



کلونینگ و بیان ژن آنزیم فیتاز در باکتری اشرشیا اکلې جهت بازیابی آنزیم در شرایط آزمایشگاهی

مریم آزادی^۱، لیلا پیشکار^{۲*}، احسان دهنوی^۳

۱- گروه بیوشیمی دانشکده علوم و فناوری پیشرفته، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

۳- گروه پژوهشی پیشگامان انتقال ژن، مرکز رشد فناوری‌های دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

مقاله پژوهشی اصیل

مقدمه

پروتئین فیتاز آنزیمی است که توانایی تجزیه‌ی فیتیک اسید به میواینوزیتول و فسفات معدنی را دارا می‌باشد و از این آنزیم به صورت گسترده‌ای به عنوان یک افزودنی در غذای حیوانات استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه دستیابی به تولید میزان بالایی از آنزیم فیتاز باکتریایی در وکتور بیانی PET26b در میزبان باکتریایی بود.

مواد و روش‌ها

جهت تولید آنزیم فیتاز نوترکیب، ژن هدف به وکتور بیانی pET-26b وارد شد و وکتور نوترکیب پس از تکثیر در باکتری اشریشیاکلی DH5α به باکتری اشریشیاکلی BL21 به عنوان میزبان بیان منتقل شد. برای جداسازی فیتاز نوترکیب از روش SDS-PAGE استفاده گردید و میزان تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از الکتروفورز بررسی شد.

یافته‌ها

آنزیم فیتاز باکتریایی با موفقیت در باکتری اشریشیاکلی بیان شد و وزن مولکولی فیتاز نوترکیب تولید شده در حدود ۸۵ کیلو دالتون تخمین زده شد. همچنین pH بهینه برای فعالیت آنزیم فیتاز باکتریایی نوترکیب در حدود ۵/۵ برآورد شد.

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده نشان دهنده موفقیت در تولید آنزیم فیتاز در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از میزبان BL21 با کمترین هزینه ممکن جهت استفاده در صنعت خوراکی طیور است.

کلیدواژه‌ها

آنزیم فیتاز، کلونینگ، اشریشیاکلی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۰

*نویسنده مسئول: لیلا پیشکار، گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران
پست الکترونیک: Pishkar@iiu.ac.ir



مقدمه

فسفر یکی از مواد مغذی محدود برای حیوانات است زیرا بیشتر فسفر موجود در گیاهان (از جمله بذره‌های گیاهی) به شکل اسید فیتیک ذخیره می‌گردد (۱). اسید فیتیک به علت اتصال به مواد مغذی، آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها، سبب عدم جذب آن‌ها شده و همچنین با اتصال به پروتئین‌ها، از عملکرد صحیح آن‌ها جلوگیری می‌کند (۲). فیتاز (میواینوزیتول هگزوفسفات فسفوهیدرولاز)، کلاس خاصی از فسفاتازها است که هیدرولیز پیوسته‌ی میواینوزیتول (۱، ۲، ۳، ۴، ۵) هگزایکسی فسفات^۱ یا اسید فیتیک به مشتقات میواینوزیتول با فسفات کمتر و فسفات معدنی را کاتالیز می‌کند (۳، ۴).

فیتاز کاربردهای بسیاری دارد و در صنعت نانوائی، صنایع غذایی و جداسازی پروتئین‌های گیاهی نیز استفاده می‌شود. حیوانات تک معده مانند ماکیان، خوک و... به دلیل مقدار ناکافی یا فقدان آنزیم فیتاز قادر به هضم و تجزیه اسید فیتیک نیستند از این رو مقدار زیادی فسفات و سایر مواد معدنی از بدن آن‌ها دفع می‌گردد (۴-۶). به منظور افزایش قابلیت جذب اسید فیتیک در این حیوانات و همچنین کاهش دفع فسفر و به دنبال آن کاهش آلودگی زیست محیطی آنزیم فیتاز سنتتیک به خوراک آن‌ها افزوده می‌شود (۷، ۸).

در محیط‌های مختلف پایداری فیتاز همانند سایر آنزیم‌ها بیش از اندازه پایین است تا امکان استفاده آن را تحت شرایط سخت برای کاربردهای صنعتی میسر سازد. به علت هزینه‌ی بالا و نیمه عمر کم آنزیم فیتاز آزاد، استفاده از آن به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست، همچنین به علت محدودیت در به کارگیری مکرر از آنزیم تثبیت شده بر روی بسترهای مختلف استفاده می‌کنند (۹). لازم به ذکر است که

به دلیل قابلیت حل بالای آنزیم فیتاز در آب نمی‌توان از آن مجدداً استفاده کرد به همین منظور بسیاری از تحقیقات استفاده از تکنیک‌های تثبیت را برای غلبه بر این محدودیت‌ها مورد بررسی قرار دادند (۹، ۱۰).

آنزیم فیتاز از مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و پروتوزوها جداسازی می‌شود. فیتازهای باکتریایی مانند فیتاز *E. coli* غیر گلیکوزیله هستند و در مقایسه با فیتازهای قارچی به دلیل pH اسیدی بهینه و فعالیت ویژه بالا نسبت به فیتات در رهاسازی فسفر از جیره غذایی خوک و طیور مؤثرتر است (۱۱، ۱۲). یکی از راههای بهینه سازی فیتازها برای مصارف کاربردی، صنعتی جهت افزایش فعالیت این آنزیم در PH و دماهای مختلف استفاده از مهندسی پروتئین می باشد. در این مطالعه هدف ما بهینه سازی آنزیم فیتاز باکتریایی جهت دستیابی به سطح بالایی از پروتئین در وکتور بیانی PET26b در میزبان *E.coli*-BL21 می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کلونینگ ژن فیتاز در باکتری اشریشیا اکل

در این مطالعه از ژن سنتزی فیتاز باکتریایی که در بانک جهانی ژن با شماره دستیابی KY497778 ثبت شده است استفاده گردید. در ابتدا سلول‌های مستعد پذیرش DNA خارجی باکتری *E.coli* سویه DH5α بر روی محیط LB حاوی ۵٪ عصاره‌ی مخمر، ۱٪ تریپتون و ۱٪ سدیم کلرید، تهیه شد. سپس به روش شوک حرارتی ترانسفورم صورت پذیرفت و در پی آن پلاسמיד pUC57-Phytase (از شرکت شاینجین چین تهیه شد) به سلول‌های مستعد *E.coli* منتقل گردید. برای رشد باکتری‌های دارای pUC57-Phytase در محیط LB به محیط آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه گردید (غلظت مورد استفاده ۱۰۰ mg/ml) و محیط کشت در شیکرانکوباتور در دمای ۳۷ درجه دور ۱۸۰ به مدت ۱۴-۱۶ ساعت قرار داده شد. برای اطمینان از حضور

¹ hexakisphosphate



pUC57-Phytase در کلونی‌های تراریخت از روش Colony PCR استفاده گردید (تمامی مواد مورد استفاده در واکنش PCR مربوط به شرکت سیناژن می‌باشد).

کلونینگ ژن فیتاز در وکتور بیانی pET-26a

به منظور جداسازی ژن فیتاز از پلاسمید pUC57 و جهت برش پلاسمید بیانی pET-26b و کلونینگ ژن فیتاز از آنزیم‌های NcoI و BamHI استفاده شد. پس از انجام واکنش هضم آنزیمی بر روی pUC57-Phytase و pET-26b، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد و بعد از مشاهده باندها در زیر نور UV، باندهای مورد نظر توسط تیغ برش داده شده و به درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری که از قبل وزن شده بودند، انتقال یافت. با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت پیشگامان انتقال ژن، خالص‌سازی طبق پروتکل انجام شد.

لیگاسیون ژن فیتاز در درون پلاسمید خطی شده pET-26b و ترانسفورماسیون به باکتری *E. coli* DH5α

برای اتصال ژن به پلاسمید pPET-26b ابتدا هضم آنزیمی هر دو آن‌ها را بر روی ژل الکتروفورز ریخته شد و بعد کیفیت DNA مربوط به ژن و پلاسمید هضم شده (ژن با طول ۱۰۴۹ bp و پلاسمید باند ۴۶۰۰ bp) بر روی ژل آگارز بررسی شد. پس از بررسی میزان شفافیت باندهای فیتاز و پلاسمید خطی شده pPET-26b بر روی ژل آگارز ۱٪، مواد لازم برای لیگاسیون شامل ۳ μl ژن آنزیم فیتاز، ۲ μl پلاسمید pPET-26b، ۱/۵ μl Ligation Buffer (10X)، ۷.۵ μl DDW و در انتها ۱ μl آنزیم DNA Ligase T4 اضافه گردید و مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد پلاسمید pET-26b-Phytase از طریق روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* DH5α انتقال یافت. در انتها مخلوط حاصل بر روی محیط LB جامد

حاوی آمپی‌سیلین برده شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۱۸-۱۶ ساعت قرار گرفتند و برای اطمینان از حضور ژن فیتاز در کلونی‌های تراریخت از روش Colony PCR استفاده گردید.

بیان فیتاز نو ترکیب

سطوح بیان ژن فیتاز به شرایط محیط بستگی دارد. جهت القاء باکتری و بیان پروتئین نو ترکیب، پلاسمید pET-26b-Phytase به سویه BL21 از *E. coli* ترانسفورم شد که این پروسه انتقال، کاملاً شبیه ترانسفورماسیون به DH5α بود. پس از انتقال پلاسمید به BL21، بیان پروتئین صورت پذیرفت (۱۳).

جهت بیان، پیش کشت از یک کلون تهیه شد. سپس از پلیت حاوی کلون درون فالتکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط LB به همراه آمپی‌سیلین تلقیح کرده و برای رشد آن را داخل شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ به مدت یک شبانه روز گذاشته شد. سپس نمونه را در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB به همراه آمپی‌سیلین برده و ۱ میلی‌لیتر از پیش کشت کلون رشد کرده را داخل ارلن مورد نظر تلقیح کرده و آنها را درون شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ درون شیکر قرار داده تا به OD مطلوب برسد. پس از زمان ۲ الی ۳ ساعت با دستگاه اسپکتوفتومتر OD نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد.

پس از اینکه نمونه به OD مطلوب رسید (حدود ۱/۵) به آن ۲ ml گلاسیسین و ۱۰ μl از IPTG نیم میلی مولار اضافه شد و به مدت یک شبانه روز داخل شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ قرار داده شد.

در نهایت پس از پایان مرحله بیان، از آنجایی که ژن مورد استفاده در آزمایش دارای سیگنال ترشحی است، آنزیم

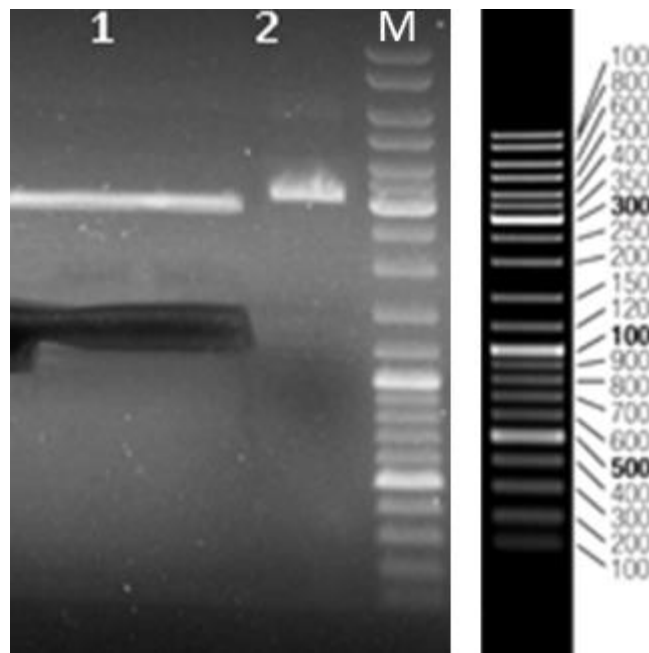
استفاده شد و در نهایت محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز برده شد. در این واکنش قطعه‌ای به طول حدود ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر یافت.

با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *BamHI* و *NcoI*، حضور پلاسمید با طول ۲۷۱۰ bp و ژن فیتاز با طول ۱۲۳۰ bp بر روی ژل آگارز به تأیید رسید. همچنین طول ناقل pET26b پس از هضم آنزیمی حدود ۵۴۰۰ bp مشاهده شد.

نوترکیب را به صورت ترش‌خی بیان می‌کند (پس از بیان پروتئین نوترکیب، آن را به محیط کشت ترشح می‌کند) به همین دلیل برای جداسازی فیتاز از روش SDS-PAGE استفاده شد.

یافته‌ها

برای تأیید حضور ژن فیتاز در درپلاسمید Puc57 از روش Colony-PCR و دو پرایمر استاندارد M13-F و M13-R

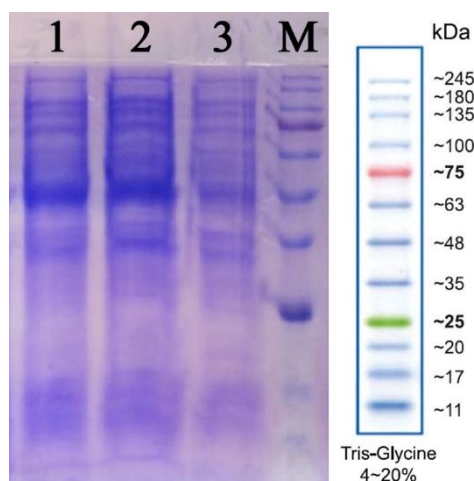


شکل ۱- ژل آگارز نشان‌دهنده تأیید کلونی PCR بر روی کلونیهای حاوی ژن فیتاز در چاهک‌های شماره ۱ و ۲ و چاهک شماره M نشانگر مارکر از چپ به راست: ۱. پلاسمید pUC حاوی ژن فیتاز بریده شده با آنزیم‌های *BamHI* و *NcoI*، ۲. پلاسمید pUC حاوی ژن فیتاز بریده نشده به عنوان کنترل، M: نشانگر مارکر GeneRuler™ #SM 0331

T7 F و T7 R واکنش Colony PCR انجام شد. نتایج، حضور ژن فیتاز در ناقل بیانی pET-26b در شکل ۲ نشان داده شده است.

لیگاسیون ژن فیتاز بریده شده در ناقل pET-26b و ترانفورماسیون به باکتری *E. coli* BL21

برای تأیید صحت همسانه سازی کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط انتخابی LB+Kana، با استفاده از پرایمرهای

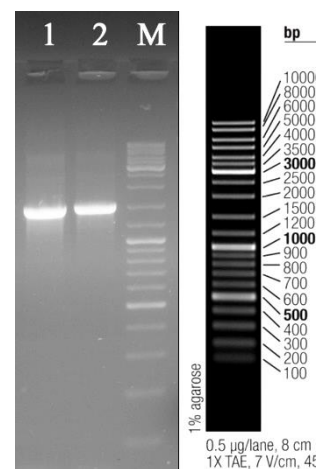


شکل ۴- بررسی بیان پروتئین نوترکیب فیتاز در محیط بیانیاچاهک ها از چپ به راست:چاهک شماره ۱. پروتئین فیتاز بیان شده از کلون شماره ۱ چاهک شماره ۲. پروتئین فیتاز بیان شده از کلون شماره ۲. چاهک شماره ۳. کنترل منفی. چاهک M. نشانگر پروتئینی prestained شرکت ویوانتیس

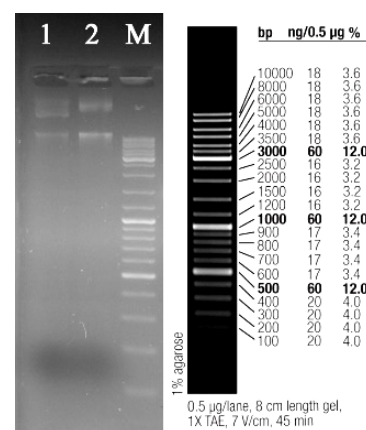
بحث

فیتاز (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) آنزیم فسفاتازی است که هیدرولیز اسید فیتیک (myo-inositol hexakisphosphate) را کاتالیز می کند (۱۴). میکروارگانیسم ها بزرگترین منبع بالقوه فیتاز هستند. به طور گسترده، چهار منبع احتمالی فیتاز وجود دارد: فیتاز گیاهی، فیتاز میکروبی، فیتاز تولید شده توسط مخاط روده کوچک و فیتازهای ریز فلورال مرتبط با روده (۱۵، ۱۶).

فیتات ذخیره اصلی فسفات در دانه های گیاهان غالباً غلات و حبوبات می باشد (۱۷). فیتاز، فیتات را به میو اینوزیتول و فسفات غیر آلی هیدرولیز می کند. از آنجا که دستگاه گوارش حیوانات از جمله خوک و مرغ فیتاز ندارند، برای تامین فسفات خود نیاز به فسفات معدنی دارند. در نتیجه، فیتات و فسفات از طریق کود دفع می شوند و باعث ایجاد مشکلات زیست محیطی در مناطق تولید دام شدید



شکل ۲- ژل آگارز نشان دهنده تأیید Colony-PCR بر روی کلونی های حاوی ژن فیتاز از چپ به راست: ۱. محصول PCR ژن فیتاز از کلون شماره ۱. ۲. محصول PCR ژن فیتاز از کلون شماره ۲. نشانگر مارکر GeneRuler™ #SM 0331.



شکل ۳- ژل آگارز نشان دهنده ی استخراج پلاسمید از نمونه های pET-26b-Phytase. استخراج پلاسمید سازه pET-26b-Phytase کلون ۱. ۲. استخراج پلاسمید سازه pET-26b-Phytase کلون ۲. نشانگر مارکر GeneRuler™ #SM 0331.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب فیتاز در محیط بیانی صحت بیان و ترشح آنزیم فیتاز نوترکیب در محیط بیانی با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل ۴).



به طور موفقیت آمیزی بیان شد. وزن ملکولی این آنزیم با استفاده از روش SDS-PAGE، 80kDa، که نشان دهنده بیان خارج سلولی ژن فیتاز نوترکیب در باکتری می باشد. همچنین محدوده فعالیت آنزیم فیتاز نوترکیب در محدوده PH اسیدی ۵/۵ نشان دهنده فعالیت و پایداری بالای این آنزیم در برار اسید معده می باشد. همچنین محدوده فعالیت دمایی فیتاز نوترکیب نشان داد که این آنزیم همانند فیتاز طبیعی دارای دمای بهینه ۵۵ درجه می باشد.

در نتیجه می توان از این فیتاز نوترکیب به عنوان فیتاز مورد استفاده در افزودنی های مواد غذایی به دلیل مقاومت در PH اسیدی معده استفاده نمود. همچنین فعالیت آنزیم فیتاز را مطابق با معیارها با کاربری صنعتی بهینه نمود

نتیجه گیری

کلونینگ و بیان ژن Pet-26b، توسط PCR با پرایمر M13، هضم آنزیمی *BamHI* و *NcoI*، الکتروفورز و تولید پروتئین نوترکیب توسط وسترن بلات تایید شد. این پروتئین نوترکیب به دلیل مقاومت بالا نسبت به PH اسیدی و فعالیت در دمای ۵۵ به افزایش ارزش غذایی خوراکی و بهبود عملکرد رشد و سلامت حیوانات کمک زیادی می کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پروژه پایان نامه کارشناسی ارشد مریم آزادی مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی با راهنمایی استاد راهنما خانم دکتر لیلا پیشکار و مشاور آقای دکتر احسان دهنوی در تاریخ ۱۳۹۷/۰۶/۲۰ است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام میدارند که هیچ تضاد منافع ندارند.

می شوند. علاوه بر این، فیتات کمپلکسهایی با یونهای فلزی چند ظرفیتی مثل آهن، روی، کلسیم و پروتئین ایجاد می کند و آسیب های زیادی را به محیط زیست می زند (۱۸، ۱۹).

بنابراین فیتاز برای افزایش ارزش غذایی خوراک و بهبود عملکرد رشد و سلامت حیوانات ضروری است. این آنزیم فیتات را هیدرولیز می کند تا فسفر را به شکل آزاد، انتشار دهد و حیوانات می توانند به طور مداوم آن را جذب کنند و در نتیجه تقاضای کمتری برای فسفر معدنی داشته باشند (۲۰). همچنین بدلیل کارایی بسیار زیاد آنزیم فیتاز در حوزهای مختلف، محققان را بر آن داشته است که تولید این آنزیم را در سیستم باکتری انجام دهند. زیرا این سیستم هم مقرون به صرفه و همچنین علاوه بر این مشکلات مرتبط با جداسازی، خالص سازی فیتاز نوترکیب را برطرف می کند (۱۳). فیتاز فعالیت بهینه را در دو pH، یعنی pH قلیایی و اسیدی نشان می دهد. PH بهینه برای فعالیت فیتاز وابسته به گونه می باشد (۲۱).

هدف ما از این مطالعه دستیابی به تولید میزان بالایی از آنزیم فیتاز باکتریایی در وکتور بیانی PET26b بود. به این منظور ژن هدف به وکتور بیانی pET-26b وارد شد و وکتور نوترکیب پس از تکثیر در باکتری اشریشیاکلی DH5α به باکتری اشریشیاکلی BL21 به عنوان میزبان بیانی منتقل شد. برای جداسازی فیتاز نوترکیب از روش SDS-PAGE استفاده گردید و میزان تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از الکتروفورز بررسی شد.

پس از کلون سازس ژن فیتاز در Pet-26b، فیتاز نوترکیب



References

1. Dersjant-Li Y, Awati A, Schulze H, Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;95(5):878-96.
2. Kumar V, Sinha AK, Makkar HP, Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*. 2010;120(4):945-59.
3. Haros M, Bielecka M, Honke J, Sanz Y. Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *International journal of food microbiology*. 2007;117(1):76-84.
4. Lei XG, Weaver JD, Mullaney E, Ullah AH, Azain MJJARAB. Phytase, a new life for an "old" enzyme. 2013;1(1):283-309.
5. Cowieson A, Acamovic T, Bedford M. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*. 2004;45(1):101-8.
6. Song H-Y, El Sheikha AF, Hu D-MJTIFS, Technology. The positive impacts of microbial phytase on its nutritional applications. 2019;86:553-62.
7. Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004;35(1):3-14.
8. Dailin DJ, Hanapi SZ, Elsayed EA, Sukmawati D, Azelee NIW, Eyahmalay J, et al. Fungal phytases: biotechnological applications in food and feed industries. Recent advancement in white biotechnology through fungi: Springer; 2019. p. 65-99.
9. Sheldon RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2007;349(8-9):1289-307.
10. Boudrant J, Woodley JM, Fernandez-Lafuente RJPB. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. 2020;90:66-80.
11. Lei XG, Porres JM, Mullaney EJ, Brinch-Pedersen H. Phytase: source, structure and application. *Industrial enzymes*: Springer; 2007. p. 505-29.
12. Ray A, Ghosh K, Ringø EJAN. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. 2012;18(5):465-92.
13. Terol GL, Gallego-Jara J, Martínez RAS, Díaz MC, de Diego Puente TJMcF. Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using *E. coli* BL21 acetate metabolism knockout strains. 2019;18(1):1-19.
14. Ariyan Nezhad H, Nasiri MR, Aslami Nezhad AA, Asoude A, Dehqani H. Cloning, over Expression and Characterization of Alkaline Phytase Enzyme in *Escherichia Coli*. *Agricultural Biotechnology Journal*. 2013;5(2):1-16(Persian).
15. Mullaney EJ, Ullah AH, Turner B, Richardson A, Mullaney EJIPLa, environment t. Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. 2007:97-110.
16. Kumar V, Sinha AK. General aspects of phytases. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*: Elsevier; 2018. p. 53-72.
17. Lolas GM, MARKAKIS PJJoFS. The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). 1977;42(4):1094-7.
18. Sharma CB, Goel M, Irshad MJP. Myoinositol hexaphosphate as a potential inhibitor of α -amylases. 1978;17(2):201-4.
19. Graf EJPAC, Applications. Chemistry and applications of phytic acid: an overview. 1986:1-21.
20. Guerrand D. Economics of food and feed enzymes: status and perspectives. *Enzymes in human and animal nutrition*: Elsevier; 2018. p. 487-514.
21. Costa FGP, Goulart C, Figueiredo D, Oliveira C, Silva JJIJoPS. Economic and environmental impact of using exogenous enzymes on poultry feeding. 2008;7(4):311-4.



Cloning and optimization of phytase enzyme gene expression in *Escherichia coli*

Maryam Azadi¹, Leila Pishkar^{2*}, Ehsan Dehnavi³

1- Department of Biochemistry Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran

3- Pharmaceutical Technology Development Center of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Original Article

Received: 2 Jan 2021

Accepted: 19 May 2021

*Corresponding Author:

Pishkar Leila, Department of
Biology, Islamshahr Branch,
Islamic Azad University,
Islamshahr, Iran

TEL:

Email: pishkar@iiu.ac

ABSTRACT

Introduction

Phytase is an enzyme that has the ability to break down phytic acid into myoinositol and mineral phosphate, and widely uses as an additive in animal foods. The aim of this study was to achieve a high level of bacterial phytase expression in PET26b expression host.

Materials and Methods

To generate the recombinant phytase enzyme, the target gene was introduced into the expression vector pET-26b-Phytase, and the recombinant vector was transferred to *Escherichia coli* BL21 as a host of expression after replication in *E. coli* DH5 α . The SDS-PAGE method was used to isolate recombinant phytase and the amount of produced recombinant protein was investigated. by electrophoresis.

Results

The bacterial phytase enzyme was successfully expressed in *Escherichia coli* and the molecular weight of recombinant phytase produced at about 85 kDa was estimated. The optimum pH for recombinant bacterial phytase was estimated at 5.5.

Conclusion

The results showed that phytase derived from *Escherichia coli* due to its low production cost and high production of recombinant phytase is a desirable alternative for use in domestic animal feed industry.

Keywords

Phytase 6-phytase, Cloning, Escherichia coli

► **Please cite this article as:** Azadi M, Pishkar L, Dehnavi E. Cloning and optimization of phytase enzyme gene expression in *Escherichia coli*. J Neyshabur Univ Med Sci 2021;9(2):118-125.