتیک، پروتئین نوترکیب.

بیولوژیکی مهم برای یک فیتازایده آل، می توان به مؤثر بودن درآزادسازی فسفر فیتاته در دستگاه گوارش، مقاومت به غیرفعال شدن در برابر حرارت طی فرآوری خوراک، ذخیره و ارزان بودن تولید آن اشاره نمود (Lei & Stahl, 2001). با توجه به این خصوصیات، تولید صنعتی آنزیم فیتاز تنها با استفاده از میکروارگانیسم ها مقرون به صرفه می باشد زیرا استحصال آنزیم از گیاهان و جانوران تراریخت بسیار پرهزینه و وقت گیر خواهد بود. از اینرو، پژوهشگران سویه های مختلفی از باکتری ها، قارچ ها و مخمرها را جهت تولید آنزیم فیتاز مؤثر بر هیدرولیز اسید فایتیک مورد آزمایش قرار دادند. در این مطالعات مشخص شد که بهترین فیتاز تولید شده مربوط به دو سویه قارچی *آسپرژیلوس فیکوم*<sup>1</sup> و *آسپرژیلوس نایجر*<sup>2</sup> می باشد (Xuan et al., 2009). فیتازهای قارچی دارای فعالیت قابل توجهی در pH اسیدی معده می باشند اما پایداری حرارتی مناسبی ندارند (Han & Lei, 1999). استفاده از آنزیم فیتاز در خوراک متراکم<sup>3</sup> زمانی مؤثر خواهد بود که آنزیم تحمل دمای 60-70 درجه سانتیگراد را داشته باشد. از طرفی میکروارگانیسم های پروکاریوت مانند باکتری ها، رشد سریعتری نسبت به میکروارگانیسم های یوکاریوت دارند و سبب کاهش چشمگیر هزینه های تولید می شوند (Dharmsthiti et al.,

اسید فایتیک (۱،۲،۳،۴،۵،۶) هگزا کیس دی هیدروژن فسفات) به عنوان مهمترین منبع فسفری در بین غلات، لگوم ها و دانه های روغنی می باشد که بیش از 80 درصد فسفر کل غلات و لگوم ها را تشکیل می دهد (Graf et al., 1987). ساختار فضایی اسید فایتیک به جهت حضور شش گروه فسفات که دوازده شارژ منفی را حمل می کنند، به شکل مؤثری می تواند با کاتیون ها، باند های یگانه، دوگانه و یا سه گانه ایجاد کند (Reddy et al., 1989). این کمپلکس های تشکیل شده در pH فیزیولوژیکی نامحلول می باشند و این مسئله مهمترین دلیل عدم جذب مواد معدنی در روده می باشد. اسید فایتیک در روده حیوانات تک معدی از قبیل جوجه و ماهی به عنوان شلات کننده قوی یون های فلزی از قبیل  $Ca^{2+}$ ،  $Zn^{2+}$ ،  $Fe^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  عمل می کند (Lei & Porres, 2003). همچنین اسید فایتیک، بازدارنده آنزیم های تریپسین، تایروزیناز و پپسین می باشد (Niewiadomski, 1990). هیدرولیز اسید فایتیک به منو، دی، تری، تترا و پنتافسفات مایواینوزیتول و فسفر معدنی توسط آنزیم فیتاز کاتالیز می شود (Liu et al., 1998). فیتازها به شکل طبیعی در گیاهان و میکروارگانیسم ها و بعضی از حیوانات یافت می شوند (et Xuan Greiner et al., 2001; al., 2009; Craxton et al., 1997). فیتازهای تولید شده در این موجودات به دو بخش اسیدهای هیستیدین و فیتازهای قلیایی تقسیم می شوند (Oh et al., 2001). از خصوصیات

<sup>1</sup>Aspergillusficuum

<sup>2</sup>Aspergillusniger

<sup>3</sup> Pellet

این پژوهش باکتری باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 برای جداسازی، توالی یابی و کلونینگ ژن *phyc* در وکتور کلونینگ pTZ57R/T و پیش بینی بیان مجازی آنزیم فیتاز با هدف بیان ژن در آینده انتخاب شد.

#### مواد و روش‌ها

#### سویه های باکتری

باکتری باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 به صورت آمپول لیوفیلیزه (خشک) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (<http://ptcc.iroost.org>) خریداری شد. باکتری اشرشیاکلی سویه DH5 $\alpha$  و وکتور کلونینگ pTZ57 R/T از شرکت Fermentas خریداری شدند.

#### کشت باکتری

محتویات آمپول لیوفیلیزه باسیلوس سابتیلیس در ابتدا بر روی محیط کشت جامد (LB-Agar) کشت داده شد و سپس تک کلونی از محیط کشت جامد برداشته و در 4 میلی لیتر محیط کشت مایع (LB) قرار داده شد. فالكون حاوی کشت مایع در انکوباتور شیکردار در دمای 30°C به مدت 16 ساعت با 180 rpm نگهداری شدند. باکتری DH5 $\alpha$  فاقد وکتور بر روی محیط LB جامد کشت و در انکوباتور در دمای 37°C به مدت 16 ساعت نگهداری شدند. باکتری DH5 $\alpha$  حاوی وکتور نوترکیب بر روی محیط LB

(2005; Cho *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2008). جنس باسیلوس به جهت تولید خارجی قسمت اعظم آنزیم‌های صنعتی، مورد توجه پژوهشگران زیادی قرار گرفته است. فیتاز جدیدی که قابلیت فعالیت در pH قلیایی داشت از باکتری باسیلوس سابتیلیس توسط Kerovuo *et al.* (1998) گزارش شد. پژوهش‌های بعدی نشان داد که آنزیم فیتاز گرده بعضی از گلها مانند لوئی<sup>1</sup> و زنبق<sup>2</sup> نیز قادرند در شرایط قلیایی فعالیت نمایند (Hara *et al.*, 1985; Scott & Loewus, 1986). این گروه از آنزیم‌های فیتاز در خانواده بتا پروپیل فیتاز قرار می‌گیرند و فسفر شماره سه اسید فایتیک را برای شروع هیدرولیز هدف قرار می‌دهند. مطابق گزارشات صورت گرفته تنها این قبیل آنزیم‌ها قادرند دمای 90 درجه سانتیگراد را تحمل نمایند (Tran *et al.*, 2010). از اینرو، فیتازهای قلیایی می‌توانند جهت مراحل تهیه و فشرده سازی خوراک، تیمار آنزیم با خوراک قبل از مصرف، استفاده شوند. گزارشات زیادی مبنی بر تولید طبیعی آنزیم فیتاز از باکتری باسیلوس سابتیلیس وجود دارد (Choi *et al.*, 2001). با این حال افزایش فعالیت آنزیم و همچنین تولید بیشتر آنزیم (کاهش هزینه‌های تولید) از مهمترین اهداف پژوهشگران مختلف در این زمینه می‌باشد. بدست آوردن بیشترین سطح بیان آنزیم با بیشترین فعالیت اختصاصی، مؤثرترین راه ممکن در جهت کاهش هزینه‌ها می‌باشد. بنابراین، در

<sup>1</sup>Typhalatifolia

<sup>2</sup>LiliumlongiXorum

مشخص گردیده‌اند). تکثیر ژن فیتاز با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از 2/5 میکرولیتر بافر (10x) آنزیم DNA پلیمرز Pfu، 2/5 میکرولیتر dNTP 20 میلی مولار، 1/5 میکرولیتر 50 MgCl<sub>2</sub> میلی مولار، 2 میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت 20 میکرومولار، 1/25 واحد آنزیم Pfu و 3 میکرولیتر DNA الگو در حجم نهایی 25 میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن فیتاز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (T-Personal) ساخت آلمان به صورت زیر انجام شد. واسرشت سازی 30 ثانیه در 94 °C، اتصال 30 ثانیه در 61 °C و بسط 45 ثانیه در 72 °C برای 35 سیکل. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94 °C برای 3 دقیقه و یک مرحله بسط نهایی به مدت 10 دقیقه در 72 °C نیز انجام گردید.

#### انتقال ژن *phyC* به وکتور pTZ57R/T

به منظور انتقال ناحیه کدکننده ژن فیتاز به ناقل pTZ57R/T با روش TA کلونینگ، واکنش A-tailing با استفاده از آنزیم پلی‌مرز *Taq* (10x) انجام شد. بدین منظور، 5 میکرولیتر بافر آنزیم پلی‌مرز *Taq*، 5 میکرولیتر dATP، 4/5 میکرولیتر 50 MgCl<sub>2</sub> میلی مولار، 1 واحد آنزیم پلی‌مرز *Taq* و 35 میکرولیتر محصول PCR استخراج از ژل شده با هم مخلوط و در دمای 72 °C به مدت 45 دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (T-Personal) قرار داده شد. برای انجام واکنش الحاق 3 میکرولیتر ناقل

جامد حاوی آمپی سلین 100 میلی‌گرم کشت و در انکوباتور در دمای 37 °C به مدت 16 ساعت نگهداری شدند.

#### تکثیر PCR ژن فیتاز *phyC*

استخراج DNA ژنومی از باکتری باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 با استفاده از روش Sambrook *et al.* (1989) و کیت استخراج DNA، شرکت Biooner کشور کره جنوبی انجام شد. آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن فیتاز (*phyC*) با توجه به همولوژی توالی‌های ژن 16srRNA باکتری باسیلوس سابتیلیس با استفاده از نرم افزار Primer primer5 طراحی گردید. ناحیه پرموتوری همراه با ناحیه کدکننده ژن فیتاز (*phyC*) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت

GTGCACGTTTCATAAAAAGGAGGAAG-

5'-3' و برگشت

5'-TTGCATGTTTATTTTCCGCTTCT-3'

تکثیر و جداسازی شد. همچنین ناحیه کدکننده ژن فیتاز (*phyC*) با استفاده از آغازگرهای لینکر دار رفت

AGCGGGATCCCGCATGAATCATTCA

5'-AAAACACTT-3' و برگشت

GCCCAAGCTTGGGTTATTTTCCGCTT

5'-CTGTCCGGTCAGT-3' تکثیر و جداسازی

شد. جایگاه برشی *Bam*HI و *Hind*III به منظور انتقال ژن فیتاز به وکتور بیانی به ترتیب در آغازگرهای رفت و برگشت قرار داده شد (جایگاه‌های برشی در پرایمرهای لینکر دار با خط

جفت پرایمر با غلظت 10 پیکومول به همراه نمونه‌ها فرستاده شد. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند. ابزار BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی‌ها استفاده گردید. از الگوریتم و نرم افزار PHRED (Ewing & Green, 1998) به منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد. برای ثبت توالی نهایی به دست آمده، نرم افزار Sequin v10 (NCBI) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی رابطه فیلوژنتیکی نمونه مورد مطالعه با دیگر گونه‌ها، ماتریس فواصل ژنتیکی و نمودار درختی به ترتیب با استفاده از رویه حداکثر درستی ترکیبی<sup>3</sup> و UPGMA به کمک نرم افزار Mega v.5 محاسبه گردید (Tamura et al., 2011). توالی سیگنال پپتید با استفاده از برنامه SignalP پیش بینی شد (Bendtsen et al., 2004). وزن مولکولی پپتید قابل پیش‌بینی جهت تولید با استفاده از نرم افزار 5 CLC Workbench محاسبه گردید. ساختار پروتئینی فیتاز تولید شده با استفاده از Swiss-pdbv (<http://www.expasy.ch/spdbv>) مدل سازی و مشخص شد. QMEAN Z score برای مدل پیش‌بینی شده، محاسبه گردید. Z score معیاری برای اندازه گیری کیفیت مطلق مدل ارائه شده می‌باشد که از مقایسه‌ی اسکور ساختاری اصلی

pTZ57R/T، 6 میکرولیتر بافر الحاق (5X)، 8 میکرولیتر قطعه A-tailing تخلیص شده، 2 میکرو لیتر محلول پلی اتیل گلیکول و 1 میکرولیتر T4 DNA لیگاز در حجم نهایی 20 میکرولیتر مخلوط شد. واکنش الحاق به مدت 16 ساعت در دمای °C 16 در دستگاه ترمومیکسر (Eppendorf) قرار داده شد. محصول الحاق با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد باکتری اشرشیاکلی سویه DH5 $\alpha$  وارد و بر روی محیط LB جامد حاوی آمپی‌سیلین، 40 میکروگرم بر میکرولیتر XGal<sup>1</sup> و 40 میکروگرم بر میکرولیتر IPTG<sup>2</sup> گسترده گردید. به منظور انتخاب کلونی‌های انتقال ژن شده، غربالگری کلونی‌های سفید و آبی انجام شد و کلونی‌های سفید از محیط کشت جداسازی و پلاسمید نوترکیب آنها استخراج گردید. هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم محدودکننده BamHI و HindIII انجام و پلاسمید نوترکیب به منظور تایید حضور ژن هدف، توالی‌یابی شد.

#### آنالیز توالی ژنی و پروتئینی فیتاز (phyC)

نتیجه PCR ناحیه پروموتوری و ناحیه کدکننده ژن فیتاز به همراه وکتور نوترکیب pTZ57R/T به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. 50 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت هر دو

<sup>3</sup>Maximum Composite Likelihood

<sup>1</sup>5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

<sup>2</sup>Isopropyl-  $\beta$  -D-thiogalactopyranoside

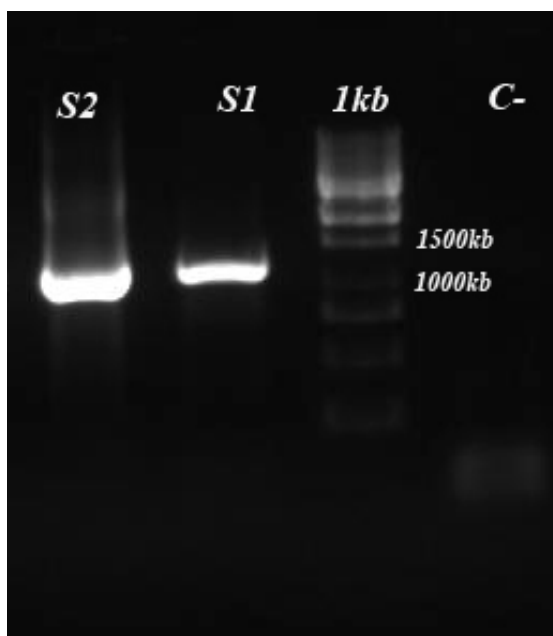
داد که قطعات اختصاصی به طول 1188 و 1089 جفت باز، به خوبی تکثیر شده است (شکل 1). عدم حضور باندها در کنترل منفی و حضور قطعات اختصاصی، نشان از دقت و صحت انجام واکنش داشت. علاوه بر این، وجود یک بانده اختصاصی نشان داد که توالی مشابهی برای جفت شدن آغازگرهای مورد استفاده در محل‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است.

پروتئین که به وسیله اشعه X بدست آمده با ساختار پیش بینی شده بدست می‌آید.

## نتایج و بحث

### جداسازی ژن فیتاز

الکتروفورز محصولات PCR ناحیه پرموتوری و کدکننده ژن فیتاز و همچنین ناحیه کدکننده ژن فیتاز روی ژل آگارز 1/5 درصد نشان



شکل 1- الکتروفورز محصولات PCR برای ناحیه پرموتوری و کدکننده ژن فیتاز به طول 1188 جفت باز و ناحیه کدکننده ژن فیتاز به طول 1089 جفت باز روی ژل 1/5 درصد، نشانگر کیفیت مناسب قطعات تکثیر شده می باشد (نشانگر وزنی 1 کیلو جفت بازی = M، ناحیه کد کننده پرموتوری و کدکننده ژن فیتاز = S1، ناحیه کدکننده ژن فیتاز = S2، کنترل منفی = C).

Figure 1- Electrophoresis of PCR products on agarose gel (1.5%), S1: Promoter and coding region PCR product (1188bp), S2: Coding region phytase(1089 bp), M = 1 kb DNA Ladder and C: negative control).

### TA کلونینگ ژن فیتاز *phyC*

حضور ژن فیتاز در وکتور pTZ57R/T با روش کلونی PCR و هضم آنزیمی تایید گردید (شکل 2). پژوهشگران در مطالعات مختلف از وکتورهای کلونینگ متفاوتی جهت کلونینگ ژن فیتاز استفاده نموده‌اند. ژن فیتاز باکتری باسیلوس آمیلولیکوئیفشن<sup>1</sup> DS11 توسط Kim et al. (1998) جهت توالی یابی به وکتور کلونینگ pUC19 انتقال داده شد. همچنین Tran et al. (2010) ژن فیتاز باکتری باسیلوس سابتیلیس MD2 را به وکتور کلونینگ pJET1.2 وارد و سپس به باکتری اشرشیاکلی سویه DH5 $\alpha$  منتقل نمودند. اما گروهی از پژوهشگران نیز ژن هدف را به شکل مستقیم وارد وکتور بیان کردند (Kerovuo et al., 1998). آنها محصول PCR خود را جهت توالی یابی مورد استفاده قرار دادند.

### آنالیز توالی ژن فیتاز *phyC*

ژن آنزیم فیتاز *phyC* باکتری باسیلوس سابتیلیس ATCC 12711 (با شماره دسترسی JQ437256) توالی یابی و ثبت شد (شکل 3). همانطور که در شکل 3 مشخص گردیده، جایگاه اتصال ریبوزوم 9 نوکلئوتید (از نوکلئوتید 77 تا نوکلئوتید 85) طول و دارای توالی GGAGG می باشد (Kerovuo et al., 1998). توالی کدکننده این آنزیم دارای 1149 جفت باز نوکلئوتید

می باشد که 383 اسید آمینه را کد می کند. 87 جفت باز ابتدایی آن سیگنال پپتید می باشد که شامل 29 اسید آمینه ابتدایی می شود. این ناحیه فاقد توالی حفاظت شده RHGXRX در سایت کاتالیکی آنزیم هستند (Oh et al., 2004). این توالی پروتئینی حاوی توالی مرکزی هیدروفوبیک می باشد که در پروتئین بالغ حذف می شود. پژوهشگران بیان کردند که با تغییر در وضعیت اسید آمینه دوم سیگنال پپتید می توان تاخوردگی پروتئین و نرخ خروج آن را تحت تاثیر قرار داد (Zalucki et al., 2009). آنها همچنین بیان کردند که توالی های سیگنالی می تواند حاوی بیش از یک توالی ریبوزومی باشند که این نشان می دهد نرخ ترجمه به این توالی ها بستگی دارد (Zalucki et al., 2009). گروه دیگری از پژوهشگران گزارش کردند که ژن فیتاز به همراه سیگنال پپتید فعال نبوده و سیگنال پپتید طبیعی ژن، توانایی انتقال پروتئین را به فضای پریپلاسمیک میزبان (*E. coli* XL-1 Blue MRF) نداشته است (Kerovuo et al., 1998). اما، در سال 1998 محققان با حضور سیگنال پپتید ژن، بیان بسیار بالایی از آنزیم فیتاز در فضای پری پلاسمیک بدست آوردند (Kim et al., 1998). ژن بتالاکتماز باسیلوس سابتیلیس به همراه سیگنال پپتید توسط Nakazawa et al. (1986) به باکتری *E. coli* انتقال داده شد. آنها گزارش کردند که پروموتور و سیگنال پپتید ژن دارای عملکرد مناسب در *E. coli* است. نتایج

<sup>1</sup> Bacillus amyloliquefaciens

کلد قرار گرفته‌اند و فاصله ژنتیکی 2/511 را از ژن فیتاز باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 نشان دادند. توالی نوکلئوتیدی باکتری باسیلوس آمیلولیکوئیفشن دارای همولوژی 80 درصدی با توالی باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 می‌باشند. در این میان توالی نوکلئوتیدی باسیلوس لیچی فورمیس<sup>1</sup> هیچ مشابهت معنی داری با باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 ندارد. همچنین نتیجه بررسی فاصله این ژن، بیشترین فاصله ژنتیکی (2/639) در میان جنس‌های باسیلوس نشان می‌دهد. به همین جهت فیتاز تولید شده از باکتری باسیلوس لیچی فورمیس به نام *phyL* خوانده شده است. در مطالعه‌ای که در سال 2001 انجام شد، محققان توالی ژن فیتاز گرده گل زنبق را بسیار نزدیک با توالی ژن فیتاز تولید شده در جنس باسیلوس می‌دانستند (Oh et al., 2001). مهمترین دلیل آن می‌تواند مربوط به عدم حضور توالی اسید آمینه‌ای RHGXRXR در توالی ژن فیتاز و فعالیت در محیط قلیایی آنزیم فیتاز گرده زنبق بود (Oh et al., 2004). اما نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که همولوژی بسیار پایینی بین توالی‌های فیتازی جنس باسیلوس و گرده گل زنبق وجود دارد و این دو تنها به لحاظ خصوصیات شیمیایی در یک دسته قرار می‌گیرند. آنالیزهای مجازی تولید پروتئین، با ترجمه ناحیه کدکننده آنزیم فیتاز و با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Expasy انجام شد. پروتئین فیتاز

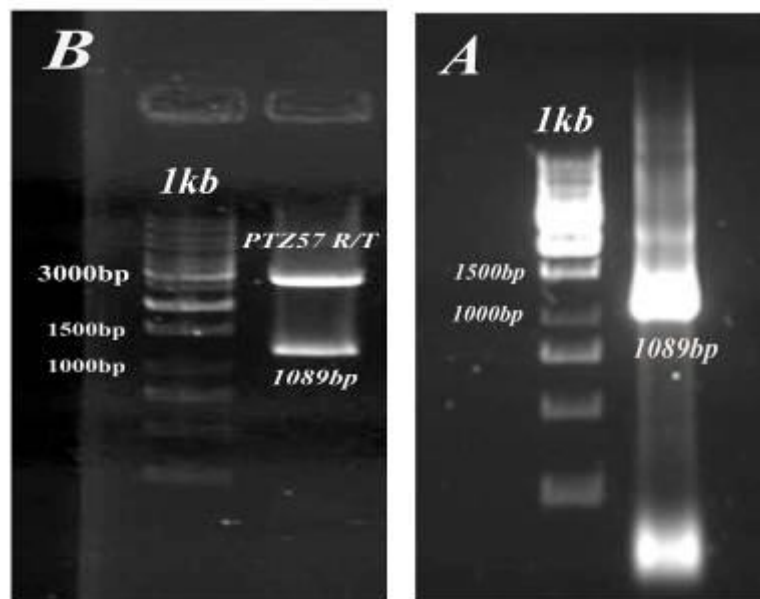
این پژوهش نشان داد که فیتاز به همراه سیگنال پپتید و بدون سیگنال پپتید می‌تواند در سویه باکتری *E. coli* BL21(DE3) در فضای پرپلاسمیک، تولید شود اما میزان بیان ژن در این دو نمونه با توجه به مدلسازی‌های انجام گرفته، متفاوت می‌باشد. بعد از کد توقف، 18 جفت باز تکراری وجود دارد که سبب به وجود آمدن ساختار سنجاق سری می‌گردد (Kerovuo et al., 1998). نتایج آنالیز فیلوژنتیکی انجام شده بر روی سویه‌های مختلف تولید کننده آنزیم فیتاز 3 قلیایی نشان داد که ژن فیتاز باکتری باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 تکثیر شده در این پژوهش با ژن فیتاز باکتری باسیلوس سابتیلیس VTTE68013، باسیلوس سابتیلیس US417 و باسیلوس سابتیلیس XF8 در یک کلد قرار می‌گیرد و بیشترین فاصله ژنتیکی آنها 0/003 می‌باشد (شکل 4). بررسی همولوژی توالی‌ها نشان داد که ژن فیتاز باسیلوس سابتیلیس ATCC12711 با باکتری باسیلوس سابتیلیس VTTE68013 مشابهت 100 درصدی و با باسیلوس سابتیلیس US417 و باسیلوس سابتیلیس XF8 مشابهت 99 درصدی را دارا است. این تفاوت ناشی از تغییر اسید آمینه 257 از اسید آمینه آرژنین (R) به پرولین (P) می‌باشد. همچنین بررسی فاصله ژنتیکی با دیگر زیرگونه‌ها در بیشترین مقدار 0/074 می‌باشد که نشان از شباهت بالای ژن فیتاز در زیرگونه‌های مختلف باسیلوس سابتیلیس می‌باشد. ایزوفرم‌های 1 و 2 آنزیم فیتاز تولید شده از گرده گل زنبق در یک

<sup>1</sup> Bacillus licheniformis



فیتاز بدست آمده از *اشرشیا کلی* را 42 کیلودالتون تخمین زدند (Greiner *et al.*, 1993). مطالعات انجام شده بر روی پروتئین فیتاز جدا شده از باکتریها نشان داد که وزن مولکولی این آنزیم از 37 تا 44 کیلو دالتون در میکروارگانیسیمهای مختلف متفاوت می باشد (Powar & Jagannathan, 1982; Greiner *et al.*, 1997; Irvine & Cosgrove, 1971).

تولید شده در این پژوهش پروتئینی منومری با وزن مولکولی در حدود 42 کیلو دالتون است. ساختار سه بعدی این پروتئین پیش بینی شد (شکل 5). اسکور Z اندازه گیری شده برای این مدل 1/76 می باشد. فعالیت این آنزیم تنها در حضور یون کلسیم امکان پذیر می باشد (Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2001). مطالعات دیگر نیز وزن مولکولی پروتئین



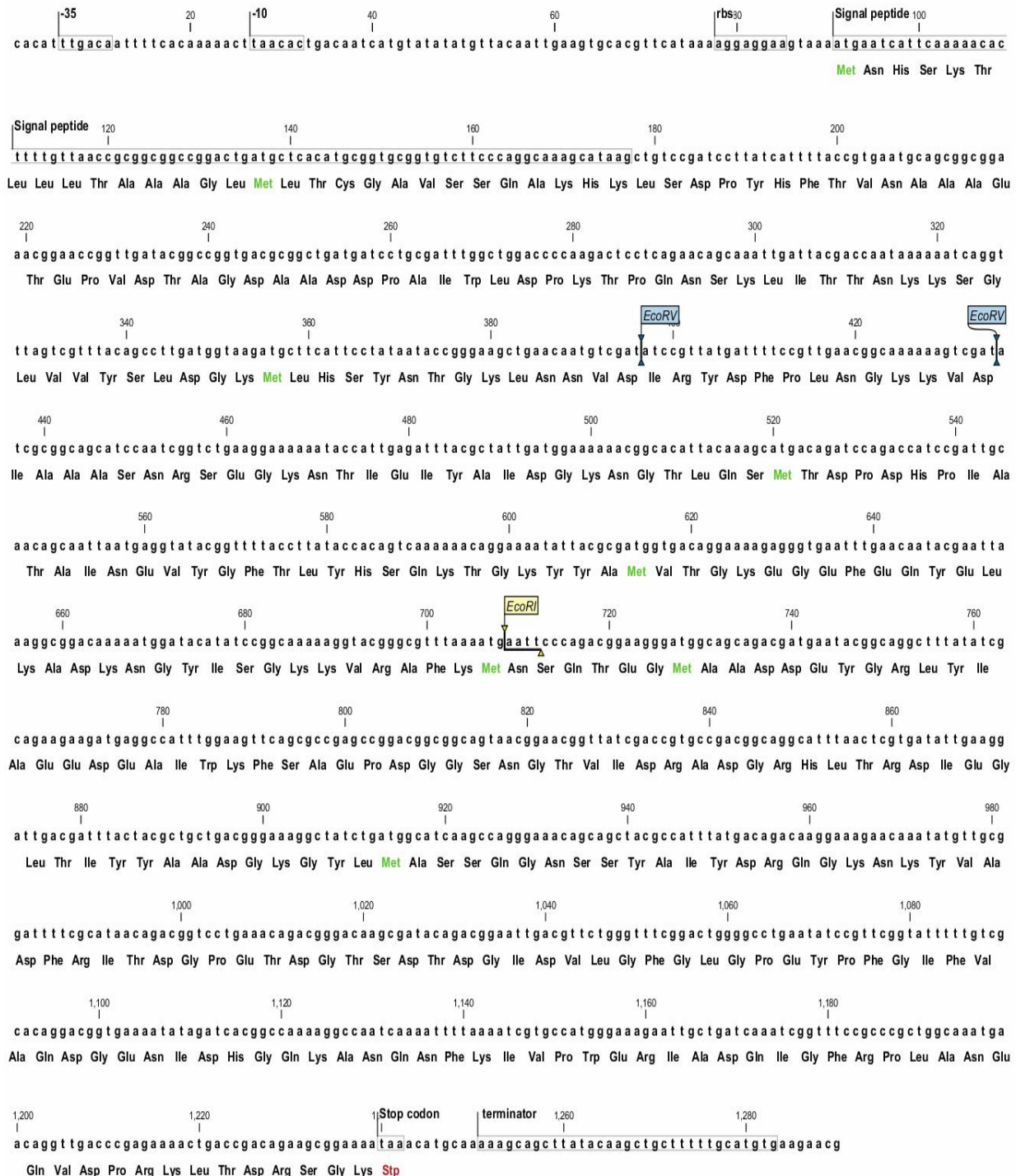
شکل 2- الکتروفورز محصولات کلونی PCR و هضم پلاسمید نو ترکیب pTZ57R/T. A: حضور باند 1089 جفت بازی در کلونی PCR و B: هضم آنزیمی ژن فیتاز *phyC*. حضور باند 2900 جفت بازی (باند بالایی) در هضم آنزیمی نشان دهنده وکتور pTZ57R/T می باشد.

**Figure 2- Electrophoresis of colony PCR and double digestion of cloning construct (pTZ57R/T with *phyC*). A: Presence of *phyC* in positive colony (1089 bp) and B: Product of double digestion of pTZ57R/T (2900 bp, upper band) and, *phyC* (lower band).**

آنزیم پتانسیل بالایی در هیدرولیز اسید فایتیک در pH طبیعی را دارد. از اینرو، توالی بدست آمده در این پژوهش را می توان برای تولید آنزیم نو ترکیب فیتاز مورد استفاده قرار داد.

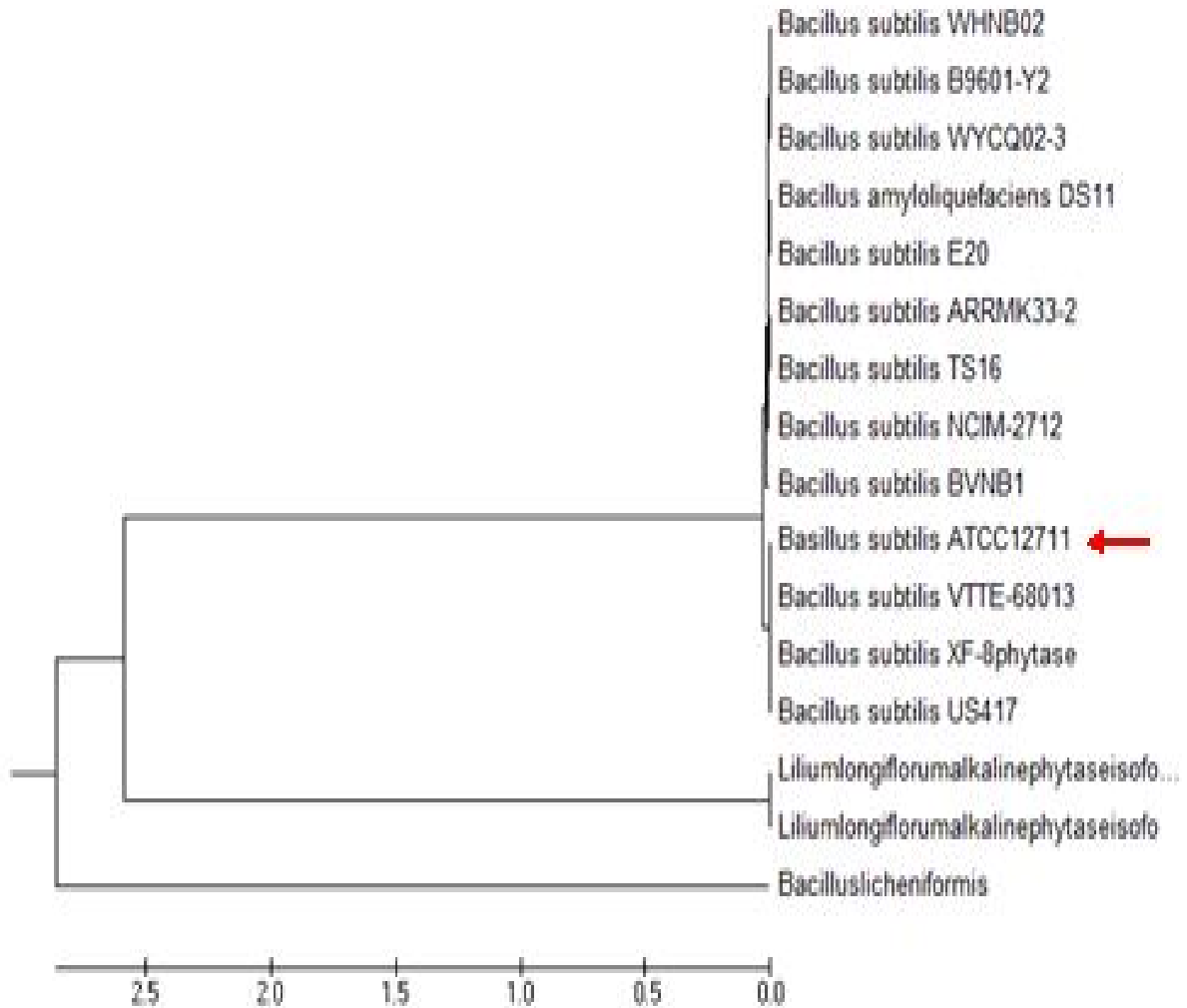
نتایج این پژوهش نشان داد که توالی قطعه کلون شده دارای همپوشانی بالایی با توالی های ژن فیتاز سویه های باسیلوس سابتیلیس-VTTE 68013 و XF-8 می باشد. همچنین بررسی آنالیز توالی و پروتئینی ژن *phyC* نشان داد که این

## آریان نژاد و همکاران، 1391



شکل 3- توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن فیتاز باکتری *Bacillus subtilis* ATCC12711. توالی‌های -35، -10 و توالی مکان اتصال ریبوزوم مشخص شده است. توالی احتمالی اسید آمینه ناحیه کدکننده ژن فیتاز در زیر توالی نوکلئوتیدی مشخص گردیده است. توالی سیگنال پپتید و انتهایی نیز مشخص گردیده است.

**Figure 3- Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of phytase gene (ATCC12711) isolated from *Bacillus subtilis*. The putative -35, -10 and ribosome binding site sequences are indicated (sequences are signed). The possible signal peptide cleavage site is indicated (sequences are signed).**



شکل 4- آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های اسید آمینه تولید کننده فیتاز قلیایی. طول خط افقی نشان دهنده فاصله ژنتیکی می‌باشد.

**Figure 4- Phylogenetic analysis of various amino acid sequence of alkaline phytases. The phylogenetic tree was constructed using the Mega 5 program. The length of horizontal lines indicates the relative evolutionary distance. The amino acid sequence of *Bacillus subtilis*TS16 (AF292103), *Bacillus subtilis* ARRMK33 (EF092835), *Bacillus subtilis*B9601(S EU624118), *Bacillus subtilis*WHNB02(AY220075), *Bacillus subtilis*E20 (FJ541287), *Bacillus subtilis*WYCQ02 (FJ986327), *Bacillus subtilis*ATCC12711 (JQ437256), *Bacillus subtilis*VTTE-68013 (AF029053), *Bacillus amyloliquefaciens*(U85968), *LiliumlongiXorum*(DQ437678& DQ437677), *Bacillus licheniformis*(AF469936), *Bacillus subtilis*NCIM-2712 (GU475117) and *Bacillus subtilis*US417(AM501550) were obtained from NCBI GenBank.**



شکل 5- شکل فضای پروتئین فیتاز باکتری باسیلوس سابتیلیس ATCC12711. فلش‌ها در ساختار نشان دهنده صفحه بتا هلیکس می باشد. گرادیان رنگ آبی تا قرمز نشان دهنده قابلیت اعتماد به مدل می باشد.

**Figure 3- The secondary structural model of phytase from *Bacillus subtilis* ATCC12711. The arrows indicated  $\beta$ -helix Sheet. Color gradient from blue to red showed reliability of the model.**

مالی ستاد سلول های بنیادی می باشد که مراتب تشکر و قدردانی را از آن ستاد محترم داریم. پروژه در آزمایشگاههای دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی انجام گرفته و بدین ترتیب از مسولان مربوطه کمال تشکر را داریم.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج شده از پروژه پژوهشی به شماره 100315 مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. لذا، بدین وسیله از آن معاونت محترم تقدیر و تشکر می گردد. تصویب این پروژه از محل حمایت‌های

#### منابع

- Bendtsen JD, Nielson H, Von Heijne G, Brunak S (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340: 783–795
- Cho J, Lee C, Kang S, Lee J, Lee H, Bok J, Woo J, Moon Y, Choi Y(2005). Molecular cloning of a phytase gene (phy M) from *Pseudomonas syringae* MOK1. *Current microbiology* 51: 11-15.
- Choi YM, Suh HJ, Kim JM(2001). Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry* 4: 287-292.

- Craxton A, Caffrey JJ, Burkhart W, Safrany ST, Shears SB (1997). Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochemical Journal* 328: 75-81.
- Dharmsthiti S, Chalermponpaisarn S, Kiatiyajarn M, Chanpokaipaboon A, Klongsithidej Y, Techawiparut J (2005). Phytase production from *Pseudomonas putida* harbouring *Escherichia coli* appA. *Process Biochemistry* 40: 789-793.
- Ewing B, Green P (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Graf E, Empson K, Eaton JW (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry* 262: 11647-11651.
- Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany KD (1997). Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341: 201-206
- Greiner R, Konietzny U, Jany KD (1993). Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303: 107-113
- Han Y, Lei XG (1999). Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 364: 83-90.
- Hara A, Ebina S, Kondo A, Funagua T (1985). A new type of phytase from *Typha latifolia* L. *Agricultural and biological chemistry* 49: 3539-3544
- Irvine GCJ, Cosgrove DJ (1971). Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. *Journal of Biological Sciences* 24: 547.
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkkinen N, Apajalahti J (1998). Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a Novel Phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 2: 2079-2085.
- Kim YO, Lee JK, Kim HK, Yu JH, Oh TK (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 162: 185-191.
- Lei XG, Porres JM (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology: a review. *Biotechnol. Letters* 25: 1787-1794.
- Lei XG, Stahl CH (2001). Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 474-481.
- Liu BL, Rafiq A, Tzeng YM, Rob A (1998). The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 415-424.
- Nakazawa K, Takano T, Sohma A, Yamane K (1986). Secretion activities of *Bacillus subtilis* a-amylase signal peptides of different lengths in *Escherichia coli* cells. *Biochemical and biophysical research communications* 5: 624-631.
- Niewiadomski H (1990). Nutritional value of rapeseed meal. In H. Niewiadomski (Ed.), *Rapeseed chemistry and technology* (pp. 397-428). Amsterdam, The Netherlands: PWN-Polish Scientific Publishers, Warszawa and Elsevier Science Publishers.
- Oh BC, Chang BS, Park KH, Ha NC, Kim HK, Oh BH, Oh TK (2001). Calcium dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry* 40: 9669-9676
- 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.
- Powar VK, Jagannathan V (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 151: 1102-1108.

- Rao DECS, Rao KV, Reddy VD (2008). Cloning and expression of *Bacillus* phytase gene (phy) in *Escherichia coli* and recovery of active enzyme from the inclusion bodies. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1128–1137.
- Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK (1989). *Phytates in cereals and legumes*. Boca Raton, CRC Press, Inc.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Scott JJ, Loewus FA (1986). A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiXorum*. *Plant Physiology* 82: 333–335
- Shimizu M (1992). Purification and charecterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 56: 1266-1269
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tran TT, Mamo G, Mattiasson B, Hatti-Kaul R (2010). A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiologic Biotechnology* 37: 279–287.
- Xuan NT, Hang MT, Thanh VN (2009). Cloning and over Expression of an *Aspergillus niger* XP Phytase Gene (phyA) in *Pichia pastoris*. *Engineering and Technology* 56: 750-753.
- Zalucki YM, Beacham IR, Jennings MP (2009). Biased codon usage in signal peptides: a role in protein export. *Trends in Microbiology* 17: 146-150.

**Cloning, nucleotide characterization and modeling expression of phytase gene *phyC* from *Bacillus subtilis***

Ariannejad H.\*<sup>1</sup>, Nassiri M.R.<sup>2,3</sup>, Aslaminejad A.<sup>4</sup>, Tahmoorespour M.<sup>5</sup>, Valizadeh R.<sup>6</sup>, Asoodeh A.<sup>7</sup>, Ghovvati S.<sup>8</sup>

<sup>1</sup>MSc Student, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>2,3</sup>Associate Professor, Animal Science Department and Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>4</sup>Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>5</sup>Associate Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>6</sup>Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>7</sup>Assistant Professor, Faculty of Science, Biochemistry Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

<sup>8</sup>Associate Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

**Abstract**

Phytase has a hydrolysis function on phytic acid which yields inorganic phosphate. Using phytase enzymes in domestic animals have a positive effect on optimal diet intake. *Bacillus* species can only produce thermostable alkaline phytase. Accordingly extracellular phytase gene was isolated from *Bacillus subtilis* ATCC 12711 (*phyc*) using linker primers containing restriction sites of *Bam*HI and *Hind*III. The isolated fragment was then inserted into pTZ57R/T vector for cloning and nucleotide characterization. Molecular weight of phytase protein was estimated about 42 kDa. On the other hand the model of phytase secondary structure showed the potential of thermostable characterization of enzyme.

**Keywords:** *Phytase enzyme, Gene cloning, Bacillus subtilis, Phytic acide, Recombinant protein.*

\* Corresponding Author: Ariannejad H.

Tel: 05118678934

Email: Ariannejhad@yahoo.com