



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 Farnoosh¹, 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

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 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 روش‌های DNA شافلینگ انجام شده است.

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

یافته‌ها: فعالیت مربوط به سویه‌های IR1.D5 و IR1.D4، IR1.D8، IR1.G1 به‌ترتیب عبارتند از ۰/۳۴ U/ml، ۰/۸ mg/L و ۰/۹۸ U/ml و ۰/۰۶۶ U/ml و سویه‌های IRL1.F2 و IRL1.F3 و IRL1.F1 دارای فعالیت ۰/۵۴۱ mg/L، 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 برخورداره (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 پروتئین، دیازینون

مقدمه

تاریخچه استفاده از آفت‌کش‌های ارگانو فسفات‌ها 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

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

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 می شود. برزدن ژنوم یک نقطه عطف در تکنولوژی بهبود سویه ها و مهندسی متابولیک است (۸).

در این مطالعه، با استفاده از روش برزدن ژنوم، تلاش برای بهبود ویژگی های سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) 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 یافته ای است که می تواند در غلظت های بالای دیازینون رشد کند و از سوی دیگر نیز دیازینون را در مدت زمان کوتاهی تجزیه کند.

روش کار

سویه های باکتریایی

سویه وحشی سودوموناس آئروژینوزا به شماره مجموعه JQ917006.1 از فاضلاب های صنعتی (پساب های کارخانه های تولید آفت کش ها و خاک آلوده آنها) در ایران جدا شده است.

مواد شیمیایی و حلال ها

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

آزمون تحمل سویه های بومی در برابر دیازینون

در ابتدا سویه IRLM.1 جدا شده از سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت MSM حاوی ۲٪ گلوکز، ۵۰ mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۵۰ mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۲ g/L KCl، ۰/۱ g/L NaCl بدون حضور دیازینون و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا OD₆₀₀ به ۰/۵ برسد. سوسپانسیون باکتری سانتی فیوژ 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 ترکیب ها بکار گرفته شده اند. روش هایی مانند روش های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی می توانند به عنوان استراتژی های آلودگی زدایی در نظر گرفته شوند (۲). تجزیه زیستی به عنوان یک روش برجسته به علت برخی از ویژگی های مهم مانند اثر سریع، سازگار با محیط زیست، امن و تولید محصولات با سمیت کم تر شناخته می شود (۳).

مطالعه های قبلی ثابت کرده اند که برخی از میکروارگانیسم ها قادر به تخریب ترکیب های سمی خاصی هستند (۴). چندین باکتری جدا شده از جمله گونه های فلاووباکتریوم (*Flavobacterium*) و سودوموناس دیمینوتا ام جی (*Pseudomonas diminuta*) (MG) نشان داده اند که قابلیت های قابل توجهی برای هیدرولیز کردن ترکیب های ارگانو فسفره دارند (۵،۶). گونه های سودوموناس به عنوان یک نامزد برجسته برای تجزیه زیست محیطی ترکیب های ارگانوفسفره محسوب می شود و برای سم زدایی پساب های آلوده و خاک های کشاورزی استفاده می شود (۷).

علیرغم مزایای متعدد استفاده از سویه های باکتریایی در فرآیند تجزیه زیستی، برخی از جنبه های کاربردی این سویه ها باعث می شود تا از استفاده مکرر آنها جلوگیری شود. یکی از عوامل محدود کننده در دسترس بودن سوبسترا است. آنزیم های سیتوپلاسمی این باکتری ها مسئول فعالیت های زیستی آنها هستند که دسترسی سوبسترا به آنها را محدود است. از سوی دیگر، نیاز به زمان بیش تری دارند تا روی سوبسترا عمل کنند، بنابراین کیفیت کارایی آنها کاهش می یابد (۳).

ژنوم شافلینگ به طور گسترده ای برای افزایش تولید متابولیت ها توسط سویه های باکتریایی، بهبود جذب سوبسترا و همچنین افزایش قدرت سویه استفاده می شود. این تکنیک ترکیبی از مزایای کراسینگ اور والدینی است که با برزدن DNA و بازسازی کامل ژنوم همراه است که به طور معمول با ترکیب (فیوژن) پروتوپلاست انجام می شود که پروسه نوترکیبی را افزایش می دهد. روش برزدن ژنوم در ابتدا توسط Stemmer و همکارانش در سال ۲۰۰۲ ارائه شد که برای بهبود تولید تیلوزین (Tylosin)

بعد، رسوب باکتریایی به محیط MSM آگار حاوی $1/5\text{g/L}$ agar، 50mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $0/5\text{g/L}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، $0/2\text{g/L}$ KCL، $0/1\text{g/L}$ NaCl و محیط بدون گلوکز، با ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ میلی گرم 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. ماده‌الفاء 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_{600} به $0/5$ برسد. محیط کشت با $0/5\%$ ، 1% ، $1/5\%$ ، 2% ، $2/5\%$ و در نهایت 3% DES (Sigma Aldrich) 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

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 $0/7\%$ آگاروز حاوی 50 میلی‌مولار بافر فسفات سیترات و $5/5$ میلی-مولار *monocrotophos* به محیط اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. کلنی‌ها 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_{246} 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 به علت اثرهای نور بر روی دیازینون انجام شد.

آماده‌سازی پروتوپلاست و تیمار غیرفعال سازی

پروتوپلاست‌ها بر اساس 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 10 میلی‌لیتر بافر پروتوپلاست (PB) حاوی 10 میلی‌مولار Tris-HCl ، 20 میلی‌مولار CaCl_2 و $0/5$ مولار سوکروز و 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیزوزیم و در دمای 60 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 6000-PEG (60%) و PB حل شده و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پروتوپلاست‌های الحاقی در 5 میلی‌لیتر PB

نتایج

ایجاد جمعیت سویه‌های اولیه برای برزیدن ژنوم

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

سانتریفوژ گردیدند. سپس در محیط احیاء کننده (۲۰ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میلی مولار ساکارز و ۱۰/۵ BSA) به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند

روش‌های آنالیزی

غریبالگری 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.

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	-	-	-

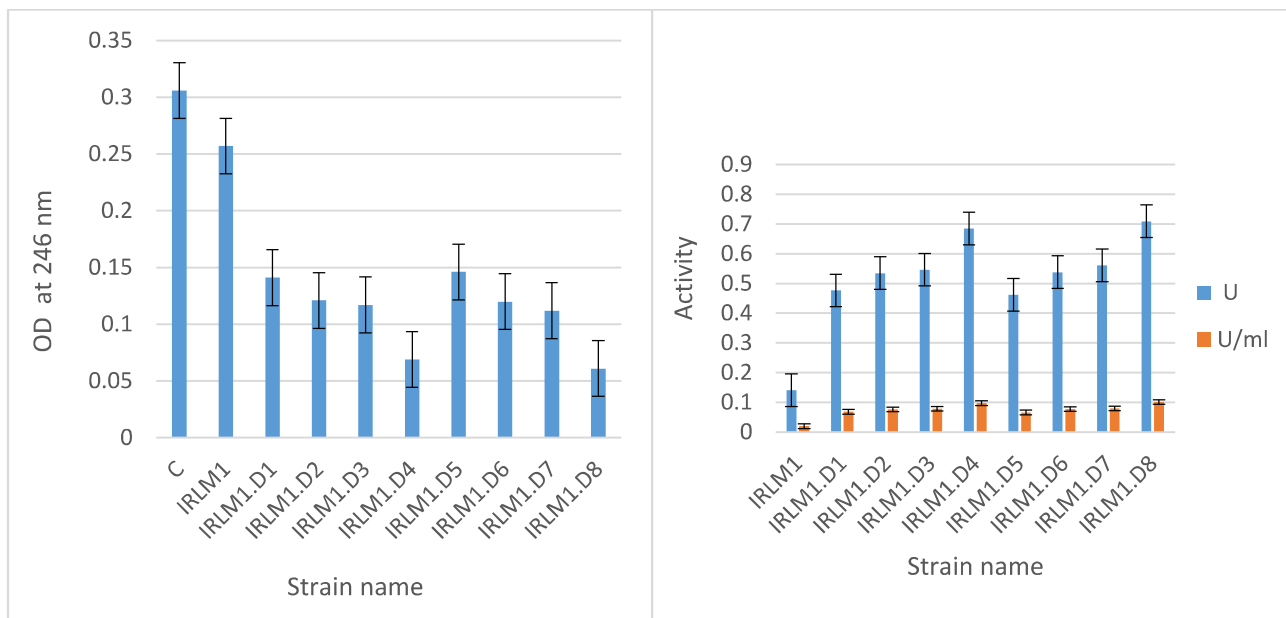
حاوی دیازینون از ۰/۵ تا ۳ درصد تیمار DES کاهش یافت. رنگدانه سبز که مشخصه سودوموناس است، در میزان ۲٪ و

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

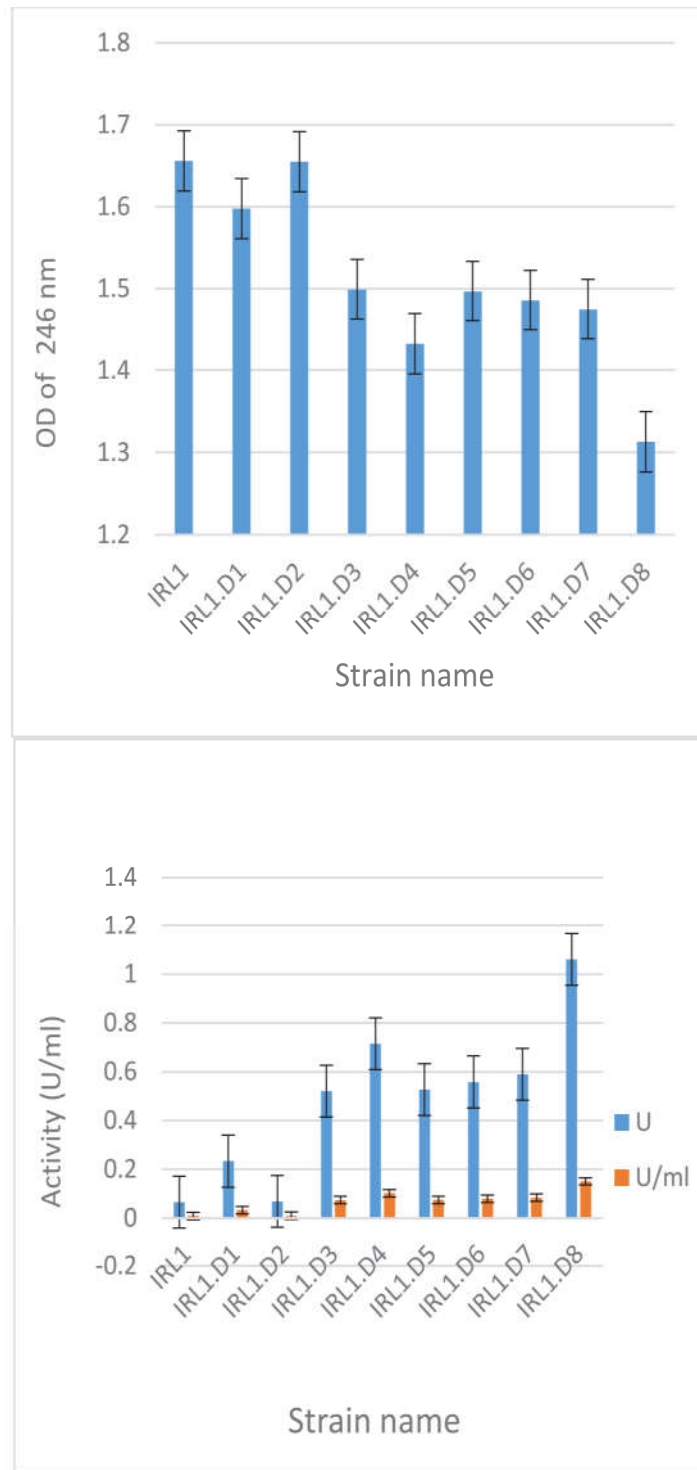
سویه‌های دیگر را نشان می‌دهد. بنابراین، سویه IRLM1.D8 به‌عنوان یکی از سویه‌های والد برای برزدن ژنوم در نظر گرفته شد.

۲/۵٪ 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 برزدن ژنوم آماده شدند.

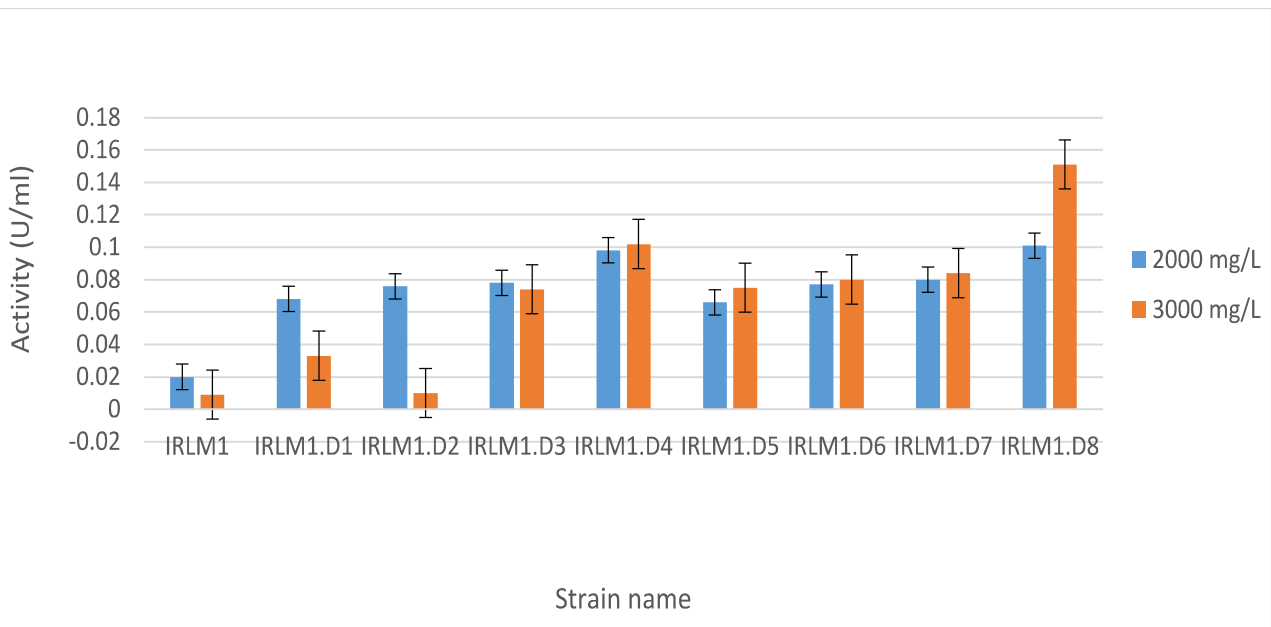
براساس نتایج جذب نوری به‌دست آمده، سویه‌های IRLM1.D4 و IRLM1.D8 نتایج رضایت‌بخشی نسبت به



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 سویه های بهبود یافته روند جهش زایی 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. فلاووباکتریوم با شمار دسترسی ATCC 27551، اولین باکتری تجزیه کننده ترکیب‌های ارگانوفسفره، شناسایی و از خاک فیلپین جد شده است. تاکنون باکتری‌های دیگری نیز کشف شده‌اند که می‌توانند از ترکیب‌های ارگانوفسفره به‌عنوان 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. به‌منظور حذف این ترکیب‌ها از فاضلاب صنعتی، باکتری‌های تخریب کننده باید قادر به رشد و 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 در مطالعه‌های دیگر، باکتری‌های تجزیه کننده از خاک جدا شد بودند. این امر نقطه‌ای قوی در این تحقیق است که سویه وحشی ما قادر است تا در غلظت‌های بالای دیازینون (۲۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر) رشد کند. علاوه بر این، فعالیت این

برزدن ژنوم و غربالگری

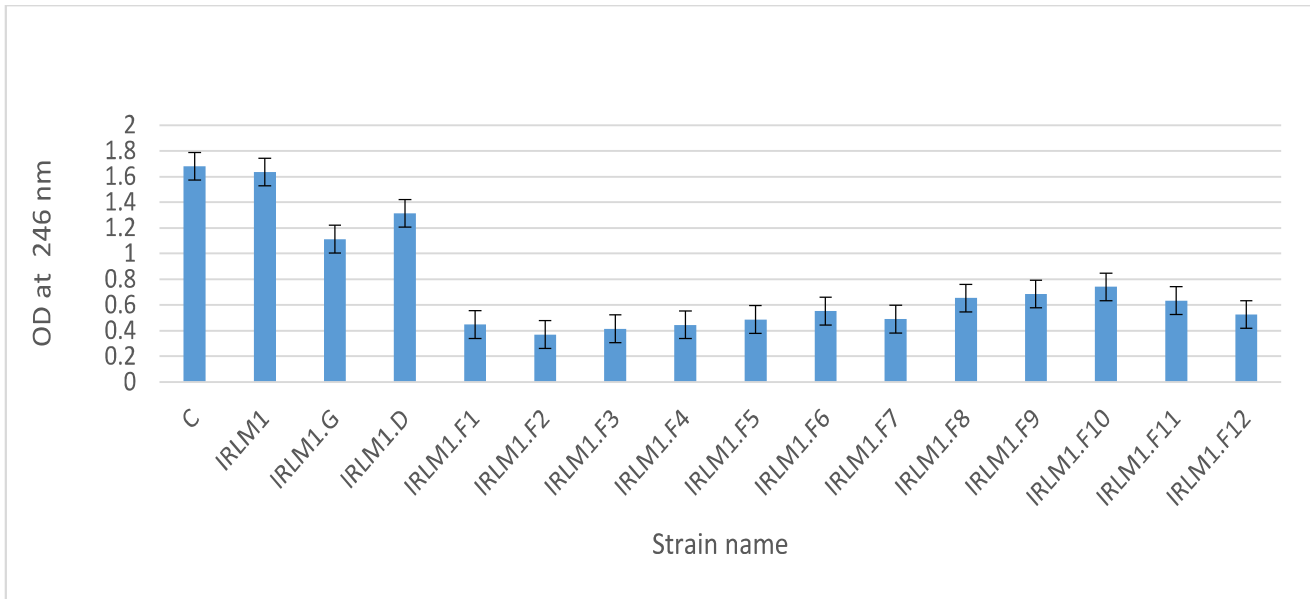
پروتوپلاست‌های ایجاد شده توسط میکروسکوپ، پس از شکستن دیواره سلولی با لیزوزیم مشاهده شدند. سویه‌های بر خورده با توجه به مقدار هاله روی LB آگار با *monocrotophos* انتخاب شدند. ۱۲ سویه بر خورده به روش تحلیلی انتخاب شدند.

رشد باکتری و تجزیه زیستی دیازینون در MSM

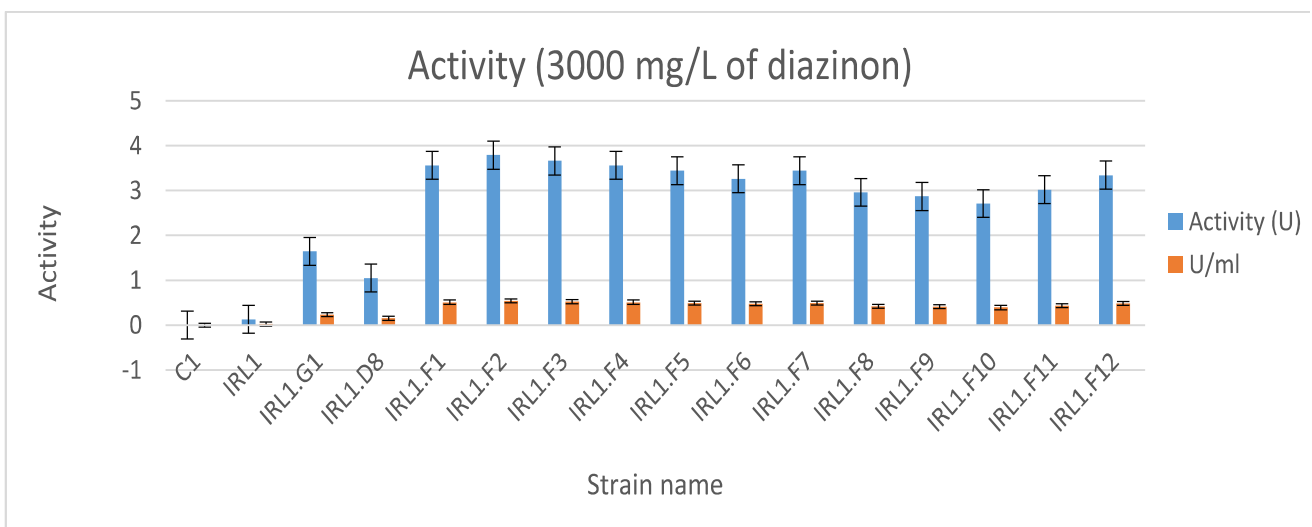
تجزیه زیستی دیازینون در MSM حاوی دیازینون با استفاده از چک کردن OD_{246} و توانایی رشد سویه‌های بر خورده در محیط MSM آگار حاوی دیازینون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p > 0.05$) در میزان تجزیه بیولوژیکی سویه‌های بر خورده نسبت به سویه‌های والد (IRLM1.D و IRLM1.G) و هم-چنین 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 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

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



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 برخورد 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	+	+	-	-

آوردن سویه IRLM1.D8 به‌عنوان یک سویه بهبود یافته کارآمد است. به‌طوری‌که 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 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 IRLM1.F3 به‌ترتیب به میزان ۰/۵۴ U/ml و ۰/۵۲ U/ml بود. این فعالیت ۶۰ و ۵۷/۷ برابر بیش‌تر از سویه وحشی و ۳/۵ و ۳/۴ برابر بیش‌تر از سویه ابتدایی است. در مطالعه‌ای توسط Wang Ch (۲۰۱۳) و همکاران پس از ۶ دور برزدن ژنوم، ۴/۲ برابر بهبود برای پنی‌سیلیوم سیتیرینوم و در مطالعه Patnaik R (۲۰۰۲) و همکاران پس از ۵ دور

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 (۲۰۰۲) Patnaik و همکاران به‌منظور بهبود تحمل pH و تولید اسید در باکتری، تطبیق pH و جهش‌زایی نیتروژوگوانیدین (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 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. هم‌چنین ما مشاهده کردیم که جهش‌زایی DES برای به‌دست

نتیجه گیری

انتخاب روش باید مطابق با هدف مطالعه باشد. برزدن ژنوم به راحتی و به سرعت می تواند ویژگی های میکروارگانسیم ها را به منظور استفاده در کاربردهای تجاری مورد استفاده قرار دهد. براساس نتایج ما، سویه IRLM1.F2 می تواند به عنوان سویه نامزد برای تولید صنعتی برای اهداف بهبود زیستی به-ویژه در تصفیه فاضلاب در نظر گرفته می شود. هم چنین این سویه می تواند برای شناسایی جهش های مسئول بهبود فعالیت و تحمل به غلظت های 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 بدین وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می شود.

برزدن ژنوم ۳ برابر بهبودی برای لاکتوباسیلوس گزارش شد (۹). Zhang Y. F (۲۰۱۴) و همکاران هم چنین بهبود ۲/۴ برابری لاکتوکوکوس لاکتیس را پس از ۴ دور به دست آوردند (۱۰). یکی از تفاوت های عمیق بین مطالعه حاضر و سایر مطالعه ها، تعداد دوره های برزدن ژنوم است که تنها در یک دور نسبت به چندین مرحله از برزدن ژنوم در مطالعه های دیگر نتایج خوبی به دست آمد.

با این وجود، انتخاب روش نقش مهمی در به دست آوردن نتیجه نهایی ایفا می کند. در برخی از روش ها، نتایج نشان می دهند که تفاوتی بین نوع سویه وحشی و سویه بر خورده وجود ندارد و بنابراین فعالیت آنزیم ثابت باقی می ماند یا به میزان بسیار کمی افزایش می یابد.

تاکنون روش های دیگری مانند برزدن DNA و ایجاد جهش با PCR برای تولید سویه های نو ترکیب توسط چندین محقق استفاده شده است، اما استفاده از میکروارگانسیم ها 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 توالی های کمابیش یکسان *opd* در سراسر جهان شناسایی شده اند. ژن مسئول تجزیه دیازینون و دیگر ارگانوفسفره ها، *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. سویه های دیگر با وجود افزایش فعالیت، قادر نبودند در غلظت های بالاتر دیازینون رشد کنند. با این وجود، وقوع هم زمان فعالیت افزایش یافته و توانایی رشد در غلظت های بالا دیازینون کم تر احتمال دارد. بنابراین، سویه IRLM1.F2 را با افزایش فعالیت (۵۷٪) برابر بیش تر از سویه های نوع وحشی) و توانایی رشد در غلظت های بالای دیازینون (تا ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر) پس از یک دور برزدن ژنوم، با موفقیت به دست آوردیم.

- 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. BioTechnology 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.