

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 K_m of 45.96 μ M and a V_{max} of 11.23 μ M/min (421 μ M/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 K_m 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 نوروتوکسین‌های ارگانوفسفره

سعید نژادند^۱، عباس صاحب‌قدم‌لطفی^{۲،*}، افشین محسنی‌فر^۳، ساره ارجمند^۴، علی مطاع^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، 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- استادیار، گروه زیست فناوری دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

Lotfi_ab@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۲/۲۷

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۲۲

چکیده

هدف: آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آنزیم هومویدیمی 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 دیمنوتا پس از بهینه‌سازی برای مخمر پیکیا پاستوریس و تبدیل آن به فرم ترشخی (آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز به فرم غشایی در باکتری وجود دارد) در ناقل بیانی pPICZαB کلون شد. پس از ترانسفورم و القای مخمرهای نو ترکیب، آنزیم به لحاظ تجزیه سموم، تعیین پارامترهای بیوشیمیایی و سینتیکی ارزیابی شد.

نتایج: آنزیم به میزان ۷/۴۹ مرتبه و با فعالیت ویژه $10^3 \times 0.421$ 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 پارااکسون، 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 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 پارااکسون 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: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۶۱-۷۲

مقدمه

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

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

هر ساله ترکیبات ارگانوفسفره (Organophosphorus)

بیان پروتئین‌های ترش‌چی 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 ترش‌چی 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 سیتیکی آنزیم نوترکیب تولید شده ارزیابی شد.

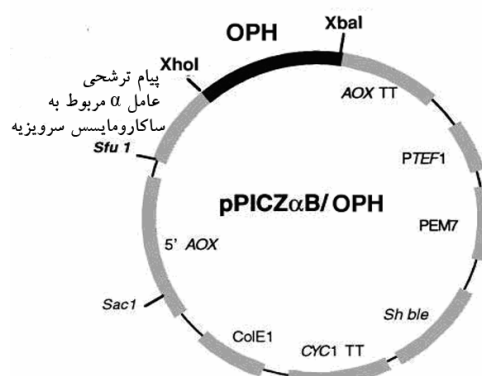
مواد و روش‌ها

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 Oxidase 1) و آنتی‌بیوتیک‌های ژئوسین (Zeocin) و تتراسیکلین (Tetracycline) از شرکت Invitrogen آمریکا و آنزیم‌های محدودکننده (*XhoI* و *XbaI*)، DNA Pfu پلیمرز، DNA *Taq* پلیمرز 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 (Tryptone)، 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) (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.

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 [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 به‌طور قابل ملاحظه‌ای سمیت آن‌ها را کاهش دهد. در مورد پاراتیون (Parathion) با هیدرولیز یکی از پیوندها سمیت به حدود صد برابر کاهش می‌یابد [۶]. آنزیم ارگانوفسفره 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 تجزیه‌کننده سموم ارگانوفسفره نظیر گونه‌های فلاوباکتر (*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 میتلوتروفیک (Methylotrophic Yeast) پیکیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) به عنوان میزبان سلولی برای

کشت ترشح شود (شکل ۱).

cDNA سنتز شده نیز با آنزیم‌های ذکر شده هضم شد. ناقل خطی ۳/۶ 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 *XbaI* و *XhoI* وارد شد و ناقل نو ترکیب 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 نو ترکیب) و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تتراسایکلین پخش و به مدت ۱۶ 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 به ترتیب 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* پلیمرز 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 (Annealing) ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب)

ساخت ناقل و همسانه‌سازی (Cloning)

cDNA مربوط به ژن OPH باکتری سودوموناس دیمنوتا با استفاده از نرم‌افزارهایی مانند GenScript Rare Codon، Gene designer، Analysis Tool و 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) پپتید باکتریایی (۲۹ اسیدآمینو 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 پروموتور (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 *XhoI* و *XbaI* هضم شد. جایگاه‌های *XhoI* و *XbaI* 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 اسیدآمینو اضافی در انتهای N-ترمینال بیان و به داخل محیط

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 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 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 [۱۶].

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 توین 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 ۴۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۰/۰۵ درصد از توین 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 توین 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 پروموتور 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 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 ژئوسین پخش شده و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. تک کلونی‌های رشد کرده به پلیت YPDS آگار حاوی مقادیر مشابه از آنتی‌بیوتیک ژئوسین انتقال یافتند. 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 ($\text{OD}_{600}=4-6$) 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 ۶۰۰ نانومتر) برداشته و در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPM حاوی متانول ۱ درصد تلقیح و به مدت ۴ روز کشت داده شد. هر روز ۱ درصد متانول حجمی/حجمی برای تداوم القای پروموتور 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.

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) رنگ آمیزی 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 میلی گرم پاراکسون در لیتر قرار گرفت. پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 میلی مولار با pH ۸ حاوی غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار پاراکسون به عنوان سوبسترا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. برای بررسی ثابت میکائیلیس (K_m) و حداکثر سرعت آنزیمی (V_{max})، 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 (۴، ۱۵، ۳۰، ۳۷، ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درجه سانتی گراد) و pH بین ۲ تا

۱۲ تعیین شد. اثر pH بر فعالیت آنزیم از طریق انجام واکنش در بافرهای مختلف (۱۰۰ میلی مولار) شامل سدیم استات (برای pH ۲، ۳، ۴ و ۵)، 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)، دی کلرید کبالت (CoCl_2)، دی کلرید کلسیم (CaCl_2)، دی کلرید منیزیم (MgCl_2)، سولفات آهن (FeSO_4) و ۲ میلی مولار سدیم دودسیل سولفات (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) و دودسیل سولفات (Ethylenediaminetetraacetic Acid) EDTA ارزیابی شد.

نتایج

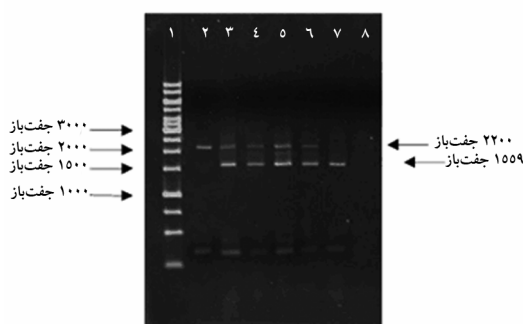
همسانه‌سازی و بیان آنزیم OPH در مخمر

پیکیا پاستوریس

مقایسه شاخص سازگاری کدونی (Codon Adaptation Index) توالی DNA ژن OPH باکتری سودوموناس دیمنوتا 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 DH5 α باکتری اشریشیا کلی انجام شد. برای ترانسفورم محصول الحاق (Ligation) از Top10F' استفاده شد. همسانه‌سازی ژن OPH در ناقل pPICZ α B به وسیله 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 ۵۰۶

بیان آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز باکتریایی در مخمر پیکیا پاستوریس

مخمرهای ترانسفورم شده حاوی ژن OPH در DNA ژنومی خود، از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 الکل اکسیداز مخمر (که با آغازگرهای AOX1 قطعه ۲۲۰۰ جفت‌باز را ایجاد می‌کرد) بود (شکل ۴).



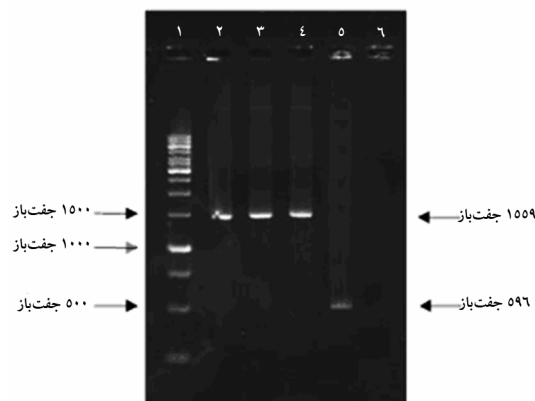
شکل ۴ نتایج مربوط به PCR از نمونه‌های مخمری استخراج شده؛ نمونه ۱ مربوط به نشانگر وزنی ۱ کیلوبازی، نمونه ۲ مربوط به ژنوم مخمر بدون ترانسفورم، نمونه‌های ۳ تا ۶ مربوط به مخمرهای ترانسفورم شده با ناقل نوترکیب، نمونه ۷ مربوط به ناقل نوترکیب، نمونه ۸ کنترل منفی (بدون نمونه)

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.

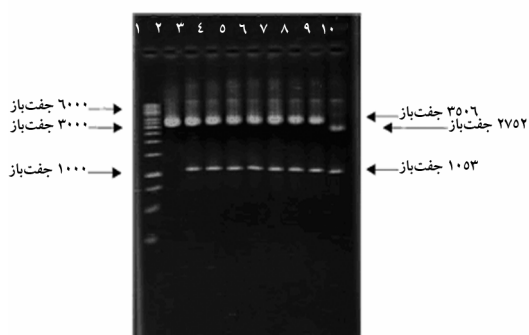
آنزیم به میزان ۷/۴۹ مرتبه و با فعالیت ویژه $10^3 \times 0.421$ واحد در میلی گرم پروتئین و با بازده ۳۳ درصد از محلول رویی محیط کشت جدا و خالص‌سازی شد. در الکتروفورز SDS-PAGE از آنزیم خالص‌سازی شده یک تک باند در ناحیه تقریباً ۴۰ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۵).

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 ۴ مربوط به ناقل نوترکیب حاوی ژن OPH، نمونه ۵ مربوط به ناقل pPICZaB، نمونه ۶ مربوط به نمونه کنترل منفی (بدون نمونه)

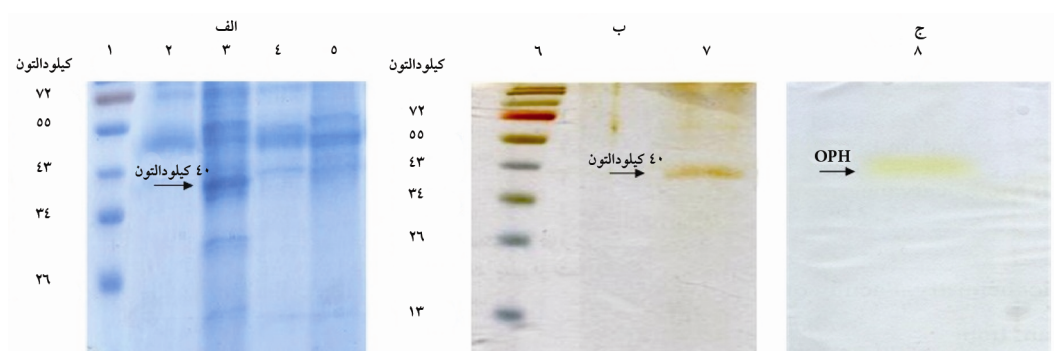
نتایج حاصل از تعیین توالی، اتصال در قالب ژن OPH را با نشانه ترشی α فاکتور ناقل تأیید کرد. همچنین هضم ناقل‌های نوترکیب با آنزیم‌های *XhoI* و *XbaI* (R-mapping) نیز همسانه‌سازی را تأیید کرد (شکل ۳).



شکل ۳ هضم ناقل نوترکیب (pPICZaB/ OPH) با آنزیم‌های محدود کننده *XbaI* و *XhoI*؛ نمونه ۱ مربوط به نشانگر وزنی ۱ کیلوبازی، 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

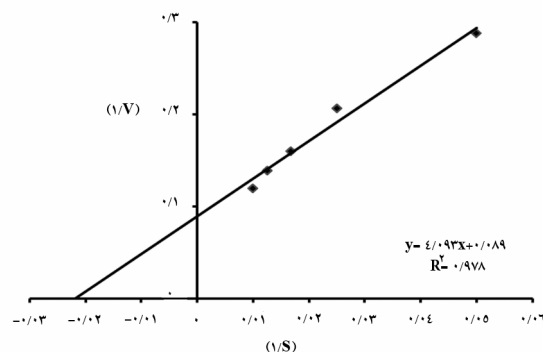
جدول ۱ مراحل خالص سازی آنزیم OPH از محلول رویی محیط کشت حاوی فعالیت آنزیمی با استفاده از ستون نیکل

مرحله خالص سازی	حجم کل (میلی لیتر)	پروتئین تام (میلی گرم)	فعالیت کل (واحد آنزیمی)	فعالیت ویژه (واحد در میلی گرم پروتئین)	میزان خالص سازی	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 خالص سازی	۵	۱/۳۸	۵۸۱/۲۵	۴۲۱	۷/۴۹	۳۳



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

نمودار لینویربرک (Lineweaver-Burk plot) به وسیله پاراکسون به عنوان سوبسترا، محاسبه و تعیین شد. مقدار Km ۴۵/۹۶ میکرومولار و Vmax در حدود ۱۱/۲۳ میکرومول در دقیقه برای سوبسترای پاراکسون در نظر گرفته شد. برای رسم نمودار لینویربرک از منحنی سوبسترا-سرعت استفاده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱ نمودار لینویربرک مربوط به آنزیم خالص سازی شده OPH

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 می یابد و به بیشترین حد خود در

۳-۳- ارزیابی پارامترهای سینتیکی آنزیم OPH

پارامترهای سینتیکی آنزیم خالص سازی شده با استفاده از

بیان آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز باکتریایی در مخمر پیکیا پاستوریس

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

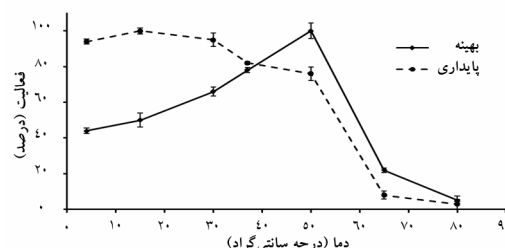
جدول ۲ تأثیر یون‌های فلزی و ترکیبات شیمیایی مختلف بر فعالیت آنزیم OPH

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

بحث

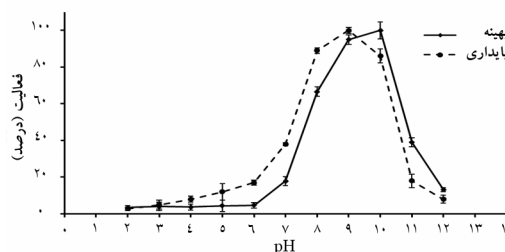
زیست‌پالایی آنزیمی یکی از روش‌های بسیار سریع و سالم برای حذف آلودگی‌های ارگانوفسفره از محیط است. اخیراً استفاده از آنزیم OPH به خاطر توانایی آن در تجزیه سموم ارگانوفسفره بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۲]. استفاده از سوش‌های باکتریایی حاوی این آنزیم به عنوان کاتالیزگر زیستی (Biocatalyst) یک استراتژی 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

دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه) می‌رسد. در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد و بین ۵۰ تا ۶۵ 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 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 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

باکتری اشیریشیا 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 ارگانوفسفرفر 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 ارگانوفسفرولاز OPHC2 با منشأ سودوموناس سودوآلکالیژنز (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) بود که توسط چو (Chu) در سال ۲۰۰۶ در مخمر پیکیا تولید شده بود [۲۰]. آنزیم ارگانوفسفرولاز 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 فرایند 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 ۴۵ میکرومولار) است که

در مقایسه با سوش‌های طبیعی از میزان پایینی برخوردار است (در سوش‌های سودوموناس دیمینوتا و سودوموناس سودوآلکالیژنز، Km برای سوسترای پاراکسون به ترتیب ۹۰ و ۶۴/۴ میکرومولار بود) [۱۶، 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 ارگانوفسفرولاز 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 ارائه 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 ارگانوفسفرفر است؛ بنابراین از اهمیت خاصی در زمینه‌های پزشکی به‌ویژه مسمومیت‌های ارگانوفسفرفر، زمینه‌های زیست‌پالایی سموم و کاربردهای نظامی برخوردار است. میل ترکیبی بالای آنزیم نسبت به سموم ارگانوفسفرفر 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

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.