

کلونینگ و بیان ژن رمزگذار آنزیم تجزیه کننده ترکیبات آلی فسفره (*opd*) در باکتری *Escherichia coli*

سیده مینو سجادیان^۱، وحید حسینی نوه^{۲*}، خلیل طالبی^۲ و مریم زمانی^۳
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. پژوهشگر پسا دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه مک ماستر، همیلتون کانادا
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳)

چکیده

کاربرد گسترده ترکیب‌های آلی فسفره منجر به بروز اثر زیان‌آور زیست‌محیطی بسیاری شده است. استفاده از میکروارگانیسم‌ها در پالایش و اندازه‌گیری این ترکیب‌های ناگوار به‌عنوان یک رویکرد دوستدار محیط‌زیست و مناسب شناخته شده است. آنزیم ارگانوفسفرس هیدرولاز از آنزیم‌های هیدرولیزکننده فسفوتری‌استری است که در برخی میکروارگانیسم‌های خاک به‌ویژه *Flavobacterium* sp. شناسایی شده و قادر به هیدرولیز تعدادی از ترکیب‌های فسفره آلی است. در این پژوهش بهینه‌سازی کدون‌های توالی رمزگذار این پروتئین برای بیان در باکتری *Escherichia coli* انجام شد و سپس همراه با پروموتور *lac* در وکتور پروموتور-پروب pTH1705 به‌صورت ادغام الگوبرداری کلون شد و ترانسفورماسیون در دو سویه باکتری *E. coli* انجام گرفت. محیط کشت معدنی M9 حاوی غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، برای سنجش عملکرد باکتری تراریخت بیان‌کننده ژن *opd* (به‌صورت *in trans*) استفاده شد. بررسی منحنی رشد استرین *E. coli* V103 نشان داد، رشد باکتری در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون تا حد زیادی تحت تأثیر (وجود آفت‌کش) قرار می‌گیرد درحالی‌که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون این تأثیر کمتر است. نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌عنوان یک روش استاندارد نشان داد، غلظت دیازینون در محیط کشت باکتری، در چهار استرین V100، V101، V102 و V103 پس از ۲۴ ساعت از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب به ۶/۳۸، ۷/۱۹، ۷/۰۹ و ۵/۷۴ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. این نتایج بیانگر انتقال موفق و نیز بیان ژن مورد نظر در باکتری است و این باکتری نوترکیب مهندسی شده توانایی تجزیه ترکیب‌های فسفره را دارد.

واژه‌های کلیدی: باکتری تراریخت، تجزیه، ترکیب‌های آلی فسفره، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

Cloning and studying the function of *opd* gene encoding organophosphorus hydrolase in *Escherichia coli*

Seyedeh Minoo Sajadian¹, Vahid Hosseini Naveh^{2*}, Khalil Talebi² and Maryam Zamani³

1, 2. Ph. D. Candidate and Professor, Department of Plant Protection, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Postdoc Fellowship, Department of Biology, McMaster University, Hamilton, Canada

(Received: May 7, 2017 - Accepted: Jan. 23, 2018)

ABSTRACT

Organophosphorus compounds are widely used, and their presence in different components of the ecosystem has led to harmful effects on the environment. The use of microorganisms in detoxification of xenobiotic compounds and measurement of pesticide residues is considered as an environmental-friendly and appropriate method. Organophosphorus hydrolase (*opd*), is a phosphotriester hydrolase enzyme which is discovered in some soil microorganisms such as *Flavobacterium* sp. and has a wide range of substrates and is able to hydrolyze many organophosphorus compounds. In the present study, codon optimization was done to express the protein in *Escherichia coli*. Following omission of the signal peptide sequence and substitution of serine by methionine as the start codon, this fragment was cloned under the control of *lac* promoter in a promoter-probe vector (pTH1705) as a transcriptional fusion and was used for transformation in two *Escherichia coli* strains DH5 α and XL1-blue. To measure the performance of the transgenic bacteria expressing *opd* gene (as *in trans*), they were cultured in M9 mineral medium containing 10 and 50 mg/L diazinon and appropriate available carbon and nitrogen sources. Studying the growth curve of V103 strain revealed that bacterial growth in the presence of 50 mg/L diazinon had been affected while this effect in the presence of 10 mg/L diazinon was minor. Results obtained from high-performance liquid chromatography as a standard method to compare with the performance of obtained transgenic strain showed that after 24 hours, diazinon concentration (initially 10mg/L) in the bacterial culture medium of V100, V101, V102 and V103 strains reached to 6.38, 7.19, 7.09 and 5.74, respectively. These results reflected the successful transfer and expression of target gene in the bacterium and this genetically engineered bacterium was able to degrade organophosphorus compounds directly.

Keywords: Degradation, HPLC, organophosphorus compounds, transgenic bacterium.

* Corresponding author E-mail: vnaveh@ut.ac.ir

مقدمه

در دنیای امروز مقدار زیادی آفت‌کش از راه‌های مختلف به محیط‌زیست راه پیدا کرده و در محیط پخش می‌شوند. مهم‌ترین خطرهای آفت‌کش‌ها تأثیر منفی آن‌ها روی محیط‌زیست، حیات‌وحش، گیاهان مفید و به‌طور کلی موجودات غیرهدف است (Hsu & Bartha, 1979). ترکیب‌های فسفره آلی از سمی‌ترین موادی هستند که هم به‌عنوان عامل‌های جنگ شیمیایی و هم به‌عنوان آفت‌کش استفاده می‌شوند (Wang et al., 2001). این ترکیب‌ها به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان آفت‌کش برای محافظت از مواد غذایی، محصولات کشاورزی و محیط‌زیست در مقابل خسارت‌های ایجادشده توسط آفات مختلف استفاده می‌شوند (Rogers et al., 1999). آفت‌کش‌های آلی فسفره مهارکننده استیل کولین استراز هستند، آنزیمی که به عمل پیام‌رسان استیل کولین پایان می‌بخشد و با تحریک عصبی به فضای سیناپسی ترشح می‌شود و روی گیرنده‌های کولینرژیک پس‌سیناپسی عمل می‌کند. در نتیجه استیل کولین در شیار عصبی جمع شده و بنابراین عمل مخابره پیام مختل می‌شود و هیجان عصبی دست می‌دهد. در نتیجه ماهیچه‌ها منقبض شده که در نهایت این حالت به فلج و مرگ منتهی می‌شود (Donarski et al., 1989). اگرچه این ترکیب‌ها نقش قابل توجهی در حفاظت از گیاهان زراعی و محصولات کشاورزی دارند اما کاربرد گسترده وجود آن‌ها در اجزای مختلف اکوسیستم منجر به بروز اثر زیان‌آور زیست‌محیطی بسیاری شده است (Musa et al., 2011). در بین ترکیب‌های آلی فسفره آفت‌کش‌هایی با خاصیت گوارشی، تماسی، نفوذی، سیستمیک و تدخینی وجود دارد که به دلیل اثرگذاری سریع، قابلیت متابولیسم سریع در بدن موجودات زنده، خاصیت نفوذی و سیستمیک برخی از آن‌ها و همچنین تجزیه سریع در خاک، آب و ایجاد آلودگی محیطی کمتر به‌طور وسیعی استفاده می‌شوند (Cai et al., 2016). ترکیب‌های فسفره در معرض نور خورشید، هوا، خاک و غیره سم‌زدایی و هیدرولیز می‌شوند (Musa et al., 2011; Zheng et al., 2013).

عامل‌های غیرزنده (مانند دما، رطوبت، اسیدیته خاک، و غیره)، جامعه میکروبی، گونه‌های گیاهی، ویژگی‌های آفت‌کش‌ها، و واکنش‌های بیولوژیکی و شیمیایی نیز سرنوشت ترکیب‌های فسفره را در محیط تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kazemi et al., 2012). اکسیداسیون شیمیایی با ازن، تجزیه نوری (Zertal et al., 2005)، ازن‌دهی (Hua et al., 2006)، فیلتراسیون غشایی (Hofman et al., 1997)، جذب (Daneshvar et al., 2007) و تخریب بیولوژیکی (Chen et al., 2009) برخی از روش‌های متعددی است که برای از بین بردن باقیمانده آفت‌کش‌ها در محیط استفاده شده است. اما در این بین استفاده از میکروارگانیسم‌ها (ریزجانداران) در سم‌زدایی این آلاینده‌ها به‌عنوان یک روش کم‌هزینه و بدون آسیب به زیست‌شناسی خاک و دوستدار محیط‌زیست در نظر گرفته شده است (Singh and Walker, 2006). تجزیه آلاینده‌ها توسط میکروب‌ها و پاک‌سازی محیط‌های آلوده با استفاده از باکتری‌ها از اواخر دهه ۱۹۶۰ میلادی مورد توجه قرار گرفت. برخی از گونه‌های باکتریایی همچون *Flavobacterium* sp. و *Pseudomonas* sp. با تولید آنزیم‌های فسفریک تری‌استر هیدرولاز ترکیب‌های فسفره آلی را تجزیه می‌کنند (Ewida, 2014). ارگانوفسفرس هیدرولاز شناخته‌شده‌ترین آنزیم فسفریک تری‌استر هیدرولاز در دنیای باکتری‌هاست (Zheng et al., 2013). هیدرولیز آنزیمی ترکیب‌های آلی فسفره باعث سم‌زدایی و کاهش سمیت آن‌ها (تا حد معدنی شدن) می‌شود (Hsu et al., 2008; Harper et al., 2006). آنزیم OPH (E.C.8.1.3.1)، از برخی از میکروارگانیسم‌های خاک مانند *Pseudomonas diminuta* و *Pseudomonas putida* (Serdar et al., 1982) و گونه‌های *Flavobacterium* spp. (Mulbry & Karns, 1989; Munnecke, 1980) جدا شده است. این آنزیم قادر به هیدرولیز تعدادی از ترکیب‌های فسفره است (Chae et al., 1994; Lai et al., 1995; Kolakowski et al., 1997) و یکی از آنزیم‌های اصلی در سم‌زدایی ترکیب‌هایی مانند

(2012). هرچند که این استرین قادر به تجزیه پاراتیون و دیگر آفت‌کش‌های آلی فسفره نیز است (Zhang et al., 2006). ژن *mpd* روی کروموزوم قرار دارد (Zhongli et al., 2001) درحالی‌که *opd* یک ژن پلازمیدی است. بررسی‌های متعددی در مورد بیان نوترکیب پروتئین تجزیه‌کننده ترکیب‌های فسفره که توسط این ژن و یا ژن‌های دیگر رمز می‌شود در میکروارگانیسم‌های مختلف و با هدف‌های مختلف صورت گرفته است. برای مثال در سال ۲۰۰۴ بررسی درزمینه بیان پروتئین ارگانوفسفرس هیدرولاز، که توسط ژن *ophc2* رمز می‌شود، در *E. coli* صورت گرفت که سطح بیان پروتئین بسیار کم گزارش شد (Wu et al., 2004). در سال ۲۰۰۶ همین محققان از مخمر *Pichia pastoris* به‌عنوان میزبان بیان همین ژن استفاده کردند (Chu et al., 2006) که سال‌هاست به‌عنوان یک میزبان برای سطح بالای بیان پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود (Baumgartner et al., 2002). این کار نخستین گزارش است که از سیستم *P. pastoris* و با استفاده از یک نسخه کروموزومی ژن *opd* برای بیان ارگانوفسفرس هیدرولاز استفاده کرده است. سیستم‌های بیانی مختلفی برای تولید آنزیم ارگانوفسفرس هیدرولاز طراحی شده‌اند. در سال‌های گذشته ژن *mpdB* رمزگذار پروتئین MPH که یک پروتئین هیدرولیزکننده ترکیب‌های آلی فسفره است از باکتری *Burkholderia cepacia* بومی تایلند جداسازی شد و در وکتور pGEX-4T-2 کلون شد. این باکتری از متیل پاراتیون (MPH) به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده کرده و MPH را به‌صورت یک پروتئین متصل به غشا تولید می‌کند که بیان آن به‌صورت دائمی گزارش شده است (Keprasertsup et al., 2001). در طراحی این وکتور بیانی، پروتئین ادغامی گلوکاتیون S-ترانسفراز (GST) با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون (در انتهای آمینی) نیز تولید شده است. این سیستم بیانی امکان خالص‌سازی ساده‌تر و سریع‌تر (تنها در یک مرحله) پروتئین را در مقایسه با سایر روش‌های پرهزینه و زمان‌بر (سه مرحله‌ای) برای دستیابی به MPH خالص و طبیعی فراهم می‌کند

پاراکسون، پاراتیون، متیل پاراتیون، دیازینون و کومافوس است (Zheng et al., 2013). تا به امروز، نه توالی DNA برای رمزگذاری ارگانوفسفرس هیدرولاز در پایگاه‌های اطلاعاتی GenBank گزارش شده است (Chu et al., 2006) که در این میان پژوهش‌های انجام‌شده با استفاده از ژن *opd* سهم بیشتری را به خود اختصاص داده‌اند. ژن *opd* با هدف‌های مختلفی و تحت سیستم‌های بیانی متعددی در *Escherichia coli* (Lan et al., 2006; Shimazu et al., 2001) *Moraxella* spp. (Shimazu et al., 2001) *Saccharomyces cerevisiae* (Takayama et al., 2006) و میکروارگانیسم‌های دیگری کلون شده است. در این تحقیقات بر تولید هیدرولاز پایدار و کارآمد توسط میکروارگانیسم‌های نوترکیب ژنتیکی برای زیست‌پالایی تمرکز شده است. در این زمینه می‌توان به نتایج بررسی Somara و همکاران (2002) اشاره کرد، توالی ژن *opd* را پایین‌دست سیگنال‌های رونویسی و ترجمه در دو وکتور pTrec99A و pET32A قرار دادند و این دو وکتور بیانی را به‌صورت مجزا به دو استرین *E. coli* JM105 و BL21 باکتری منتقل کردند. سپس با مشاهده سطح بالای بیان ژن، قطعه ۶۰ کیلو دالتونی (شامل ژن *opd* ۴۰ کیلو دالتونی + توالی برچسب هیستیدین به وزن ۲۰ کیلودالتون) را با استفاده از ستون‌های نیکل استخراج کرده و پروتئین خالص را از طریق هضم برچسب هیستیدین با ترومبین به دست آوردند که پس از فولدینگ این پروتئین خالص شده در حضور Zn^{2+} توانایی تجزیه پاراتیون توسط آن مشاهده شده است. یکی دیگر از ژن‌های رمزگذار OPH که از *Agrobacterium radiobacter* P230 از استرالیا جدا شده *opdA* بوده که قادر به هیدرولیز طیف گسترده‌ای از حشره‌کش‌های آلی فسفره است و توالی آن شبیه به ژن *opd* است (Horne et al., 2002). باکتری تجزیه‌کننده متیل پاراتیون *Plesiomonas* sp. M6 در چین از خاک جداسازی شده است (Zhongli et al., 2001) و ژن هیدرولیزکننده آن (به نام *ampd* شماره دسترسی در بانک ژن AF338729) هیچ شباهت و همسانی با ژن *opd* ندارند (Ekkhunnatham et al.,

دنبال داشته و پروتئین حاصل از این ادغام همچنان توانایی فلورسنت را داشته است. در مقابل، هنگامی که دو ژن *opd* با دو منطقه اتصال ریبوزوم مستقل با یکدیگر ادغام شد، افزایشی در محصول بیان شده توسط ژن دیده نشده است.

افزایش استفاده از آفت‌کش‌های آلی فسفره به‌عنوان سموم عصبی، در کنترل آفات کشاورزی باعث نگرانی‌های زیست‌محیطی و عمومی در رابطه با سمیت این ترکیب‌ها در موجودات غیرهدف شده است (Jabeen *et al.*, 2014; Diez, 2010). این اثرگذاری‌ها نیاز و تقاضا برای نوآوری روش‌های ساده، قابل‌اعتماد، سریع، حساس و کم‌هزینه را برای تشخیص و تجزیه باقیمانده سموم آشکار می‌سازد (Stoytcheva, 2010). نگرانی‌های جوامع از نقش آفت‌کش‌های پایدار در محیط و راهیابی آن‌ها به چرخه غذایی از موضوع‌های مهم بهداشت محیط‌زیست است که ضرورت انجام این پژوهش را برای تجزیه ترکیب‌های سمی فسفره آشکار می‌سازند. در این بررسی، بهینه‌سازی کدون‌های توالی رمزکننده پروتئین OPD برای بیان در باکتری *Escherichia coli* انجام و سپس تحت کنترل پروموتور *lac*، در یک وکتور پروموتور-پروب (pTH1705) با چهار پروتئین نشانگر، به‌صورت ادغام الگوبرداری کلون شد. حذف پپتید نشانه منجر به بیان پروتئین به‌صورت محلول در باکتری تراریخت می‌شود. انتظار می‌رود که بتوان از این باکتری، که بیان‌کننده ژن *opd* ادغام شده با دو نشانگر پروتئینی است، برای تولید پروتئین به‌صورت انبوه به‌منظور تجزیه ترکیب‌های آلی فسفره استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

سنتز ژن

توالی ژن *opd* مربوط به باکتری *Flavobacterium sp.* ATCC27551 از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت و بررسی شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد، توالی این ژن در گونه‌های مختلف باکتریایی شباهت زیادی دارد. سپس به دلیل اینکه کدون‌های این ژن برای بیان در میزبان بیانی *E. coli* ارجحیت نداشت، کدون‌های توالی اصلی با کدون‌های ترجیحی در *E. coli* توسط نرم‌افزار آنلاین IDT (<https://eu.idtdna.com>) جایگزین شد.

(Ekkhunnatham *et al.*, 2012). محققان در بررسی موفق به تولید یک باکتری نو ترکیب شدند که افزون بر نشر نور فلورسنت قرمز، توانایی تجزیه باقیمانده آفت‌کش‌های فسفره را دارد (Li & Wu, 2014). این میکروارگانیسم‌های مهندسی‌شده می‌توانند یک منبع بالقوه برای آماده‌سازی آنزیم‌های تجزیه‌کننده آفت‌کش‌های آلی فسفره باشند و می‌توان با توجه به بیان بالای پروتئین هدف EGFP-OPH این آنزیم را با کمک برچسب His6 جداسازی و خالص‌سازی کرد (Li *et al.*, 2014). Wu *et al.* (2000) موفق به تولید یک سویه نو ترکیب *E. coli* شدند که در آن دو ژن *gfp* و *oph* در پلازمید pTrcHis B تحت یک پروموتور با هم ادغام شده و بیان پروتئین OPH به‌صورت داخل سلولی صورت می‌گیرد. *Saccharomyces cerevisiae* نیز یک میکروارگانیسم مطلوب به‌عنوان عامل زیستی تشخیصی در حسگرهای زیستی است (Mulchandani & Rajesh, 2011). این فارچ برای بیان ژن *opd* از باکتری *Flavobacterium sp.* و توانایی هیدرولیز پارا اوکسون دستکاری و مهندسی شده است (Schofield *et al.*, 2007). در این پژوهش پروموتورهای القایی توسط پارا اوکسون با ژن *gfp*، و پروموتورهای مربوط به هیدرولیز این ترکیب با ژن *rffp* ادغام شدند. بنابراین توانایی این حسگر زیستی فارچی در تشخیص پارا اوکسون و هیدرولیز آن با القای بیان پروتئین‌های گزارشگر مختلف (به ترتیب پروتئین فلورسنت سبز و قرمز) به اثبات رسیده است. پیشرفت در زیست‌شناسی مولکولی و فن‌آوری DNA نو ترکیب راهی را برای بهبود فعالیت آنزیم‌های موجود در میکروارگانیسم‌ها و یا بیان یک پروتئین/ آنزیم خارجی در سلول میزبان فراهم می‌کند (Mulchandani & Rajesh, 2011). از آنجاکه سم‌زدایی آنزیمی باکتریایی آفت‌کش‌های آلی فسفره روشی مقرون‌به‌صرفه و مؤثر است، بررسی‌های بسیاری در این زمینه صورت گرفته است. Wu *et al.* (2001) به‌منظور افزایش تولید و بهره‌وری پروتئین OPH در کنار استفاده از مزایای پروتئین گزارشگر (GFP)، از دو نسخه ژن *opd* به‌صورت پشت سر هم و به دنبال ژن *gfp* برای همسانه‌سازی ژن استفاده کرده‌اند. نتایج پژوهش آن‌ها تحقق این هدف و دستیابی به میزان پروتئین بالاتر را به

پژوهش در جدول ۱ آورده شده است. پس از آن آنالیز لایگیشن انجام گرفت و چهار کلنی به صورت تصادفی انتخاب و پس از کشت و استخراج پلازمید و برش توسط دو آنزیم محدودکننده *XhoI* و *ApaI* انجام شد.

بررسی منحنی رشد باکتری

به منظور بررسی رشد جمعیت سازه باکتریایی به دست آمده و نیز بررسی تأثیر دیازینون به عنوان آلاینده فسفره روی رشد سلول باکتری، پویایی رشد باکتری در زمان ارزیابی شد. این بررسی در محیط کشت لوریا برتانی (LB) و محیط کشت معدنی M9 (شامل: Na_2HPO_4 (۶ گرم در لیتر)، KH_2PO_4 (۳ گرم در لیتر)، NaCl (۰/۵ گرم در لیتر)، NH_4Cl (۱ گرم در لیتر) به عنوان منبع نیتروژن، MgSO_4 (۱ میلی مولار)، CaCl_2 (۰/۱ میلی مولار)، ZnCl_2 (۰/۱ میلی مولار) و دی-مانیتول (۲۰ میلی مولار) به عنوان منبع کربن) در سه غلظت ۰، ۱۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر دیازینون انجام شد. در این بررسی از دیازینون تکنیکال ۹۵ درصد استفاده شد و استوک ۱۰۰۰ میلی-گرم در لیتر آن تهیه و با استفاده از فیلترهای سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی خالص شد. همچنین برای القای بیان ژن *opd* تحت کنترل پرموتر *lac* از IPTG با غلظت ۱ میلی مولار استفاده شد. برای این بررسی از استرین V0 (*E. coli* DH5 α - pTH1705) به عنوان استرین شاهد استفاده شد. در بررسی منحنی رشد، از کشت ۱۶ ساعته هر استرین در محیط کشت مایع استریل، مقداری تلفیح شد تا OD₆₀₀ اولیه به ۰/۱ رسید و سپس در شرایط رشد مطلوب در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۲۰۰ rpm انکوبه شد. بدین ترتیب باکتری شروع به استفاده از اجزای محیط کرده و اندازه و توده سلولی آن افزایش خواهد یافت. پس از آن برای بررسی پویایی رشد باکتری هر دو ساعت یکبار کدورت یا چگالی نوری مربوط به مقدار نور جذب شده توسط سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از اسپکتروفتومتر (طیف سنج نوری) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

در نهایت ژن بهینه سازی شده دوباره بررسی شد و هم ردیفی آن با این ژن در سایر گونه های باکتریایی انجام شد. برای انجام هم ردیفی از نرم افزار کاربردی MegAlign از پکیج نرم افزاری جامع DNASTAR Lasergene Suite و همچنین نرم افزار MEGA 5 استفاده شد. سپس توالی رمزگذار پپتید نشانه حذف و اسید آمینه متیونین به جای سرین به عنوان کدون آغاز، جایگزین شد و توالی پرموتر *lac* در بالادست این ژن بهینه سازی شده قرار داده شد. بعد از آن این توالی برای انتخاب دو آنزیم برشی مناسب در ابتدا و انتهای قطعه مورد نظر، با استفاده از نرم افزار آنالیز NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>) بررسی و جایگاه فعالیت دو آنزیم محدودگر *ApaI* و *KpnI* در ابتدای قطعه و جایگاه فعالیت دو آنزیم محدودگر *XhoI* و *NsiI* در انتهای آن قرار داده شد و در نهایت این توالی در وکتور حدواسط pUCIDT-KAN توسط شرکت IDT ایالات متحده آمریکا سنتز (ساخت) شد. این قطعه سنتز شده ۱۱۵۷ جفت باز طول داشت که با ۳۳۶ اسید آمینه و وزن مولکولی ۳۶/۳ کیلودالتون قابل تشخیص بود.

ساب کلون کردن *opd* در وکتور pTH1705

برای تکثیر پلازمیدی که قطعه سنتز شده در آن قرار داشت از دو استرین DH5 α و XL1-blue باکتری *E. coli* استفاده شد. سپس پلازمید با استفاده از کیت استخراج پلازمید^۱ تخلیص شد و توسط دو آنزیم محدودکننده *ApaI* و *XhoI* بریده شد. قطعه هدف (با طول ۱۱۵۷ جفت باز) از روی ژل آگاروز ۱ درصد برش داده شد و در جایگاه برش داده شده وکتور pTH1705 توسط دو آنزیم *ApaI* و *XhoI* وارد شد. در شکل ۲ تصویر شماتیکی از مراحل مختلف ساب کلونینگ قطعه ژنی *opd* سنتز شده، در وکتور pTH1705 مشاهده می شود. سازه وکتوری جدیدی که بدین ترتیب به دست آمد، از طریق ترانسفورماسیون به دو استرین DH5 α و XL1-blue (استرین دارای ژن *lacI^q*) باکتری *E. coli* منتقل شد. فهرستی از پلازمیدها و استرین های به دست آمده در این

2. Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside

1. Mini Plasmid Prep Kit

جدول ۱. پلازمیدها و استرین‌های استفاده‌شده در این پژوهش

Table 1. Plasmids and strains used in this study

plasmids	Features	Reference
pUCIDT- <i>opd</i> ^r	pUC with pMB1 origin, Km ^r ,	This study
pTH1705	pTH1522 derivative with multiple cloning sites inserted at the position of the <i>XhoI</i> site and four reporter genes, Gm ^r	Cowie <i>et al.</i> , 2006
pVHN1100	pTH1705 with 1157 bp optimized <i>opd</i> inserted into <i>ApaI/XhoI</i> restriction sites, Gm ^r	This study
Strains	Genotype	Reference
<i>E. coli</i> DH5α	F' <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻</i>	Lab collection
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Lab collection
V0	DH5α (pTH1705), Gm ^r	This study
V01	XL1-blue (pTH1705), Gm ^r	This study
V100	DH5α (pUCIDT- <i>opd</i> ^r), Km ^r	This study
V101	XL1-blue (pUCIDT- <i>opd</i> ^r), Km ^r , Tet ^r	This study
V102	XL1-blue (pVHN1100), Gm ^r , Tet ^r	This study
V103	DH5α (pVHN1100), Gm ^r	This study

استفاده شد. برای محاسبه فعالیت ویژه نیز از معادله زیر استفاده شد:

$$(U/mg) = \frac{(1000 \times OD_{420})}{(OD_{600} \times \text{زمان} \times \text{حجم محیط کشت در مخلوط واکنش})}$$

آماده‌سازی نمونه برای تزریق به کروماتوگرافی مایع برای بررسی عملکرد مطلوب سازه میکروبی نو ترکیب تولیدشده، اندازه‌گیری میزان آلاینده در نمونه توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز به‌عنوان روش استاندارد انجام گرفت. برای این کار محیط کشت معدنی حاوی غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون تهیه و باکتری نو ترکیب در آن کشت شد. سپس ترکیب سمی باقیمانده در محیط استخراج و نمونه برای اندازه‌گیری میزان دیازینون به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Shimadzu, LC9A) تزریق شد. برای استخراج باقیمانده آفت‌کش از محیط کشت باکتری از روش Cullington & Walker (1999) استفاده شد. بدین ترتیب که ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت باکتری با ۲ میلی‌لیتر اتیل‌استات با استفاده از ورتکس به‌خوبی مخلوط شد. با این کار ترکیب سمی به اتیل‌استات وارد می‌شود. پس از سانتریفیوژ این مخلوط، فاز روشن‌شده که در واقع همان اتیل‌استات است، جدا شد و این حلال به‌طور کامل با کمک جریان گاز ازت تبخیر شد. سپس بی‌درنگ ۱ میلی‌لیتر متانول به لوله آزمایش اضافه شد و باقیمانده دیازینون موجود در جدار لوله در متانول محلول و

سنجش عملکرد سازه باکتریایی تولیدشده

پس از کلونینگ و بررسی منحنی رشد سازه به‌دست‌آمده که توانایی هیدرولیز آفت‌کش‌های آلی فسفره را داشت، برای سنجش عملکرد باکتری تراریخت بیان‌کننده ژن *opd* (به‌صورت *in trans*) از نظر توانایی هیدرولیز، از محیط کشت معدنی M9 حاوی غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به‌عنوان آلاینده فسفره استفاده شد و باکتری تراریخت در آن کشت داده شد و همچنین برای القای بیان ژن از IPTG استفاده شد.

سنجش کمی فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز

فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز با اضافه کردن ۶۰ میکرولیتر از محیط کشت ۱۶ ساعته باکتری به ۲۴۰ میکرولیتر بافر Z (شامل: ۶۰ میلی‌مولار Na₂HPO₄·7H₂O، ۴۰ میلی‌مولار NaH₂PO₄، ۱۰ میلی‌مولار KCl، ۱ میلی‌مولار MgSO₄، ۰/۱۲۵ درصد SDS، ۴۰ میلی‌مولار بتا-مرکاپتواتانول حاوی ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۲-نیترو فنیل بتا-دی-گالاکتوپیرانوزید به‌عنوان سوبسترا) اندازه‌گیری شد (Cowie *et al.*, 2006). سپس مخلوط واکنش در دمای اتاق به مدت یک ساعت انکوبه شد و پس از آن با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۱ مولار Na₂CO₃ واکنش آنزیم و سوبسترا متوقف شد و جذب محصول تولیدشده در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است از محیط کشتی که هیچ تلقیح باکتریایی در آن انجام نگرفته بود به‌عنوان نمونه شاهد

$$= \text{درصد بازیابی} \\ \frac{\text{مقدار آفت کش اندازه گیری شده در نمونه آلوده}}{\text{مقدار آفت کش اندازه گیری شده در نمونه} + \text{مقدار آفت کش اضافه شده}} \times 100$$

الکتروفورز

در این آزمایش هدف تعیین بیان موفق آنزیم ارگانوفسفروس هیدرولاز در استرین V103 با استفاده از الکتروفورز بود. بدین منظور از الکتروفورز احیایی (SDS-PAGE) استفاده شد. برای به دست آوردن عصاره آنزیمی ابتدا کشت ۱۶ ساعت از استرین V103 و V0 تهیه شد. پس از انجام سانترفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور $4000 \times g$ ، رسوب باکتریایی با استفاده از محلول $NaCl$ ۰/۸۵ درصد شست و شو داده شد و در ۵ میلی لیتر بافر ۵۰ میلی مولار تریس-HCl حل شد. سپس این محلول به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط دمایی ۴ درجه سلسیوس در حمام اولتراسونیک سونیکه شد. بدین ترتیب امواج الکتریکی با فرکانس بالا باعث تخریب دیواره های سلول می شود و پروتئین درون بافر آزاد می شود. سپس بقایای سلولی از طریق انجام سانترفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس و در دور $16000 \times g$ حذف و محلول رونشین با استفاده از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون استات سلولز تخلیص شد. ۲۴ میکرو لیتر از عصاره آنزیمی دو استرین V0 و V103 با ۶ میکرو لیتر بافر نمونه (متشکل از: ۲ میلی لیتر بافر ۱/۵ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک با pH ۶/۸، ۵ میلی لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۲/۵ میلی لیتر بتا-مرکاپتو اتانول و ۰/۱ درصد بروموفنول بلو) مخلوط شد و نمونه به دست آمده در چاهک های ژل متراکم کننده (۵ درصد) لود شد. پس از برقراری جریان ۸۵ ولت، عصاره آنزیمی در طول ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد برای جداسازی، به حرکت در آمد. بعد از پایان الکتروفورز و جداسازی ژل از شیشه ها، ژل در محلول متانول-استیک اسید-آب (۵۰:۱۰:۵۰) حاوی ۱ درصد (w/v) کوماسی بلو R-250 در مدت زمان ۴ ساعت روی شیکر رنگ آمیزی شد. در مرحله بعد ژل رنگ شده طی چند مرحله با محلول متانول-استیک اسید-آب (۱۰:۵:۸۵) شستشو داده شد تا رنگ بری صورت گیرد. بعد از پایان رنگ بری

آماده تزریق شد. ستون مورد استفاده در دستگاه، C-18 و فاز متحرک استونیتریل و آب (به نسبت ۳۰:۷۰ حجمی/حجمی) بود. طول موج مورد استفاده برای آشکارساز ۲۵۴ نانومتر و سرعت فاز متحرک ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه و دمای ستون ۴۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. برای رسم منحنی استاندارد (خط کالیبراسیون) دیازینون و به دست آوردن معادله خط برای محاسبه میزان غلظت آفت کش در نمونه ها، و همچنین به دست آوردن زمان بازداری دیازینون ابتدا چند محلول با غلظت های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر دیازینون در متانول تهیه و به مقدار ۲۰ میکرو لیتر، به دستگاه تزریق شد. میزان آفت کش موجود در نمونه ها از طریق مقایسه زمان بازداری و سطح زیر پیک های به دست آمده در کروماتوگرام حاصل از نمونه با کروماتوگرام حاصل از تزریق محلول های استاندارد انجام شد و غلظت آفت کش دیازینون با استفاده از مقدار عددی سطح زیر پیک هر نمونه و با استفاده از معادله خط به دست آمده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

برای حصول اطمینان از درستی انجام و دقت روش استخراج آفت کش از محیط کشت باکتری، درصد بازیابی تعیین شد. از آنجاکه به دلایل مختلفی مانند وجود ترکیب های مزاحم و یا وجود مقداری آب در محیط کشت، صد در صد باقیمانده آفت کش موجود در محیط کشت استخراج نمی شود، برای استخراج آفت کش از محیط آبی در روش های جدید توصیه می شود که پیش از انجام عملیات روی نمونه های اصلی، ابتدا آزمایش بازیابی^۱ انجام پذیرد. بدین صورت که همه مراحل استخراج و خالص سازی به دقت با روش مورد نظر، روی نمونه ای که غلظت آفت کش موجود در آن مشخص است انجام و در شرایط یکسان به دستگاه تزریق شود. به این ترتیب با توجه به غلظت آفت کش اضافه شده به محیط کشت و غلظت به دست آمده توسط دستگاه، درصد بازیابی روش استخراج با استفاده از رابطه زیر به دست آمد.

1. Recovery

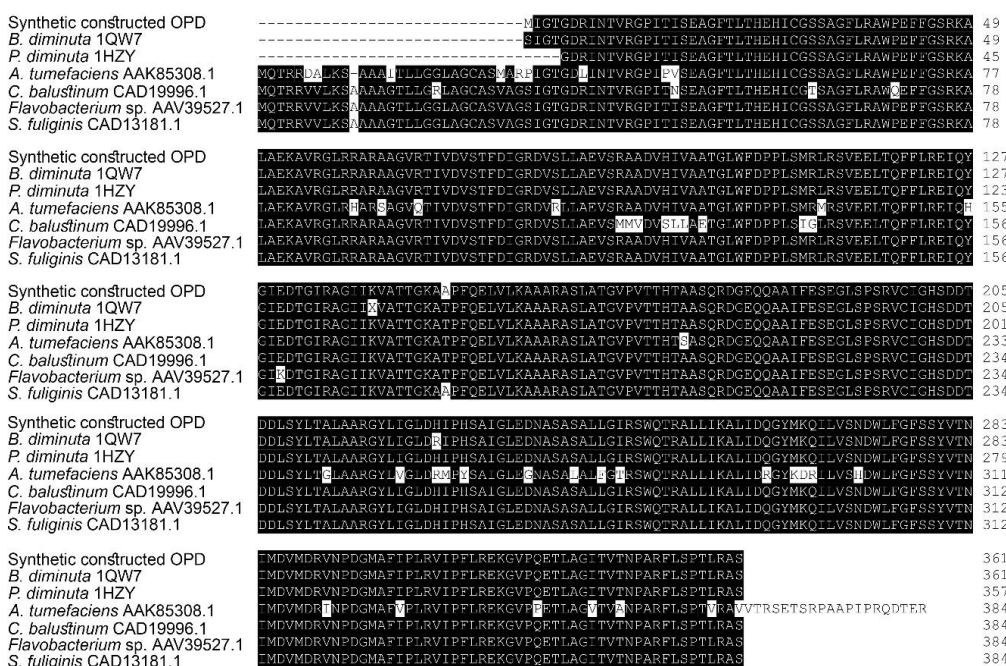
دلیل انتخاب وکتور pTH1705 وجود چهار مارکر پروتئینی برای بررسی بیان ژن منقل شده در آن است. این پلازمید در واقع یک مشتق به‌دست‌آمده از وکتور گزارشگر pTH1522 است که نقشه آن در شکل ۳ آورده شده است.

همان‌گونه که در نقشه این پلازمید مشاهده می‌شود ژن‌های گزارشگر *gfp*⁺، *lacZ* و *gusA* و *tdimer2(12)* در این وکتور وجود دارند. دو ژن رمزکننده پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و ژن رمزکننده بتا-گالاکتوزیداز به‌عنوان آنزیمی که فعالیت آن به‌آسانی قابل اندازه‌گیری است (*gfp*⁺ و *lacZ*) از محل کلونینگ *XhoI* در یک‌جهت رونویسی می‌شوند. در سمت دیگر جایگاه *XhoI* دو ژن گزارشگر دیگر بتا-گلوکونیداز و پروتئین فلورسنت قرمز هستند و در جهت مخالف دو ژن *gfp*⁺ و *lacZ* رونویسی می‌شوند. این پلازمید حامل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک (پادزیست) جنتامایسین (*aacC4*) است. کدون پایان ترجمه نیز به‌صورت هر سه قالب خواندن، در بالادست نخستین ژن گزارشگر هر یک از طرفین جایگاه *XhoI* وجود دارد.

باند‌های تیره پتید درزمینه آبی‌رنگ ژل نمایان شد. که تصویر دیجیتالی آن با استفاده از دستگاه ژل داگ گرفته شد.

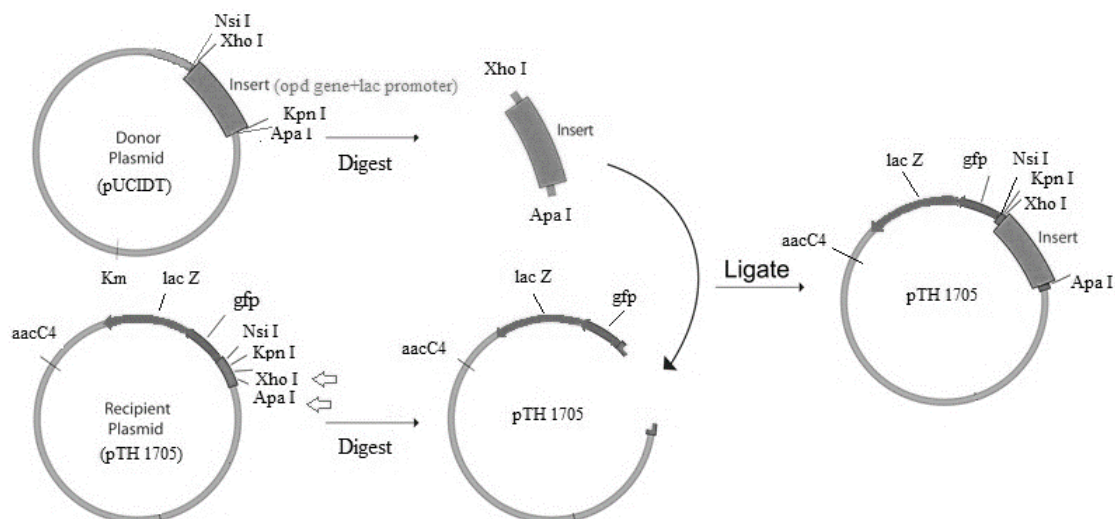
نتایج و بحث

در این پژوهش ژن تجزیه‌کننده ترکیب‌های آلی فسفره (*opd*) بهینه‌شده برای بیان در باکتری *E. coli* برای این هدف استفاده شده است. این پروتئین در گونه‌های مختلف باکتریایی توالی آمینواسیدی به نسبت یکسانی دارد. بررسی‌های مختلفی در زمینه‌های متعدد با استفاده از ژن *opd* در گونه‌های باکتریایی صورت گرفته که توالی نوکلئوتیدی این ژن را در پایگاه‌های اطلاعاتی ارائه کرده‌اند. همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است نتایج هم‌ترازی پروتئین به‌دست‌آمده از ژن سنتز شده، با توالی این پروتئین در گونه‌های مختلف باکتریایی که از سایر بررسی‌ها و پژوهش‌ها به‌دست‌آمده است نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها توالی به نسبت یکسان و مشابهی دارند. این قطعه ژنی (۱۱۵۷ جفت باز) پس از برش از وکتور pUCIDT-*opd*⁺ (۴۵۶۶ جفت باز)، به وکتور pTH1705 برش داده شده منتقل شد و کانستراکت pVHN1100 به دست آمد (شکل ۲).

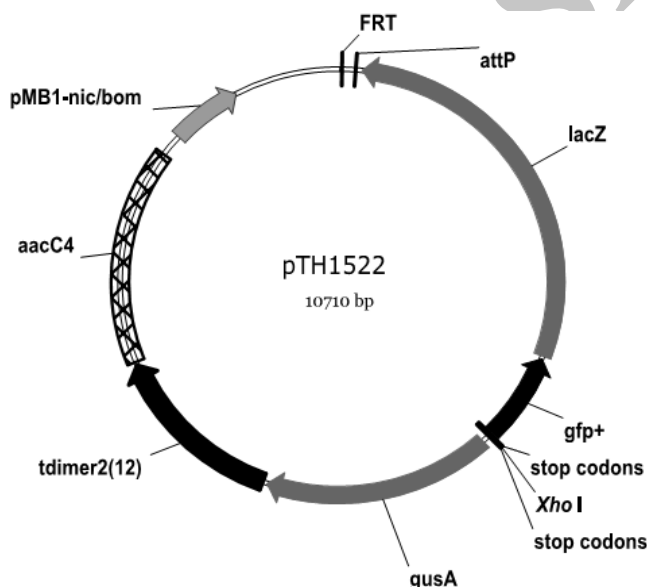


شکل ۱. نتیجه هم‌ترازی پروتئین حاصل از ژن *opd* سنتز شده با توالی‌های به‌دست‌آمده از سایر گونه‌های باکتریایی

Figure 1. Sequence alignment of OPD from different bacterial species



شکل ۲. تصویر شماتیک ساب کلونینگ قطعه ژنی *opd* سنتز شده در وکتور pTH1705
 Figure 2. Schematic image of *opd* subcloning to pTH1705 vector



شکل ۳. نقشه ژنی وکتور pTH1522. پلازمید pTH1705 از این پلازمید مشتق شده است و در جایگاه *XhoI* جایگاه های کلونینگ چندگانه دارد. این جایگاه های کلونینگ چندگانه برای pTH1705 به صورت: *gfp+--BglIII-SwaI-KpnI-SphI-NotI-SphI-NsiI-ApaI-PacI-XhoI--gus A* هستند (Cowie et al., 2006)

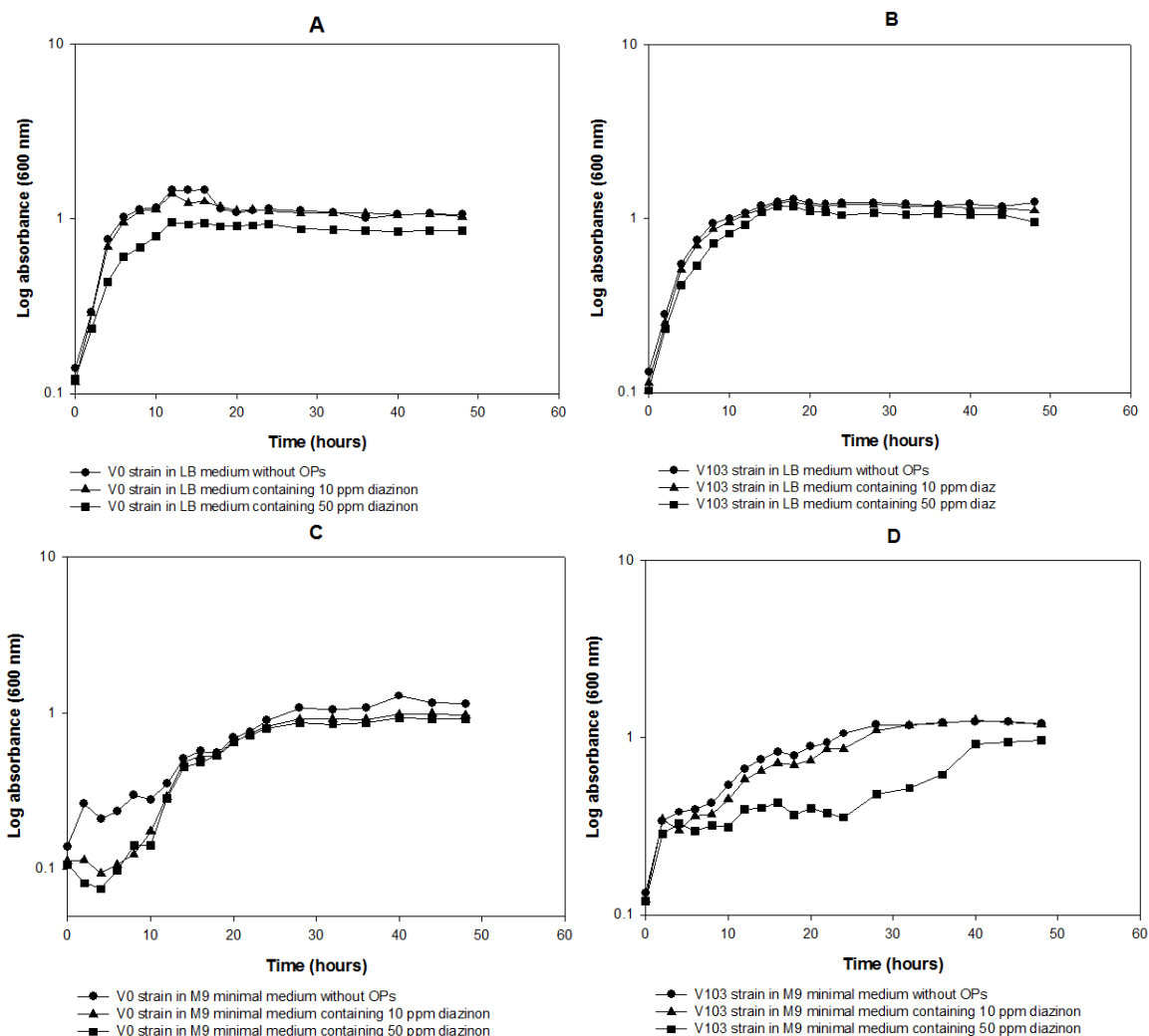
Figure 3. Plasmid pTH1522, with reporter genes shown as divergent operons from the *XhoI* cloning site. Multiple restriction enzyme sites inserted in pTH1705 as the pTH1522 derivative, is: *gfp+--BglIII-SwaI-KpnI-SphI-NotI-SphI-NsiI-ApaI-PacI-XhoI--gus A* (Cowie et al., 2006)

شکل ۴-b مشخص است در محیط کشت LB وجود و یا نبود دیازینون تأثیر کمی بر رشد استرین V103 داشته است زیرا این محیط غنی از مواد غذایی لازم برای رشد باکتری است. اما رشد این استرین در محیط معدنی M9 که حداقل منابع غذایی برای رشد باکتری را دارد، در حضور غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر

پویایی رشد باکتری را می توان با رسم نمودار رشد سلول (جذب) در مقابل زمان و یا لگاریتم تعداد سلول در مقابل زمان بررسی کرد. منحنی رشد باکتری برای استرین V103 (*E. coli* DH5α-pTH1705-*opd+*) و استرین V0 (*E. coli* DH5α- pTH1705-*opd*) به عنوان استرین شاهد بررسی شد. همان گونه که در

در لیتر تأثیر چشمگیری روی رشد این استرین داشته است (شکل ۴-۳). به‌طور کلی بررسی‌ها و مقایسهٔ منحنی‌های رشد این دو استرین نشان می‌دهد که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون دز مناسبی برای مراحل بعدی آزمایش‌ها نیست زیرا به‌شدت رشد باکتری را تحت تأثیر قرار داده است و این تأثیر در محیط معدنی M9 که برای باکتری از نظر غذایی محدودیت وجود دارد چشمگیرتر و واضح‌تر بوده است. بنابر نتایج به‌دست‌آمده از این مرحله غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به‌عنوان آلایندهٔ آلی فسفره برای مراحل بعدی آزمایش‌ها انتخاب شد.

دیازینون به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفته است درحالی‌که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر این ترکیب فسفره تأثیر زیادی بر رشد این استرین حاوی ژن *opd* نداشته است (شکل ۴-۴). رشد استرین V0 به‌عنوان استرین شاهد (*E. coli* DH5 α - pTH1705-*opd*) در محیط کشت غنی LB در حضور غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفته است (شکل ۴-۵)، درحالی‌که در محیط معدنی M9 که منابع غذایی کاملی در اختیار باکتری نبوده و از طرفی ژن تجزیه‌کنندهٔ دیازینون هم در این استرین وجود نداشته، حضور دیازینون حتی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم



شکل ۴. منحنی رشد دو استرین V0 (DH5 α - pTH1705-*opd*⁺) و V103 (DH5 α - pTH1705-*opd*⁺) در دو محیط کشت LB

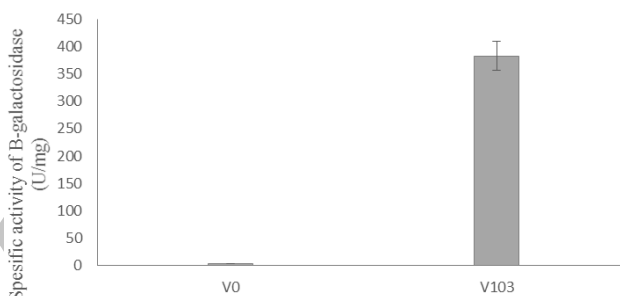
(A و B) و M9 (C و D) حاوی سه غلظت ۰، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون

Figure 4. Growth curve of V0 (DH5 α - pTH1705-*opd*⁺) and V103 (DH5 α - pTH1705-*opd*⁺) strains in LB (A and B) and M9 minimal medium (C and D) containing 0, 10 and 50 mg/L diazinon

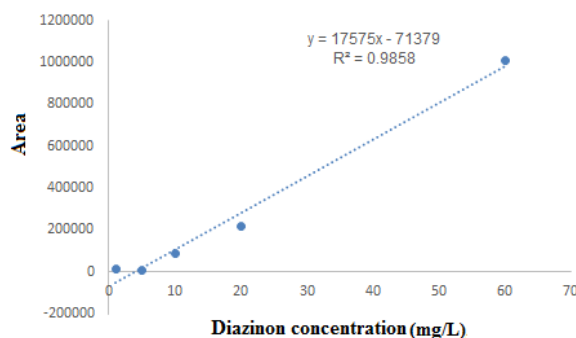
او- نیتروفیل که ترکیبی زرد رنگ است، شکسته می‌شود. شکل ۵ نتایج اندازه‌گیری این آنزیم را در دو استرین V0 و V103 (به‌عنوان استرین شاهد) نشان می‌دهد. این نمودار بر پایه فعالیت ویژه (فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین) رسم شده است و مشخص است که در استرین V0 همان‌گونه که انتظار می‌رفت تا حدودی هیچ فعالیت آنزیمی مشاهده نمی‌شود در حالی که در استرین V103 میزان فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز و بیان ژن *lacZ* به‌طور قابل توجهی بالاست، که این نمایانگر بیان ژن‌های بالادست *lacZ* که همگی تحت کنترل پروموتور *lac* بوده، است.

برای سنجش عملکرد باکتری نو ترکیب ایجاد شده در تجزیه دیازینون به‌عنوان ترکیب فسفره، از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. در شکل ۶ منحنی استاندارد دیازینون و معادله خط به‌دست‌آمده برای تعیین غلظت باقیمانده این ترکیب در نمونه‌ها مشاهده می‌شود. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا کاربرد وسیعی در اندازه‌گیری باقیمانده آفت‌کش‌ها پیدا کرده است.

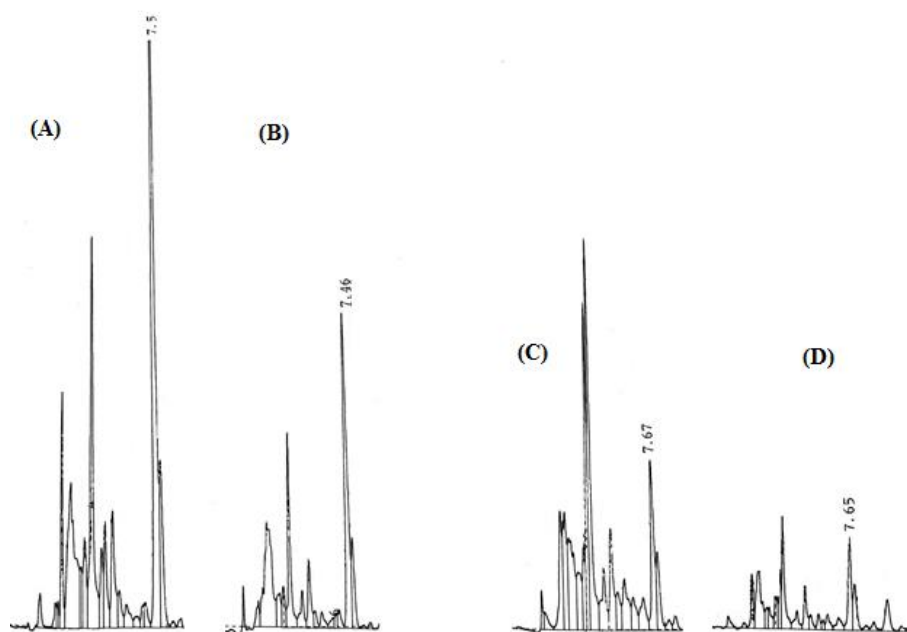
همان‌گونه که بیان شد وکتور پروموتور-پروپ pTH1705 چهار مارکر پروتئینی دارد که توالی نوکلئوتیدی رمزکننده پروتئین OPD، تحت کنترل پروموتور *lac* در آن به‌صورت ادغام الگوبرداری کلون شده است. این بدان معناست که پس از القای بیان ژن تحت کنترل پروموتور *lac* با IPTG دو مارکر پروتئینی پایین‌دست آن یعنی پروتئین فلورسنت سبز و پروتئین بتا-گالاکتوزیداز نیز بیان خواهند شد. بنابراین با اندازه‌گیری این دو پروتئین می‌توان از بیان ژن منتقل شده توسط این وکتور به استرین باکتریایی اطمینان به دست آورد. بتا گالاکتوزیداز که با ژن *lacZ* از اپرون *lac* رمزگذاری می‌شود، یک پروتئین بزرگ متشکل از ۱۰۲۴ اسید آمینه و با وزنی معادل ۱۲۰ کیلودالتون است که یک تترامر را تشکیل می‌دهد. این آنزیم در سلول لاکتوز را می‌شکند و به گلوکز و گالاکتوز، که به‌عنوان منابع کربن (انرژی) استفاده می‌شوند، تبدیل می‌کند. ترکیب مصنوعی او- نیتروفیل-بتا-دی-گالاکتوزید (ONPG) نیز به‌عنوان سوبسترای این آنزیم شناخته می‌شود که به گالاکتوز و



شکل ۵. سنجش کمی آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در دو استرین V0 (DH5 α - pTH1705-*opd*⁺) و V103 (DH5 α - pTH1705-*opd*⁺)
Figure 5. Quantitative measurement of β -galactosidase activity in V0 and V103 strains

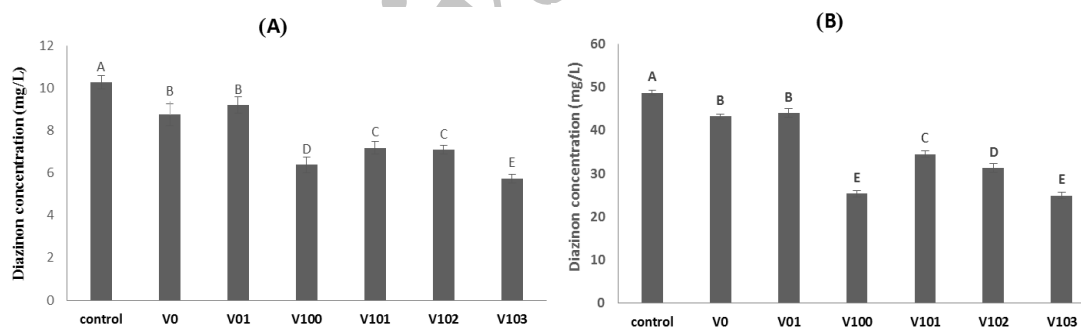


شکل ۶. منحنی استاندارد آفت‌کش دیازینون
Figure 6. Calibration curve of diazinon



شکل ۷. کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق باقیماندهٔ دیازینون استخراج‌شده از (A) محیط کشت شاهد (بدون تلقیح باکتری) حاوی غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، (B) محیط کشت استرین V103 حاوی غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، (C) محیط کشت شاهد (بدون تلقیح باکتری) حاوی غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، (D) محیط کشت استرین V103 حاوی غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، پس از ۲۴ ساعت

Figure 7. Chromatograms obtained from injection of diazinon residues extracted from (A) control medium (without bacterial inoculation) containing 50 mg/L of diazinon, (B) V103 medium containing 50 mg/L of diazinon, (C) control media (without bacterial inoculation) containing 10 mg/L of diazinon, (D) V103 medium containing 10 mg/L of diazinon, after 24 hours



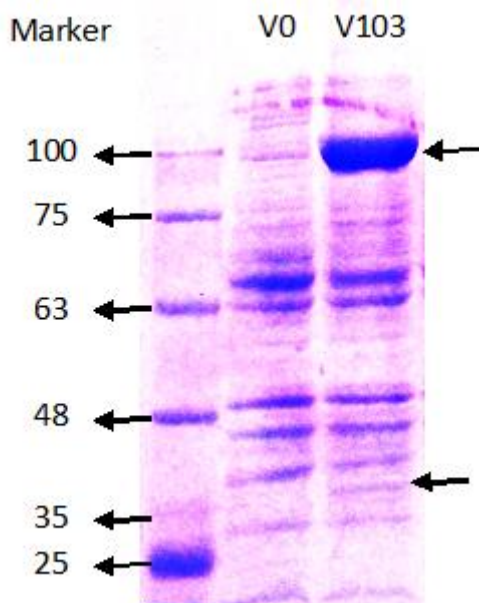
شکل ۸. میانگین تجزیهٔ دیازینون توسط استرین‌های مختلف \pm SE در غلظت‌های اولیهٔ ۱۰ (A) و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (B). مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت و حرف‌های متفاوت نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار است.

Figure 8. Diazinon degradation by different strains \pm SE at 10 (A) and 50 (B) mg/L initial concentrations. Comparisons were done using Duncan's test at 0.05 level and different letters indicate significant difference

استفاده را قابل اعتماد نشان می‌دهد. این نتایج از مقایسهٔ سطح زیر پیک مربوط به دیازینون در نمونهٔ استاندارد و نمونهٔ استخراج‌شده از محیط کشت با غلظت دیازینون مشخص به دست آمد. در شکل ۷ کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق دیازینون باقیمانده در محیط کشت شاهد (بدون تلقیح باکتری) و استرین

نتایج حاصل از تعیین درصد بازیابی نشان داد، روش جداسازی و خالص‌سازی دیازینون از محیط کشت تا حد بالایی صحیح صورت گرفته و این روش یک روش مناسب بوده است. این عامل برای استخراج باقیماندهٔ دیازینون از نمونه برابر با ۹۸/۴ درصد به دست آمد که مقدار قابل قبولی است و روش مورد

مشاهده می‌شود، در حدود ناحیه باند ۳۵ کیلو دالتونی مارکر، در نمونه پروتئینی V103 باند ضعیفی مشاهده می‌شود که در نمونه V0 دیده نمی‌شود. این باند در واقع مربوط به پروتئین OPD است که با ۳۳۶ اسیدآمین، وزن مولکولی ۳۶/۳ کیلودالتون را دارد. دلیل ضعیف بودن این باند به این دلیل است که این پروتئین تحت پروموتور *lac* کلون شد است و این پروموتور مانند پروموتور باکتریوفاژی T7 یک پروموتور قوی و فعال با عملکرد بیانی بسیار بالا نیست. از طرفی وکتور مورد استفاده (pTH1705) نیز جزو وکتورهای با تعداد نسخه‌های تکثیر بالا^۱ طبقه‌بندی نمی‌شود. اما همان‌طور که دیده می‌شود در حدود ناحیه باند ۱۰۰ کیلو دالتونی مارکر، در نمونه پروتئینی V103 باندی با وضوح و شدت بالا مشاهده می‌شود که در نمونه V0 بسیار ضعیف دیده می‌شود. این باند در حقیقت مربوط به پروتئین حاصل از بیان ژن *lacZ* است که در پایین دست ژن *opd* قرار گرفته و به دنبال آن بیان می‌شود.



شکل ۹. الکتروفورز عصاره پروتئینی حاصل از دو استرین V0 (DH5α- pTH1705-*opd*) و

V103 (DH5α- pTH1705-*opd*⁺)

Figure 9. Gel electrophoresis of extracted protein from two strains V0 (DH5α-pTH1705-*opd*⁻) and V103 (DH5α-pTH1705-*opd*⁺)

V103 نشان داده شده است. دیازینون باقیمانده در محیط کشت باکتری پس از ۲۴ ساعت استخراج شد و در این شکل میزان کاهش غلظت دیازینون و کروماتوگرام حاصل تنها در مورد استرین V103 نمایش داده شده است. در شکل ۸ نتایج حاصل از اندازه‌گیری دیازینون باقیمانده در محیط کشت هر استرین پس از ۲۴ ساعت با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مشاهده می‌شود در این کروماتوگرام ستون control نشان‌دهنده میزان تجزیه دیازینون در اثر هیدرولیز آبی در طول ۲۴ ساعت است. در واقع به‌منظور بررسی هیدرولیز خودبه‌خودی سم، این مقدار دیازینون از محیط کشتی جداسازی شده است که هیچ سلول باکتری در آن تلقیح نشده و فقط دیازینون در آن وجود داشته است. ستون V0 میزان تجزیه توسط استرین DH5α که فاقد ژن تجزیه‌کننده است را به‌عنوان استرین شاهد برای V103 و V100 و همچنین ستون V10 میزان تجزیه توسط استرین XL1-blue (*opd*) را به‌عنوان استرین شاهد برای V101 و V102 نشان می‌دهند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تفاوت در میزان تجزیه آفت‌کش در آن‌ها معنی‌دار است. میزان تجزیه در دو غلظت اولیه دیازینون اندازه‌گیری شد و به‌طور میانگین در غلظت اولیه ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ۳۴ درصد از دیازینون، و در غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور متوسط ۴۰ درصد از این ترکیب فسفره توسط هر یک از چهار استرین حاوی ژن *opd* پس از ۲۴ ساعت تجزیه شده است. وجود اختلاف در میزان تجزیه توسط دو استرین شاهد و چهار استرین حاوی ژن تجزیه‌کننده، نشان‌دهنده بیان ژن و عملکرد پروتئین OPD است.

الکتروفورز پروتئین

همان‌گونه که اشاره شد، با هدف تأیید بیان موفق پروتئین OPD در استرین V103 از روش الکتروفورز استفاده شد. در واقع الکتروفورز برای جداسازی و مقایسه پروتئین‌ها در عصاره پروتئینی به‌دست‌آمده از دو استرین V0 (فاقد ژن *opd*) و V103 (دارای ژن *opd*) به کار گرفته شد. شکل ۹ تصویر ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو را نشان می‌دهد و همان‌طور که

1. High-copy number

ژن مربوطه)، و تغییر مسیرهای زیستی است (Wong, 2006). دستکاری مسیرهای زیستی از طریق جلوگیری از تولید یک آنزیم، و یا تولید یک آنزیم خارجی میسر می‌شود. از طریق وارد کردن یک ژن خارجی در موجود زنده، که منجر به تولید پروتئین‌های جدیدی می‌شود، می‌توان عملکردهای جدیدی را ایجاد کرد که پیش از این در آن موجود زنده وجود نداشته است (Wong, 2006). بیان ارگانوفسفروس هیدرولاز به‌صورت داخل سلولی در سیستم‌های بیانی *Escherichia coli* می‌تواند به توسعه فرآیندهای سم‌زدایی در مقیاس وسیع منجر شود زیرا از این طریق پروتئین در مقادیر بالاتری نسبت به میزبان‌های اصلی بیان می‌شود (Chen & Mulchandani, 1998). OPH نوترکیب بیان‌شده در این بررسی، با توجه به عملکرد و فعالیت بالا و ویژگی‌های بیوشیمیایی خوب خود، می‌تواند انتخاب خوبی برای تولید انبوه و حذف آلاینده‌های فسفره، و همچنین کاربرد در زیست‌حسگرها و تشخیص مستقیم ترکیب‌های فسفره در آینده محسوب شود.

کاربرد *opd* باکتریایی نه تنها برای بیان در میکروارگانیسم‌های مختلف بررسی شده بلکه در سال‌های اخیر استراتژی‌های متنوعی برای استفاده از این ژن به کار گرفته شده است. برای مثال محققان چینی در سال‌های اخیر یک کاست بیانی برای ژن *opd* تحت کنترل پروموتور E8 طراحی و سپس آن را به میوه گوجه‌فرنگی منتقل کردند. آن‌ها از رنگ‌آمیزی β -گلوکوزونیداز (GUS)، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس (RT-PCR)، اسکن طول موج و واکنش فلورسنت برای بررسی بیان ژن *opd* و توانایی هیدرولیز کومافوس در گوجه‌فرنگی، استفاده کردند. نتایج تحقیقات آنان نشان می‌دهد، این گوجه‌فرنگی بیان‌کننده OPH حداکثر فعالیت هیدرولیز کومافوس را دارد. آن‌ها معتقدند که با استفاده از این نتایج می‌توان بر پرورش و تولید گیاهان تراریختی تمرکز کرد که نه تنها محصولشان توانایی تجزیه ترکیب‌های آفت‌کش را دارد، بلکه هیچ تأثیر منفی بر کنترل آفات در مزارع ندارند (Zhao & Zhao, 2009). در دهه اخیر راهکار جدیدی با استفاده از یک وکتور برای بیان دو ژن برای سم‌زدایی

سرنوشت آفت‌کش‌ها در محیط‌زیست توسط فرآیندهای بیولوژیک، شیمیایی و فیزیکی مختلفی که پایداری و تحرک آن‌ها را تعیین می‌کند، تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بعضی از آفت‌کش‌ها از طریق جذب شدن به ذرات خاک یا مواد آلی موجود در خاک پایدار می‌مانند، بعضی دیگر از راه هوا یا ذرات خاک وارد جریان آب و پخش می‌شوند و بالاخره بعضی هم توسط میکروارگانیسم‌ها، متابولیزه شده و یا با تبدیل شدن به مواد سمی‌تر وارد چرخه غذایی می‌شوند (Talebi-Jahromi, 2008). وارد شدن این ترکیب‌ها به داخل بدن موجودات از جمله انسان و تجمع آن‌ها منجر به اثر جبران‌ناپذیری می‌شود. نظر به نگرانی‌های زیادی که در مورد سمیت ترکیب‌های آلی فسفره وجود دارد، بررسی و به‌کارگیری ابزار و روش‌های جدید و نوآورانه از طرفی برای تشخیص و شناسایی سریع و از طرف دیگر برای تجزیه و کاهش سمیت این گروه از ترکیب‌های سمی به‌شدت ضروری و مورد نیاز است.

استفاده از میکروارگانیسم‌های مهندسی ژنتیک شده که می‌توانند ترکیب‌های فسفره آلی را تجزیه کنند، یک راه مؤثر برای کاهش باقیمانده این ترکیب‌ها در محیط‌زیست خواهد بود. از آنجاکه ارگانوفسفروس هیدرولاز طبیعی را نمی‌توان به‌راحتی به دست آورد، توسعه تکنولوژی DNA نوترکیب، رویکرد امیدوارکننده‌ای است که برای تولید یک میکروارگانیسم مهندسی شده که قادر به بیان این پروتئین باشد، مناسب خواهد بود (Li et al., 2014). میکروارگانیسم‌های مهندسی (دستکاری) شده بسیاری برای بیان یک پروتئین نوترکیب که عملکردهای متنوعی دارد، با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب ساخته شده است (Wang et al., 2011). Rowland et al. (1991) سطح بالایی از بیان فسفوتری استراز نوترکیب را در *Streptomyces lividans* در نتیجه کلونینگ ژن *mpdB* در یک سیستم ترشحی پروتئین گزارش کرده‌اند و این بررسی را برای دستیابی به سطح بالای MPH در آینده جالب توجه می‌دانند. هدف عمومی همسانه‌سازی ژن، دستکاری سنتز پروتئین به‌منظور تولید یک پروتئین در مقادیر زیاد، تغییر ساختار و عملکرد پروتئین (از طریق دستوری

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش بر تولید هیدرولاز پایدار و کارآمد توسط میکروارگانیسم‌های نوترکیب ژنتیکی برای پالایش زیستی دیازینون تمرکز شده است. استرین‌های نوترکیب حاصل توانایی بیان پروتئین OPH را دارند و این ادعا در مورد استرین V103 با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید اثبات شد. در سال‌های اخیر، تثبیت آنزیم OPH روی مواد مناسب به‌عنوان حامل، توجه زیادی را در شاخه‌های مختلف محیط‌زیست به خود معطوف داشته است. همگام با توسعه بیوشیمی و زیست‌شناسی مولکولی و دیگر تکنولوژی‌های زیستی مدرن مانند مهندسی ژنتیک، آنزیم‌شناسی، فرمنتاسیون و غیره تحقیقات بسیاری در زمینه تغییر ویژگی‌های زیستی OPH و ایجاد یک باکتری‌های نوترکیب متنوع در حال انجام است که چشم‌انداز و آینده‌ای امیدوارکننده را در سم‌زدایی و تجزیه آلاینده‌های فسفره متصور می‌شود.

آفت‌کش‌های مختلف بررسی شده است (Lan et al., 2006). در این بررسی دو ژن هدف ارگانوفسفروس هیدرولاز (*opd*) از *Flavobacterium* sp. و کربوکسیل استراز B1 (*b1*) از *Culex pipiens* برای بیان همزمان در وکتور pETDuet کلون شد و استرین *E. coli* BL-21 (DE3) به‌عنوان میزبان بیان استفاده شده است. بدین ترتیب این میکروارگانیسم به‌تنهایی قادر به تولید دو آنزیم OPH و B1 به ترتیب با وزن مولکولی تقریبی ۳۵ و ۶۵ کیلو دالتون، برای تجزیه آفت‌کش‌های آلی فسفره و کاربامات بود. سویه‌های تولیدکننده OPH متعددی برای تصفیه زیستی آلاینده‌های فسفره به کار گرفته شده است. Mulchandani et al. (1999) در بررسی خود از باکتری نوترکیب تجزیه‌کننده با عنوان یک زیست‌کاتالیزور یاد می‌کنند و معتقدند استفاده از سلول کامل و تکنولوژی تثبیت سلول، راه را برای توسعه روش‌های ساده، کارا و کم‌هزینه در سم‌زدایی از ترکیب‌های فسفره هموار می‌کند.

REFERENCES

- Baumgartner, P., Raemaekers, R. J., Durieux, A., Gatehouse, A., Davies, H. & Taylor, M. (2002). Large-scale production, purification, and characterisation of recombinant *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin E-form expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 26, 394-405.
- Cai, Z., Ma, J., Wang, J., Rong, Y., Chen, J., Li, S., Zhang, W. & Zhao, X. (2016) Aerobic biodegradation kinetics and pathway of the novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide Paichongding in yellow loam and Huangshi soils. *Applied Soil Ecology*, 98, 150-158.
- Chae, M. Y., Postula, J. F. & Raushel, F. M. (1994) Stereospecific enzymatic hydrolysis of phosphorus-sulfur bonds in chiral organophosphate triesters. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 4, 1473-1478.
- Chen, H., He, X., Rong, X., Cai, W. C. P., Liang, W., Li, S. & Huang, Q. (2009) Adsorption and biodegradation of carbaryl on montmorillonite, kaolinite and goethite. *Applied clay science*, 46: 102-108.
- Chen, W. & Mulchandani, A. (1998). The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 71-76.
- Chu, X. Y., Wu, N. F., Deng, M. J., Tian, J., Yao, B., Fan, Y. L. (2006) Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 49(1), 9-14.
- Cowie, A., Cheng, J., Sibley, C. D., Fong, Y., Zaheer, R., Patten, C. L., Morton, R. M., Golding, G. B. & Finan, T. M. (2006) An integrated approach to functional genomics: construction of a novel reporter gene fusion library for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7156-7167.
- Cullington, J. E. & Walker, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(5), 677-686.
- Daneshvar, N., Aber, S., Khani, A. & Rasoulifard, M. H. (2007) Investigation of adsorption kinetics and isotherms of imidacloprid as a pollutant from aqueous solution by adsorption onto industrial granular activated carbon. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5, 425-429.
- Diez, M. C. (2010) Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 10(3), 244-267.

11. Donarski, W. J., Dumas, D. P., Heitmeyer, D. P., Lewis, V. E. & Raushel, F. M. (1989) Structure–activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*, 28, 4650-4655.
12. Ekkhunnatham, A., Jongsareejit, B., Yamkunthong, W. & Wichitwechkarn, J. (2012) Purification and characterization of methyl parathion hydrolase from *Burkholderia cepacia* capable of degrading organophosphate insecticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1739-1746.
13. Ewida, A. Y. (2014) Biodegradation of alachlor and endosulfan using environmental bacterial strains. *World Applied Sciences Journal*, 32, 540-547.
14. Harper, L. L., Mcdaniel, C. S., Miller, C. E. & Wild, J. R. (2006). Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC27551) contain identical *opd* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2586-2589.
15. Hofman, J., Beerendonk, E. F., Flolmer, H. C. & Kruithof, J. C. (1997) Removal of pesticides and other micro pollutants with cellulose-acetate, polyamide and ultra-low pressure reverse osmosis membranes. *Desalination*, 113, 209-214.
16. Horne, I., Sutherland, T. D., Harcourt, R. L., Russell, R. J. & Oakeshott, J. G. (2002) Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3371-3376.
17. Hsu, T. S. & Bartha, R. (1979) Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 36-41.
18. Hsu, Y. T., Su, C. Y., Du, H. C., Jao, S. C., Li, W. S. (2008) Evaluation of organophosphorus chemicals-degrading enzymes: a comparison of *Escherichia coli* and human cytosolic aminopeptidase P. *Chemistry and Biodiversity*, 5, 1401-11.
19. Hua, W., Bennett, E. R. & Letcher, R. J. (2006) Ozone treatment and the depletion of detectable pharmaceuticals and atrazine herbicide in drinking water sourced from the upper Detroit River, Ontario, Canada. *Water Research*, 40, 2259-2266.
20. Jabeen, H., Iqbal, S., Anwar, S. (2014) Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN3. *Water and Environment Journal*, 15, 300-306.
21. Kazemi, M., Tahmasbi, A. M., Valizadeh, R., Naserian, A. A. & Soni, A. (2012) Organophosphate pesticides: a general review. *Agricultural Science Research Journal*, 2, 512-522.
22. Keprasertsup, C., Upatham, E. S., Sukhapanth, N. & Prempre, P. (2001) Degradation of methyl parathion in an aqueous medium by soil bacteria. *Scienceasia*, 27, 261-270.
23. Kolakowski, J. E., DeFrank, J. J., Harvey, S. P., Szafraniec, L. L., Beaudry, W. T., Lai, K. & Wild, J. R. (1997) Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 15, 297-312.
24. Lai, K., Stolowich, N. J. & Wild, J. R. (1995) Characterization of P–S bond hydrolysis in organophosphorothioate pesticides by organophosphorus hydrolase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318, 59-64.
25. Lan, W. S., Gu, J. D., Zhang, J. L., Shen, B. C., Jiang, H., Mulchandani, A., ... & Qiao, C. L. (2006) Coexpression of two detoxifying pesticide-degrading enzymes in a genetically engineered bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58(2), 70-76.
26. Li, Q., Wang, P., Chen, R., Li, W., Wu, Y.J. (2014) Construction of genetically engineered bacteria that degrades organophosphorus pesticide residues and can be easily detected by the fluorescence. *Environmental Technology*, 35(5), 556-561.
27. Li, Q. & Wu, Y. J. (2014) A safety type genetically engineered bacterium with red fluorescence which can be used to degrade organophosphorus pesticides. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11, 891-898.
28. Mulbry, W. W., Karns, J. S. (1989) Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. *Journal of bacteriology*, 171: 6740-6746.
29. Mulchandani, A. Rajesh. (2011) Microbial biosensors for organophosphate pesticides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 687-699.
30. Mulchandani, A., Kaneva, I. & Chen, W. (1999) Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(2), 216-223.
31. Munnecke, D. M. (1980). Enzymatic detoxification of waste organophosphate pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 105-111.
32. Musa, S., Gichuki, J. W., Raburu, P. O. & Aura, C. M. (2011) Risk assessment for organochlorines and organophosphates pesticide residues in water and sediments from lower Nyando/Sondu-Miri river within Lake Victoria Basin, Kenya. *Lakes and Reservoirs: Reserarch and Management*, 16, 273-280.

33. Rogers, K. R., Wang, Y., Mulchandani, A., Mulchandani, P. & Chen, W. (1999) Organophosphorus hydrolase-based fluorescence assay for organophosphate pesticides. *Biotechnology Progress*, 15, 517-522.
34. Rowland, S. S., Speedie, M. K. & Pogell, B. M. (1991) Purification and characterization of a secreted recombinant phosphotriesterase (parathion hydrolase) from *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 440-444.
35. Schofield, D. A., Westwater, C., Barth, J. L. & DiNovo, A. A. (2007) Development of a yeast biosensor-biocatalyst for the detection and biodegradation of the organophosphate paraoxon. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1383-1394.
36. Serdar, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, D. M. & Lancaster, J. H. (1982) Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 246-249.
37. Shimazu, M., Mulchandani, A. & Chen, W. (2001) Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and *p*-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(4), 318-324.
38. Singh, B. K. & Walker, A. (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 428-471.
39. Somara, S., Manavathi, B., Tebbe, C. C. & Siddavatam, D. (2002) Over-expression of parathion hydrolase of *Flavobacterium balustinum* in *E. coli*: Purification and characterization of His-tagged parathion hydrolase. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 39(2), 82-6.
40. Stoytcheva M. Enzyme vs. bacterial electrochemical sensors for organophosphorus pesticides quantification, Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería México. Source: Intelligent and Biosensors, Book edited by: Vernon S. Somerset, pp. 386, January 2010, InTech, Croatia. Fownloaded from SCIYO.COM.
41. Takayama, K., Suye, S. I., Kuroda, K., Ueda, M., Kitaguchi, T., Tsuchiyama, K., ... & Mulchandani, A. (2006) Surface display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 22(4), 939-943.
42. Talebi-jahromi, Kh. (2008). *Pesticides toxicology* (2nd ed.) University of Tehran press. 492 pp.
43. Wang, H., Gong, Y., Xie, W., Xiao, W., Wang, J., Zheng, Y., Hu, J. & Liu, Z. (2011) Identification and characterization of a novel thermostable gh-57 gene from metagenomic fosmid library of the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 1323-1338.
44. Wang, J., Chatrathi, M. P., Mulchandani, A. & Chen, W. (2001) Capillary electrophoresis microchips for separation and detection of organophosphate nerve agents. *Analytical Chemistry*, 73, 1804-1808.
45. Wong, D. (2006) *The ABCs of Gene Cloning* (2nd Edition). New York, NY: Springer. Springer, 196 pp.
46. Wu, C. F., Cha, H. J., Rao, G., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2000) A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorus hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(1), 78-83.
47. Wu, C. F., Valdes, J. J., Rao, G. & Bentley, W. E. (2001) Enhancement of organophosphorus hydrolase yield in *Escherichia coli* using multiple gene fusions. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(1), 100-103.
48. Wu, N. F., Deng, M. J., Liang, G. Y., Chu, X. Y., Yao, B. & Fan, Y. L. (2004) Cloning and expression of *ophc2*, a new organophosphorus hydrolase gene. *Chinese Science Bulletin*, 49(12), 1245-1249.
49. Zertal, A., Jacquet, M., Lavedrine, B. & Sehili, T. (2005) Photodegradation of chlorinated pesticides dispersed on sand. *Chemosphere*, 58, 1431-1437.
50. Zhao, J. H. & Zhao, D. G. (2009) Transient expression of organophosphorus hydrolase to enhance the degrading activity of tomato fruit on coumaphos. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(2), 142-146.
51. Zheng, Y., Long, L., Fan, Y., Gan, J., Fang, J., Jin, W. (2013) A review on the detoxification of organophosphorus compounds by microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 2127-2134.
52. Zhongli, C., Shunpeng, L., Guoping, F. (2001) Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4922-4925.