Research article

New Cell Mol Biotech
j.10/39 , 2020

Scan online to view this article

Improving the activity and stability of OPH enzyme using DNA Shuffling method

Morteza Mirzaei [1], Mona Rastegar Shariat Panahi [2], Enayat Ghahremani [1], Ehsan Rezae [3], Rezvan Seid Moradi [1], Gholamreza Farnoosh[1], Ali Mohammad Latifi [1,*]

1- Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Department of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran
3- Molecular Biology Research Center, Systems biology and poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and background: One of the effective methods for protein engineering, especially for improving the capabilities of industrial strains, is the genome shuffling method. This study is based on biocatalytic engineering techniques and DNA shuffling methods.

Materials and Methods: *Pseudomonas aeruginosa* wild strain was prepared under the access number JQ917006.1. Mutant strains were evaluated by DES method and compatibility with diazinon concentration. After the protoplast was prepared, the genome was mutated from the mutant library. Fused protoplasts were evaluated for activity.

Results: The activities related to IR1.G1, IR1.D8, IR1.D4 and IR1.D5 strains are 0.234 U/ml, 0.1 U/ml, 0.098 U/ml and 0.066 U/ml, respectively, and IRL1.F2, IRL1.F3 and IRL1.F1 strains have activities of 0.541 mg/L, 0.523 mg/L and 0.509 mg/L, respectively.

Conclusion: The results of evaluation of the first generation of genome shuffling (first round of protoplast fusion) showed that the shuffled strains that were able to grow in the presence of toxin (3000 ml/L diazinon concentration) had better activity than the obtained strain through both methods (toxin concentration gradient and DES method).

Keywords: Genome shuffling, improved strains, protein engineering, diazinon

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

Corresponding author:
Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: amlatifi290@gmail.com

www.SID.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره -۳۹ تابستان ۱۳۹۹
مقاله پژوهشی
Archive of SID

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بهبود فعالیت و پایداری آنزیم OPH با استفاده از روش DNA شافلینگ

مرتضی میرزایی[۱]، مونا رستگار شریعت پناهی[۲]، عنایت قهرمانی[۱]، احسان رضایی[۳]، رضوان صید مرادی[۱]، غلامرضا فرنوش[۱]، علی محمد لطیفی[*۱]

۱-مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۲-گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳-مرکز تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی، انستیتوی زیست‌شناسی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: از جمله روش‌های مؤثر برای مهندسی پروتئین، به‌ویژه برای بهبود قابلیت‌های سویه‌های صنعتی، روش ژنوم شافلینگ است. این مطالعه منطبق بر تکنیک‌های مهندسی بیوکاتالیستی و بر اساس روش های DNA شافلینگ انجام شده است.

مواد و روش‌ها: سویهٔ وحشی *سودوموناس آئروژینوزا* به‌شماره دسترسی JQ917006.1 تهیه گردید. سویه‌های جهش یافته به‌روش DES و سازگاری با غلظت دیازینون بررسی شدند. پس از آماده سازی پروتوپلاست، برزدن ژنوم انجام شد که از کتابخانهٔ جهش یافته حاصل شده بود. پروتوپلاست‌های الحاقی از نظر فعالیت بررسی شدند.

یافته‌ها: فعالیت مربوط به سویه‌های IR1.G1، IR1.D8، IR1.D4 و IR1.D5 به‌ترتیب عبارتند از ۰/۲۳۴ U/ml، ۰/۱ U/ml، ۰/۰۹۸ U/ml و ۰/۰۶۶ U/ml و سویه‌های IRL1.F2 و IRL1.F3 و IRL1.F1 به‌ترتیب دارای فعالیت mg/L ۰/۵۴۱، ۰/۵۲۳ mg/L و ۰/۵۰۹ mg/L هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از ارزیابی نسل اول ژنوم شافلینگ (دور اول فیوژن پروتوپلاست) نشان داد که سویه‌های برخورده (شافل شده) که قادر به رشد در مجاورت توکسین (۳۰۰۰ میلی‌لیتر در لیتر غلظت دیازینون) بودند، فعالیت بهتری نسبت‌به سویه‌های جهش یافته با استفاده از هر دو روش (گرادیان غلظت سم و روش DES) را از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: ژنوم شافلینگ، سویه‌های بهبود یافته، مهندسی پروتئین، دیازینون

مقدمه

تاریخچهٔ استفاده از آفت‌کش‌های ارگانو فسفاته برای مصارف کشاورزی به دهه‌های قبل باز می‌گردد. تعدادی از ترکیب-های ارگانوفسفره شامل مالاتیون، دیکلرووس و، پاراتیون کلروپیریفوس هستند. این ترکیب‌ها، استیل کولین استراز را که یک آنزیم حیاتی در هیدرولیز استیل کولین عصبی است را مورد هدف قرار داده و منجر به غیرفعال شدن استیل کولین استراز و در نتیجه باعث سمیت می‌شوند (۱). بر این اساس استفاده از این ترکیب‌ها نگرانی‌های سلامتی بسیاری را نسبت‌به انسان و سایر موجودات زنده ایجاد کرده است. به‌منظور غلبه‌بر این مشکل، تلاش‌های زیادی صورت گرفته و روش‌های متفاوتی برای از بین بردن آلودگی ناشی از

نویسنده مسئول:
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
پست الکترونیکی: amlatifi290@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۷
www.SID.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

استفاده از این ترکیب‌ها بکار گرفته شده‌اند. روش‌هایی مانند روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی می‌توانند به‌عنوان استراتژی‌های آلودگی‌زدایی در نظر گرفته شوند (۲). تجزیه زیستی به‌عنوان یک روش برجسته به‌علت برخی از ویژگی-های مهم مانند اثر سریع، سازگار با محیط‌زیست، امن و تولید محصولات با سمیت کم‌تر شناخته می‌شود (۳).

مطالعه‌های قبلی ثابت کرده‌اند که برخی از میکروارگانیسم-ها قادر به تخریب ترکیب‌های سمی خاصی هستند (۴). چندین باکتری جدا شده از جمله گونه‌های *فلاووباکتریوم* (*Flavobacterium*) و *سودوموناس دیمینوتا* امجی (*Pseudomonas diminuta* MG) نشان داده‌اند که قابلیت‌های قابل توجهی برای هیدرولیز کردن ترکیب‌های ارگانو فسفره دارند (۵،۶). گونه‌های *سودوموناس* به‌عنوان یک نامزد برجسته برای تجزیه زیست محیطی ترکیب‌های ارگانوفسفره محسوب می‌شود و برای سم‌زدایی پساب‌های آلوده و خاک‌های کشاورزی استفاده می‌شود (۷).

علیرغم مزایای متعدد استفاده از سویه‌های باکتریایی در فرآیند تجزیه زیستی، برخی از جنبه‌های کاربردی این سویه‌ها باعث می‌شود تا از استفادهٔ مکرر آن‌ها جلوگیری شود. یکی از عوامل محدود کننده در دسترس بودن سوبسترا است. آنزیم‌های سیتوپلاسمی این باکتری‌ها مسئول فعالیت‌های زیستی آن‌ها هستند که دسترسی سوبسترا به آن‌ها را محدود است. از سوی دیگر، نیاز به زمان بیش‌تری دارند تا روی سوبسترا عمل کنند، بنابراین کیفیت کارایی آن‌ها کاهش می‌یابد (۳).

ژنوم شافلینگ به‌طور گسترده‌ای برای افزایش تولید متابولیت‌ها توسط سویه‌های باکتریایی، بهبود جذب سوبسترا و هم‌چنین افزایش قدرت سویه استفاده می‌شود. این تکنیک ترکیبی از مزایای کراسینگ اور والدینی است که با بر زدن DNA و بازسازی کامل ژنوم همراه است که به‌طور معمول با ترکیب (فیوژن) پروتوپلاست انجام می-شود که پروسهٔ نوترکیبی را افزایش می‌دهد. روش برزدن ژنوم در ابتدا توسط Stemmer و همکارانش در سال ۲۰۰۲ ارائه شد که برای بهبود تولید تیلوزین (Tylosin) توسط *استرپتومایسس فرادیه* (*Streptomyces fradiae*) مورد استفاده قرار گرفت. امروزه در بسیاری از آزمایش ها برای افزایش تولید متابولیت ها توسط سویه های باکتریایی، بهبود جذب سوبسترا و افزایش تحمل سویه استفاده می‌شود. برزدن ژنوم یک نقطه عطف در تکنولوژی بهبود سویه‌ها و مهندسی متابولیک است (۸).

در این مطالعه، با استفاده از روش بر زدن ژنوم، تلاش برای بهبود ویژگی های *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) به منظور تجزیهٔ دیازینون انجام شد. مقاومت در مقابل سمیت سموم ارگانوفسفره و هم‌چنین افزایش فعالیت سلول از اهداف این مطالعه هستند. هدف اصلی به‌دست آوردن سویهٔ جهش یافته ای است که می‌تواند در غلظت‌های بالای دیازینون رشد کند و از سوی دیگر نیز دیازینون را در مدت زمان کوتاهی تجزیه کند.

روش کار

سویه‌های باکتریایی

سویهٔ وحشی *سودوموناس آئروژینوزا* به شماره مجموعه JQ917006.1 از فاضلاب‌های صنعتی (پساب‌های کارخانه‌های تولید آفت‌کش‌ها و خاک آلوده آن‌ها) در ایران جدا شده است.

مواد شیمیایی و حلال‌ها

دیازینون (خلوص ٪۹۹/۵) از Sigma-Aldrich خریداری شد. سایر مواد شیمیایی و حلال‌ها نیز از Merck آلمان تهیه شد.

آزمون تحمل سویه‌های بومی در برابر دیازینون

در ابتدا سویهٔ IRLM.1 جدا شده از *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت MSM حاوی ٪۲ گلوکز، ۰/۲g/L ،$(NH_4)_2SO_4$ ۰/۵g/L ،$CaCl_2.H_2O$ ۵۰mg/L ،KCL ،NaCl ۰/۱g/L بدون حضور دیازینون و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا OD_{600} به ۰/۵ برسد. سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ شده (با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه در مدت ۵ دقیقه) و سپس چندین بار با محیط MSG بدون گلوکز شستشو داده شدند. در مرحلهٔ

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

www.SID.ir

بعد، رسوب باکتریایی به محیط MSM آگار حاوی agar ۱/۵g/L، $CaCl_2.H_2O$ ۵۰mg/L، ۰/۵g/L $(NH_4)_2SO_4$، KCL ۰/۲g/L، NaCl ۰/۱g/L و محیط بدون گلوکز، با ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون اضافه شد و سپس به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

برزدن ژنوم از دو مسیر انجام می‌شود: ۱. سازگاری شیمیایی (سویهٔ IRLM1.G) ۲. مادهٔ القاء کنندهٔ جهش دی اتیل سولفات (DES) (سویهٔ IRLM1.D).

ایجاد کتابخانه جهش یافته (IRLM1.G) از طریق سازگاری شیمیایی

جمعیت اول توسط سازگاری شیمیایی به‌دست آمد که شامل افزایش تدریجی مقدار دیازینون در ۱۲۰۰ ساعت بود. این امر را می‌توان به این شیوه توضیح داد که پس از تأیید مقاومت سویه‌های مادری، در معرض غلظت‌های بالاتر دیازینون (۲۵۰۰-۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در MSM آگار قرار گرفتند. سپس کشت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در محلی تاریک نگهداری شدند تا از تجزیهٔ نوری دیازینون جلوگیری شود.

ایجاد سویه‌های جهش یافته (IRLM1.D) توسط DES

سویه‌های بومی در محیط MSM کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیده تا OD_{600} به ۰/۵ برسد. محیط کشت با ٪۰/۵، ٪۱، ٪۱/۵، ٪۲، ٪۲/۵ و در نهایت ٪۳ DES (Sigma Aldrich) تیمار شدند و سپس به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۵ دقیقه انکوبه شدند. سوسپانسیون باکتریایی سانتریفیوژ شده (۷۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه) و سپس با PBS شسته شد و در نهایت در محیط LB agar کشت داده شد.

غربالگری بر اساس رشد در حضور monocrotophos و تجزیه زیستی دیازینون در

کتابخانه جهش یافتهٔ به‌دست آمده بر روی LB agar کشت داده شده و در ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس لایه نازک ٪۰/۷ آگاروز حاوی ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات سیترات و ۵/۵ میلی-مولار monocrotophos به محیط اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. کلنی ها بر اساس بزرگی میزان هاله انتخاب شدند.

کلنی‌های انتخاب شده در محیط MSM حاوی دیازینون (۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تلقیح شدند. $OD_{۲۴۶}$ در ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از نانودراپ، اندازه‌گیری شد. همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، تمام آزمایش‌های مربوط به دیازینون در شرایط تاریک به‌علت اثرهای نور بر روی دیازینون انجام شد.

آماده‌سازی پروتوپلاست و تیمار غیرفعال سازی

پروتوپلاست‌ها براساس روش Cocconcelli و همکاران با اعمال تغییرهایی انجام شد. سلول‌های باکتریایی به‌صورت کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سلول‌ها رسوب داده شدند. سلول‌های باکتریایی در ۱۰ میلی‌لیتر بافر پروتوپلاست (PB) حاوی ۱۰ میلی‌مولار Tris-Hcl، ۲۰ میلی‌مولار $CaCl_2$ و ۰/۵ مولار سوکروز و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیزوزیم و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲ ساعت انکوبه شده تا غیرفعال شوند. تشکیل پروتوپلاست با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

برزدن ژنوم

اولین جمعیت مورد استفاده برای برزدن ژنوم، کتابخانهٔ جهش یافته‌ای بود که با افزایش سازگاری با غلظت دیازینون و عامل DES به‌دست آمد. پروتوپلاست‌های غیرفعال شده در نسبت ۱:۱ مخلوط و سپس سانتریفوژ شده و دوباره به‌نسبت ۱:۹ در ۶۰۰۰PEG (٪۶۰) و PB حل شده و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پروتوپلاست‌های الحاقی در ۵ میلی‌لیتر PB و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

www.SID.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

Archive of SID

سانتریفوژ گردیدند. سپس در محیط احیاء کننده (۲۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میلی‌مولار ساکارز و ۰/۵٪ BSA) به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند

روش‌های آنالیزی

غربالگری براساس رشد در حضور monocrotophos انجام شد و پروتوپلاست‌های الحاقی انتخاب شدند. هم-چنین، تجزیه زیستی دیازینون و مقاومت در برابر دیازینون براساس آنچه پیش‌تر شرح داده شد، مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

ایجاد جمعیت سویه‌های اولیه برای برزدن ژنوم

اولین جمعیت کتابخانهٔ جهش یافتهٔ سازگار با افزایش غلظت دیازینون از ۱۰۰۰ تا ۳۳۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ۱۲۰۰ ساعت به‌دست آمد. سویه‌های جهش یافته (IRLM1.G) قادر به رشد در غلظت ۳۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دیازینون بودند در حالی‌که سویهٔ وحشی به-سختی در ۲۹۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد کرد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- رشد جمعیت اول سویه‌های جهش یافته در غلظت‌های مختلف دیازینون

غلظت دیازینون (mg/L)	نمونه	زمان		
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۱۰۰۰-۲۶۰۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	+	+	+
۲۷۰۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	+	+
۲۸۰۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	-	+
۲۹۰۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	+	+
۲۹۵۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	-	-
۳۰۰۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	-	-
۳۰۵۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	-	-
۳۱۰۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	-	—
۳۱۵۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	-	-
۳۲۰۰	IRLM1.G	+	+	+
	IRLM1	-	-	-
۳۲۵۰	IRLM1.G	-	+	+
	IRLM1	-	-	-
۳۳۰۰	IRLM1.G	-	-	-
	IRLM1	-	-	-

جمعیت دوم سویه‌های جهش یافته (IRLM1.D) با تیمار DES به‌دست آمد. تعداد کلنی‌های موجود در MSM آگار حاوی دیازینون از ۰/۵ تا ۳ درصد تیمار DES کاهش یافت. رنگدانه سبز که مشخصه *سودوموناس* است، در میزان ۲٪ و

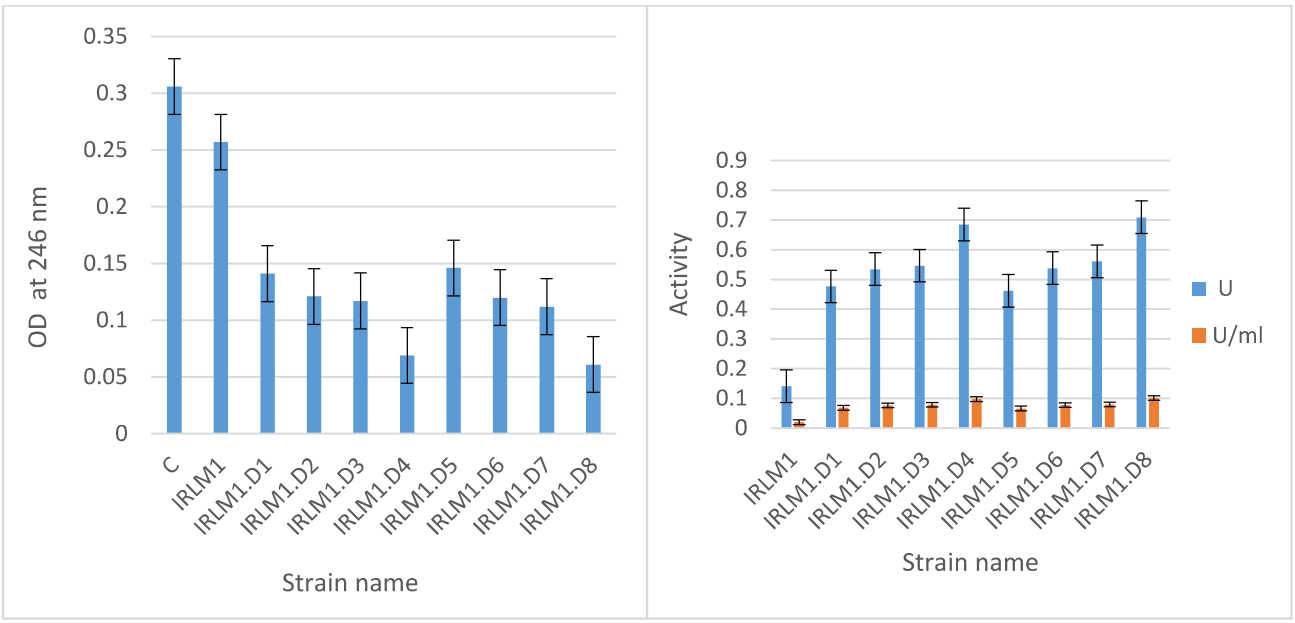
www.SID.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

۲/۵٪ از DES تولید نمی‌شود. سویه‌های جهش یافته با توجه‌به مقدار هاله در LB آگار حاوی monocrotophos و سرعت تجزیهٔ زیستی دیازینون انتخاب شدند. بنابراین، ۸ سویهٔ جهش یافته برای برزدن ژنوم آماده شدند.

براساس نتایج جذب نوری به‌دست آمده، سویه‌های IRLM1.D4 و IRLM1.D8 نتایج رضایت‌بخشی نسبت‌به سویه‌های دیگر را نشان می‌دهد. بنابراین، سویهٔ IRLM1.D8 به‌عنوان یکی از سویه‌های والد برای برزدن ژنوم در نظر گرفته شد.



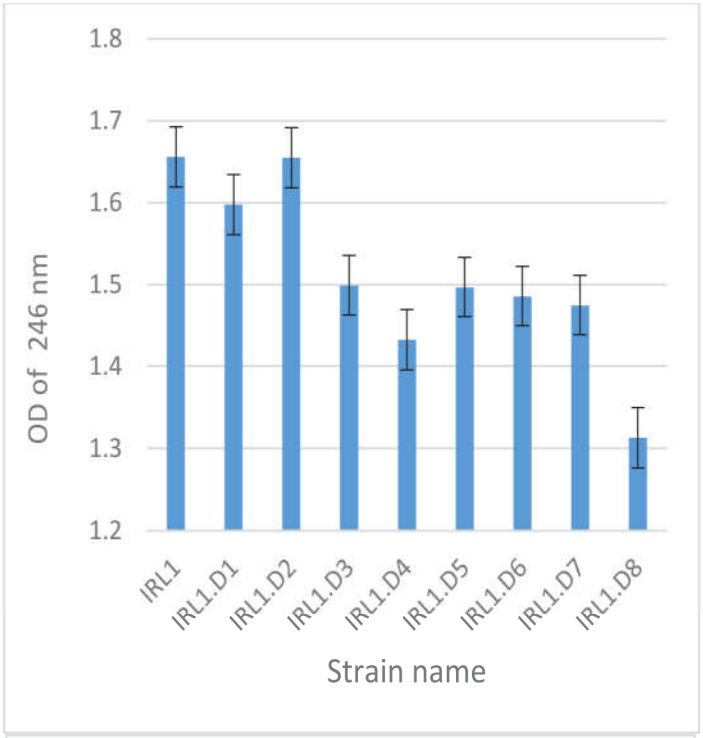
شکل ۱- جذب نوری و ارزیابی تجزیهٔ زیستی دیازینون (۲۰۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر دیازینون) با استفاده از سویه‌های بهبود یافته روند جهش‌زایی DES

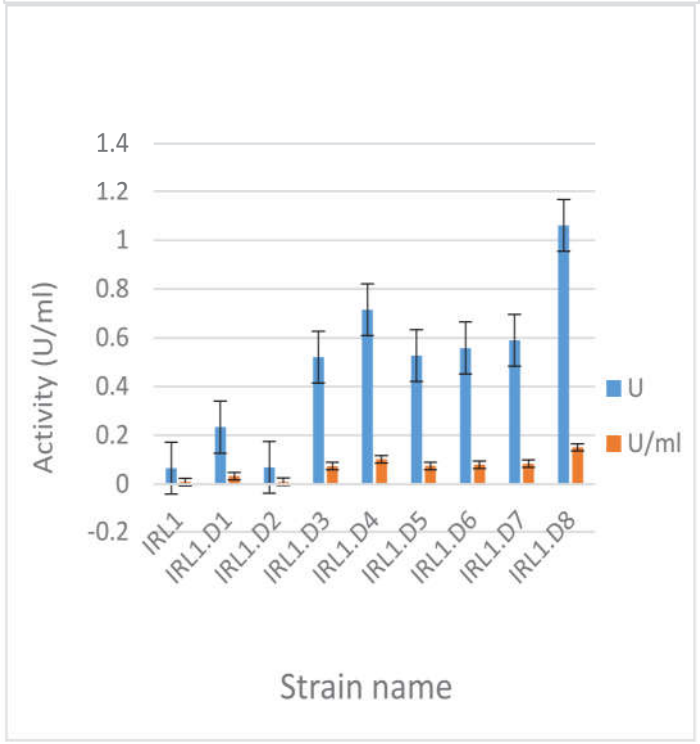
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

www.SID.ir

A



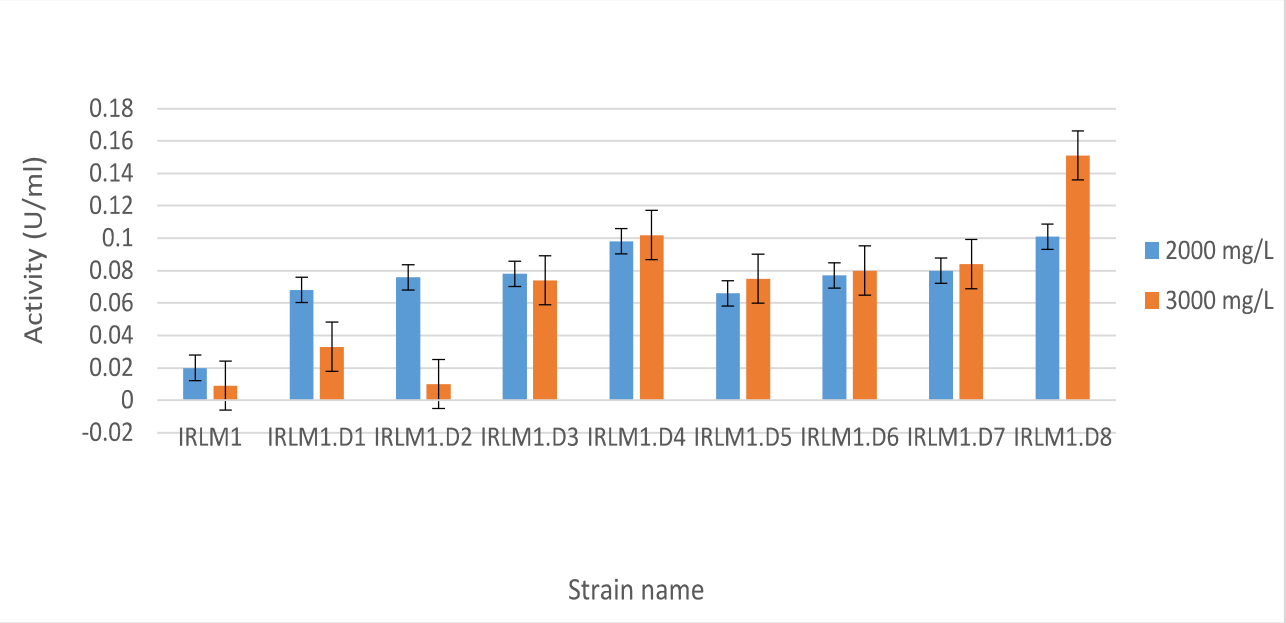


شکل ۲- جذب نوری و ارزیابی تجزیه زیستی دیازینون (۳۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر دیازینون) با استفاده از سویه‌های بهبود یافته روند جهش‌زایی DES

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

www.SID.ir



شکل ۳- مقایسه فعالیت کل سلول با سویه‌های بهبود یافته با DES در ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون.

برزدن ژنوم و غربالگری

پروتوپلاست‌های ایجاد شده توسط میکروسکوپ، پس از شکستن دیواره سلولی با لیزوزیم مشاهده شدند. سویه‌های بر خورده با توجه‌به مقدار هاله روی LB آگار با monocrotophos انتخاب شدند. ۱۲ سویهٔ بر خورده به روش تحلیلی انتخاب شدند.

رشد باکتری و تجزیه زیستی دیازینون در MSM

تجزیه زیستی دیازینون در MSM حاوی دیازینون با استفاده از چک کردن OD_{246} و توانایی رشد سویه‌های بر خورده در محیط MSM آگار حاوی دیازینون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p>۰/۰۵$) در میزان تجزیه بیولوژیکی سویه‌های بر خورده نسبت‌به سویه‌های والد (IRLM1.G و IRLM1.D) و هم-چنین سویه‌های کنترل در محیط MSM حاوی دیازینون (شکل ۳) وجود دارد.

نتایج حاصل از رشد در آگار MSM حاوی دیازینون (۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نشان داد که تنها یک سویهٔ بر خورده (IRLM1.F3) قادر به رشد در ۳۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر دیازینون بود، اما تنها یکی از آن‌ها توانست در ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون رشد کند. در مقابل، سویهٔ بومی (IRLM1) تغییرهای جزئی در OD_{246} ر نسبت‌به نمونه غیر تلقیح شده نشان داد.

بحث

تیمار زیستی ترکیب‌های ارگانوفسفره از خاک و آب سطحی یک وظیفه اساسی بشمار می‌رود. فلاووباکتریوم با شمار دسترسی ATCC 27551، اولین باکتری تجزیه کنند ترکیب‌های ارگانوفسفره، شناسایی و از خاک فیلیپین جد شده است. تاکنون باکتری‌های دیگری نیز کشف شده‌اند ک می‌توانند از ترکیب‌های ارگانوفسفره به‌عنوان تنها منبع کربن، نیتروژن و فسفر استفاده کنند.

در مطالعه‌های مختلف، سویه‌های تجزیه کنندهٔ ترکیب‌های ارگانوفسفره برای از بین بردن آلودگی‌های محیط زیست معرفی شده‌اند. به‌منظور حذف این ترکیب‌ها از فاضلاب صنعتی، باکتری‌های تخریب کننده باید قادر به رشد د غلظت بالای ترکیب‌های ارگانوفسفره باشند تا قادر باشند این ترکیب‌ها را تجزیه کنند. سویهٔ وحشی در مطالعهٔ حاض از خاک و پساب کارخانجات جدا شده است. در حالی‌که د مطالعه‌ای دیگر، باکتری‌های تجزیه کننده از خاک جدا شد بودند. این امر نقطه‌ای قوی در این تحقیق است که سوی وحشی ما قادر است تا در غلظت‌های بالای دیازینون (ت ۲۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد کند. علاوه‌بر این، فعالیت این

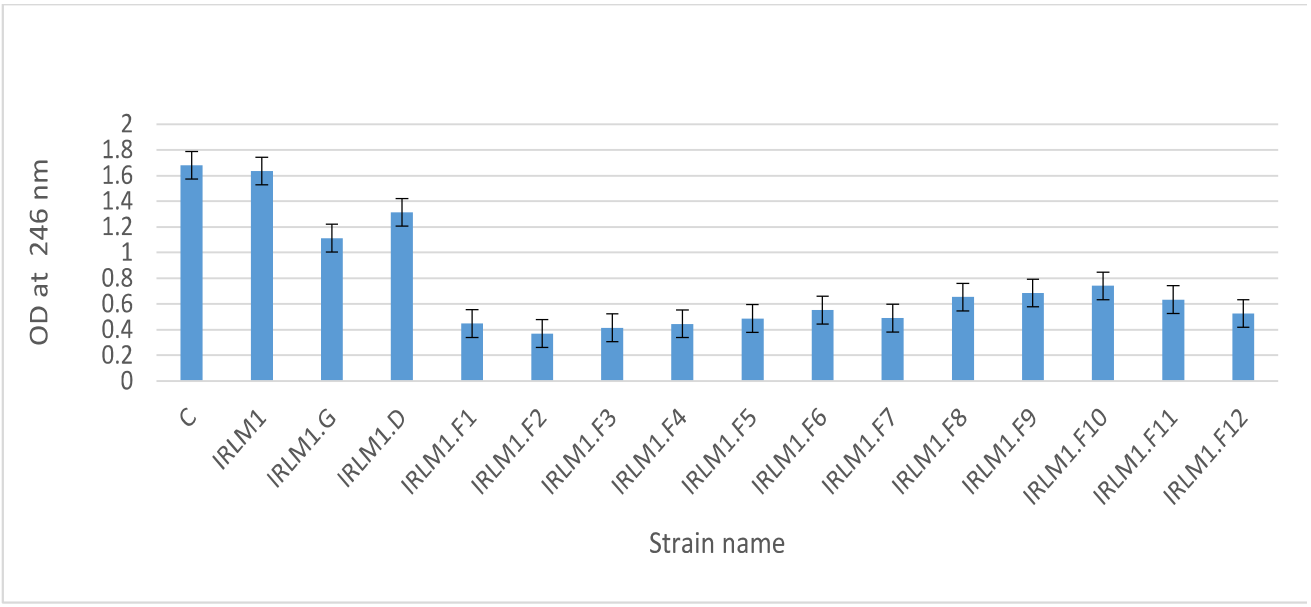
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

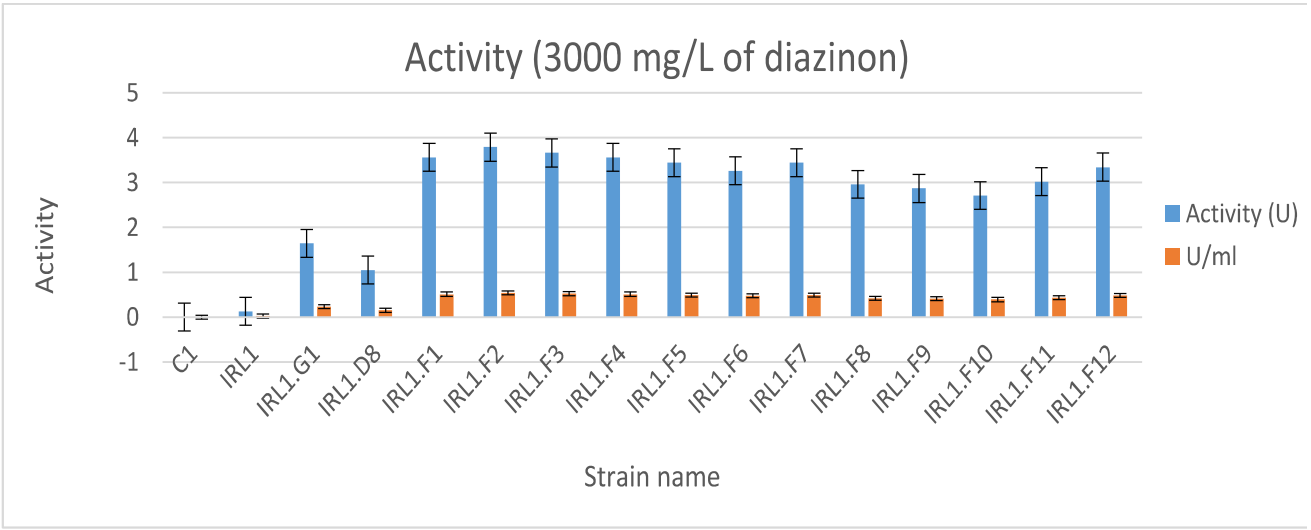
www.SID.ir

Archive of SID

سویه وحشی با استفاده از روش برزدن ژنوم بهبود یافته
ست.



شکل ۴- ارزیابی تخریب زیستی دیازینون (۳۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر دیازینون) با استفاده از سویه‌های بر خورده.



شکل ۵- ارزیابی فعالیت کل سلول با استفاده از سویهٔ بر خورده در ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- رشد سویه‌های برخورده در MSM آگار حاوی دیازینون (در غلظت‌های مختلف) به‌عنوان تنها منبع کربن، فسفر و انرژی

نمونه	بیش از ۲۵۰۰ mg/L	۳۰۰۰ mg/L	۴۰۰۰ mg/L	۵۰۰۰ mg/L
IRLM1.G	+	+	-	-
IRLM1.D	+	-	-	-
IRLM1	+	-	-	-
IRLM1.F1	+	+	-	-
IRLM1.F2	+	+	+	+
IRLM1.F3	+	+	-	-
IRLM1.F4	+	+	-	-
IRLM1.F5	+	+	-	-
IRLM1.F6	+	+	-	-
IRLM1.F7	+	+	-	-
IRLM1.F8	+	+	-	-
IRLM1.F9	+	+	-	-
IRLM1.F10	+	+	-	-
IRLM1.F11	+	+	-	-
IRLM1.F12	+	+	-	-

از آنجایی‌که این مطالعه هدف، بهبود بخشیدن به عملکرد باکتری‌ها و فراهم کردن توانایی رشد آن‌ها در غلظت‌های بالایی از ترکیب‌های ارگانوفسفره است، سازگاری با این ترکیب‌ها و جهش‌زایی DES در این مطالعه به‌کار برده شده است. در مقایسه با سایر مطالعه‌های Patnaik (۲۰۰۲) و همکاران به‌منظور بهبود تحمل pH و تولید اسید در باکتری، تطبیق pH و جهش‌زایی نیتروزوگوانیدین (NTG) استفاده شد (۹).

برخی از تغییرهایی مانند افزایش تحمل به ترکیب‌های ارگانوفسفره و توانایی رشد در غلظت‌های بالای این ترکیب-ها، نیازمند تغییرهای زیادی در ژنوم هستند که قابل پیش-بینی نیستند. پس از سازگاری با ترکیب‌های ارگانوفسفره، سویهٔ IRLM1.G قادر به تحمل و رشد در ۳۲۵۰ mg/L دیازینون (جدول ۱) بود. از این امر می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تدریجی غلظت دیازینون ممکن است باعث جهش شود که منجر به انطباق با شرایط جدید می‌شود.

از سوی دیگر، در بسیاری از مطالعه‌ها، جهش‌زایی DES برای آماده‌سازی سویه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. هم-چنین ما مشاهده کردیم که جهش‌زایی DES برای به‌دست آوردن سویهٔ IRLM1.D8 به‌عنوان یک سویهٔ بهبود یافته کارآمد است. به‌طوری‌که فعالیت کل سلول توسط IRLM1.D8 تا ۵ و ۱۶/۷ برابر بیش‌تر از سویهٔ وحشی در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون بوده است. بسیاری از گونه‌های جهش یافته با DES (IRLM1.F3,4,6,7) در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون نشان دادند که توانایی بیش‌تری در تجزیه پیدا می‌کنند (شکل ۳). بنابراین، جهش‌های ناشی از ژن‌هایی که در تجزیه ترکیب‌های ارگانوفسفره دخالت دارند، حتی فعالیت تجزیه‌کنندگی را حتی در غلظت‌های بالای دیازینون مختل نمی‌کنند.

پس از یک دور برزدن ژنوم و غربالگری، تمام سویه‌ها، فعالیت کل سلول را در ۳۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر دیازینون نشان دادند، به‌طوری‌که فعالیت کل سلول‌های IRLM1.F2 و IRLM.F3 به‌ترتیب به میزان ۰/۵۴ U/ml و ۰/۵۲ U/ml بود. این فعالیت ۶۰ و ۵۷/۷ برابر بیش‌تر از سویهٔ وحشی و ۳/۵ و ۳/۴ برابر بیش‌تر از سویهٔ ابتدایی است. در مطالعه‌ای توسط Wang Ch (۲۰۱۳) و همکاران پس از ۶ دور برزدن ژنوم، ۴/۲ برابر بهبود برای پنی‌سیلیوم سیترینوم و در مطالعهٔ Patnaik R (۲۰۰۲) و همکاران پس از ۵ دور

www.SID.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

Archive of SID

برزدن ژنوم ۳ برابر بهبودی برای *لاکتوباسیلوس* گزارش شد (۹). Zhang Y. F (۲۰۱۴) و همکاران هم‌چنین بهبود ۲/۴ برابری *لاکتوکوکوس لاکتیس* را پس از ۴ دور به‌دست آوردند (۱۰). یکی از تفاوت‌های عمیق بین مطالعهٔ حاضر و سایر مطالعه‌ها، تعداد دورهای برزدن ژنوم است که تنها در یک دور نسبت‌به چندین مرحله از بر زدن ژنوم در مطالعه-های دیگر نتایج خوبی به‌دست آمد.

با این وجود، انتخاب روش نقش مهمی در به‌دست آوردن نتیجه نهایی ایفا می‌کند. در برخی از روش‌ها، نتایج نشان می‌دهند که تفاوتی بین نوع سویهٔ وحشی و سویهٔ بر خورده وجود ندارد و بنابراین فعالیت آنزیم ثابت باقی می‌ماند یا به میزان بسیار کمی افزایش می‌یابد.

تاکنون روش‌های دیگری مانند برزدن DNA و ایجاد جهش با PCR برای تولید سویه‌های نوترکیب توسط چندین محقق استفاده شده است، اما استفاده از میکروارگانیسم‌ها در بهبود تجزیهٔ زیستی دارای مزایای خاصی از قبیل پایداری، سازگاری با محیط زیست، تولید مقرون‌به صرفه و آسان نیز است.

چندین باکتری با توالی‌های کمابیش یکسان *opd* در سراسر جهان شناسایی شده اند. ژن مسئول تجزیهٔ دیازینون و دیگر ارگانوفسفره‌ها، *opd* است. ژن *opd* در ژنوم چندین باکتری وجود دارد.

اگر چه تمام سویه های الحاقی فعالیت بیش‌تری را در مقایسه با نوع وحشی نشان دادند، اما تنها IRLM1.F2 قادر به رشد در محیط کشت حاوی بیش از ۳۰۰۰ میلی-گرم در لیتر غلظت دیازینون بود. سویه‌های دیگر با وجود افزایش فعالیت، قادر نبودند در غلظت‌های بالاتر دیازینون رشد کنند. با این وجود، وقوع هم‌زمان فعالیت افزایش یافته و توانایی رشد در غلظت‌های بالا دیازینون کم‌تر احتمال دارد. بنابراین، سویهٔ IRLM1.F2 را با افزایش فعالیت (۵۷/۷ برابر بیش‌تر از سویه‌های نوع وحشی) و توانایی رشد در غلظت-های بالای دیازینون (تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) پس از یک دور برزدن ژنوم، با موفقیت به‌دست آوردیم.

نتیجه‌گیری

انتخاب روش باید مطابق با هدف مطالعه باشد. برزدن ژنوم به‌راحتی و به‌سرعت می تواند ویژگی‌های میکروارگانیسم‌ها را به‌منظور استفاده در کاربردهای تجاری مورد استفاده قرار دهد. براساس نتایج ما، سویهٔ IRLM1.F2 می‌تواند به‌عنوان سویهٔ نامزد برای تولید صنعتی برای اهداف بهبود زیستی به-ویژه در تصفیه فاضلاب درنظر گرفته می‌شود. هم‌چنین این سویه می‌تواند برای شناسایی جهش‌های مسئول بهبود فعالیت و تحمل به غلظت‌های بالای سم، مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق زیر نظر و با حمایت مالی در دانشگاه علوم پزشکی بقیه اللهُ بخش بیوتکنولوژی به انجام رسیده است که بدین‌وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- Narang U, Narang P, Gupta O. Organophosphorus poisoning: A social calamity. Journal of Mahatma Gandhi Institute of Medical Sciences. 2015;20(1):46.

2- Gianessi LP. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. Pest management science. 2013;69(10):1099-105.

3- Shimazu M, Nguyen A, Mulchandani A, Chen W. Cell Surface Display of Organophosphorus Hydrolase in Pseudomonasputida Using an Ice-Nucleation Protein Anchor. Biotechnology progress. 2003;19(5):1612-4.

4- Diaz Casas AZ. Bioremediation of the organophosphate methyl parathion using genetically engineered and native organisms: Texas A&M University; 2005.

5- Serdar CM, Murdock DC, Rohde MF. Parathion hydrolase gene from Pseudomonas diminuta MG: subcloning, complete nucleotide sequence, and expression of the mature portion of the enzyme in Escherichia coli. Bio/technology. 1989;7(11):1151.

6- Mulbry WW, Karns JS. Parathion hydrolase specified by the Flavobacterium opd gene: relationship between the gene and protein. Journal of Bacteriology. 1989;171(12):6740-6.

7- Latifi AM, Karami A, Khodi S. Efficient surface display of diisopropylfluorophosphatase (DFPase) in E. coli for biodegradation of toxic organophosphorus compounds (DFP and Cp). Applied biochemistry and biotechnology. 36-624: (3) 177. 2015

8- Leja K, Myszka K, Czaczyk K. Genome shuffling: a method to improve biotechnological processes. BioTechnologia Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology. 2011;92(4).

9- Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, Perry K ,Stemmer WP, Ryan CM, et al. Genome shuffling of Lactobacillus for improved acid tolerance. Nature biotechnology. 2002;20(7):707.

10- Zhang Y, Liu S, Du Y, Feng W, Liu J, Qiao J. Genome shuffling of Lactococcus lactis subspecies lactis YF11 for improving nisin Z production and comparative analysis. Journal of dairy science. 2014;97(5):2528-41.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2022-01-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.6.3]

www.SID.ir