دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

کلونینگ و امکان سنجی بیان ژن فیتاز از باکتری *باسیلوس سابتیلیس*

طوبی عباسی دلویی

دی ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

کلونینگ و امکان سنجی بیان ژن فیتاز از باکتری *باسیلوس سابتیلیس*

طوبی عباسی دلویی

اساتید راهنما

دکتر محمدرضا نصیری

دکتر علی‌اصغر اسلمی‌نژاد

اساتید مشاور

دکتر مجتبی طهمورث‌پور

دکتر حسام دهقانی

دی ۱۳۹۰

دانشگاه فردوسی مشهد

دانشکده کشاورزی – گروه علوم دامی

تصویب نامه

این پایان نامه با عنوان « کلونینگ و امکان سنجی بیان ژن فیتاز از باکتری *باسیلوس سابتیلیس*» توسط «طوبی عباسی دلویی» در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۲۸ با نمره ۲۰ و درجه ارزشیابی عالی در حضور هیات داوران با موفقیت دفاع شد.

هیات داوران

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیات	امضاء
۱	آقای دکتر محمدرضا نصیری	دانشیار	استاد راهنما	
۲	آقای دکتر علی‌اصغر اسلمی‌نژاد	استادیار	استاد راهنما	
۳	آقای دکتر مجتبی طهمورث‌پور	دانشیار	استاد مشاور	
٤	آقای دکتر حسام دهقانی	دانشیار	استاد مشاور	
٥	آقای دکتر حسن مرعشی	استاد	استاد مدعو	
٦	آقای دکتر علیرضا هروی	دانشیار	استاد مدعو	
۷	آقای دکتر احمد حسن‌آبادی	دانشیار	نماینده تحصیلات تکمیلی	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه:

کلونینگ و امکان سنجی بیان ژن فیتاز از باکتری *باسیلوس سابتیلیس*

اینجانب **طوبی عباسی دلویی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح دام دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی **جناب آقای دکتر محمدرضا نصیری** و **جناب آقای دکتر علی‌اصغر اسلمی‌نژاد** متعهد می‌شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می‌گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان‌نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان‌نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

طوبی عباسی دلویی

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

فیتات منبع عمده تأمین فسفر در جیره حیوانات مزرعه‌ای می‌باشد. این ترکیب دسترسی زیستی به مواد معدنی، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها را کاهش می‌دهد. آنزیم فیتاز با تجزیه فیتات، باعث کاهش اثر ضد تغذیه‌ای آن می‌شود. میکروارگانیسم‌ها بهترین منبع تولید تجاری این آنزیم محسوب می‌شوند. فیتاز تولید شده توسط *باسیلوس سابتیلیس* برای استفاده در صنعت مناسب می‌باشد. در این مطالعه به منظور همسانه‌سازی و بررسی امکان تولید فیتاز نوترکیب، ژن فیتاز با استفاده از آغازگرهای لینکردار طراحی شده از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* PTCC 1156، جداسازی شد. پس از انجام واکنش PCR، ژن فیتاز با روش همسانه‌سازی TA در وکتور pTZ57R/T کلون شد و جهت تأیید صحت، مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج توالی‌یابی صحت انجام همسانه‌سازی را نشان داد. توالی به دست آمده پس از ویرایش با شماره دسترسی JN886002 در NCBI ثبت شد. به منظور استخراج ژن فیتاز و همسانه‌سازی در وکتور بیان pET-32a(+)، پلاسمید نوترکیب و وکتور با آنزیم‌های برشی (*Bam*HI و *Hind*III) مورد هضم قرار گرفتند. در نهایت، پس از انجام واکنش اتصال، پلاسمید حاصل به باکتری اشرشیاکلی BL21(DE3) منتقل و ساختاری حاصل شد که ممکن است پس از القای بیان با القاگر مناسب قادر به تولید آنزیم فیتاز نوترکیب باشد.

کلید واژه‌ها: باسیلوس سابتیلیس، فیتات، فیتاز C، همسانه‌سازی

فهرست مطالب

۱- مقدمه ۱

۱-۱- اهمیت موضوع ۱

۱-۲- اهداف تحقیق ٤

۲- بررسی منابع ۵

۲-۱- فسفر ۵

۲-۲- اسید فیتیک ٦

۲-۲-۱- ساختار شیمیایی اسید فیتیک ۸

۲-۲-۲- توزیع اسید فیتیک ۹

۲-۲-۳- عملکردهای فیزیولوژیکی اسید فیتیک ۹

۲-۲-٤- اثرات ضد تغذیه‌ای اسید فیتیک ۱۰

۲-۳- فیتاز ۱۳

۲-۳-۱- منابع تولید فیتاز ۱۷

۲-۳-۱-۱- منابع میکروبی ۱۸

۲-۳-۱-۲- منابع گیاهی ۱۹

۲-۳-۱-۳- منابع حیوانی ۱۹

۲-۳-۱-٤- منابع جلبکی ۲۰

۲-۳-۲- ویژگی‌های آنزیمی فیتاز ۲۰

۲-۳-۲-۱- دما و pH بهینه ۲۱

۲-۳-۲-۲- مدولاتورهای فعالیت آنزیمی ۲۳

۲-۳-۳- کاربرد آنزیم فیتاز ۲۳

۲-٤- باسیلوس سابتیلیس ۲٤

۲-۵- تحقیقات انجام شده در این زمینه ۲۷

۲-٦- فرآیند همسانه‌سازی ژن ۳۰
۲-٦-۱- تاریخچه ۳۰
۲-٦-۲- ابزارهای مورد استفاده در همسانه‌سازی ژن ۳۱
۲-٦-۳- سایر تکنیک‌ها و استراتژی‌های همسانه‌سازی ژن ۳۲
۲-٦-۳-۱- آنزیم‌های مورد استفاده ۳۲
۲-٦-۳-۲- تکنیک‌های مورد استفاده در همسانه‌سازی ۳٤
۲-٦-۳-۳- ناقلین همسانه‌سازی ۳٤
۲-٦-۳-٤- میزبان‌ها ۳۸
۲-۷- واکنش زنجیرهای پلیمراز ٤۰
۲-۸- اصول طراحی آغازگر ٤۲
۲-۹- همسانه‌سازی TA ٤٤
۲-۹-۱- نکات کلیدی در همسانه‌سازی TA ٤٥
۲-۱۰- استفاده از آنزیم‌های برشی در همسان‌هسازی ژن ٤٥
۲-۱۱- توالی‌یابی ٤٦
۲-۱۱-۱- نرم‌افزار Chromas Life 2.0 ..... ٤٦
۲-۱۱-۲- نرم‌افزار BioEdit ٤۷
۲-۱۱-۳- ابزار BLAST ٤۸
۳- مواد و روش‌ها ٤۹
۳-۱- تهیه باکتری باسیلوس سابتیلیس ٤۹
۳-۲- استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ٤۹
۳-۲-۱- مراحل انجام کار استخراج ٥۰
۳-۲-۲- تعیین غلظت DNA استخراج شده ٥۱
۳-۳- طراحی آغازگرها ٥۳

۳-٤- انجام واکنش PCR ٥٤
۳-٤-۱- اطمینان از قطعه تکثیر شده توسط آغازگر لینکردار ٥٥
۳-٥- استخراج ژن فیتاز تکثیر شده با آغازگر لینکردار از ژل آگارز ٥٥
۳-٦- واکنش A-tailing ٥٧
۳-٦-۱- استخراج محصول واکنش A-tailing از ژل آگارز ٥٧
۳-۷- همسان‌هسازی قطعه مورد نظر در وکتور pTZ57R/T ٥٨
۳-۷-۱- تهیه محیط کشت باکتری DH5α ٥٨
۳-۷-۲- کشت خطی و کشت مایع باکتری DH5α ٥٩
۳-۷-۳- تهیه سلول‌های مستعد DH5α ٥٩
۳-۷-٤- پیوند قطعه و ناقل pTZ57R/T ٦٠
۳-۷-٥- انتقال پلاسمیدها به باکتری DH5α ٦١
۳-۷-٦- غربالگری کلونی‌ها ٦١
۳-۸- تأیید صحت قطعه همسانه‌شده در pTZ57R/T ٦٢
۳-۸-۱- کلونی PCR ٦٢
۳-۸-۲- هضم آنزیمی ٦٢
۳-۹- استخراج پلاسمید نوترکیب ٦٣
۳-۹-۱- تعیین کیفیت و کمیت پلاسمید نوترکیب استخراج شده ٦٤
۳-۹-۲- Miniprep PCR ٦٤
۳-۹-۳- توالی‌یابی ٦٥
۳-۱۰- همسانه‌سازی قطعه مورد نظر در pET-32a(+) ٦٦
۳-۱۰-۱- آماده‌سازی قطعه ٦٦
۳-۱۰-۱-۱- هضم پلاسمید pTZ-PhyC ٦٦
۳-۱۰-۱-۲- استخراج محصول واکنش هضم پلاسمید ٦٧
۳-۱۰-۲- آماده‌سازی وکتور بیان ٦٧

۳-۱۰-۲-۱- هضم وکتور pET-32a(+) ٦٧
۳-۱۰-۲-۲- استخراج وکتور هضم شده از ژل ٦٨
۳-۱۰-۳- پیوند قطعه و ناقل pET-32a(+) ٦٨
۳-۱۰-٤- انتقال پلاسمید نوترکیب pET-32/PhyC به باکتری DH5α ٦٩
۳-۱۰-٥- کشت خطی کلونی‌ها ٦٩
۳-۱۰-٦- تأیید صحت قطعه همسانه‌شده در pET-32a(+) ۷۰
۳-۱۱- استخراج پلاسمید نوترکیب ۷۰
۳-۱۱-۱- تعیین کیفیت و کمیت پلاسمید نوترکیب استخراج شده ۷۰
۳-۱۱-۲- Miniprep PCR ۷۰
۳-۱۲- تهیه محیط کشت باکتری BL21(DE3) ۷۰
۳-۱۲-۱- کشت خطی و کشت مایع باکتری BL21(DE3) ۷۱
۳-۱۲-۲- تهیه سلول‌های مستعد باکتری BL21(DE3) ۷۱
۳-۱۳- انتقال پلاسمیدها به باکتری میزبان ۷۱
۳-۱۳-۱- کشت خطی کلونی‌ها ۷۲
۳-۱۳-۲- کلونی PCR ۷۲
٤- نتایج و بحث ۷۳
٤-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۷۳
٤-۲- بررسی محصول PCR ۷٤
٤-۳- تأیید صحت محصول PCR ۷٥
٤-٤- استخراج از ژل محصول PCR ۷٦
٤-٥- استخراج از ژل محصول واکنش A-tailing ۷٦
٤-٦- همسانه‌سازی ژن فیتاز در pTZ57R/T ۷۷
٤-۷- نتایج کلونی PCR پلاسمید pTZ57R/T حاوی ژن هدف و هضم آنزیمی ۷۸

٤-٨- نتایج استخراج پلاسمید pTZ57R/T حاوی ژن فیتاز ٧٩
٤-٨-١- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت پلاسمید نوترکیب ٧٩
٤-٩- نتایج توالی‌یابی ٨٠
٤-١٠- نتیجه هضم پلاسمید نوترکیب و وکتور بیان ٨٢
٤-١١- استخراج از ژل محصولات هضم ژن هدف و وکتور بیان ٨٢
٤-١٢- انتقال ژن فیتاز همسانه‌سازی شده در pET-32a(+) به باکتری DH5α ٨٣
٤-١٣- تأیید صحت قطعه همسانهسازی شده در pET-32a(+) ٨٤
٤-١٤- استخراج پلاسمید نوترکیب و انتقال آن به میزبان بیان ٨٥
٤-١٥- بحث ٨٦
٥- نتیجه گیری و پیشنهادات ٨٩
منابع ٩١

فهرست شکل‌ها

شکل ۲-۱. ساختار شیمیایی فیتیک اسید ۸

شکل ۲-۲. اثر متقابل فیتیک اسید با فلزات، پروتئین‌ها و کربوهیدرات ۱۲

شکل ۲-۳. فیتاز نوع ۳ و فیتاز نوع ٦ ..... ١٤

شکل ۲-٤. نمایش شماتیک نحوه عمل فیتاز ۱۵

شکل ۲-۵. توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن فیتاز *باسیلوس سابتیلیس* ۲۵

شکل ۲-٦. شمای کلی انجام همسانه‌سازی ۳۱

شکل ۲-۷. نقشه پلاسمید pTZ57R/T و مکان‌های برشی آن ۳٦

شکل ۲-۸. نقشه پلاسمید pET-32(+) و مکان‌های برشی آن ۳۷

شکل ۲-۹. شمای کلی واکنش PCR ٤۱

شکل ۲-۱۰. ساختارهای ثانویه آغازگرها ٤۳

شکل ۲-۱۱. ساختارهای ثانویه که منجر به تولید دایمر آغازگر می‌شود ٤۳

شکل ۲-۱۲. چگونگی تعیین نوکلئوتیدها با کمک رنگ خاص هر نوکلئوتید در دیاگرام ٤۷

شکل ۳-۱. مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن فیتاز ۵۳

شکل ٤-۱. استخراج DNA بر روی ژل آگارز ۱٪ ۷۳

شکل ٤-۲. خروجی نانودراپ اسپکتروفتومتری برای نمونه استخراج DNA ۷٤

شکل ٤-۳. قطعه تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ ۷۵

شکل ٤-٤. تأیید صحت توالی تکثیر شده توسط هضم آنزیمی ۷۵

شکل ٤-۵. قطعه تکثیر شده پس از استخراج از ژل بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ ۷٦

شکل ٤-٦. قطعه فیتاز پس از A-tailing و استخراج از ژل بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ ۷۷

شکل ٤-۷. کلونی‌های آبی رنگ تولید شده از باکتری‌های حاوی پلاسمید pTZ57R/T (کنترل منفی) ۷۷

شکل ٤-۸. کلونی‌های آبی و سفید رنگ تولید شده از باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب ۷۸

شکل ٤-۹. محصولات PCR برای تأیید قطعه همسانه‌سازی در pTZ57R/T ۷۸

شکل ٤-۱۰. پلاسمید نوترکیب استخراج شده روی ژل آکارز ۱٪ ۷۹

شکل ٤-۱۱. خروجی نانودراپ اسپکتروفتومتری برای پلاسمید نوترکیب ۸۰

شکل ٤-۱۲. نتیجه BLAST توالی‌های AF029053 و JN886002 ..... ۸۱

شکل ٤-۱۳. محصولات هضم پلاسمید نوترکیب و وکتور بیان ۸۲

شکل ٤-١٤. نتایج استخراج از ژل ژن فیتاز و pET-32a(+) ۸۲

شکل ٤-١٥. کلونی‌های سفید رنگ تولید شده از باکتری‌های DH5α دریافت کننده پلاسمید نوترکیب ٨٣
شکل ٤-١٦. محصول واکنش PCR برای تأیید صحت همسانه‌سازی در pET-32a(+) ٨٤
شکل ٤-١٧. نتایج واکنش هضم آنزیمی محصول PCR برای تأیید صحت همسانه‌سازی ژن فیتاز در pET-32a(+) ٨٤
شکل ٤-١٨. pET-32a(+) حاوی ژن هدف ٨٥
شکل ٤-١٩. کلونی‌های سفید رنگ تولید شده از باکتری‌های BL21(DE3) دریافت کننده پلاسمید نوترکیب ٨٥

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱. محتوای فسفر فیتاتی و فعالیت فیتازی برخی از اجزای رایج خوراک ۷

جدول ۲-۲. منابع مختلف تولید کننده فیتاز ۱۶

جدول ۲-۳. وزن مولکولی، دما و pH بهینه فیتازهای منابع مختلف ۲۲

جدول ۲-۴. عناصر ژنتیکی ناقل pTZ57R/T ۳۶

جدول ۲-۵. عناصر ژنتیکی ناقل pET-32a(+) ۳۸

جدول ۲-۶. خصوصیات ژنتیکی باکتری DH5α ۳۹

جدول ۲-۷. خصوصیات ژنتیکی باکتری BL21(DE3) ۴۰

جدول ۲-۸. ساختار انتهای ′۳ محصولات تولیده بوسیله *Taq* پلیمراز ۴۴

جدول ۳-۱. مواد و مقادیر لازم برای انجام PCR برای یک واکنش ۵۴

جدول ۳-۲. برنامه حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر ژن فیتاز ۵۴

جدول ۳-۳. مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش هضم قطعه تکثیر شده ۵۵

جدول ۳-۴. مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش A-tailing ۵۷

جدول ۳-۵. مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش پیوند قطعه و ناقل pTZ57R/T ۶۰

جدول ۳-۶. مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش تأیید صحت قطعه همسانه‌شده ۶۵

جدول ۳-۷. مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش هضم پلاسمید pTZ-PhyC ۶۶

جدول ۳-۸. مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش هضم pET-32a(+) ۶۷

جدول ۳-۹. مواد و مقادیر لازم برای انجام واکنش پیوند قطعه و ناقل ۶۸

فهرست علائم و اختصارات

معادل فارسی	معادل لاتین	علامت اختصاری
جفت باز	Base pair	Bp
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رقابتی	Competitive PCR	cPCR
آب دوبار تقطیر	Double Distilled Water	ddW
اسید دزوکسی ریبو نوکلئیک	Deoxyribonocleic Acid	DNA
اتیلن دیامین تترا- استیک اسید	Ethylenediaminetetra-acetic acid	EDTA
میواینوزیتول هگزاکیس فسفات	myo-Inositol Hexakisphosphate	Ins P_6
اینوزیتول پلی فسفات‌ها	Inositol Poly Phosphates	IPPs
تیوگالاکتوپیرانوزید ایزوپروپیل	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside	IPTG
اتحادیه بین الملل شیمی خالص و کاربردی- اتحادیه بین المللی بیوشیمی	International Union of Pure and Applide Chemistry-International Union of Biochemistry	IUPAC-IUB
لوریا- برتانی	Lauria – Bertani	LB
جایگاه چندگانه همسانه سازی	Multiple Cloning Site	MCS
مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی	National Center of Biotechnology Information	NCBI
چگالی نوری	Optic Density	OD
چارچوب خواندن آزاد	Open Reading Frame	ORF
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	Polymerase Chain Reaction	PCR
جایگاه اتصال ریبوزوم	Ribosomal Binding Site	RBS
چند شکلی حاصل از طول قطعات هضم	Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP
اسید ریبونوکلئیک	Ribonocleic Acid	RNA
دور در دقیقه	Round per minute	rpm
سدیم دودسیل سولفات - ژل الکتروفورز پلی‌اکریل آمید	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacryl Amide Gel Electrophoresis	SDS-PAGE

فصل اول

۱- مقدمه

۱-۱- اهمیت موضوع

فیتات عمده‌ترین شکل ذخیره فسفر در اکثر گیاهان است و ۸۰ درصد کل فسفر موجود در غلات و لگوم‌ها به شکل فیتات می‌باشد که برای حیوانات قابل دسترسی نیست. دانه‌های روغنی، لگوم‌ها و غلات، منابع اصلی تغذیه حیوانات و انسان را تشکیل می‌دهند و یکی از اجزای مهم سازنده آن‌ها اسید فیتیک می‌باشد (کراوو و همکاران، ۱۹۹۸). اسید فیتیک در جیره حیوانات غیر نشخوارکننده به عنوان یکی از ذخایر فسفر وجود دارد. میزان فسفر فیتینی درون خوراک دام و طیور متفاوت است. این ترکیب یک عامل کلات کننده قوی می‌باشد که حلالیت و هضم بسیاری از مواد مغذی را از طریق تشکیل کمپلکس‌های فیتات کاهش می‌دهد (سل، ۱۹۹۷؛ انجل و همکاران، ۲۰۰۲). فیتات در انسان و حیوانات تک معده‌ای مانند طیور و ماهی، به دلیل کلات کردن یون‌های فلزی مختلف مانند کلسیم و مس به عنوان یک ماده ضد تغذیه‌ای محسوب می‌شود که با کاهش جذب در روده دسترسی زیستی به این عناصر را کاهش داده و باعث افزایش دفع آن‌ها از طریق مدفوع می‌شود (چریان، ۱۹۸۰؛ اپلگات و همکاران، ۲۰۰۳). از طرف دیگر پایین بودن قابلیت دسترسی فسفر موجود در منابع گیاهی علاوه بر افزایش نیاز به

استفاده از منابع فسفر غیر آلی، از طریق تجمع در خاک‌های زراعی، شسته شدن از طریق زه آب‌ها و عوامل فرساینده شدید خاک، وارد آب‌های سطحی شده و موجب افزایش آلودگی آب رودخانه‌ها، جویبارها و دریاچه‌ها می‌شود (کارل، ۱۹۹۹).

با توجه به مطالب ذکر شده و بالا بودن قیمت نسبی منابع غیر آلی فسفر در مقایسه با منابع کلسیم جیره، مطالعات زیادی جهت بررسی راهکارهای کاهش دفع فسفر از طریق مدفوع انجام گرفته است که می‌توان به مواردی همانند کاهش سطح فسفر خوراک، استفاده از برنامه تغذیه مرحله‌ای فسفر، پرورش جداگانه جنس نر و ماده، تنظیم جیره بر اساس فسفر قابل دسترس به جای فسفر کل و اخیراً استفاده از آنزیم فیتاز اشاره نمود (کاوآ و همکاران، ۲۰۰۷).

آنزیم فیتاز (میواینوزیتول هگزا فسفوهیدرولاز) گروه‌های فسفاتی را از فیتین جدا می‌کند و فسفر را برای حیوانات قابل دسترس می‌کند. این آنزیم متعلق به خانواده فسفومونواسترازها می‌باشد که می‌تواند سبب آزاد شدن تدریجی فسفات از فیتاز شود (گرینر و فارک، ۲۰۰۷). فیتاز به عنوان مکمل غذا در جیره حیواناتی مانند طیور و تا حدودی ماهی بطور گسترده استفاده می‌شود. فیتاز آنزیمی است که فیتات غیر قابل هضم را تجزیه می‌کند و در طی دو دهه اخیر در پاسخ به نگرانی‌های ایجاد شده نسبت به افزایش بیش از حد آلودگی‌های فسفری در محیط زیست به میزان چشم‌گیری مورد بررسی قرار گرفته است. از آن‌جایی که منابع فسفاتی جهان تجدید ناپذیر هستند می‌توان با بهره‌گیری از این آنزیم به طور مؤثری از هدر رفتن فسفر جلوگیری کرد. قابلیت این آنزیم در فراهمی فسفر و کاهش دفع آن به خوبی اثبات شده است (واتس و بنرجی، ۲۰۰٤). با بهره‌گیری از فیتاز، فسفر فیتاتی تبدیل به فسفر قابل دسترس می‌شود که می‌تواند به طور مستقیم در دسترس حیوانات و یا گیاهان آبزی قرار گیرد. بدین ترتیب نرخ استفاده از فسفر به صورت قابل توجهی با استفاده از فیتاز افزایش می‌یابد (کاوو و همکاران، ۲۰۰۷). فیتاز علاوه بر این که می‌تواند فیتات را هیدرولیز کند، با بهبود در دسترس قرار گرفتن مواد معدنی باعث افزایش غلظت

برخی مواد معدنی از قبیل منیزیم، کلسیم ، منگنز و روی در پلاسما، استخوان‌ها و کل بدن می‌شود (ویلما و همکاران، ۱۹۹۸). بنابراین فیتاز می‌تواند ضریب قابلیت هضم ظاهری مواد معدنی را افزایش دهد (چنگ، ۲۰۰٤).

به دلیل عدم وجود مقادیر مناسب و کافی فیتاز طبیعی برای کاربرد در جیره حیوانات، مطالعاتی بر روی شناسایی فیتازهایی که تولید تجاری آن‌ها راحت‌تر است، در حال انجام است. فیتاز مورد استفاده به عنوان مکمل غذایی باید بتواند فسفات فیتات را در دستگاه گوارش آزاد کند. این فیتاز باید به غیر فعال شدن توسط فرآیندهای گرمایی و ذخیره شدن مقاوم باشد و همچنین تولید آن ارزان باشد. ثبات و پایداری فیتاز در مقابل دما به ویژه هنگامی که فرآیند پلت کردن غذا بین دماهای ٦٥ تا ۹۵ درجه سانتیگراد انجام می‌شود مهم است (گرینر و فارک، ۲۰۰۷). به نظر می‌رسد که فیتاز به دست آمده از ارگانیسم‌های گرمادوست بیشترین مقاومت را در برابر حرارت داشته باشد. توانایی آزادسازی فسفر فیتاتی در دستگاه گوارش را با توجه به خصوصیات آنزیمی، مانند راندمان تجزیه، سوبسترای اختصاصی، دما و pH بهینه و مقاومت در برابر پروتئولیز تعیین می‌کنند و از آن‌جا که محل اصلی عمل فیتاز در معده و در pH اسیدی است، pH بهینه اسیدی و مقاومت در برابر پپسین ضروری است (لی و همکاران، ۲۰۰۱). فیتازهای باکتریایی و قارچی میزان حساسیت‌های متفاوتی در برابر پپسین و تریپسین از خود نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد فیتازهای باکتری‌هایی در مقایسه با فیتازهای قارچی مقاومت بالاتری را در مقابل تجزیه پروتئولیتیکی دارند (گرینر و فارک، ۲۰۰۷). لازم به ذکر است که فیتاز ایده‌آل برای گونه‌های مختلف متفاوت است، زیرا pH دستگاه گوارش و به ویژه معده در آن‌ها متفاوت است.

باسیلوس سابتیلس و دیگر باسیل‌ها در دهه اخیر بیشتر برای تولید آنزیم‌های صنعتی به کار برده شده‌اند. این باکتری‌ها در بعضی از این تحقیقات به شکل طبیعی برای تولید آنزیم‌هایی مانند فیتاز، آمیلاز و پروتئاز استفاده شده‌اند. فیتاز *باسیلوس سابتیلیس* با فیتاز قارچی شناخته شده از نظر توالی، خصوصیات

آنزیمی و مسیر هیدرولیز تفاوت‌هایی دارد. تحقیقات نشان داده‌اند فیتاز *باسیلوس سابتیلیس* دارای پایداری حرارتی بالایی می‌باشد و از این رو برای تولید صنعتی آنزیم فیتاز مناسب می‌باشد (یداو و همکاران، ۲۰۱۱).

۱-۲- اهداف تحقیق

با توجه به مطالبی که در مورد اهمیت فیتاز در تغذیه حیوانات بیان شد، هدف از این تحقیق جداسازی و بهینه کردن شرایط همسانه‌سازی ژن فیتاز از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* است. از جمله اهداف دیگر این تحقیق امکان سنجی بیان ژن فیتاز با هدف تولید آنزیم نوترکیب مؤثر می‌باشد.