



Scan online to view this article

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

Morteza Mirzaei <sup>1</sup>, Mona Rastegar Shariat Panahi <sup>2</sup>, Enayat Ghahremani <sup>1</sup>, Ehsan Rezae <sup>3</sup>, Rezvan Seid Moradi <sup>1</sup>, Gholamreza Farnoosh<sup>1</sup>, Ali Mohammad Latifi <sup>1,\*</sup>

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

Corresponding author:

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

برای مشاهده این مقاله به صورت  
آنلاین اسکن کنید

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

مرتضی میرزابی<sup>۱</sup>، مونا رستگار شریعت پناهی<sup>۲</sup>، عنايت قهرمانی<sup>۱</sup>، احسان رضایی<sup>۳</sup>، رضوان

صید مرادی<sup>۱</sup>، غلامرضا فرنوش<sup>۱</sup>، علی محمد لطیفی<sup>۱\*</sup>

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، انتستیتوی زیست‌شناسی و مسمومیت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

### چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** سویه وحشی سودوموناس آتروژینوزا به شماره دسترسی JQ917006.1 تهیه گردید. سویه‌های جهش یافته به روش DES و سازگاری با غلظت دیازینون بررسی شدند. پس از آماده سازی پروتوبلاست، برزدن ژنوم انجام شد که از کتابخانه جهش یافته حاصل شده بود. پروتوبلاست‌های الحاقی از نظر فعالیت بررسی شدند.

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

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از ارزیابی نسل اول ژنوم شافلینگ (دور اول فیوژن پروتوبلاست) نشان داد که سویه‌های برخورده (شافل شده) که قادر به رشد در مجاورت توکسین (۳۰۰۰ میلی‌لیتر در لیتر غلظت دیازینون) بودند، فعالیت بهتری نسبت به 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 پرتوئین، دیازینون

های ارگانوفسفره شامل مالاتیون، دیکلورووس 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 نسبت به انسان و سایر موجودات زنده ایجاد کرده است. به منظور غلبه بر این مشکل، تلاش‌های زیادی صورت گرفته و روش‌های متفاوتی برای از بین بردن آلودگی ناشی از

### مقدمه

تاریخچه استفاده از آفت‌کش‌های ارگانو فسفاته برای مصارف کشاورزی به دهه‌های قبل باز می‌گردد. تعدادی از ترکیب-

### 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

توسط استرپتومایسیس فرادیه (*Streptomyces fradiae*) مورد استفاده قرار گرفت. امروزه در بسیاری از آزمایش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌ها توسط سویه‌های باکتریایی، بهبود جذب سوبسترا و افزایش تحمل سویه استفاده می‌شود. بروز دهنده نیز 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 ویژگی‌های سودوموناس آئروزینوزا (*aeruginosa Pseudomonas*) به منظور تجزیه دیازینون انجام شد. مقاومت در مقابل سمیت سموم ارگانوفسفره و همچنین افزایش فعالیت سلول از اهداف این مطالعه هستند. هدف اصلی به دست آوردن سویه جهش یافته‌ای 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

سویه وحشی سودوموناس آئروزینوزا 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 سویه IRLM.1 متابولیت‌ها از سودوموناس آئروزینوزا در محیط کشت MSM حاوی ۲٪ گلوکز، ۰/۲g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۵g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  و ۵۰mg/L KCL بدون حضور دیازینون و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا  $\text{OD}_{600}$  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 مرحله

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

مطالعه‌های قبلی ثابت کردند که برخی از میکروارگانیسم‌ها قادر به تخریب ترکیب‌های سمی خاصی هستند (۴). چندین باکتری جدا شده از جمله گونه‌های *فلاؤبacterium* (Flavobacterium) و *Pseudomonas diminuta* (MG) نشان داده‌اند که قابلیت‌های قابل توجهی برای هیدرولیز کردن ترکیب‌های ارگانو فسفره دارند (۵,۶). گونه‌های سودوموناس به عنوان 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 استفاده 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 به طور گستردگی 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 به طور معمول با ترکیب (فیوزن) پروتوبلاست انجام می‌شود که پروسه نوترکیبی را افزایش می‌دهد. روش بروز دهنده نیز در ابتدا توسط Stemmer و همکارانش در سال ۲۰۰۲ ارائه شد که برای بهبود تولید تیلوزین (Tylosin)

کتابخانه جهش یافته به دست 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 به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. کلنجی‌ها بر اساس بزرگی میزان هاله انتخاب شدند.

کلنجی‌های انتخاب شده در محیط MSM حاوی دیازینون (۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تلقیح شدند. OD<sub>۶۴۶</sub> در ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از نانودرآپ، اندازه‌گیری شد. همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، تمام آزمایش‌های مربوط به دیازینون در شرایط تاریک به علت 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 به صورت 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<sub>2</sub> 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، کتابخانه جهش یافته‌ای بود که با افزایش سازگاری با غلظت دیازینون و عامل DES به دست آمد. پروتوپلاست‌های غیرفعال شده در نسبت ۱:۱ مخلوط و سپس سانتریفیوژ شده و دوباره به نسبت ۱:۹ در ۶۰۰۰PEG (۰/۶٪) و PB حل شده و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پروتوپلاست‌های الحاقی در ۵ میلی‌لیتر PB

بعد، رسوب باکتریایی به محیط MSM آگار حاوی ۰/۵g/L CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O ۵۰mg/L agar ۱/۵g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>۲</sub>SO<sub>۴</sub> ۰/۲g/L KCL ۰/۱g/L و NaCl بدون گلوکر، با ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون اضافه شد و سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

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

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

جمعیت اول توسط سازگاری شیمیایی به دست 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 به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در محلی تاریک نگهداری شدند تا از تجزیه 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<sub>600</sub> به ۰/۵ برسد. محیط کشت با ۰/۵٪، ۲٪، ۱٪، ۱/۵٪، ۲٪ و در نهایت ۳٪ (Sigma Aldrich) DES تیمار شدند و سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ دقیقه انکوبه شدند. سوسپانسیون باکتریایی سانتریفیوژ شده (۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت 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

## نتایج

**ایجاد جمعیت سویه‌های اولیه برای بروزدن ژنوم**  
 اولین جمعیت کتابخانه جهش یافته سازگار با افزایش غلظت دیازینون از ۱۰۰۰ تا ۳۳۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ۱۲۰۰ ساعت به دست آمد. سویه‌های جهش یافته میلی‌لیتر (IRLM1.G) قادر به رشد در غلظت ۳۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دیازینون بودند در حالی که سویه وحشی به-سختی در ۲۹۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد کرد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.

سانتریفوژ گردیدند. سپس در محیط احیاء کننده (۲۰ میلی‌مولا رکلرید منیزیم، ۵٪ میلی‌مولا ساکارز و ۱۰٪.۵ BSA) به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند

## روش‌های آنالیزی

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

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	-	-	-

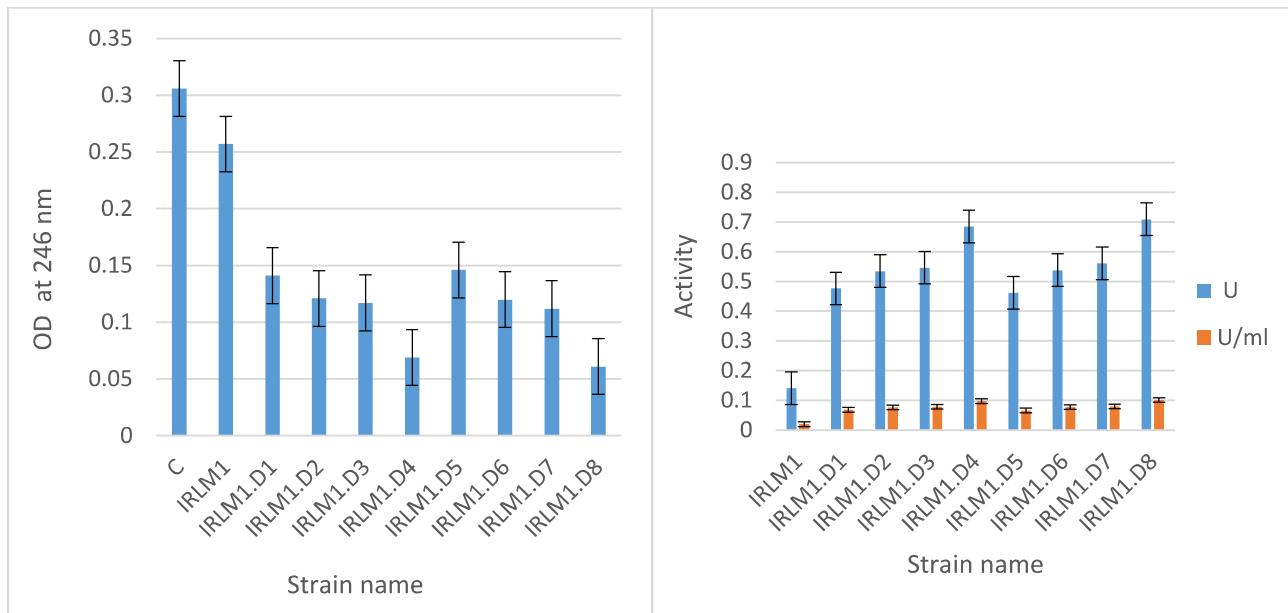
حاوی دیازینون از ۵٪ تا ۳ درصد تیمار DES کاهش یافت. رنگدانه سبز که مشخصه سودوموناس است، در میزان ۲٪ و

جمعیت دوم سویه‌های جهش یافته (IRLM1.D) با تیمار DES به دست آمد. تعداد کلنی‌های موجود در MSM آگار

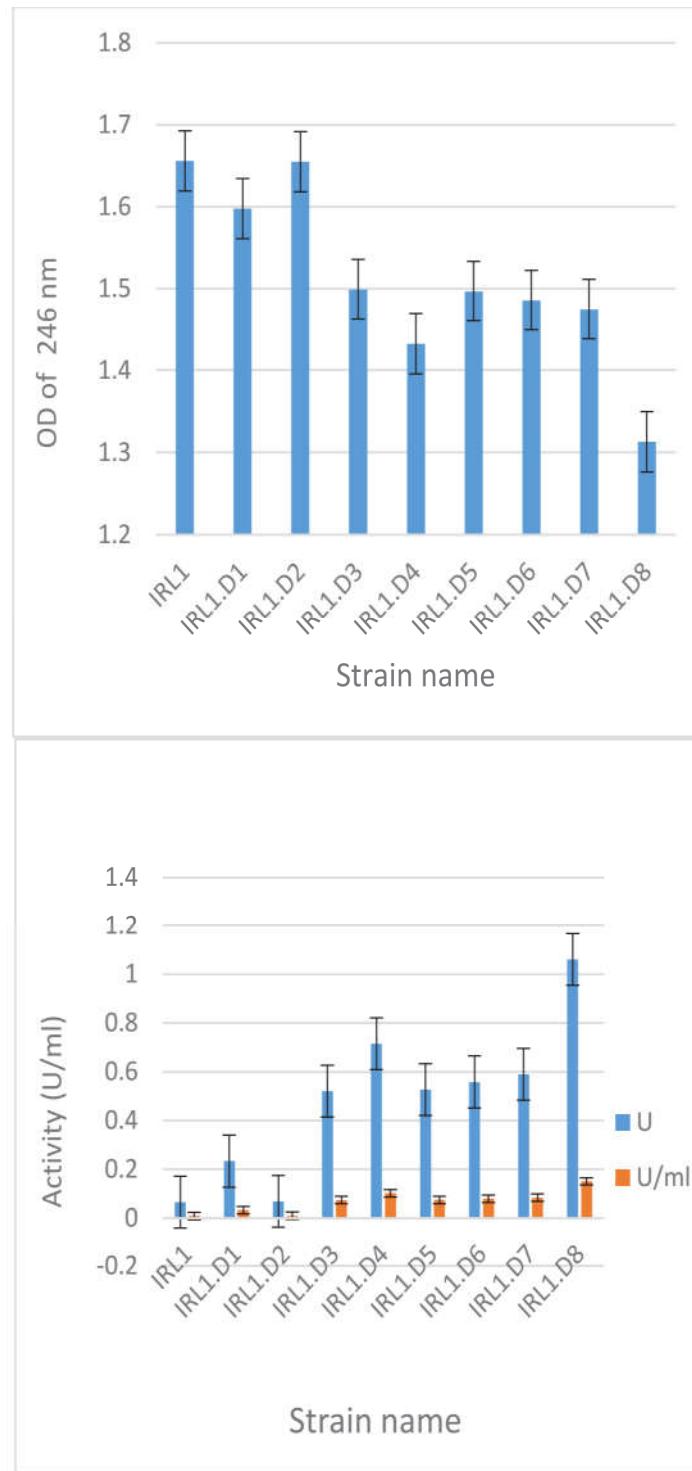
سویه‌های دیگر را نشان می‌دهد. بنابراین، سویه IRLM1.D8 به عنوان یکی از سویه‌های والد برای بزردن ژنوم در نظر گرفته شد.

۲٪ از DES تولید نمی‌شود. سویه‌های جهش یافته با توجه به مقدار هاله در LB آگار حاوی monocrotophos و سرعت تجزیه زیستی دیازینون انتخاب شدند. بنابراین، ۸ سویه جهش یافته برای بزردن ژنوم آماده شدند.

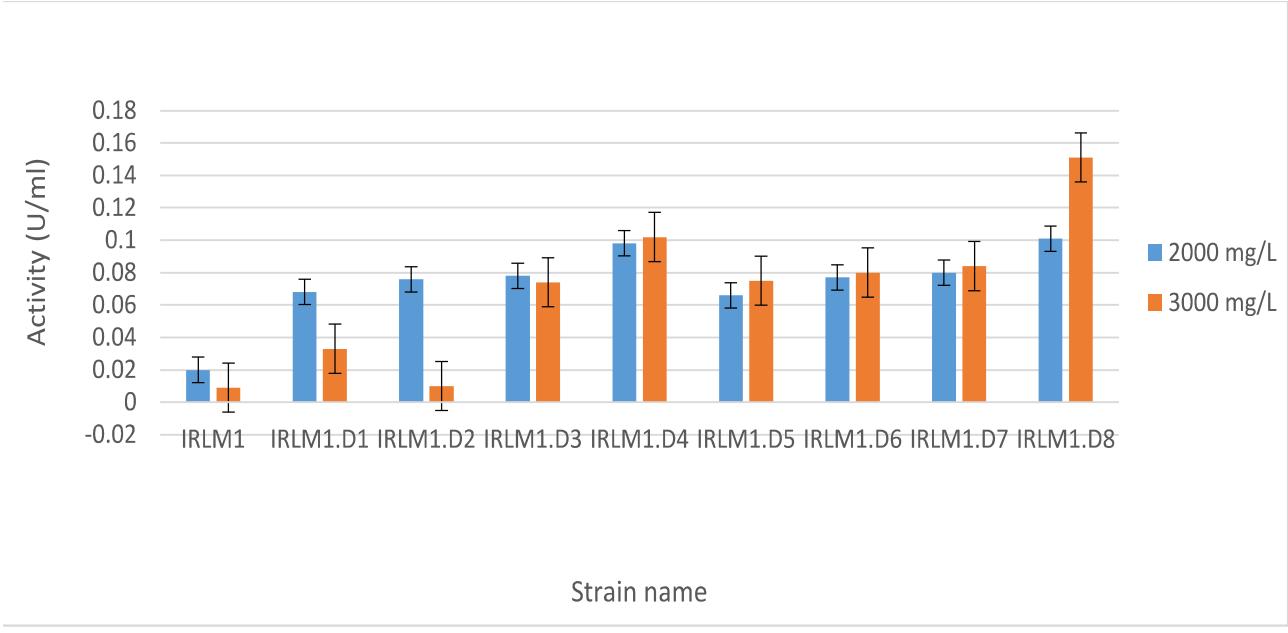
براساس نتایج جذب نوری بدست آمده، سویه‌های IRLM1.D8 و IRLM1.D4 نتایج رضایتبخشی نسبت به



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



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



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

مقابل، سویه بومی (IRLM1) تغییرهای جزئی در  $OD_{246}$  نسبت به نمونه غیر تلقیح شده نشان داد.

## بحث

تیمار زیستی ترکیب‌های ارگانوفسفره از خاک و آب سطحی یک وظیفه اساسی بشمار می‌رود. فلاوباكتریوم 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 به عنوان تنها منبع کربن، نیتروژن و فسفر استفاده کنند.

در مطالعه‌های مختلف، سویه‌های تجزیه کننده ترکیب‌های ارگانوفسفره برای از بین بردن آلودگی‌های محیط زیست معرفی شده‌اند. به منظور حذف این ترکیب‌ها از فاضلاب صنعتی، باکتری‌های تخریب کننده باید قادر به رشد در غلظت بالای ترکیب‌های ارگانوفسفره باشند تا قادر باشند این ترکیب‌ها را تجزیه کنند. سویه وحشی در مطالعه حاضر از خاک و پساب کارخانجات جدا شده است. در حالی که 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 (۲۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد کند. علاوه‌بر این، فعالیت این

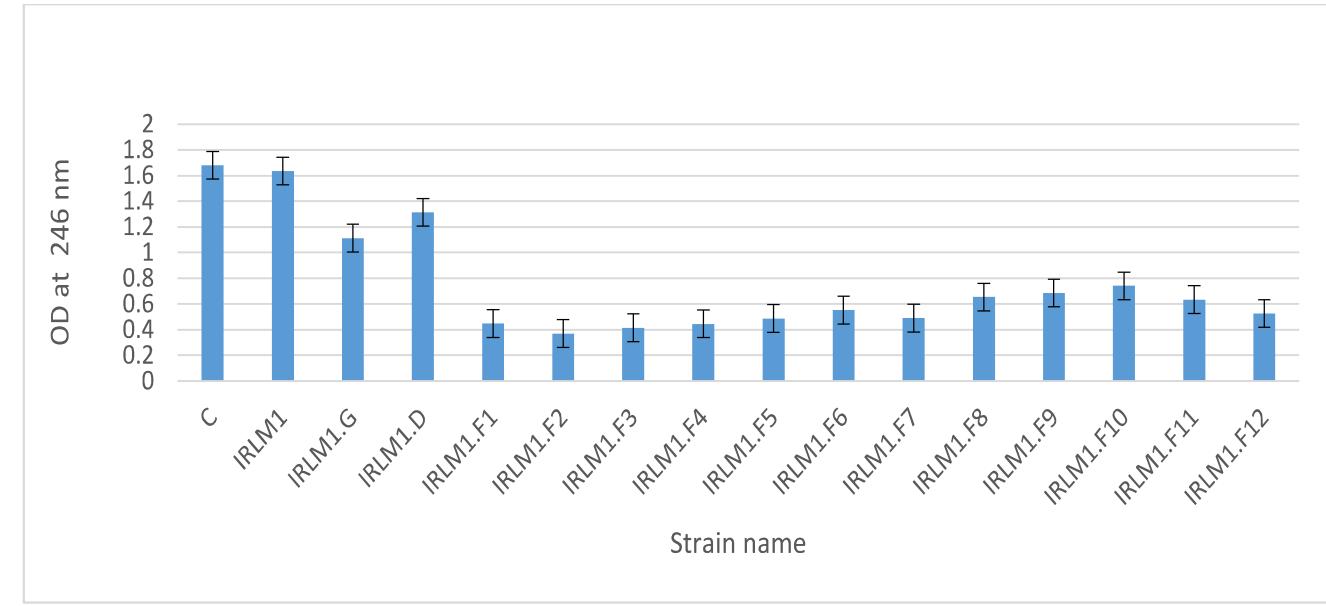
## بروزدن ژنوم و غربالگری

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

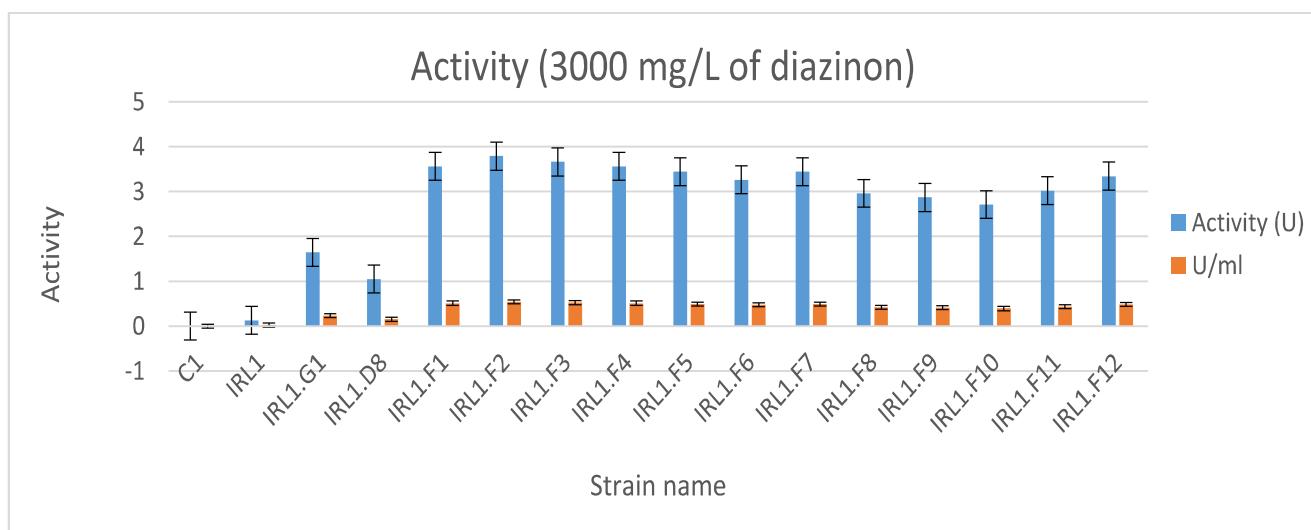
## Rشد باکتری و تجزیه زیستی دیازینون در MSM

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 ( $p < 0.05$ ) در میزان تجزیه بیولوژیکی سویه‌های بر خورده نسبت به سویه‌های والد (IRLM1.G و IRLM1.D) و هم‌چنین 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 سویه 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



شکل ۴- ارزیابی تخریب زیستی دیازینون (۳۰۰۰ میلی گرم/لیتر دیازینون) با استفاده از سویه های بر خورده.



شکل ۵- ارزیابی فعالیت کل سلول با استفاده از سویه بر خورده در ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون.

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

نمونه	۲۵۰۰ mg/L	بیش از 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	+	+	-	-

آوردن سویه IRLM1.D8 به عنوان یک سویه بهبود یافته کارآمد است. به طوری که فعالیت کل سلول توسط IRLM1.D8 تا ۵ و ۱۶/۷ برابر بیشتر از سویه 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 میلی‌گرم 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 تجزیه کنندگی را حتی در غلظت‌های بالای دیازینون مختل نمی‌کنند.

پس از یک دور بزرگ ژنوم و غربالگری، تمام سویه‌ها، فعالیت کل سلول را در ۳۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر دیازینون نشان دادند، به طوری که فعالیت کل سلول‌های IRLM1.F2 و IRLM.F3 به ترتیب به میزان  $0.54 \text{ U/ml}$  و  $0.52 \text{ U/ml}$  بود. این فعالیت  $60$  و  $57/7$  برابر بیشتر از سویه وحشی و  $3/5$  و  $3/4$  برابر بیشتر از سویه ابتدایی است. در مطالعه‌ای توسط Wang Ch (۲۰۱۳) و همکاران پس از ۶ دور بزرگ ژنوم،  $4/2$  برابر بهبود برای پنی‌سیلیوم سیترینوم و در مطالعه (۲۰۰۲) Patnaik R و همکاران پس از ۵ دور

از آنجایی که 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 به کار برده شده است. در مقایسه با سایر مطالعه‌های (۲۰۰۲) Patnaik و همکاران به منظور 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 ترکیب‌ها، نیازمند تغییرهای زیادی در ژنوم هستند که قابل پیش‌بینی نیستند. پس از سازگاری با ترکیب‌های ارگانوفسفره، سویه IRLM1.G قادر به تحمل و رشد در  $2250 \text{ mg/L}$  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. هم‌چنین ما مشاهده کردیم که جهش‌زایی DES برای به دست

## نتیجه‌گیری

انتخاب روش باید مطابق با هدف مطالعه باشد. برزدن ژنوم به راحتی و به سرعت می‌تواند ویژگی‌های میکرووارگانیسم‌ها را به منظور استفاده در کاربردهای تجاری مورد استفاده قرار دهد. براساس نتایج ما، سویه IRLM1.F2 می‌تواند به عنوان سویه نامزد برای تولید صنعتی برای اهداف بهبود زیستی به‌ویژه در تصفیه فاضلاب در نظر 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 الله بخش بیوتکنولوژی به انجام رسیده است که بدین‌وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

برزدن ژنوم ۳ برابر بهبودی برای لاکتوباسیلوس گزارش شد (۹). Zhang Y. F (۲۰۱۴) و همکاران همچنین بهبود ۲/۴ برابر لاکتوكوکوس لاکتیس را پس از ۴ دور به دست آورند (۱۰). یکی از تفاوت‌های عمیق بین مطالعه حاضر و سایر مطالعه‌ها، تعداد دورهای برزدن ژنوم است که تنها در یک دور نسبت به چندین مرحله از برزدن ژنوم در مطالعه‌های دیگر نتایج خوبی به دست آمد.

با این وجود، انتخاب روش نقش مهمی در به دست آوردن نتیجه نهایی ایفا می‌کند. در برخی از روش‌ها، نتایج نشان می‌دهند که تفاوتی بین نوع سویه وحشی و سویه برخورده 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 میکرووارگانیسم‌ها در بهبود تجزیه زیستی دارای مزایای خاصی از قبیل پایداری، سازگاری با محیط زیست، تولید مقرون به صرفه و آسان نیز است.

چندین باکتری با توالی‌های کمایش یکسان *opd* در سراسر جهان شناسایی شده‌اند. ژن مسئول تجزیه دیازینون و دیگر ارگانوفسفره‌ها، *opd* است. ژن ژنوم چندین باکتری وجود دارد.

اگر چه تمام سویه‌های 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، سویه IRLM1.F2 را با افزایش فعالیت (۵۷/۷ برابر بیشتر از سویه‌های نوع وحشی) و توانایی رشد در غلظت‌های بالای دیازینون (تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) پس از یک دور برزدن ژنوم، با موفقیت به دست آوردم.

- 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 *Pseudomonas putida* 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.