



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 Rezaei 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

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
سید 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 بیوکاتالستی و بر اساس روش های DNA شافلینگ انجام شده است.

مواد و روش‌ها: سویه 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 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، ۰/۱ U/ml، ۰/۹۸ 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 (۳۰۰ 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. برزیدن ژنوم یک نقطه عطف در تکنولوژی بهبود سویه ها 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 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 NaCl بدون حضور دیازینون و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا OD₆₀₀ 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 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 بر زدن 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 برزیدن 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 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $0/5\text{g/L}$ NaCl و محیط $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0/2\text{g/L}$ ، KCL $0/1\text{g/L}$ بدون گلوکز، با ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون اضافه شد و سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

برزدن ژنوم از دو مسیر انجام می شود: 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 می توان به این شیوه توضیح داد که پس از تأیید مقاومت سویه های مادری، در معرض غلظت های بالاتر دیازینون (۲۵۰۰-۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر) در MSM آگار قرار گرفتند. سپس کشت ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و در محلی تاریک نگهداری شدند تا از تجزیه نوری دیازینون جلوگیری شود.

ایجاد سویه های جهش یافته (IRLM1.D) توسط DES

سویه های بومی در محیط MSM کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد 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 سانتی گراد انکوبه شد. سپس لایه نازک $0/7\%$ آگاروز حاوی ۵۰ میلی مولار بافر فسفات سیتрат و $5/5$ میلی-مولار *monocrotophos* به محیط اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. کلنی ها بر اساس بزرگی میزان هاله انتخاب شدند.

کلنی های انتخاب شده در محیط MSM حاوی دیازینون (۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر) تلقیح شدند. OD_{246} در ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از نانودراپ، اندازه گیری شد. همان طور که پیش تر ذکر شد، تمام آزمایش های مربوط به دیازینون در شرایط تاریک به علت اثرهای نور بر روی دیازینون انجام شد.

آماده سازی پروتوپلاست و تیمار غیرفعال سازی

پروتوپلاست ها بر اساس روش *Cocconcelli* و همکاران با اعمال تغییرهایی انجام شد. سلول های باکتریایی به صورت کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سلول ها رسوب داده شدند. سلول های باکتریایی در ۱۰ میلی لیتر بافر پروتوپلاست (PB) حاوی ۱۰ میلی مولار Tris-Hcl، ۲۰ میلی مولار CaCl_2 و $0/5$ مولار سوکروز و ۱ میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد 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 یافته ای بود که با افزایش سازگاری با غلظت دیازینون و عامل DES به دست آمد. پروتوپلاست های غیرفعال شده در نسبت ۱:۱ مخلوط و سپس سانتریفیوژ شده و دوباره به نسبت ۱:۹ در 6000PEG (60%) و PB حل شده و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پروتوپلاست های الحاقی در ۵ میلی لیتر PB به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

نتایج

ایجاد جمعیت سویه‌های اولیه برای برزدن 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	-	-	-

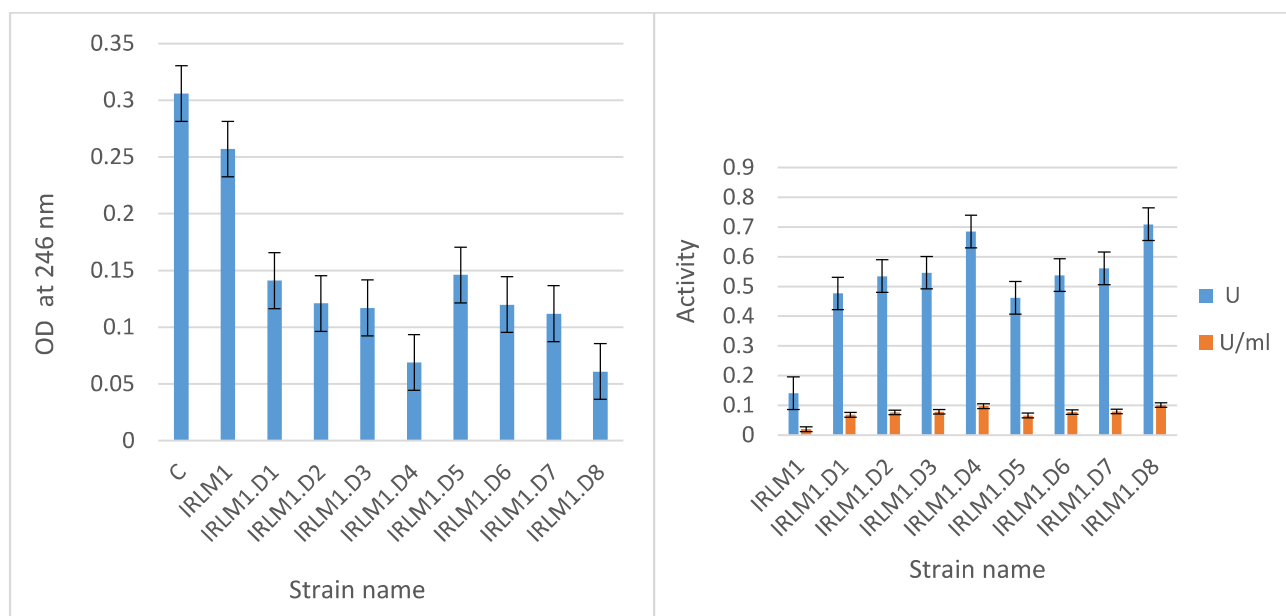
حاوی دیازینون از ۰/۵ تا ۳ درصد تیمار DES کاهش یافت. رنگدانه سبز که مشخصه سودوموناس است، در میزان ۲٪ و

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

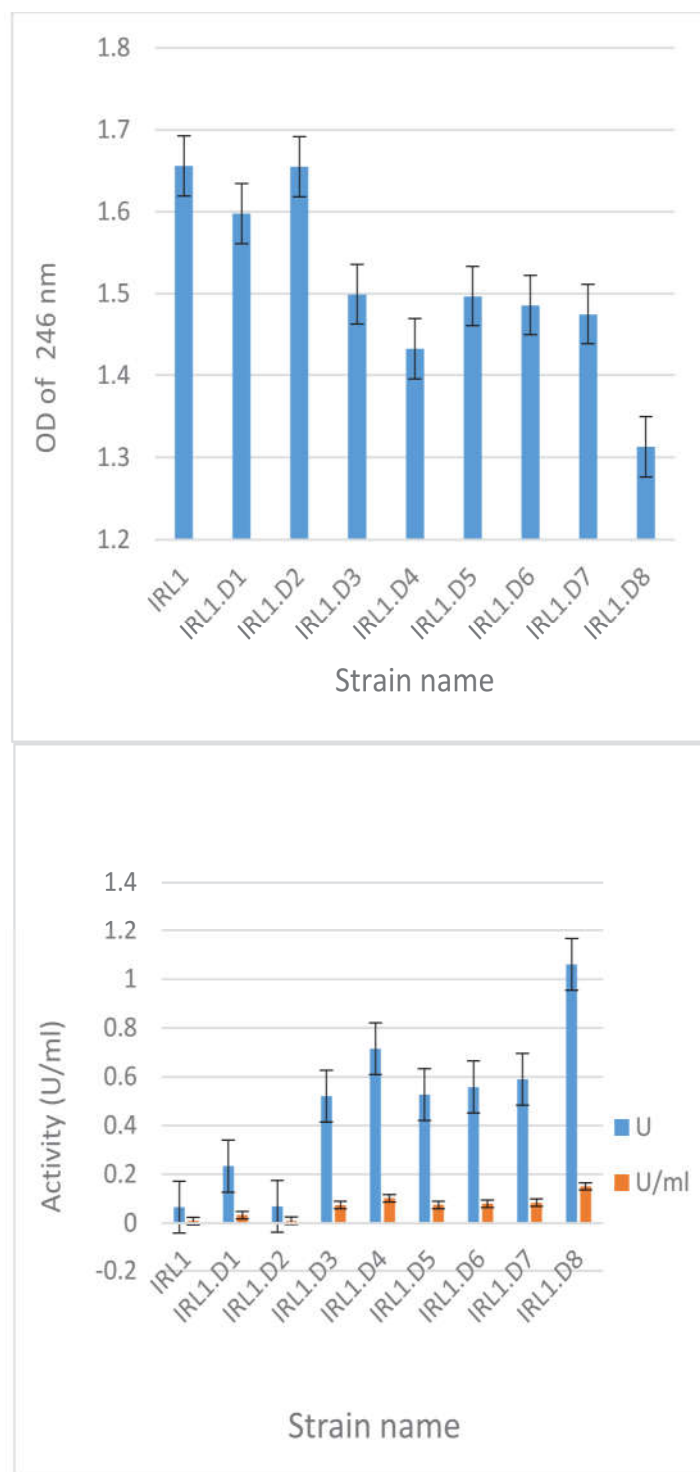
سویه‌های دیگر را نشان می‌دهد. بنابراین، سویه IRLM1.D8 به‌عنوان یکی از سویه‌های والد برای برزدن ژنوم در نظر گرفته شد.

DES از ۲/۵٪ 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.

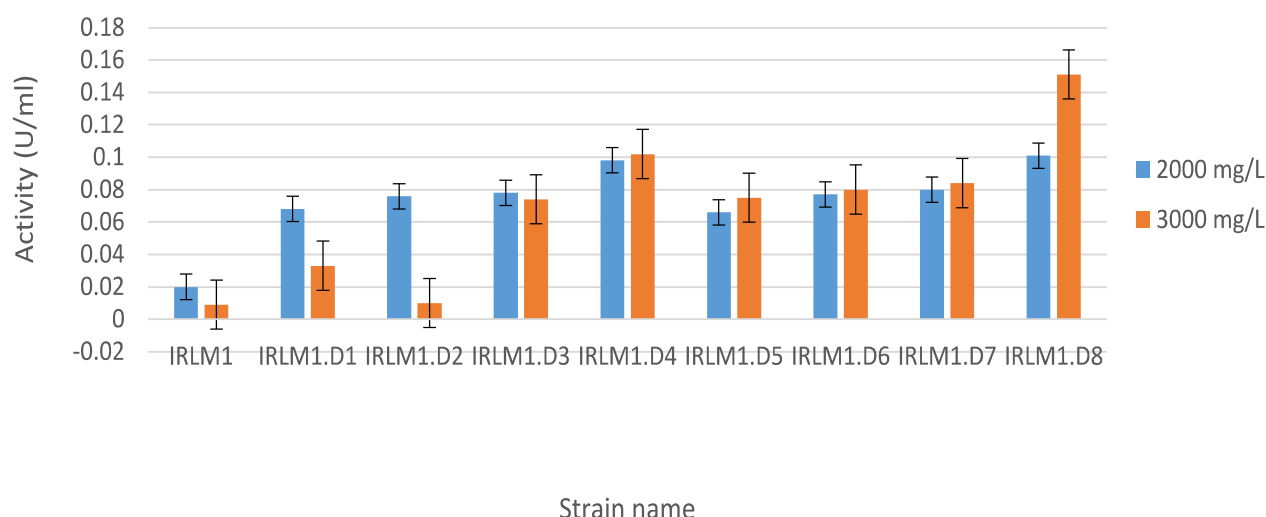
براساس نتایج جذب نوری به‌دست آمده، سویه‌های IRLM1.D4 و IRLM1.D8 نتایج رضایت‌بخشی نسبت به



شکل ۱- جذب نوری و ارزیابی تجزیه زیستی دیازینون (۲۰۰۰ میلی گرم/میلی لیتر 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 سویه های بهبود یافته با DES در ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون.

برزدن ژنوم و غربالگری

پروتوپلاست های ایجاد شده توسط میکروسکوپ، پس از شکستن دیواره سلولی با لیزوزیم مشاهده شدند. سویه های 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 سویه های بر خورده در محیط MSM آگار حاوی دیازینون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری ($p > 0.05$) در میزان تجزیه بیولوژیکی سویه های بر خورده نسبت به سویه های والد (IRLM1.D و IRLM1.G) و هم-چنین سویه های کنترل در محیط MSM حاوی دیازینون (شکل ۳) وجود دارد.

نتایج حاصل از رشد در آگار MSM حاوی دیازینون (۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر) نشان داد که تنها یک سویه بر خورده (IRLM1.F3) قادر به رشد در ۳۰۰۰ میلی گرم/لیتر دیازینون بود، اما تنها یکی از آنها توانست در ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون رشد کند. در

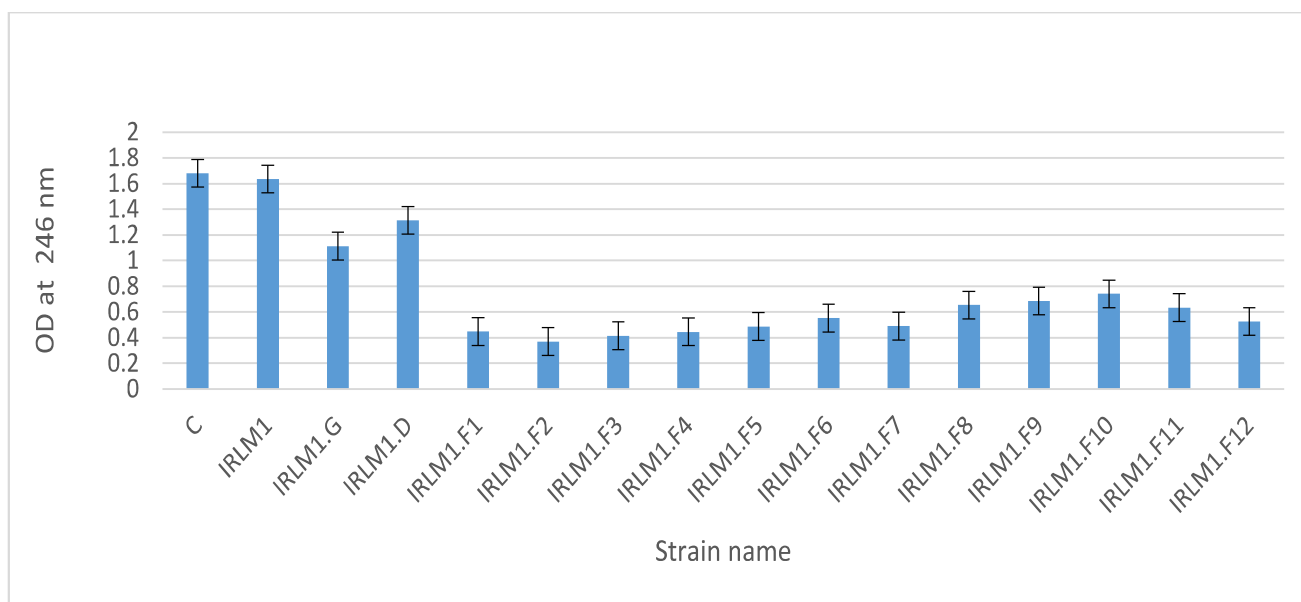
مقابل، سویه بومی (IRLM1) تغییرهای جزئی در OD_{246} نسبت به نمونه غیر تلقیح شده نشان داد.

بحث

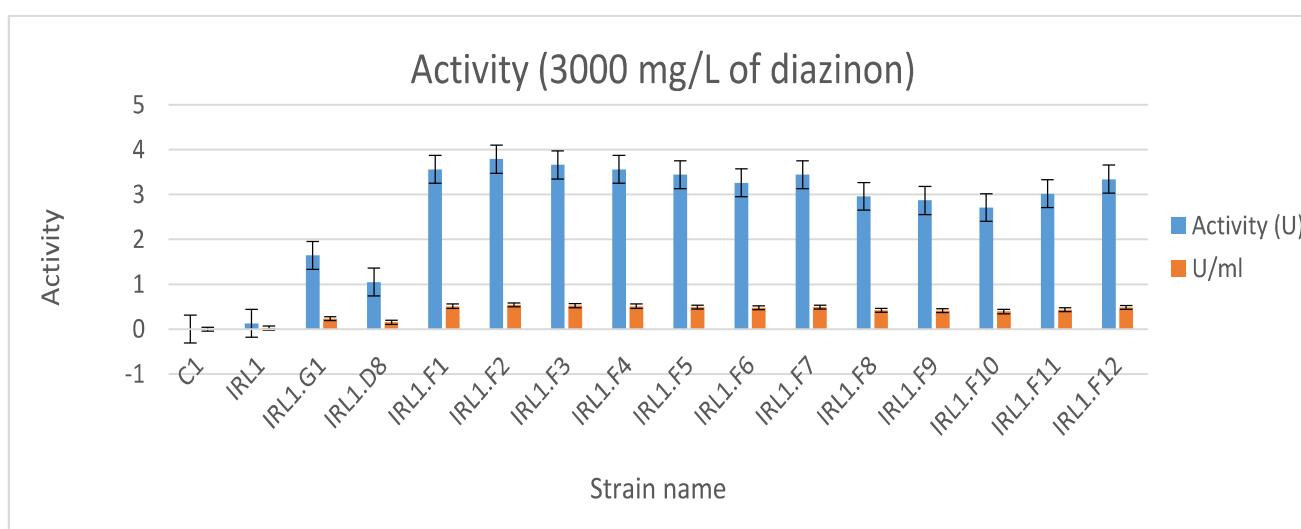
تیمار زیستی ترکیب های ارگانوفسفره از خاک و آب سطحی یک وظیفه اساسی بشمار می رود. فلاووباکتریوم با شمار دسترسی ATCC 27551، اولین باکتری تجزیه کنند ترکیب های ارگانوفسفره، شناسایی و از خاک فیلپین جد شده است. تاکنون باکتری های دیگری نیز کشف شده اند که می توانند از ترکیب های ارگانوفسفره به عنوان تنها منبع کربن، نیتروژن و فسفر استفاده کنند.

در مطالعه های مختلف، سویه های تجزیه کننده ترکیب های ارگانوفسفره برای از بین بردن آلودگی های محیط زیست معرفی شده اند. به منظور حذف این ترکیب ها از فاضلاب صنعتی، باکتری های تخریب کننده باید قادر به رشد و غلظت بالای ترکیب های ارگانوفسفره باشند تا قادر باشند این ترکیب ها را تجزیه کنند. سویه وحشی در مطالعه حاضر از خاک و پساب کارخانجات جدا شده است. در حالی که در مطالعه ای دیگر، باکتری های تجزیه کننده از خاک جدا شد بودند. این امر نقطه ای قوی در این تحقیق است که سویه وحشی ما قادر است تا در غلظت های بالای دیازینون (۲۹۰۰ میلی گرم در لیتر) رشد کند. علاوه بر این، فعالیت این

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 سویه های برخورد در MSM آگار حاوی دیازینون (در غلظت های مختلف) به عنوان 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 به عنوان یک سویه بهبود یافته کارآمد است. به طوری که فعالیت کل سلول توسط IRLM1.D8 تا ۵ و ۱۶/۷ برابر بیش تر از سویه وحشی در غلظت های ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون بوده است. بسیاری از گونه های جهش یافته با DES (IRLM1.F3,4,6,7) در غلظت های ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی گرم در لیتر دیازینون نشان دادند که توانایی بیشتری در تجزیه پیدا می کنند (شکل ۳). بنابراین، جهش های ناشی از ژن هایی که در تجزیه ترکیب های ارگانوفسفره دخالت دارند، حتی فعالیت تجزیه کنندگی را حتی در غلظت های بالای دیازینون مختل نمی کنند.

پس از یک دور برزدن ژنوم و غربالگری، تمام سویه ها، فعالیت کل سلول را در ۳۰۰۰ میلی گرم/لیتر دیازینون نشان دادند، به طوری که فعالیت کل سلول های IRLM1.F2 و IRLM1.F3 به ترتیب به میزان ۰/۵۴ U/ml و ۰/۵۲ U/ml بود. این فعالیت ۶۰ و ۵۷/۷ برابر بیش تر از سویه وحشی و ۳/۵ و ۳/۴ برابر بیش تر از سویه ابتدایی است. در مطالعه ای توسط Wang Ch (۲۰۱۳) و همکاران پس از ۶ دور برزدن ژنوم، ۴/۲ برابر بهبود برای پنی سیلیوم سیتینوم و در مطالعه Patnaik R (۲۰۰۲) و همکاران پس از ۵ دور

از آنجایی که این مطالعه هدف، بهبود بخشیدن به عملکرد باکتری ها و فراهم کردن توانایی رشد آن ها در غلظت های بالایی از ترکیب های ارگانوفسفره است، سازگاری با این ترکیب ها و جهش زایی DES در این مطالعه به کار برده شده است. در مقایسه با سایر مطالعه های (۲۰۰۲) Patnaik و همکاران به منظور بهبود تحمل pH و تولید اسید در باکتری، تطبیق pH و جهش زایی نیتروزوگوانیدین (NTG) استفاده شد (۹).

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

از سوی دیگر، در بسیاری از مطالعه ها، جهش زایی DES برای آماده سازی سویه ها مورد استفاده قرار گرفته است. هم چنین ما مشاهده کردیم که جهش زایی DES برای به دست

نتیجه گیری

انتخاب روش باید مطابق با هدف مطالعه باشد. برزدن ژنوم به راحتی و به سرعت می تواند ویژگی های میکروارگانیسم 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 دورهای برزدن ژنوم است که تنها در یک دور نسبت به چندین مرحله از بر زدن 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 میکروارگانیسم 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 (۵۷/۷) 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 *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.