Original Article

Expression and Characterization of Bacterial Organophosphorus Hydrolase in *Pichia pastoris* with the Intent to Degrade Organophosphate Neurotoxins

Saeed Najavand[1], Abbass Sahebghadam Lotfi[2, 5*], Afshin Mohsenifar[3], Sareh Arjmand[4], Ali Mota[1]

1- Ph.D. Candidate, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Toxicology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Animal and Marine Biotechnology, National Institute of Genetics Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

5- Professor, Department of Animal and Marine Biotechnology, National Institute of Genetics Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: Lotfi_ab@modares.ac.ir

Received: 14/Oct/2011, Accepted: 17/May/2012

Abstract

Objective: Organophosphorus hydrolase (OPH) is a homodimeric enzyme that can hydrolyze phosphoester bonds and reduce the toxicity of organophosphorus compounds. This makes OPH a suitable element for the biodegradation of these compounds.

Methods: We successfully cloned the OPH gene from *Pseudomonas diminuta*, after optimization for *Pichia pastoris*, into a yeast expression vector (pPICZαB). After transformation and induction of recombinant yeasts, the expressed enzyme was investigated for its biochemical and kinetical parameters.

Results: The enzyme was purified 7.49-fold to a specific activity of 0.421×10^3 U/mg protein from the supernatant with a yield of 33%. The purified enzyme was able to degrade organophosphates. It had an optimal activity and stability up to 50°C, and a pH range of 7.0-10.0. The enzyme had a Km of 45.96 µM and a Vmax of 11.23 µM/min (421 µM/min/mg) for paraoxon as a substrate. This enzyme was sensitive to divalent cations and inactivated by denaturing compounds such as SDS. The molecular mass of the purified enzyme as estimated by SDS–PAGE analysis was approximately 40 kDa.

Conclusion: In this study, the purified enzyme effectively hydrolyzed paraoxon, an organophosphorus compound. The activity and stability of this enzyme at high temperatures and pH, and low Km in comparision with bacterial isolates could make it an attractive biocatalyst for applied bioremediation and biosensing.

Keywords: Organophosphorus compounds, Organophosphorus hydrolase, *Pichia pastoris*

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 1, Spring 2012, Pages: 61-72

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

مقاله اصیل

بیان و تعیین خصوصیات آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز باکتریایی در مخمر پیکیا پاستوریس با هدف تجزیه نوروتوکسین‌های ارگانوفسفره

سعید نژاوند[1]، عباس صاحبقدم‌لطفی[2،5*]، افشین محسنی‌فر[3]، ساره ارجمند[4]، علی مطاع[1]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه سم‌شناسی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه زیست فناوری دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۵- استاد، گروه زیست فناوری دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
Lotfi_ab@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۲۲ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۲/۲۷

چکیده

هدف: آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آنزیم هومودیمری است که قادر به هیدرولیز پیوندهای فسفواستر و کاهش سمیت نوروتوکسین‌های ارگانوفسفره است. این خصوصیت آنزیم، ارگانوفسفر هیدرولاز را ابزار ارزشمندی برای تجزیه، تشخیص و زیست‌پالایی سموم ارگانوفسفره می‌سازد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ژن آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز باکتری سودوموناس دیمینوتا پس از بهینه‌سازی برای مخمر پیکیا پاستوریس و تبدیل آن به فرم ترشحی (آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز به فرم غشایی در باکتری وجود دارد) در ناقل بیانی pPICZαB کلون شد. پس از ترانسفورم و القای مخمرهای نوترکیب، آنزیم به لحاظ تجزیه سموم، تعیین پارامترهای بیوشیمیایی و سینتیکی ارزیابی شد.

نتایج: آنزیم به میزان ۷/۴۹ مرتبه و با فعالیت ویژه $۰/۴۲۱ \times ۱۰^{۳}$ واحد در میلی‌گرم پروتئین و با بازده ۳۳ درصد از محلول رویی محیط کشت، جداسازی و خالص‌سازی شد. آنزیم بهترین فعالیت و پایداری را تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ تا ۱۰ از خود نشان داد. با استفاده از سوبسترای پاراکسون، ثابت میکائیلیس (Km) و حداکثر سرعت آنزیم (Vmax) به‌ترتیب ۴۵/۹۶ میکرومولار و ۱۱/۲۳ میکرومولار در دقیقه محاسبه شد. آنزیم نسبت به کاتیون‌های دو ظرفیتی بسیار حساس بود و توسط عوامل واسرشته کننده نظیر سدیم دودسیل سولفات فعالیت خود را از دست داد. وزن مولکولی آنزیم با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE حدود ۴۰ کیلودالتون تخمین زده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بررسی حاضر آنزیم به‌طور مؤثری سموم ارگانوفسفره نظیر پاراکسون را تجزیه می‌کند. فعالیت و پایداری در pH و دماهای بالا و همچنین پایین بودن ثابت میکائیلیس آنزیم نسبت به انواع باکتریایی، آن را کاتالیزگر زیستی مناسبی برای کاربردهای زیست‌پالایی و تشخیصی می‌سازد.

کلیدواژگان: ترکیبات ارگانوفسفره، ارگانوفسفر هیدرولاز، پیکیا پاستوریس

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۶۱-۷۲

مقدمه

هر ساله ترکیبات ارگانوفسفره (Organophosphorus Compounds) هزاران نفر را در گوشه و کنار جهان مسموم کرده و باعث مرگ صدها نفر می‌شود [۱]. ترکیبات

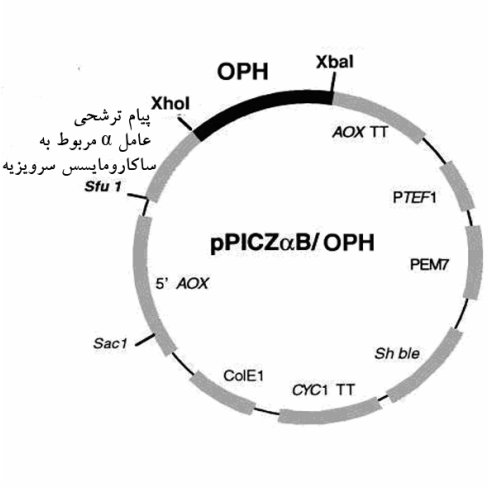
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

ارگانوفسفره متعلق به دسته‌ای از نوروتوکسین‌های بسیار سمی است که معمولاً به عنوان حشره‌کش، جونده‌کش و ترکیبات شیمیایی جنگی استفاده می‌شود [۲]. این ترکیبات آنزیم استیل کولین استراز (Acetylcholinesterase) را در سیناپس‌های سیستم عصبی مرکزی مهار کرده، منجر به از دست رفتن فعالیت و عملکرد اعصاب و در نهایت مرگ می‌شود [۳]. بعد از مصرف، این ترکیبات در خاک، آب، محصولات کشاورزی و محصولات آبی باقیمانده و سلامتی انسان‌ها را تهدید می‌کند [٤]. یکی از مهم‌ترین راه‌های حل مسئله آلودگی‌های ترکیبات ارگانوفسفره، تشخیص و زیست‌پالایی (Bioremediation) این ترکیبات است [٥]. ترکیبات ارگانوفسفره دارای سه پیوند فسفواستر بوده و از این رو اغلب اصطلاح فسفو تری‌استر در مورد آن‌ها به کار برده می‌شود هیدرولیز. تنها یکی از پیوندهای فسفواستر (P-O، P-S، P-F، P-CN) می‌تواند به‌طور قابل ملاحظه‌ای سمیت آن‌ها را کاهش دهد. در مورد پاراتیون (Parathion) با هیدرولیز یکی از پیوندها سمیت به حدود صد برابر کاهش می‌یابد [٦]. آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (Organophosphorus Hydrolase: OPH) یک آنزیم هومودایمر است که به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث هیدرولیز پیوندهای فسفواستر در نوروتوکسین‌های ارگانوفسفره می‌شود [۷]. این آنزیم در زمینه سم‌زدایی و آلودگی‌زدایی زمین‌های کشاورزی و انبار تسلیحات شیمیایی آلوده به سموم ارگانوفسفره کاربرد دارد. این مسئله آنزیم OPH را به عامل مناسبی برای زیست‌پالایی و تجزیه عوامل عصبی تبدیل نموده است [۸]. باکتری‌هایی تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره نظیر گونه‌های فلاووباکتر (*Flavobacterium* sp) [۹]، گونه‌های سودوموناس (*Pseudomonas* sp) [۱۰-۱۲] و آرتروباکتر (*Arthrobacter* sp) [۱۳] از محیط‌هایی که در تماس با این ترکیبات بوده‌اند جدا شده‌اند. به‌منظور تولید آنزیم OPH تاکنون سیستم‌های بیانی مختلفی استفاده شده‌اند. اخیراً استفاده از مخمر متیلوتروفیک (Methylotrophic Yeast) پیکیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) به عنوان میزبان سلولی برای بیان پروتئین‌های ترشحی بسیار رایج شده است. پیکیا پاستوریس قادر به تولید پروتئین‌های نوترکیب محلول و با تاخوردگی (Folding) مناسب است [۱۳-۱۵]. در این مطالعه روش موفقی برای بیان آنزیم OPH ترشحی در مخمر پیکیا پاستوریس ارایه شده است. در ابتدا ژن OPH باکتری سودوموناس دیمینوتا (*Pseudomonas diminuta*) برای میزبان پیکیا پاستوریس بهینه‌سازی شد و سپس ژن نوترکیب OPH در ناقل بیانی مخمر به منظور بیان کلون شد. در مرحله بعد خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی و سینتیکی آنزیم نوترکیب تولید شده ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

در تمامی دست‌ورزی‌های DNA از سوش‌های DH5α و Top10F' باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. سوش X.33 مخمر پیکیا پاستوریس، ناقل pPICZαB مربوط به مخمر X.33، آغازگرهای (Primers) تعیین توالی الکل اکسیداز یک (AOX1: Alcohol Oxidase1) و آنتی‌بیوتیک‌های زئوسین (Zeocin) و تتراسیکلین (Tetracycline) از شرکت Invitrogen آمریکا و آنزیم‌های محدودکننده (*Xba*I و *Xho*I)، DNA Pfu پلیمراز، DNA *Taq* پلیمراز و DNA T4 لیگاز از شرکت Fermentase کانادا خریداری شد. همچنین سوبسترای ارگانوفسفره پاراکسون (Paraoxon) از شرکت Sigma آمریکا خریداری شد. سوش‌های اشریشیا کلی در محیط کشت LB (Luria Bertani) (۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد تریپتون (Triptone)، ۰/۵ درصد کلرید سدیم) و LB با غلظت نمک کمتر (Low Salt Luria Bertani: LSLB) کشت داده شدند. برای کشت مخمر از محیط YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol) (۱ درصد عصاره مخمر، ۲ درصد پپتون (Peptone)، ۲ درصد دکستروز، سوربیتول ۱ مولار) و محیط YPG (Yeast Extract Peptone Glycerol) (۱ درصد عصاره مخمر، ۲ درصد پپتون، ۲ درصد گلیسرول) استفاده شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]



شکل ۱ نمای شماتیکی از ناقل pPICZαB حاوی ژن OPH (ناقل نوترکیب)

ساخت ناقل و همسانه‌سازی (Cloning)

cDNA مربوط به ژن OPH باکتری سودوموناس دیمینوتا با استفاده از نرم‌افزارهایی مانند GenScript Rare Codon Analysis Tool، Gene designer، Synthetic Gene Designer و GCUA که حاوی اطلاعات مربوط به توالی‌های بهینه برای بیان در مخمر پیکیا پاستوریس یا مخمرهای مشابه مانند ساکارومایسس (*Saccharomyces*) بودند، برای میزبان پیکیا بهینه شد و پس از بهینه‌سازی توسط شرکت چینی ShineGene Molecular Biotech در ناقل PUC57 سنتز شد. نشانه (Signal) پپتید باکتریایی (۲۹ اسیدآمینه اول) از ابتدای آنزیم برداشته شد و برچسب پلی‌هیستیدین به انتهای N- ترمینال آنزیم اضافه شد. ناقل pPICZαB برای بیان ژن OPH در مخمر پیکیا پاستوریس در نظر گرفته شد. این ناقل حاوی پروموتر (AOX1) است که ناقل را برای ورود به جایگاه ژنی AOX1 در مخمر مجهز کرده و باعث القای متانولی و بیان بالای پروتئین مورد نظر در مخمر می‌شود. ناقل با آنزیم‌های *Xba*I و *Xho*I هضم شد. جایگاه‌های *Xba*I و *Xho*I در محل همسانه‌سازی ناقل به ما اجازه می‌دهد تا ژن مورد نظر در قالب با نشانه ترشحی α فاکتور مربوط به ناقل قرار گرفته و بدون هیچ‌گونه اسیدآمینه اضافی در انتهای N- ترمینال بیان و به داخل محیط کشت ترشح شود (شکل ۱).

cDNA سنتز شده نیز با آنزیم‌های ذکر شده هضم شد. ناقل خطی ۳/٦ کیلوباز و قطعه ژنی ۱۰۵۳ جفت‌بازی (مربوط به ژن OPH) با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز جدا و توسط کیت استخراج از ژل (شرکت Roche آلمان) استخراج از ژل انجام شد. قطعه ژنی به محل همسانه‌سازی ناقل در جایگاه‌های *Xba*I و *Xho*I وارد شد و ناقل نوترکیب به منظور تکثیر به سلول‌های مستعد Top10F' (مقاوم به تتراسایکلین) ترانسفورم (Transform) شد. سلول‌های ترانسفورم شده روی پلیت‌های LSLB حاوی ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زئوسین (ژن مقاوم به زئوسین (*Sh ble* gene) در ناقل pPICZαB برای انتخاب سلول‌های ترانسفورم شده با ناقل نوترکیب) و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تتراسایکلین پخش و به‌مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تک کلونی‌های رشد کرده به پلیت‌های LSLB آگار حاوی مقادیر مشابه از آنتی‌بیوتیک‌ها انتقال یافتند. به منظور تعیین توالی و تأیید همسانه‌سازی، از آغازگرهای تعیین توالی AOX1 برای PCR استفاده شد. توالی آغازگرها به‌ترتیب 5´AOX GACTGGTTCCAATTGACAAG و 3´AOX GCAAATGGCATTCTGACATCC بود. PCR در مخلوط واکنشی حاوی ۱/۵ میلی‌مولار دی کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۰/۳ میکرومولار از هر کدام از آغازگرها و یک واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز انجام شد. بعد از واسرشت شدن (Denaturation) DNA در ۹۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، قطعه وارد شده در ۳۰ چرخه با دمای واسرشت ٩٤ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال (Annealing) ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه تکثیر شد. قطعه تکثیر یافته با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR خالص‌سازی و خلوص آن توسط الکتروفورز ژل آگارز تأیید شد. تعیین توالی ناقل نوترکیب و محصول PCR با استفاده از تعیین توالی کننده اتوماتیک ABI Prism 377 (Applied Biosystems, CA، آمریکا) و آغازگرهای ذکر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

شده انجام پذیرفت. بعد از تأیید همسانه‌سازی، ناقل نوترکیب (pPICZαB/OPH) به منظور ترانسفورم به مخمر پیکیا پاستوریس در محل برش آنزیم SacI (جایگاه برش واحد (Unique) در پروموتر AOX1 که باعث ورود مؤثر ناقل خطی شده به ژنوم مخمر می‌شود) خطی شد.

ترانسفورم به مخمر، کشت و تولید آنزیم

حدود ۵ میکروگرم ناقل خطی شده به‌وسیله روش الکتروپوریشن (Electroporation) به سلول‌های مستعد پیکیا پاستوریس ترانسفورم شد. الکتروپوریشن با استفاده از میکروپالسر (شرکت Bio-Rad آمریکا) با کووت ۰/۲ سانتی‌متر و در ولتاژ ۲۰۰۰ ولت صورت گرفت. سلول‌های ترانسفورم شده روی پلیت YPDS حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زئوسین پخش شده و به‌مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تک کلونی‌های رشد کرده به پلیت YPDS آگار حاوی مقادیر مشابه از آنتی‌بیوتیک زئوسین انتقال یافتند. برای ارزیابی موفقیت ترانسفورم، کلونی‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر محیط YPG به‌مدت ۲٤ تا ۷۲ ساعت و تا رسیدن به جذب نوری (Optical Density: OD) ٤ تا ٦ در طول موج ٦۰۰ نانومتر (OD_{600}=4-6) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. به منظور تأیید ورود قطعه ژنی به درون ژنوم مخمر، DNA مخمری با استفاده از کیت استخراج DNA استخراج و PCR با روش قبلی و آغازگرهای ذکر شده انجام شد. برای بررسی فعالیت آنزیمی در محیط کشت، حدود ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت YPG حاوی مخمر (جذب نوری ۱ تا ۱/۵ در طول موج ٦۰۰ نانومتر) برداشته و در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPM حاوی متانول ۱ درصد تلقیح و به‌مدت ٤ روز کشت داده شد. هر روز ۱ درصد متانول حجمی/حجمی برای تداوم القای پروموتر الکل اکسیداز به محیط کشت اضافه شد. در تمامی موارد نمونه مخمری ترانسفورم با ناقل بدون قطعه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

آزمایش بررسی فعالیت آنزیمی (Functionality Assay)

رهایش پارانیتروفنل (Paranitrophenol) ناشی از هیدرولیز پاراکسون (سوبسترای ارگانوفسفره) برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی به ۷۸۰ میکرولیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH ۸ اضافه شد و در نهایت ۲۰ میکرولیتر از محلول ٤۰ میلی‌مولار پاراکسون برای شروع واکنش هیدرولیز به محلول فوق اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. میزان هیدرولیز پاراکسون از طریق تغییر در جذب در طول موج ٤۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد از فعالیت آنزیمی معادل مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که قادر به آزادسازی یک میکرومول پارانیتروفنل در هر دقیقه در دمای ۳۷ درجه است [١٦].

خالص‌سازی آنزیم OPH

۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی فعالیت آنزیمی با استفاده از دستگاه اولترافیلتر (شرکت Thermo آمریکا) و با فیلترهای ۱۰ کیلودالتون به ۱۰ میلی‌لیتر تغلیظ یافت. آنزیم نوترکیب حاوی بر چسب پلی‌هیستیدین در یک مرحله توسط کروماتوگرافی تمایلی نیکل (Ni-NTA) خالص‌سازی شد. محلول رویی به ستون آگارز نیکل که قبلاً با بافر اتصال (۵۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4، ۰/۵ مولار NaCl، ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول (Imidazole)، ۰/۰۵ درصد از توئین ۲۰ (Tween 20) با pH ۸) به تعادل رسیده بود منتقل شد. بعد از سه مرحله شستشو با بافر شستشو (۵۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4، ۰/۵ مولار NaCl، ۲۰، ۳۰ و ٤۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۰/۰۵ درصد از توئین ۲۰ با pH ۸) پروتئین نوترکیب با استفاده از ۵ میلی‌لیتر بافر خارج کننده (۵۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4، ۰/۵ مولار NaCl، ۳۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۰/۰۵ درصد از توئین ۲۰ با pH ۸) از ستون جدا شد. آنزیم خالص‌سازی شده مقابل بافر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

۲۰ میلی‌مولار Na_2HPO_4 با pH ۸/٦ دیالیز شد. الکتروفورز SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) روی نمونه‌ها انجام شد. باندهای پروتئینی با استفاده از رنگ‌های کوماسی بلو G-۲۵۰ (Coomassie Blue G-250) و نیترات نقره ($AgNo_3$) رنگ‌آمیزی شد.

تجزیه و تحلیل زایموگرام (Zymogram Analysis)

تجزیه و تحلیل زایموگرام با استفاده از روش اصلاح شده مالون (Malone) انجام پذیرفت. ۸۰ میکرولیتر از محلول رویی محیط کشت حاوی فعالیت آنزیمی با ۲۰ میکرولیتر بافر بارگذاری PAGE (5X) مخلوط شد و سپس الکتروفورز PAGE روی نمونه‌ها صورت گرفت. بعد از الکتروفورز، ژل روی پلیت LB آگار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم پاراکسون در لیتر قرار گرفت. پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا زمانی که باندهای مربوط به هیدرولیز پاراکسون (باند زرد رنگ مربوط به پارانیتروفنل) به وضوح در ژل مشاهده شد [۳].

تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم OPH

مطالعات سینتیکی روی آنزیم در بافر تریس-HCl ۵۰ میلی‌مولار با pH ۸ حاوی غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار پاراکسون به عنوان سوبسترا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. برای بررسی ثابت میکائیلیس (Km) و حداکثر سرعت آنزیمی (Vmax)، سرعت اولیه آنزیم در غلظت‌های فوق محاسبه شد.

بررسی اثر دما، pH و یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم

دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم از طریق اندازه‌گیری فعالیت پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دماهای مختلف (٤، ۱۵، ۳۰، ۳۷، ۵۰، ٦۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و pH بین ۲ تا ۱۲ تعیین شد. اثر pH بر فعالیت آنزیم از طریق انجام واکنش در بافرهای مختلف (۱۰۰ میلی‌مولار) شامل سدیم استات (برای pH ۲، ۳، ٤ و ۵)، سدیم فسفات (برای pH ٦ و ۷)، تریس-HCl (برای pH ۸ و ۹)، گلیسین هیدروکسید سدیم (برای pH ۱۰، ۱۱ و ۱۲) تحت شرایط یکسان تعیین شد. اثر دما و pH بر پایداری آنزیم به‌وسیله اندازه‌گیری فعالیت باقیمانده آنزیم پس از ٦۰ دقیقه انکوباسیون در دما و pH های ذکر شده تعیین شد. اثر کاتیون‌های فلزی بر فعالیت آنزیمی از طریق انجام واکنش آنزیمی در بافر تریس-HCl حاوی ۲ میلی‌مولار از یون‌های سولفات نیکل ($NiSo_4$)، دی کلرید کبالت ($CoCl_2$)، دی کلرید کلسیم ($CaCl_2$)، دی کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، سولفات آهن ($FeSo_4$) و ۲ میلی‌مولار سدیم دودسیل سولفات (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) ارزیابی شد.

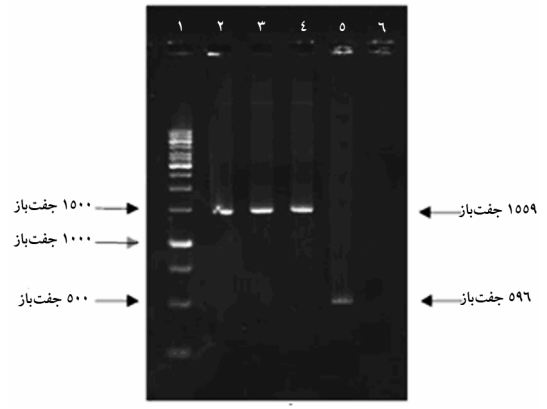
نتایج

همسانه‌سازی و بیان آنزیم OPH در مخمر پیکیا پاستوریس

مقایسه شاخص سازگاری کدونی (Codon Adaptation Index) توالی DNA ژن OPH باکتری سودوموناس دیمینوتا با توالی DNA ژن مهندسی شده OPH (برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از سایت بیوانفورماتیک GenScript، www.genscript.com استفاده شد) نشان داد که شاخص سازگاری کدونی از ۵۵ درصد به ۸۷ درصد برای مخمر پیکیا پاستوریس افزایش یافته است. تمامی مراحل همسانه‌سازی در سوش DH5α باکتری اشریشیا کلی انجام شد. برای ترانسفورم محصول الحاق (Ligation) از 'Top10F استفاده شد. همسانه‌سازی ژن OPH در ناقل pPICZαB به‌وسیله PCR و با استفاده از آغازگرهای تعیین توالی AOX1 تأیید شد. الکتروفورز ژل آگارز از محصولات PCR یک باند در ناحیه ۱۵۵۹ جفت‌باز (۱۰۵۳ جفت‌باز مربوط به ژن OPH و ۵۰٦

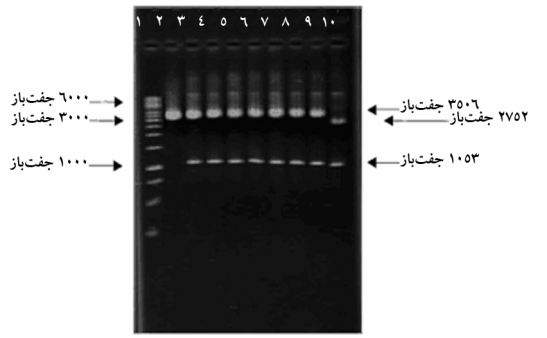
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

جفت‌باز مربوط به توالی بین دو آغازگر در ناقل) نشان داد که تأییدی بر همسانه‌سازی ژن مورد نظر در ناقل مربوط بود (شکل ۲).



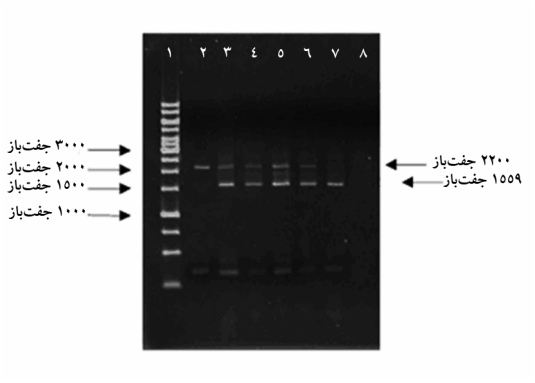
شکل ۲ ژل الکتروفورز آگارز حاصل از تکثیر PCR روی ناقل نوترکیب؛ نمونه ۱ مربوط به نشانگر ۱ کیلوبازی SM0311‡، نمونه‌های ۲، ۳ و ٤ مربوط به ناقل نوترکیب حاوی ژن OPH، نمونه ۵ مربوط به ناقل pPICZaB، نمونه ٦ مربوط به نمونه کنترل منفی (بدون نمونه)

نتایج حاصل از تعیین توالی، اتصال در قالب ژن OPH را با نشانه ترشحی α فاکتور ناقل تأیید کرد. همچنین هضم ناقل‌های نوترکیب با آنزیم‌های *Xba*I و *Xho*I (R-mapping) نیز همسانه‌سازی را تأیید کرد (شکل ۳).



شکل ۳ هضم ناقل نوترکیب (pPICZαB/ OPH) با آنزیم‌های محدود کننده *Xho*I و *Xba*I؛ نمونه ۱ مربوط به نشانگر وزنی ۱ کیلوبازی، نمونه ۲ مربوط به هضم ناقل pPICZαB بدون قطعه، نمونه‌های ۳ تا ۹ مربوط به هضم ناقل‌های نوترکیب استخراج شده از کلونی‌های ترانسفورم مختلف، نمونه ۱۰ مربوط به هضم ناقل PUC57 حاوی قطعه ژنی OPH به عنوان کنترل مثبت

مخمرهای ترانسفورم شده حاوی ژن OPH در DNA ژنومی خود، از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA کروموزومی خود تأیید شدند. الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR، به‌ترتیب دو باند در ناحیه‌های ۱۵۵۹ جفت‌باز و ۲۲۰۰ جفت‌باز نشان داد که به‌ترتیب مربوط به ژن OPH و ژن الکل اکسیداز مخمر (که با آغازگرهای AOX1 قطعه ۲۲۰۰ جفت‌باز را ایجاد می‌کرد) بود (شکل ٤).



شکل ٤ نتایج مربوط به PCR از نمونه‌های مخمری استخراج شده؛ نمونه ۱ مربوط به نشانگر وزنی ۱ کیلوبازی، نمونه ۲ مربوط به ژنوم مخمر بدون ترانسفورم، نمونه‌های ۳ تا ٦ مربوط به مخمرهای ترانسفورم شده با ناقل نوترکیب، نمونه ۷ مربوط به ناقل نوترکیب، نمونه ۸ کنترل منفی (بدون نمونه)

خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های آنزیم OPH

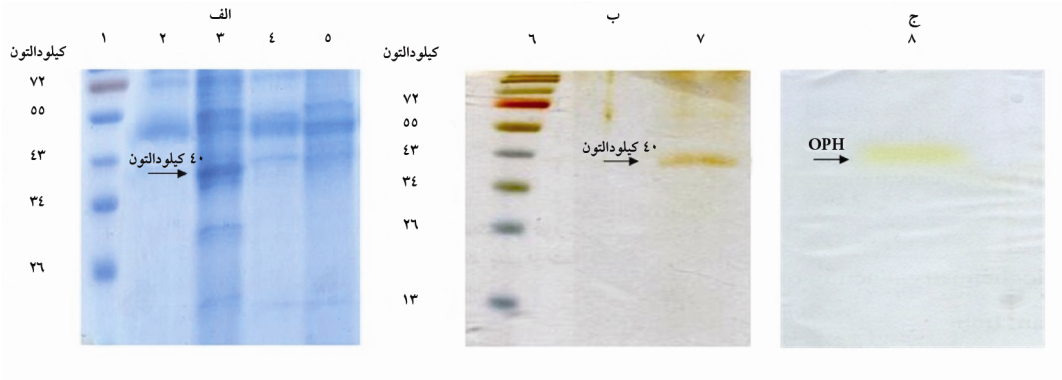
تحت شرایط کشت درون فلاسک، حداکثر فعالیت آنزیمی در محیط کشت بعد از سه روز القا ایجاد شد. آنزیم در یک مرحله از محلول رویی محیط کشت توسط کروماتوگرافی تمایلی خالص‌سازی شد. نتایج خالص‌سازی در جدول ۱ خلاصه شده است.

آنزیم به میزان ۷/٤۹ مرتبه و با فعالیت ویژه $۰/٤۲۱ \times ۱۰^{۳}$ واحد در میلی‌گرم پروتئین و با بازده ۳۳ درصد از محلول رویی محیط کشت جدا و خالص‌سازی شد. در الکتروفورز SDS-PAGE از آنزیم خالص‌سازی شده یک تک باند در ناحیه تقریباً ٤۰ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۵).

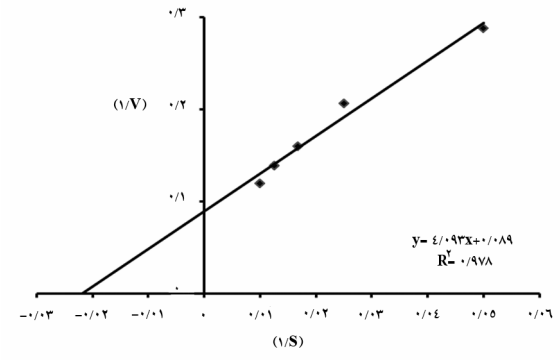
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

جدول ۱ مراحل خالص‌سازی آنزیم OPH از محلول رویی محیط کشت حاوی فعالیت آنزیمی با استفاده از ستون نیکل

مرحله خالص‌سازی	حجم کل (میلی‌لیتر)	پروتئین تام (میلی‌گرم)	فعالیت کل (واحد آنزیمی)	فعالیت ویژه (واحد در میلی‌گرم پروتئین)	میزان خالص‌سازی	بازده (درصد)
محلول رویی محیط کشت	۱۰۰	۳۱/٤	۱۷٦٤	٥٦/۱۷	۱	۱۰۰
بعد از اولترافیلتراسیون	۱۰	۷/٥۱	۱۱۲۷	۱٥۰/۱۲	۲/٦۷	٦۳
بعد از خالص‌سازی	٥	۱/۳۸	٥۸۱/۲٥	٤۲۱	۷/٤۹	۳۳



شکل ٥ نتایج مربوط به الکتروفورز SDS PAGE و آشکارسازی آنزیم نوترکیب تولید شده؛ **الف)** نمونه ۱ مربوط به استاندارد وزن مولکولی، نمونه‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب مربوط به محلول رویی نمونه دارای فعالیت در شرایط قبل و بعد از القا، نمونه‌های ٤ و ٥ به‌ترتیب مربوط به محلول رویی نمونه کنترل منفی قبل و بعد از القا، **ب)** نمونه ٦ مربوط به استاندارد وزن مولکولی، نمونه ۷ مربوط به نمونه خالص‌سازی شده (رنگ‌آمیزی با نیترات نقره)، **ج)** نمونه ۸ مربوط به تجزیه و تحلیل زایموگرام



نمودار ۱ نمودار لینویوربرک مربوط به آنزیم خالص‌سازی شده OPH

۳-۳- ارزیابی پارامترهای سینتیکی آنزیم OPH

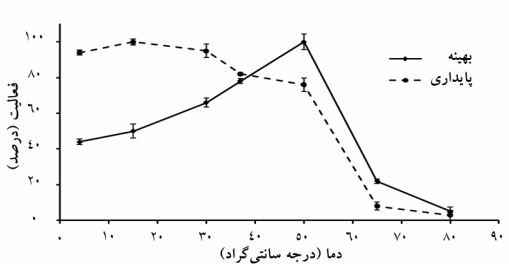
پارامترهای سینتیکی آنزیم خالص‌سازی شده با استفاده از نمودار لینویوربرک (Lineweaver-Burk plot) به‌وسیله پاراکسون به عنوان سوبسترا، محاسبه و تعیین شد. مقدار Km ٤٥/۹٦ میکرومولار و Vmax در حدود ۱۱/۲۳ میکرومول در دقیقه برای سوبسترای پاراکسون در نظر گرفته شد. برای رسم نمودار لینویوربرک از منحنی سوبسترا- سرعت استفاده شد (نمودار ۱).

بررسی نتایج اثر دما، pH و ترکیبات شیمیایی و فلزی بر فعالیت آنزیم

الگوی دمایی فعالیت آنزیم در طیف ٤ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد مطالعه شد. نتایج نشان داد که با افزایش دما به تدریج فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد و به بیشترین حد خود در

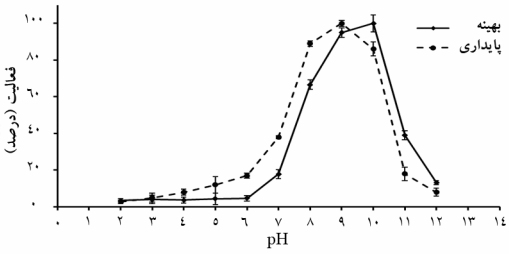
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه) می‌رسد. در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد و بین ۵۰ تا ٦٥ درجه فعالیت با شیب تندی کاهش یافت و آنزیم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تقریباً فعالیت خود را از دست داد. به لحاظ پایداری، آنزیم پایداری مناسبی در طیف دمایی ٤ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد از خود نشان داد (نمودار ۲).



نمودار ۲ الگوی فعالیت و پایداری آنزیم OPH در دماهای مختلف

الگوی pH فعالیت آنزیم یک حالت خمیده با بیشترین فعالیت در pH ۱۰ (pH بهینه) را نشان داد (نمودار ۳). همچنان که در شکل ۸ نشان داده شده است آنزیم در pH های بین ۷ تا ۱۰ پایداری مناسبی از خود نشان می‌دهد.



نمودار ۳ الگوی فعالیت و پایداری آنزیم OPH در pH های مختلف

اثر یون‌های کبالت، نیکل، کلسیم، منیزیم و آهن بر فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ مطالعه شد. فعالیت آنزیم در محلول واکنش فاقد این یون‌ها ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. تحت شرایط واکنش، یون کبالت به‌طور قابل ملاحظه‌ای فعالیت آنزیم را تا ۱۲۸ درصد افزایش داد. در حضور سایر یون‌ها میزان فعالیت آنزیم به این ترتیب بود: $Co^{2+} > Ni^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Fe^{2+}$. فعالیت آنزیم در حضور EDTA و SDS به‌ترتیب به ٤۸ و ۸ درصد کاهش یافت (جدول ۲).

جدول ۲ تأثیر یون‌های فلزی و ترکیبات شیمیایی مختلف بر فعالیت آنزیم OPH

یون‌ها و ترکیبات شیمیایی	فعالیت نسبی (درصد)
طبیعی	۱۰۰
Co^{2+}	۱۲۸
Ni^{2+}	۹۸
Mg^{2+}	۹٦
Ca^{2+}	۸۹
Fe^{2+}	۸۱
EDTA	٤۸
SDS	۸

بحث

زیست‌پالایی آنزیمی یکی از روش‌های بسیار سریع و سالم برای حذف آلودگی‌های ارگانوفسفره از محیط است. اخیراً استفاده از آنزیم OPH به خاطر توانایی آن در تجزیه سموم ارگانوفسفره بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۲]. استفاده از سوش‌های باکتریایی حاوی این آنزیم به عنوان کاتالیزگر زیستی (Biocatalyst) یک استراتژی مهم برای آلودگی‌زدایی این ترکیبات است. با این حال محدودیت انتقال ترکیبات ارگانوفسفره از میان غشای سلولی به عنوان مانعی برای استفاده از سوش‌های باکتریایی به عنوان کاتالیزگر زیستی محسوب می‌شود [۱۷]. تاکنون سیستم‌های بیانی مختلفی به منظور تولید آنزیم OPH طراحی شده است. تلاش‌ها برای بیان آنزیم در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

باکتری اشریشیا کلی به علت تشکیل پروتئین‌های با ساختار نامناسب (Misfold)، اجسام نامحلول درونی (Inclusion Body) و بازده تولیدی کم به علت حلالیت پایین این آنزیم همواره با شکست مواجه بوده است [۱۸، ۱۹]. در مطالعه حاضر آنزیم OPH به‌طور موفقیت‌آمیزی در مخمر پیکیا پاستوریس بیان شد. به علت قرارگیری جایگاه فعال آنزیم در انتهای کربوکسیل ضرورتاً برچسب پلی‌هیستیدین به انتهای N–ترمینال آنزیم اضافه شد. آنزیم تولید شده قادر به تجزیه سموم ارگانوفسفره نظیر پاراکسون بود. آنزیم OPH خالص‌سازی شده بیشترین فعالیت را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و بهترین پایداری را در دمای ٤ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد از خود نشان داد، به‌طوری که آنزیم بعد از ٦۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد توانست ۸۰ درصد فعالیت خود را حفظ کند. این نتایج متفاوت از آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز OPHC2 با منشأ سودوموناس سودوآلکالیژنز (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) بود که توسط چو (Chu) در سال ۲۰۰٦ در مخمر پیکیا تولید شده بود [۲۰]. آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز OPHC2 بهترین فعالیت را در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد از خود نشان می‌داد و در دماهای پایین غیرفعال می‌شد. آنزیم خالص‌سازی شده پایداری خوبی را در pH های بالا از خود نشان داد. پایداری آنزیم در pH و دماهای بالا را می‌توان به گلیکوزیله شدن آنزیم در سیستم پس از ترجمه‌ای مخمر نسبت داد. گلیکوزیله شدن فرآیند پس‌ترجمه‌ای است که در آن دنباله‌های کربوهیدراتی به‌صورت کووالان به پروتئین متصل می‌شود و باعث تسهیل تاخوردگی مناسب، جلوگیری از تجمع پروتئینی (Aggregation) و حفاظت در برابر پروتئازها می‌شود. اکثر پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در مخمر پیکیا پاستوریس پایداری بیشتری در pH و دماهای بالا از خود نشان می‌دهند. این خصوصیات آنزیم OPH تولید شده را آنزیم مناسبی برای کاربردهای تشخیصی و زیست‌پالایی می‌سازد. خصوصیت دیگری که می‌تواند آنزیم را کاتالیزگر زیستی مؤثری برای اهداف زیست‌پالایی قرار دهد، Km آن برای سم پاراکسون (حدود ٤۵ میکرومولار) است که در مقایسه با سوش‌های طبیعی از میزان پایینی برخوردار است (در سوش‌های سودوموناس دیمینوتا و سودوموناس سودوآلکالیژنز، Km برای سوبسترای پاراکسون به‌ترتیب ۹۰ و ٦٤/٤ میکرومولار بود) [۱٦، ۲۱]. مطالعه حاضر نشان داد که کاتیون دو ظرفیتی خصوصاً کبالت فعالیت آنزیم را افزایش و EDTA و SDS به‌طور قابل ملاحظه‌ای فعالیت آن را کاهش می‌دهد. کاهش فعالیت آنزیم با EDTA نشان می‌دهد که یون‌های کاتیونی دو ظرفیتی در انجام عمل هیدرولیز برای آنزیم ضروری‌اند؛ چرا که EDTA باعث شلاته کردن (Chelation) یون‌های دو ظرفیتی و در نتیجه باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. این نتیجه در مورد آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز OPHC2 صادق نبود و EDTA هیچ تأثیری بر فعالیت این آنزیم نداشت. این مطالعه یک گزارش مهم از ساخت و تولید آنزیم فعال OPH را ارایه می‌دهد که بر خلاف سوش باکتریایی آن ترشحی بوده و پایداری خوبی را تحت شرایط مختلف دمایی و pH از خود نشان می‌دهد. آنزیم نوترکیب تولید شده قادر به تجزیه سموم ارگانوفسفره است؛ بنابراین از اهمیت خاصی در زمینه‌های پزشکی به‌ویژه مسمومیت‌های ارگانوفسفره، زمینه‌های زیست‌پالایی سموم و کاربردهای نظامی برخوردار است. میل ترکیبی بالای آنزیم نسبت به سموم ارگانوفسفره اهمیت آن را دو چندان می‌سازد. نکته مهم دیگر استفاده از مخمر پیکیا پاستوریس به عنوان میزبانی مناسب برای تولید این آنزیم است که علاوه بر مزیت‌های ذکر شده پتانسیل تولید آنزیم نوترکیب در مقیاس صنعتی را نیز دارد. در نهایت آنزیم OPH تولید شده دارای مزایای زیادی برای مطالعات بعدی نظیر فرآیندهایی پایدارسازی و تثبیت است و پتانسیل بالایی برای کاربردهای تشخیصی و پالایشی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از رساله دکتری رشته بیوشیمی بالینی استخراج و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های دانشگاه تربیت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

مدرس و پژوهشگاه ملـی مهندسـی ژنتیـک و زیـست فنـاوری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

[1] Bird SB, Sutherland TD, Gresham C, Oakeshott J, Scott C, Eddleston M. OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides. Toxicology 2008; 247(2-3): 88-92.

[2] Kang DG, Lim GB, Cha HJ. Functional periplasmic secretion of organophosphorous hydrolase using the twin-arginine translocation pathway in Escherichia coli. J Biotechnol 2005; 118(4): 379-85.

[3] Yu H, Yan X, Shen W, Hong Q, Zhang J, Shen Y, Li S. Expression of methyl parathion hydrolase in Pichia pastoris. Curr Microbiol 2009; 59(6): 573-8.

[4] Fu G, Cui Z, Huang T, Li S. Expression, purification, and characterization of a novel methyl parathion hydrolase. Protein Expr Purif 2004; 36(2): 170-6.

[5] Ang EL, Zhao H, Obbard JP. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. Enzyme Microbial Technol 2005; 37(5): 487-96.

[6] Lan WS, Gu JD, Zhang JL, Shen BC, Jiang H, Mulchandani A, Chen W, Qiao CL. Coexpression of two detoxifying pesticide-degrading enzymes in a genetically engineered bacterium. Int Biodeterioration Biodegrad 2006; 58(2): 70-6.

[7] Efremenko EN, Sergeeva VS. Organo-phosphate hydrolase -an enzyme catalyzing degradation of phosphorus-containing toxins and pesticides. Russ Chem Bull 2001; 50(10): 1826-32.

[8] Li C, Zhu Y, Benz I, Schmidt MA, Chen W, Mulchandani A, Qiao C. Presentation of functional organophosphorus hydrolase fusions on the surface of Escherichia coli by the AIDA-I autotransporter pathway. Biotechnol Bioeng 2008; 99(2): 485-90.

[9] Mulbry WW, Karns JS, Kearney PC, Nelson JO, Mcdaniel CS, Wild JR. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from Flavobacterium sp. by southern hybridization with opd from Pseudomonas diminuta. Appl Environ Microbiol 1986; 51(5): 926–30.

[10] Mcdaniel CS, Harper LL, Wild JR. Cloning and sequencing of a plasmid-borne gene (opd) encoding a phosphotriesterase. J Bacteriol 1988; 170(5): 2306-11.

[11] Dong YJ, Bartlam M, Sun L, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, Rao Z, Zhang XE. Crystal structure of methyl parathion hydrolase from Pseudomonas sp. WBC-3. J Mol Biol 2005; 353(3): 655-63.

[12] Rani NL, Lalithakumari D. Degradation of methyl parathion by Pseudomonas putida. Can J Microbiol 1994; 40(12): 1000-6.

[13] Ohshiro K, Kakuta T, Nikaidou N, Watanabe T, Uchiyama T. Molecular cloning and nucleotide sequencing of organophosphorus insecticide hydrolase gene from Arthrobacter sp. strain B-5. J Biosci Bioeng 1999; 87(4): 531-4.

[14] Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]

relationship between the gene and protein. J Bacteriol 1989; 171(12): 6740-6.

[19] Grimsley JK, Scholtz JM, Pace CN, Wild JR. Organophosphorus hydrolase is a remarkably stable enzyme that unfolds through a homodimeric intermediate. Biochemistry 1997; 36(47): 14366-74.

[20] Chu XY, Wu NF, Deng MJ, Tian J, Yao B, Fan YL. Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in Pichia pastoris: purification and characterization. Protein Expr Purif 2006; 49(1): 9-14.

[21] Dumas DP, Caldwell SR, Wild JR, Raushel FM. Purification and properties of the phospho-triesterase from Pseudomonas diminuta. J Biol Chem 1989; 264(33): 19659-65.

proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit 2005; 18(2): 119-38.

[15] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast 2005; 22(4): 249-70.

[16] Wu N, Deng M, Shi X, Liang G, Yao B, Fan Y. Isolation, purification and characterization of a new organphosphorus hydrolase OPHC2. Chin Sci Bull 2004; 49(3): 268-72.

[17] Chen W, Mulchandani A. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. Trends Biotechnol 1998; 16(2): 71-6.

[18] Mulbry WW, Karns JS. Parathion hydrolase specified by the Flavobacterium opd gene:

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-26]