

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

Saeed Najavand¹, Abbass Sahebghadam Lotfi^{2,5*}, Afshin Mohsenifar³, Sareh Arjmand⁴, Ali Mota¹

- 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 comparison 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

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

سعید نژاوند^۱، عباس صاحب‌قدم‌لطفی^{۲*}، افشین محسنی‌فر^۳، ساره ارجمند^۴، علی مطاع^۱

- 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 سمت‌شناسی 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 ژئوکوئیم و زیست فناوری، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کد پستی: 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 نوروتوكسین‌های 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 لحظه تجزیه سموم، تعیین پارامترهای بیوشیمیایی و سینتیکی ارزیابی شد.

نتایج: آنزیم به میزان ۷/۴۹ مرتبه و با فعالیت ویژه $10^3 \times ۰/۴۲۱$ واحد در میلی گرم 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) به ترتیب ۴۵/۹۶ میکرومولار و ۱۱/۲۳ میکرومولار در دقیقه محاسبه شد. آنزیم نسبت به کاتیون‌های دو ظرفیتی بسیار حساس بود و توسط عوامل واسرنشتۀ کننده نظیر سدیم دودسیل سولفات فعالیت خود را از دست داد. وزن مولکولی آنزیم با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE حدود ۴۰ کیلو Dalton تخمین زده شد.

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

کلیدواژگان: ترکیبات ارگانوفسفره، ارگانوفسفر هیدرولاز، پیکیا پاستوریس

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

مقدمه

(Compounds) هزاران نفر را در گوش و کنار جهان مسموم

کرده و باعث مرگ صدها نفر می‌شود [۱]. ترکیبات

هر ساله ترکیبات ارگانوفسفره (Organophosphorus)

بیان آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز باکتریایی در مخمر پیکیا پاستوریس

بیان پروتئین‌های ترشحی بسیار رایج شده است. پیکیا پاستوریس قادر به تولید پروتئین‌های نوترکیب محلول و با تاخوردگی (Folding) مناسب است [۱۵-۱۳]. 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 میزان 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 سیتیکی آنزیم نوترکیب تولید شده ارزیابی شد.

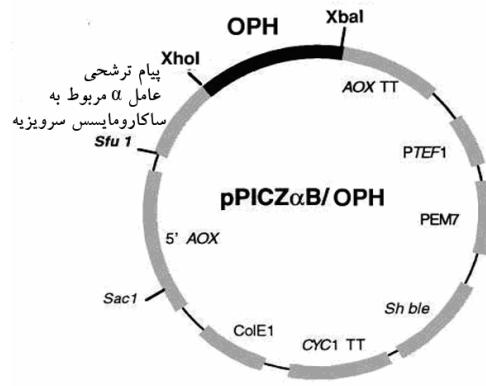
مواد و روش‌ها

در تمامی دستورزی‌های DNA از سوش‌های DH5 α و Top10F' باکتری اشتریشیا کلی (*Escherichia coli*) تهیه شده از بانک سلولی انسنتیتو پاستور ایران استفاده شد. سوش X.33 از آنکه محدود کننده استفاده شد. سوش X.33 مخمر پیکیا پاستوریس، ناقل pPICZ α B مربوط به مخمر AOX1 آغازگرهای (Primers) تعیین توالی الكل اکسیداز یک (Alcohol Oxidase1: Zeocin) و آنتی‌بیوتیک‌های زئوسبین (Tetracycline) از شرکت Invitrogen آمریکا و آنزیم‌های محدود کننده (*Xba*I و *Xho*I) از شرکت Pfu DNA 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 اشتریشیا کلی در محیط کشت (Luria Bertani LB) (۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد تریپتیون (Triptone)، ۰/۵ درصد کلرید سدیم) و LB با غلظت نمک کمتر (Salt Luria Bertani: LSLB Yeast Extract Peptone Dextrose) YPDS (۱ درصد عصاره مخمر، ۲ درصد پیتون (Sorbitol)، ۲ درصد دکستروز، سوربیتول ۱ مولار) و محیط Yeast (YPG) (۱ درصد عصاره مخمر، ۲ درصد پیتون، ۲ درصد گلیسرول) استفاده شد.

ارگانوفسفره متعلق به دسته‌ای از نوروتوكسین‌های بسیار سمی است که معمولاً به عنوان حشره‌کشن، جونده‌کشن 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 [۴]. یکی از مهم‌ترین راه‌های حل مسئله آلودگی‌های ترکیبات ارگانوفسفره، تشخیص و زیست‌پالایی (Bioremediation) این ترکیبات است [۵]. 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-CN، P-F، P-S، P-O) می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای سمیت آن‌ها را کاهش دهد. در مورد پاراتیون (Parathion) با هیدرولیز یکی از پیوندهای سمیت به حدود صد برابر کاهش می‌یابد [۶]. آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (Organophosphorus Hydrolase: OPH) یک آنزیم هومودیمر است که به طور قابل ملاحظه‌ای باعث هیدرولیز پیوندهای فسفواستر در نوروتوكسین‌های ارگانوفسفره می‌شود [۷]. این آنزیم در زمینه سمزدایی و آلودگی زدایی زمین‌های کشاورزی و انبار تسلیحات شیمیایی آلوده به سوم 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. به منظور تولید آنزیم OPH تاکنون سیستم‌های بیانی مختلفی استفاده شده‌اند. اخیراً استفاده از مخمر متیلوتروفیک (Methylotrophic Yeast) پیکیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) به عنوان میزان سلولی برای

کشت ترشح شود (شکل ۱).

cDNA سنتز شده نیز با آنژیم‌های ذکر شده هضم شد. ناقل خطی ۲/۶ کیلو باز و قطعه ژنی ۱۰۵۳ جفت‌بازی (مربوط به ژن OPH) با استفاده از الکتروفوروز 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 تراسایکلین) ترانسفورم (Transform) شد. سلول‌های ترانسفورم شده روی پلیت‌های LSB حاوی ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر زئوسبین (ژن مقاوم به زئوسبین) در ناقل *Sh ble* gene pPICZαB برای انتخاب سلول‌های ترانسفورم شده با ناقل نوترکیب و ۷۵ میکروگرم در میلی لیتر تراسایکلین پخش و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تک کلونی‌های رشد کرده به پلیت‌های LSB آگار حاوی مقادیر مشابه از آنتی‌بیوتیک‌ها انتقال یافته‌ند. به منظور تعیین توالی و تأیید همسانه‌سازی، از آغازگرهای تعیین توالی AOX1 برای PCR استفاده شد. توالی آغازگرهای به ترتیب ۵' AOX GACTGGTTCCAATTGACAAG ۳' AOX GCAAATGGCATTCTGACATCC PCR بود. در مخلوط واکنشی حاوی ۱/۵ میلی مولار دی کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۰/۳ میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای و یک واحد آنژیم *Taq* DNA پلیمراز انجام شد. بعد از واسرشت شدن (Denaturation) DNA در ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، قطعه وارد شده در ۳۰ چرخه با دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه تکثیر شد. قطعه تکثیر یافته با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR خالص‌سازی و خلوص آن توسط الکتروفوروز 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



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 Synthetic Gene Designer Analysis Tool و GCUA Designer 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) پیتید باکتریایی (۲۹ اسیدآمینه اول) از ابتدای آنژیم برداشته شد و بر جسب پلی‌هیستیدین به انتهای N-ترمینال آنژیم اضافه شد. ناقل pPICZαB برای بیان ژن OPH در مخمر پیکیا پاستوریس در نظر گرفته شد. این ناقل حاوی پروموتور AOX1 است که ناقل را برای ورود به جایگاه ژنی AOX1 در مخمر مجهز کرده و باعث القای متانولی و بیان بالای پروتئین *Xho*I و *Xba*I مورد نظر در مخمر می‌شود. ناقل با آنژیم‌های *Xho*I و *Xba*I در محل همسانه‌سازی ۳' AOX و *Xba*I و *Xho*I در ژل همسانه‌سازی هضم شد. جایگاه‌های *Xba*I و *Xho*I در قالب با نشانه ناقل به ما اجازه می‌دهد تا زن 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

آزمایش بررسی فعالیت آنزیمی (Assay)

راهیش پارانیتروفنل (Paranitrophenol) (ناثی از هیدرولیز پاراکسون (سوپسترات 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 ۴۰ میلی‌مولار پاراکسون برای شروع واکنش هیدرولیز به محلول فوق اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. میزان هیدرولیز پاراکسون از طریق تغییر در جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر 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 [۱۶].

خالص‌سازی آنزیم OPH

۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی فعالیت آنزیمی با استفاده از دستگاه اولترافیلتر (شرکت Thermo آمریکا) و با فیلترهای ۱۰ کیلودانلون 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 NaH₂PO₄, ۰/۵ مولار NaCl, ۱۰ میلی‌مولار Tween ۲۰، ۰/۰۵ درصد از تویین (Imidazole) با pH ۸) به تعادل رسیده بود منتقل شد. بعد از سه مرحله شستشو با بافر شستشو (۵۰ میلی‌مولار NaH₂PO₄, ۰/۵ مولار NaCl, ۰/۰۵ مولار ایمیدازول، ۴۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۲۰ میلی‌مولار NaCl, ۰/۰۵ مولار NaH₂PO₄, ۰/۰۵ درصد از تویین ۲۰ با pH ۸) پروتئین نوترکیب با استفاده از ۵ میلی‌لیتر بافر خارج کننده (۵۰ میلی‌مولار NaH₂PO₄, ۰/۰۵ مولار NaCl, ۳۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول, ۰/۰۵ درصد از تویین ۲۰ با pH ۸) از ستون جدا شد. آنزیم خالص‌سازی شده مقابل بافر

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 پرموترا 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 به وسیله روش الکتروپوریشن (Electroporation) به سلول‌های مستعد پیکیا پاستوریس ترانسفورم شد. الکتروپوریشن با استفاده از میکروپالس (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 به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تک کلونی‌های رشد کرده به پلیت YPDS آگار حاوی مقدار مشابه از آنتی‌بیوتیک زئوسین انتقال یافتدند. برای ارزیابی موفقیت ترانسفورم، کلونی‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر محیط YPG به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت و تا رسیدن به جذب نوری (Optical Density: OD) ۴ تا ۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD₆₀₀=4-6) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. به منظور تأیید ورود قطعه ژنی به درون ژنوم DNA، Mxmri با استفاده از کیت استخراج 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 ۶۰۰ نانومتر) برداشته و در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPM حاوی متانول ۱ درصد متانول و به مدت ۴ روز کشت داده شد. هر روز ۱ درصد متانول حجمی/حجمی برای تداوم القای پرموترا الكل اکسیداز به محیط کشت اضافه شد. در تمامی موارد نمونه مخمری ترانسفورم با ناقل بدون قطعه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

۱۲ تعیین شد. اثر pH بر فعالیت آنزیم از طریق انجام واکنش در بافرهای مختلف (۱۰۰ میلی مولار) شامل سدیم استات (برای pH ۴، ۳، ۲)، سدیم فسفات (برای pH ۶ 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 به وسیله اندازه‌گیری فعالیت باقیمانده آنزیم پس از ۶۰ 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 میلی مولار از یون‌های سولفات نیکل (NiSO_4)، دی‌کلرید کربالت (CoCl_2)، دی‌کلرید کلسیم (CaCl_2)، دی‌کلرید منیزیم (MgCl_2)، سولفات آهن (FeSO_4) و ۲ میلی مولار سدیم دودسیل سولفات (SDS: Sodium Dodecyl Sulfate) و (Ethylenediaminetetraacetic Acid: EDTA) ارزیابی شد.

نتایج

همسانه‌سازی و بیان آنزیم OPH در مخمر

پیکیا پاستوریس

مقایسه شاخص سازگاری کدونی (Codon Adaptation Index) توالی OPH باکتری سودوموناس دیمینوتا با توالی DNA ژن مهندسی شده OPH (برای تجزیه و تحلیل GenScript اطلاعات از سایت بیوانفورماتیک 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 DH5 α باکتری اشریشیا کلی انجام شد. برای ترانسفسورم محصول الحاق (Ligation) از Top10F' استفاده شد. همسانه‌سازی ژن OPH در ناقل pPICZαB به وسیله PCR و با استفاده از آغازگرهای تعیین توالی AOX1 تأیید شد. الکتروفورز ژل آگارز از محصولات PCR یک باند در ناحیه ۱۰۵۳ جفت باز (۱۰۵۹) جفت باز مربوط به ژن OPH و ۵۰۶ تا ۱۳۹۱ بهیه برای فعالیت آنزیم از طریق اندازه‌گیری فعالیت پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دماهای مختلف (۴، ۱۵، ۳۰، ۳۷، ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و pH بین ۲ تا

۲۰ میلی مولار Na_2HPO_4 با pH ۸/۶ دیالیز شد. الکتروفورز Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide SDS-PAGE (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 (5X PAGE) مخلوط شد و سپس الکتروفورز PAGE روی نمونه‌ها صورت گرفت. بعد از الکتروفورز، ژل روی پلیت LB آگار حاوی ۲۰۰ میلی گرم 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 سیستیکی آنزیم OPH

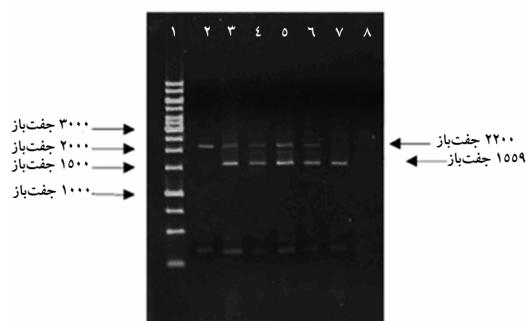
مطالعات سیستیکی روی آنزیم در بافر تریس-HCl ۵۰ میلی مولار با pH ۸ حاوی غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار پاراکسون به عنوان سویسترا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. برای بررسی ثابت میکائیلیس (Km) و حداقل سرعت آنزیمی (Vmax)، سرعت اولیه آنزیم در غلظت‌های فوق محاسبه شد.

بررسی اثر دما، pH و یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم

دما و pH بهیه برای فعالیت آنزیم از طریق اندازه‌گیری فعالیت پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دماهای مختلف (۴، ۱۵، ۳۰، ۳۷، ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و pH بین ۲ تا

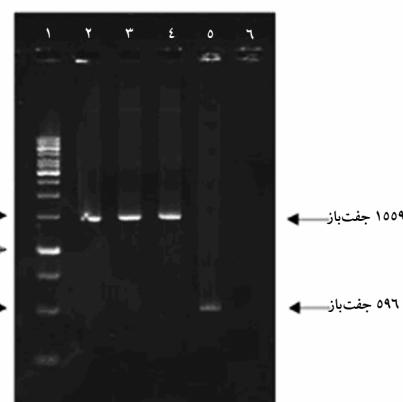
بیان آنزیم ارکانوفسفر هیدرولاز باکتریایی در مخمر پیکیا پاستوریس

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 به ترتیب دو باند در ناحیه‌های ۱۵۵۹ جفت‌باز و ۲۲۰۰ جفت‌باز نشان داد که به ترتیب مربوط به ژن OPH و ژن الكل اکسیداز مخمر (که با آغازگرهای AOX1 قطعه ۲۲۰۰ جفت‌باز را ایجاد می‌کرد) بود (شکل ۴).



شکل ۴ نتایج مربوط به PCR از نمونه‌های مخمری استخراج شده؛ نمونه ۱ مربوط به نشانگر وزنی ۱ کیلوسازی، نمونه ۲ مربوط به ژنوم مخمر بدون ترانسفورم، نمونه‌های ۳ تا ۶ مربوط به مخمرهای ترانسفورم شده با ناقل نوترکیب، نمونه ۷ مربوط به ناقل نوترکیب، نمونه ۸ کنترل منفی (بدون نمونه)

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



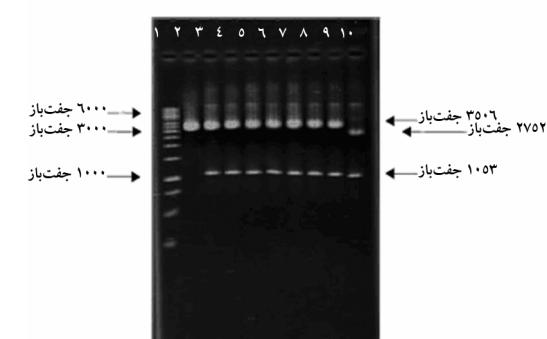
شکل ۲ ژل الکتروفورز آگارز حاصل از تکثیر PCR روی ناقل نوترکیب؛ نمونه ۱ مربوط به نشانگر ۱ کیلوسازی SM0311، نمونه‌های ۲، ۳ و ۴ مربوط به ناقل نوترکیب حاوی ژن OPH، نمونه ۵ مربوط به ناقل pPICZaB، نمونه ۶ مربوط به نمونه کنترل منفی (بدون نمونه)

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

خلاصه سازی و تعیین ویژگی‌های آنزیم OPH

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

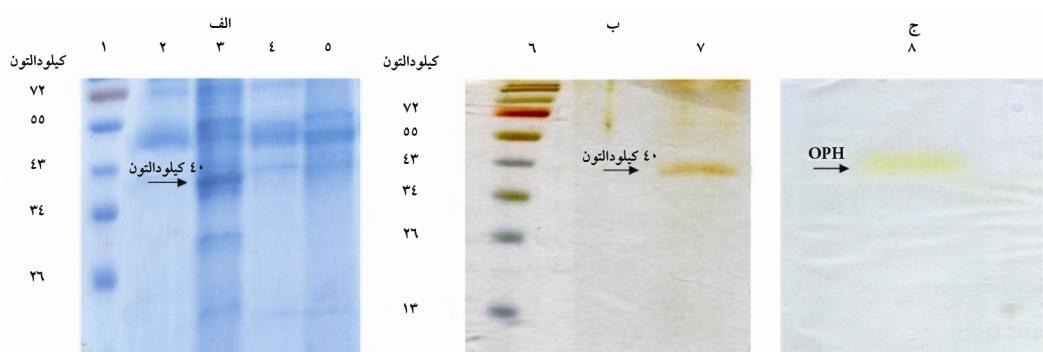
آنژیم به میزان $7/49 \text{ مرتبه}$ و با فعالیت ویژه $10^3 \times 421/40$ واحد در میلی‌گرم پروتئین و با بازده ۳۳ درصد از محلول رویی محیط کشت جدا و خالص سازی شد. در الکتروفورز SDS-PAGE از آنزیم خالص سازی شده یک تک باند در ناحیه تقریباً ۴۰ کیلو Dalton مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۳ هضم ناقل نوترکیب (pPICZaB/OPH) با آنزیم‌های محدود کننده *Xba*I، نمونه ۱ مربوط به نشانگر وزنی ۱ کیلوسازی، نمونه ۲ مربوط به هضم ناقل pPICZaB 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

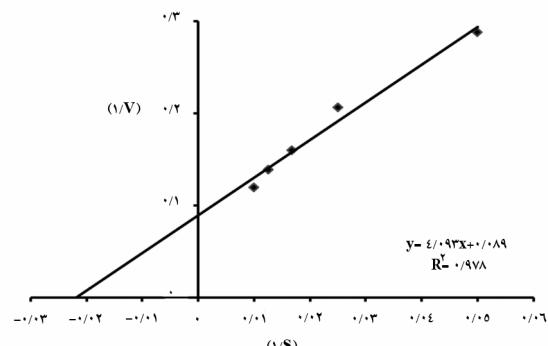
جدول ۱ مراحل خالص‌سازی آنزیم OPH از محلول رویی محیط کشت حاوی فعالیت آنزیمی با استفاده از ستون نیکل

مرحله خالص‌سازی	حجم کل (میلی لیتر)	پروتئین تام (میلی گرم)	فعالیت کل (واحد در میلی گرم پروتئین)	فعالیت ویژه (واحد در میلی گرم پروتئین)	میزان خالص‌سازی بازده (درصد)	بازده (درصد)
محلول رویی محیط کشت	۱۰۰	۳۱/۴	۱۷۶۴	۵۶/۱۷	۱	۱۰۰
بعد از اولترافیلتراسیون	۱۰	۷/۵۱	۱۱۲۷	۱۵۰/۱۲	۲/۶۷	۶۳
بعد از خالص‌سازی	۵	۱/۳۸	۵۸۱/۲۵	۴۲۱	۷/۴۹	۲۳



شکل ۵ نتایج مربوط به الکتروفورز SDS و آشکارسازی آنزیم نوترکیب تولید شده؛ (الف) نمونه ۱ مربوط به استاندارد وزن مولکولی، نمونه‌های ۲ و ۳ به ترتیب مربوط به محلول رویی نمونه دارای فعالیت در شرایط قبل و بعد از القا، نمونه‌های ۴ و ۵ به ترتیب مربوط به محلول رویی نمونه کترل منفی قبل و بعد از القا، (ب) نمونه ۶ مربوط به استاندارد وزن مولکولی، نمونه ۷ مربوط به نمونه خالص‌سازی شده (رنگ آمیزی با نیترات نقره)، (ج) نمونه ۸ مربوط به تجزیه و تحابیل زایموگرام

نمودار لینویوربرک (Lineweaver-Burk plot) (به وسیله Km پاراکسون به عنوان سوبسترا، محاسبه و تعیین شد. مقدار ۴۵/۹۶ میکرومولار و Vmax در حدود ۱۱/۲۳ میکرومول در دقیقه برای سوبستراتی 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 ۴ تا ۸۰ درجه سانتی گراد مطالعه شد. نتایج نشان داد که با افزایش دما به تدریج فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد و به بیشترین حد خود در

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

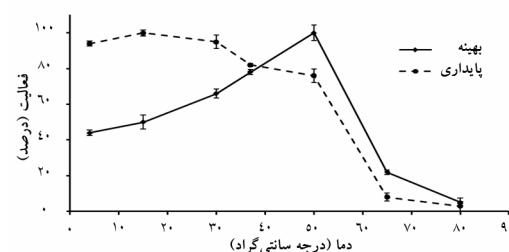
بیان آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز باکتریایی در مخمر پیکیا پاستوریس

حضور سایر یون‌ها میزان فعالیت آنزیم به این ترتیب بود: $\text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Fe}^{2+}$. فعالیت آنزیم در حضور SDS و EDTA به ترتیب به ۴۸ و ۸ درصد کاهش یافت (جدول ۲).

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

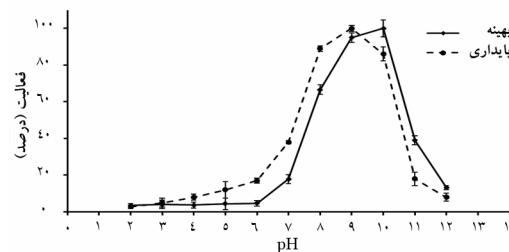
یون‌ها و ترکیبات شیمیایی	فعالیت نسبی (درصد)
طبيعي	۱۰۰
Co^{2+}	۱۲۸
Ni^{2+}	۹۸
Mg^{2+}	۹۶
Ca^{2+}	۸۹
Fe^{2+}	۸۱
EDTA	۴۸
SDS	۸

دماهای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (دماهای بهینه) می‌رسد. در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد و بین ۵۰ تا ۶۵ درجه فعالیت با شبیه تندری کاهش یافت و آنزیم در دماهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تقریباً فعالیت خود را از دست داد. به لحاظ پایداری، آنزیم پایداری مناسبی در طیف دماهای ۴ 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 ۱۰ pH (دماهای 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 کربالت، نیکل، کلسیم، منیزیم و آهن بر فعالیت آنزیم در دماهای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸ pH مطالعه شد. فعالیت آنزیم در محلول واکنش قادر این یون‌ها ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. تحت شرایط واکنش، یون کربالت به طور قابل ملاحظه‌ای فعالیت آنزیم را تا ۱۲۸ درصد افزایش داد. در

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 سوم 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 مانع 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

در مقایسه با سوش‌های طبیعی از میزان پایینی برخوردار است (در سوش‌های سودوموناس دیمینوتا و سودوموناس سودوآلکالیژنر، Km برای سوبسترای پاراکسون به ترتیب ۹۰ و ۶۴/۴ میکرومولار بود) [۲۱، ۱۶]. مطالعه حاضر نشان داد که کاتیون دو ظرفیتی خصوصاً کالت فعالیت آنزیم را افزایش و EDTA و SDS به طور 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 آنزیم (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 ثبت 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 نویسندهای مقاله از حمایت‌های دانشگاه تربیت

باکتری اشتبه کلی به علت تشکیل پروتئین‌های با ساختار Inclusion (Misfold)، اجسام نامحلول درونی (Body) و بازده تولیدی کم به علت حلایت پایین این آنزیم همواره با شکست مواجه بوده است [۱۸، ۱۹]. در مطالعه حاضر آنزیم OPH به‌طور موقتی آمیزی 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 ۴ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد از خود نشان داد، به‌طوری که آنزیم بعد از ۶۰ 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 سودوآلکالیژنر (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) بود که توسط چو (Chu) در سال ۲۰۰۶ در مخمر پیکیا تولید شده بود [۲۰]. آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز OPHC2 بهترین فعالیت را در دمای ۶۵ 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 به صورت کووالان به پروتئین متصل می‌شود و باعث تسهیل تاخورده‌گی 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، آن برای سم پاراکسون (حدود ۴۵ میکرومولار) است که

تشکر و قدردانی می نمایند.

مدرس و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنیک و زیست فناوری

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. Organophosphate 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

- 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 organophosphorus 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: 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 phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem* 1989; 264(33): 19659-65.