مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و سوم - تابستان ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

مقایسه روش های سنجش فعالیت آنزیم تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره با استفاده از تکنیک های اسپکتروسکوپی، FPLC و ISE

صفرعلی احمدی زاد فیروزجائی[۱]، سمانه خودی[۲]، علی محمد لطیفی[۲*]، شمس الضحی ابوالمعالی[۳]

۱. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده بیوفناوری، پردیس علوم و فناوری های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه تولید آنزیم های با قابلیت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره مثل ارگانوفسفات هیدرولاز(OPH) شناسایی از اهمیت ویژهای برخوردار است. تولید این آنزیم ها با کارایی بالا یکی از اهداف مهندسی پروتئین است. بنابراین استفاده از تکنیک های کارا برای اندازه گیری فعالیت آنزیم مهم می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق از تکنیک سنجش یونی جهت بررسی میزان تجزیه دی ایزوپروپیل فلوروفسفاتاز(DFP)و با تکنیک اسپکتروسکوپی و FPLC جهت سنجش میزان تجزیه دیازینون و کلرپیریفوس استفاده شد. و نتایج حاصل از این سنجش ها با هم مقایسه گردید.

یافته ها: تکنیک الکترود انتخابی یون فلوئور (ISE) برای DFP روش خوبی است. در مورد کلرپیریفوس و دیازینون به دلیل تغییرات جذبی نوری محصولات حاصل از واکنش اسپکتروسکوپی روشی مناسب می باشد. روش FPLC را می توان برای اکثر سوبسترا ها استفاده نمود و روشی بهینه مطرح می گردد.

بحث: در روش FPLC همه سوبسترا ها قابلیت استفاده دارند به جهت اینکه در این مورد بررسی جذب انواع نمونه ها در طول موج های مختلف با اختلاف جذب و اختلاف غلظت معنی داری امکان پذیر می باشد به همین خاطر روشی با حساسیت بالا جهت سنجش عملکرد معرفی می شود.

نتیجه گیری: انتخاب روش دقیق در بررسی عملکرد یک محصول پروتئینی در برآورد میزان کارایی روش تولید آن محصول بسیار مهم می باشد.

کلمات کلیدی: ارگانوفسفات ها، سنجش فعالیت آنزیم ، FPLC، اسپکتروسکوپی، ISE

مقدمه

تا به امروز آنزیم های متعددی با استفاده از مهندسی ژنتیک تولید گردید که کاربرد های متعددی نظیر پزشکی(۶)، صنعتی، محصولات کشاورزی(۳،۱۸) تولیدات دامی و کاربرد های زیست محیطی دارند. بسیاری از کشورهای صنعتی با تولید این محصولات درآمد های زیادی کسب می نمایند. یکی از زمینه هایی که تولید آنزیم ها در آن مورد توجه می باشد مسائل زیست محیطی می باشد. با پیشرفت صنعت و استفاده از ترکیبات شیمیایی متعدد، جهت بهره وری بالا در زمینه پزشکی و یا محیط زیست مشکلاتی هم از طریق این ترکیبات در محیط زیست به وجود آمد. یکی از این موارد آلودگی محیط زیست با ترکیبات ارگانوفسفره می باشد. امروزه ارگانوفسفات های متعددی در زمینه های های صنعتی، نظامی، کشاورزی مورد استفاده قرار می گیرند. سموم ارگانوفسفره برای اولین بار، حدود سال ۱۸۵۰، زمانی که موچنین[۱] تتراتیل پیروفسفات (TEPP)، را سنتز کرد، شناخته شدند. سنتز اولین ترکیب ارگانوفسفره، که شامل پیوند P-F بود، سال ها بعد توسط لانگ و وان روگر معرفی شد. گفته می شود گروس[۲] در سال ۱۹۵۲ اولین کسی

نویسنده مسئول :
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
پست الکترونیکی: amlatify@yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۴/۰۳/۱۹
تاریخ پذیرش:۹۴/۰۹/۲۸

1(moschenine)
2-Gross

است که عملکرد سمی ارگانوفسفات ها را، که غیر فعال نمودن آنزیم استیل کولین استراز(AChE)می باشد، بیان کرد(۱). سالانه تقریبا سه میلیون مسمومیت و سیصد هزار مورد مرگ در جهان در اثر ترکیبات ارگانوفسفره اتفاق می افتد(۲). این ترکیبات مشکلات بالینی متعددی را علاوه بر اثر بر روی استیل کولین بر روی سیستم های متعدد اعصاب و روان، سیستم های گوارشی، سیستم های تولید مثلی(۱۱،۱۷) و هم چنین با تولید مواد اکسیده بر روی ساختارهای لیپیدی، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها اثر می گذارند(۱۳). به خاطر این اثرهای زیان بار بالینی روش هایی برای سمیت زدایی این ترکیبات تا به امروز به کار رفته است که تجزیه آنزیمی این ترکیبات از بهترین روش برای این منظور می باشد(۱۴). در بین آنزیم هایی هم که مورد استفاده قرار گرفتند آنزیم OPH به عنوان یکی از مناسب ترین آنزیم ها معرفی گردید(۱۶). بعد از پی بردن به نقش این آنزیم، تولید صنعتی این آنزیم بسیار مورد توجه می باشد. تولید آنزیم با کیفیت و عملکرد خوب به مقدار زیاد، از معیار های بسیار مهم می باشند. استفاده از میکروارگانیسم های دارای رشد بالا و تکثیر زیاد و فاقد اپیدمی، برای این منظور مناسب می باشند(۹،۱۰). در تحقق این هدف مهندسی ژنتیک هم بسیار دارای اهمیت می باشد، دست ورزی های ژنتیکی با اهداف متعدد صورت می گیرد یکی از این اهداف تولید بالای یک محصول می باشد(۴،۸). بعد از تولید آنزیم، بررسی میزان عملکرد آنزیم برای محققان بسیار مهم می باشد برای بررسی فعالیت آنزیم با توجه به سوبسترا های آنزیم و هم چنین ویژگی های عملکردی آنزیم، می توان روش های سنجش فعالیت را برای آنزیم طراحی نمود.

برای بررسی میزان فعالیت آنزیم از روش های مختلف سنجش آنزیمی استفاده می گردد که یکی از این روش ها یون سنجی با استفاده از دستگاه سنجش یون[۳] می باشد. در این روش با استفاده از الکترود مخصوص یون فلوئور که در اثر تجزیه DFP که به عنوان یکی از سوبسترا های آنزیم می باشد تولید می گردد مورد استفاد قرار می گیرد(۷). روشی بسیار خوب و حساس می باشد و از قابلیت بالایی جهت سنجش عملکرد آنزیم برخوردار می باشد، اما در این مورد باید محصولات تولیدی آنزیم، یون باشد تا قابل سنجش باشد. روش دیگری که برای سنجش عملکرد آنزیم استفاده می شود استفاده از اسپکتروسکوپی می باشد. در این روش بعد از اینکه سوبسترا ها در معرض آنزیم قرار گرفتند در اثر عملکرد آنزیم تغییرات در میزان جذب نوری محلول واکنش ایجاد می گردد. که از این تغییر ایجاد شده در اثر تغییر جذب به میزان عملکرد آنزیم پی برد(۱۲). روش دیگر مورد استفاده برای این منظور FPLC می باشد که در این روش سنجش عملکرد آنزیم بر اثر تغییرات میزان جذب مواد به فاز ثابت می باشد(۵). در این تحقیق از این روش ها با سوبسترا های مختلف این آنزیم، جهت بررسی فعالیت آنزیم OPH استفاده شد. تا روشی مناسب جهت بررسی فعالیت آنزیم OPH در تجزیه هر کدام از سوبسترا ها تعریف شود و میزان کارایی این روش ها در بررسی فعالیت آنزیم در تجزیه سوبسترا ها، مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و رو ش ها:

مطالعه به صورت آزمایشگاهی بوده است. آزمایش در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام شد.

۱. سنجش فعالیت آنزیم OPH با استفاده از دستگاه یون سنج

الکترود مخصوص سنجش یون فلوراید مورد استفاده در این دستگاه حاوی غشای تک کریستالی است. این الکترود برای تشخیص یون فلوراید در محلول های آبی طراحی شده است. که جهت سنجش یون ها هم در آزمایشگاه و هم در محیط مناسب می باشد. فلوراید یون آنیون تک ظرفیتی است و دارای وزن مولی ۱۸/۹۹ گرم می باشد. سنجش میزان یون فلوئور درون محلول تیزاب انجام گرفت. محلول تیزابی که برای این منظور استفاده گردید حاوی ۵/۸٪ Nacl(w/v) ، ۵/۷٪ اسید استیک (v/v) با pH ۵/۵ بود. این محلول فاقد یون فلوئور می باشد. برای این کار نیاز به محلولی با قدرت یونی پایین و PH بین ۴ تا ۸ می باشد که این مؤلفه ها در محلول تیزاب موجود می باشد.

۹ میلی لیتر از محلول TISAB به درون یک ظرف ریخته و ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی سوبسترای DFP با غلظت ppm ۵۰۰ و یک میلی لیتر از محلول حاوی آنزیم، به آن اضافه گردید و در فواصل زمانی ۰، ۵ و ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ION METER غلظت یون فلوئور سنجیده شد.

۳. بررسی فعالیت آنزیم OPH با تکنیک اسپکتروسکوپی

اساس این روش، استفاده از دستگاه جذب برای ارزیابی غلظت آنالیت در نمونه است. در این روش با استفاده از قانون بیرلامبرت غلظت نمونه ها از طریق میزان جذب نور محاسبه می شود. از آن جا که الکترون های یک اتم با جذب طول موج مشخص به سطح انرژی بالاتر می روند و در حالت برانگیخته در می آیند که این مقدار انرژی جذب شده برای هر اتم با اتم دیگر متفاوت می باشد. باریک بودن پرتو نور در این روش موجب می شود تا انرژی خاصی تولید شود که این روش بسیار دقیق می باشد. در این روش با برگشت اتم برانگیخته به حالت پایه طول موج مشخصی از خود ساطع می کند با اندازه گیری میزان جذب نمونه و رسم منحنی کالیبراسیون و قانون بیرلامبرت به میزان نمونه مجهول

3-ION METER.

در نمونه پی برده می شود.

در این روش ابتدا محلول واکنش به صورت زیر آماده گردید: به طور جداگانه مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر یک از محلول های حاوی آنزیم مورد نظر با ۸۹۰ میکرولیتر بافر PBS و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای حارگانوفسفره (کلرپیریفوس ۲۰ mM و دیازینون ۲۰ mM) مخلوط گردید. به محض اضافه نمودن سوبسترا (زمان صفر) ، بعد از ۲ دقیقه و ۳ دقیقه میزان سوبسترا با استفاده از دستگاه طیف سنج در طول موج nm ۲۱۵ و ۲۸۰ nm (برای ترکیب کلرپیریفوس) و ۲۴۵ nm (برای ترکیب دیازینون) اندازه گیری شد.

۴ . بررسی فعالیت آنزیم OPH با استفاده از FPLC

برای این منظور از دستگاه ACTA Purifier استفاده شد که دارای قابلیت بررسی نمونه ها با سه طول موج مختلف است. یکی از مزیت های دیگر این دستگاه این است که به طور هم زمان می توان غلظت سوبسترا و محصولات را اندازه گیری نمود. هم چنین از این دستگاه جهت جداسازی اجزای یک مخلوط به منظور شناسایی و تعیین مقدار استفاده نمود.

در همه ی روش های کروماتوگرافی، جداسازی بر پایه تفاوت مقداری ماده مورد جداسازی در دو فاز ساکن[۴] و متحرک[۵] انجام می شود. در این تکنیک ۵/. میلی لیتر از نمونه مطالعه شده (نمونه هایی که در معرض ترکیب ارگانوفسفره بودند بعد از ۳ دقیقه به ۲ میلی لیتر به ویال HPLC و توسط HPLC مورد سنجش قرار گرفت. و FPLC با شرایط زیر انجام گرفت: ستون Zorbax SB- C۱۸ (۵ Rm ,۴.۶ mm^۲ × ۲۵۰)، در دمای محیط فاز متحرک حاوی استونیتریل (۸۰ درصد) آب مقطر (۱۹/۵ درصد) و استیک اسید (۰/۵ درصد) سرعت جریان ml/min ۱/۵ تغییرات در طول موج nm ۲۱۵ (برای ترکیب کلرپیریفوس) و ۲۴۵ nm (برای ترکیب دیازینون) اندازه گیری شد.

به منظور بررسی فعالیت آنزیم، ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم مورد نظر با ۸۹۰ میکرولیتر بافر PBS و ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای کلرپیریفوس و دیازینون و هم چنین TCP ۲۰mM مخلوط گردید. بعد از ۳ دقیقه میزان سوبسترای کلرپیریفوس و پس از ۳، ۵، ۱۰ دقیقه میزان سوبسترای دیازینون با استفاده از تکنیک FPLC و حسگر UV اندازه گیری شد. دستگاه HPLC دارای مشخصات شرایط و میزان تزریق و هم چنین طول موج مورد مطالعه برای هر یک از ترکیبات در جدول شماره ۱ آمده است.

کلرپیریفوس	شرایط FPLC
ستون	C18(25 cm × 4.6 mm)
دمای ستون	۳۰ °C
سرعت جریان ستون	۱ Ml/min
حساسیت آشکارساز	۰/۰۵
حجم تزریق	۲۰ میکرولیتر
فاز متحرک	استونیتریل (۸۰٪) آب (۱۹/۵ ٪) اسیداستیک(۰/۵٪)

جدول ۱: شرایط دستگاه FPLC

یافته ها

۱ . نتایج بررسی فعالیت آنزیم DFPase با استفاده از یون سنج

انواع محلول ها	میزان فلوراید آزاد شده در زمان صفر	میزان فلوراید آزاد شده پس از ۵ دقیقه	میزان فلوراید آزاد شده پس از ۱۰ دقیقه
محلول فاقد آنزیم	صفر	**0.000ppm**	**0.001**
محلول حاوی OPH	صفر	**0.05**	**0.07**

جدول ۲: بررسی میزان فلوراید تولید شده با دستگاه یون متر

نمونه حاوی آنزیم تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره تولید میزان ۰/۰۵ و ۰/۰۷ ppm یون فلوراید را به ترتیب در مدت زمان ۵ و ۱۰ دقیقه نشان داد، در حالی که در نمونه فاقد آنزیم پس از گذشت ۱۰ دقیقه یون فلوراید قابل قابل مقایسه ایی تولید نشد.

روش محاسبه فعالیت در این روش به صورت زیر می باشد:

$$R = C_{\Delta} - C_{substrate}\left[\frac{E_1}{V_1 xT}\right]$$

R = میکرومول /دقیقه/ فعالیت آنزیم در میلی لیتر

C_{Δ} =غلظت ابتدایی(میکرومولار) – ۴غلظت در دقیقه

$C_{substrate}$ = سرعت تجزیه خودبخودی DFP

C = غلظت یون فلوراید به میکرومول اندازه گیری شده از یون متر

E1 = 1/E

E = حجم نمونه به میلی لیتر

$V1 = 1000/V$

V = حجم کل مورد سنجش ۱۰ میلی لیتر

4- Stationary Phase
5-Mobile Phase

۱۰- ۵ دقیقه = Tزمان

۲ . نتایج بررسی فعالیت آنزیم OPH با روش اسپکتروسکوپی

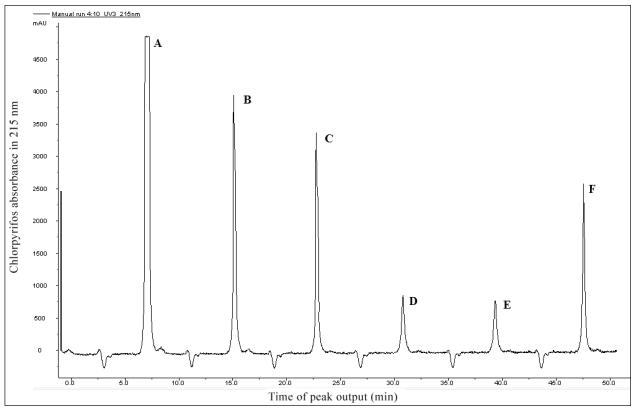
از آنجایی که طول موج ۲۱۰ در طیف نور UV است، دقت دستگاه نتایج قابل مقایسه ایی را نشان نداد و طول موج مطلوب برای بررسی غلظت کلرپیریفوس به روش اسپکتروسکوپیnm ۲۸۰ به دست آمد. نتایج تجزیه حدود ۵۷٪ ترکیب کلرپیریفوس را نشان داد. نتایج قابل تفسیری در مورد ترکیب دیازینون نیز در طول موج ۲۴۵ به روش اسپکتروسکوپی مشاهده نشد.

Bacteria	$OD_{2\Lambda\cdot}$ T=0	$OD_{2\Lambda\cdot}$ T=2	$OD_{2\Lambda\cdot}$ T=3
Negative Control	1.1~	1.1~	1.1~
Cells harboring OPH	1.1~	0.573	0.376

جدول ۳: بررسی جذب نوری سم کلرپیریفوس به روش اسپکتروسکوپی

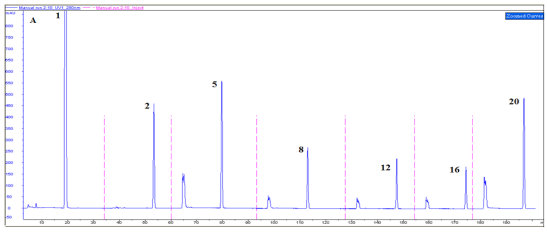
۳ . نتایج بررسی فعالیت آنزیم OPH با روش FPLC

بررسی تجزیه سم کلرپیریفوس به روش FPLC در شکل ۱ مشاهده می شود. پیک A نمونه استاندارد سم می باشد. پیک های B و C به ترتیب محلول فاقد باکتری و محلول واجد باکتری فاقد آنزیم پس از ۳ دقیقه هستند. پیک های D و E میزان جذب کلرپیریفوس پس از ۳ دقیقه در معرض قرار گرفتن محلول واجد آنزیم OPH را نشان می دهند. پیک F نیز نمونه کنترل فاقد آنزیم پس از گذشت ۱۰ دقیقه می باشد که در این مورد نیز تجزیه قابل توجهی نسبت به نمونه های تست مشاهده نمی شود.



شکل ۱: بررسی میزان کلرپیریفوس تجزیه شده به روش FPLC، A) نمونه استاندارد سم، B) نمونه کنترل فاقد باکتری. C) نمونه حاوی باکتری کنترل، D، E) نمونه تست حاوی آنزیم بعد از ۳ دقیقه، F) نمونه حاوی باکتری کنترل بعد از ۳ دقیقه

بررسی تجزیه دیازینون در شکل ۲ نشان داده شده است. پیک های ۵ و ۲۰ مربوط به نمونه کنترل می باشند که میزان جذب بالای سم را نشان می دهند که بیانگر وجود مقدار زیاد دیازینون است. پیک های ۸، ۱۲ و ۱۶ بترتیب میزان جذب دیازینون بعد از ۳، ۵ و ۱۰ دقیقه را نشان می دهد، که این نتایج نشان دهنده تجزیه این ماده در محلول حاوی آنزیم است.



شکل ۲: بررسی میزان دیزانیون تجزیه شده به روش FPLC. ۱)نمونه استاندارد سم، ۲) نمونه کنترل فاقد باکتری. ۵) نمونه حاوی باکتری کنترل، ۸و ۱۲ و ۱۶) نمونه تست حاوی آنزیم بعد از ۳ ، ۵ و ۱۰ دقیقه، ۲۰) نمونه حاوی باکتری کنترل بعد از ۳ دقیقه

روش مورد استفاده	مزایا	معایب
یون متر	مناسب جهت ارزیابی میزان یون تولیدی، حساسیت مناسب	گران قیمت، محدود به تولید یون
FPLC	دقت بالا	عدم ثبات اعداد مربوط به میزان جذب در طول موج پایین
اسپکتروسکوپی	دامنه وسیع کاربردی در زمینه های مختلف	احتمال خطا بدلیل وجود آلودگی

جدول ۴: مقایسه روش های مورد استفاده

بحث

بررسی میزان فعالیت آنزیم یکی از مسائل مهم جهت تولید صنعتی آن می باشد. در تولیدات صنعتی تولید آنزیم به مقدار زیاد دارای فعالیت بالا، یکی از اهداف مهم محسوب می شود. به همین خاطر طراحی آزمایشی جهت بررسی میزان فعالیت حائز اهمیت می باشد. در این تحقیق استفاده از روش های گوناگون و هم چنین سوبسترا های مختلف جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم OPH که به صورت بیان سطحی تولید شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم OPH یکی از آنزیم های خوب جهت بررسی فعالیت آنزیمی با روش های گوناگون می باشد. زیرا این آنریم بر روی سوبسترا های مختلف عمل می کند که هر یک از این سوبسترا ها دارای ویژگی خاصی جهت سنجش عملکرد آنزیمی می باشد. موادی نظیر دیازینون، کلرپیریفوس، DFP از جمله سوبسترا های این آنزیم می باشند(۱۶). با توجه به ویژگی های سوبسترا ها روش هایی که برای سنجش فعالیت به کار گرفته می شوند با کیفیت متنوع متناسب با سوبسترا می تواند دارای نتیجه باشد. یکی از سوبسترا های این آنزیم DFP می باشد(۱۵). در

مورد DFP با توجه به ساختار این ماده که عملکرد آنزیم بر روی آن سبب شکست پیوند P-F می گردد که بهترین روش برای سنجش آن استفاده از دستگاه یون سنج می باشد. در روش های دیگر هیچ گونه یونی تولید نمی گردد که قابل سنجش باشد به همین جهت یکی از بهترین روش جهت بررسی عملکرد آنزیم در تجزیه DFP همان یون سنجی می باشد. این روش از این جهت که مواد آن گران قیمت است و هم چنین محدود به تولید یون می باشد در مورد همه سوبسترا ها نمی تواند به کار رود. در روش اسپکتروسکوپی که در این مورد کلرپیریفوس به عنوان سوبسترا استفاده شد در حضور آنزیم جذب نوری بعد از ۳ دقیقه نصف گردید. که این نشان دهنده این است که رسوب حاصل از ۱/۵ میلی لیتر از باکتری های بیان کننده OPH (۱ = OD) قادر است در مدت ۳ دقیقه حدود ۵۰ درصد از کلرپیریفوس mM ۲۰ را تجزیه کند. در این روش بر اساس تغییر جذب نوری به میزان فعالیت آنزیم پی برد. البته در این روش احتمال خطا بدلیل وجود آلودگی ها و هم چنین کدورت وسایل مورد استفاده وجود دارد. اما در مورد FPLC که استفاده شد می توان نمونه ها را با دقت بالا مورد بررسی قرار داد. که این مزیتی بر روش های دیگر است البته در مورد مزیت FPLC نسبت به اسپکتروسکوپی می توان به دقت بالای FPLC در تعیین غلظت نمونه ها اشاره کرد که در FPLC میزان جذب بر اساس mAu می باشد اما در اسپکتروسکوپی میزان جذب بر اساس Au می باشد که این نشان دهنده حساسیت و دقت بالاتر FPLC نسبت به اسپکتروسکوپی می باشد. هم چنین دامنه دقت FPLC نسبت به اسپکتروسکوپی بیش تر می باشد. یکی از مشکلاتی که در روش اسپکتروسکوپی وجود دارد این است که اعداد مربوط به میزان جذب نوری در طول موج پایین ثابت نمی ماند. اما FPLC عملکرد خوبی را در طول موج های مختلف حتی در دامنه نور UV نشان می دهد. لرزش های محیطی بر میزان عملکرد دستگاه FPLC در مقایسه با اسپکتروسکوپی کم تر تأثیر گذار می باشد. با توجه به موارد بالا می توان نتیجه گرفت که هر روشی با توجه به سوبسترای خاص خودش می تواند روشی بهتر باشد. اما در مجموع روش FPLC از حساسیت و دقت و عمومیت بالاتری نسبت به روش های دیگری برخوردار است.

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت دست یابی به روش های مناسب جهت ارزیابی عملکرد محصول در فرایند تولید صنعتی، استفاده از ابزار و موادی که در تحقق این مهم بتواند کمک کننده باشد از جایگاه ویژه ای در فرایند تولید محصول به خصوص آنزیم برخوردار است. در این تحقیق روش های مختلف و هم چنین سوبسترا های مختلف جهت بررسی عملکرد آنزیم OPH استفاده شد که ارزیابی نتایج نشان دهنده برتری روش FPLC نسبت به روش های دیگر می باشد.

سپاسگزاری

از کلیه کارمندان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله به خصوص از جناب آقای محمد هیئت که در این تحقیق به ما یاری رساندند، کمال تشکر و سپاس داریم.

منابع

1. Aluigi, M., et al., Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. Chemico-Biological Interactions, 2005. 157: p. 305-316.
2. Bird, S.B., et al., OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides. Toxicology, 2008. 247(2): p. 88-92.
3. Bochtis, D.D., C.G. Sørensen, and P. Busato, Advances in agricultural machinery management: A review. Biosystems Engineering, 2014. 126 :p. 69-81.
4. Carroad, P.A. and C.R. Wilke, Enzymes and microorganisms in food industry waste processing and conversion to useful products: A review of the literature. Resource Recovery and Conservation, 1978. 3(2): p. 165-178.
5. Cattan, A.R. and J. Smith, Computer control of fast protein liquid chromatography (FPLC). Computers in biology and medicine, 1990. 20(2): p. 95-101.
6. Ciftci, K. and P. Trovitch, Applications of genetic engineering in veterinary medicine. Advanced drug delivery reviews, 2000. 43(1): p. 57-64.
7. Ficklin, W.H., A rapid method for the determination of fluoride in rocks and soils, using an ion selective electrode. US Geol. Surv. Paper C, 1970. 700: p. 18188-6.
8. Godfrey, T. and J. Reichelt, Industrial enzymology: the application of enzymes in industry. 1982.
9. Jang, Y.-S., et al., Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches. Biotechnology advances ,(5)30.2012 :p. 989-1000.
10. Jin, H., et al., *Engineering biofuel tolerance in non-native producing microorganisms.* Biotechnology advances, 2014. **32**(2): p. 541-548.
11. Klotz, D.M., et al., *Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays.* Environmental health perspectives, 1996. **104**(10): p. 1084.
12. Lakowicz, J.R. and C.D. Geddes, *Topics in fluorescence spectroscopy*. Vol. 1. 1991: Springer.
13. Mehta, A., R.S. Verma, and N. Srivastava, *Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver.* Pesticide biochemistry and physiology, 2009. **94**(2): p. 55-59.
14. Ojha, A., S.K. Yaduvanshi ,and N. Srivastava, *Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues.* Pesticide biochemistry and physiology, 2011. **99**(2): p. 148-156.
15. Rastogi, V.K., et al., *Enzymatic hydrolysis of Russian-VX by organophosphorus hydrolase.* Biochemical and biophysical research communications, 1997. **241**(2): p. 294-296.
16. Samaneh, K., M. Saadati, and H .Aghamollaei, *Surface display of organophosphorus hydrolase on E. coli using N-terminal domain of ice nucleation protein InaV.* J. microbiology and biotechnology, 2012. **22**(2): p. 234-238.
17. Scippo, M.-L., et al., *Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors.* Analytical and bioanalytical chemistry, 2004. **378**(3): p. 66.669-4-
18. Verma, S.R. and U. Dwivedi, *Lignin genetic engineering for improvement of wood quality: Applications in paper and textile industries, fodder and bioenergy production.* South African J. Botany, 2014. **91**: p. 107-125.