**Iranian Journal of Plant Protection Science**
Vol 48, No 2, Autumn & Winter 2017-2018 (253-269)
DOI: 10.22059/ijpps.2018.232783.1006784

**دانش گیاهپزشکی ایران**
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۶ (ص ۲۶۹-۲۵۳)

# کلونینگ و بیان ژن رمزگذار آنزیم تجزیه‌کننده ترکیبات آلی فسفره (*opd*) در باکتری *Escherichia coli*

**سیده مینو سجادیان[۱]، وحید حسینی نوه[۲*]، خلیل طالبی[۲] و مریم زمانی[۳]**
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. پژوهشگر پسا دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه مک مستر، همیلتون کانادا
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳)

## چکیده

کاربرد گستردهٔ ترکیب‌های آلی فسفرهٔ منجر به بروز اثر زیان‌آور زیست‌محیطی بسیاری شده است. استفاده از میکروارگانیسم‌ها در پالایش و اندازه‌گیری این ترکیب‌های ناگوار به‌عنوان یک رویکرد دوستدار محیط‌زیست و مناسب شناخته شده است. آنزیم ارگانوفسفروس هیدرولاز از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ فسفوتری‌استری است که در برخی میکروارگانیسم‌های خاک به‌ویژه *Flavobacterium* sp. شناسایی شده و قادر به هیدرولیز تعدادی از ترکیب‌های فسفرهٔ آلی است. در این پژوهش بهینه‌سازی کدون‌های توالی رمزگذار این پروتئین برای بیان در باکتری *Escherichia coli* انجام شد و سپس همراه با پروموتر *lac*، در وکتور پروموتر-پروب pTH1705 به‌صورت ادغام الگوبرداری کلون شد و ترانسفورماسیون در دو سویهٔ باکتری *E. coli* انجام گرفت. محیط کشت معدنی M9 حاوی غلظت ۱۰و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، برای سنجش عملکرد باکتری تراریخت بیان‌کنندهٔ ژن *opd* (به‌صورت *in trans*) استفاده شد. بررسی منحنی رشد استرین V103 *E. coli* نشان داد، رشد باکتری در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون تا حد زیادی تحت تأثیر (وجود آفت‌کش) قرار می‌گیرد درحالی‌که در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون این تأثیر کمتر است. نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌عنوان یک روش استاندارد نشان داد، غلظت دیازینون در محیط کشت باکتری، در چهار استرین V100، V101، V102 و V103 پس از ۲٤ ساعت از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب به ٦/۳۸، ۷/۱۹، ۷/۰۹ و ۵/۷٤ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. این نتایج بیانگر انتقال موفق و نیز بیان ژن مورد نظر در باکتری است و این باکتری نوترکیب مهندسی‌شده توانایی تجزیهٔ ترکیب‌های فسفره را دارد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری تراریخت، تجزیه، ترکیب‌های آلی فسفره، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

# Cloning and studing the function of *opd* gene encoding organophosphorus hydrolase in *Escherichia coli*

**Seyedeh Minoo Sajadian[1], Vahid Hosseini Naveh[2*], Khalil Talebi[2] and Maryam Zamani[3]**
1, 2. Ph. D. Candidate and Professor, Department of Plant Protection, University College of Agriculture & Natural Resoucrs, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Postdoc Fellowship, Department of Biology, McMaster University, Hamilton, Canada
(Received: May 7, 2017 - Accepted: Jan. 23, 2018)

## ABSTRACT

Organophosphorus compounds are widely used, and their presence in different components of the ecosystem has led to harmful effects on the environment. The use of microorganisms in detoxification of xenobiotic compounds and measurement of pesticide residues is considered as an environmental-friendly and appropriate method. Organophosphorus hydrolase (*opd*), is a phosphotriester hydrolase enzyme which is discovered in some soil microorganisms such as *Flavobacterium* sp. and has a wide range of substrates and is able to hydrolyze many organophosphorus compounds. In the present study, codon optimization was done to express the protein in *Escherichia coli*. Following omission of the signal peptide sequence and substitution of serine by methionine as the start codon, this fragment was cloned under the control of *lac* promoter in a promoter-probe vector (pTH1705) as a transcriptional fusion and was used for transformation in two *Escherichia coli* strains DH5α and XL1-blue. To measure the performance of the transgenic bacteria expressing *opd* gene (as *in trans*), they were cultured in M9 mineral medium containing 10 and 50 mg/L diazinon and appropriate available carbon and nitrogen sources. Studying the growth curve of V103 strain revealed that bacterial growth in the presence of 50 mg/L diazinon had been affected while this effect in the presence of 10 mg/L diazinon was minor. Results obtained from high-performance liquid chromatography as a standard method to compare with the performance of obtained transgenic strain showed that after 24 hours, diazinon concentration (initially 10mg/L ) in the bacterial culture medium of V100, V101, V102 and V103 strains reached to 6.38, 7.19, 7.09 and 5.74, respectively. These results reflected the successful transfer and expression of target gene in the bacterium and this genetically engineered bacterium was able to degrade organophosphorus compounds directly.

**Keywords:** Degradation, HPLC, organophosphorus compounds, transgenic bacterium.

* Corresponding author E-mail: vnaveh@ut.ac.ir

## مقدمه

در دنیای امروز مقدار زیادی آفت‌کش از راه‌های مختلف به محیط‌زیست راه پیدا کرده و در محیط پخش می‌شوند. مهم‌ترین خطرهای آفت‌کش‌ها تأثیر منفی آن‌ها روی محیط‌زیست، حیات‌وحش، گیاهان مفید و به‌طورکلی موجودات غیرهدف است (Hsu & Bartha, 1979). ترکیب‌های فسفرهٔ آلی از سمی‌ترین موادی هستند که هم به‌عنوان عامل‌های جنگ شیمیایی و هم به‌عنوان آفت‌کش استفاده می‌شوند (Wang *et al*., 2001). این ترکیب‌ها به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان آفت‌کش برای محافظت از مواد غذایی، محصولات کشاورزی و محیط‌زیست در مقابل خسارت‌های ایجادشده توسط آفات مختلف استفاده می‌شوند (Rogers *et al*., 1999). آفت‌کش‌های آلی فسفرهٔ مهارکنندهٔ استیل کولین‌استراز هستند، آنزیمی که به عمل پیام‌رسان استیل کولین پایان می‌بخشد و با تحریک عصبی به فضای سیناپسی ترشح می‌شود و روی گیرنده‌های کولینرژیک پس‌سیناپسی عمل می‌کند. در نتیجه استیل کولین در شیار عصبی جمع شده و بنابراین عمل مخابرهٔ پیام مختل می‌شود و هیجان عصبی دست می‌دهد. در نتیجه ماهیچه‌ها منقبض شده که در نهایت این حالت به فلج و مرگ منتهی می‌شود (Donarski *et al*., 1989). اگرچه این ترکیب‌ها نقش قابل توجهی در حفاظت از گیاهان زراعی و محصولات کشاورزی دارند اما کاربرد گسترده و وجود آن‌ها در اجزای مختلف اکوسیستم منجر به بروز اثر زیان‌آور زیست‌محیطی بسیاری شده است (Musa *et al*., 2011). در بین ترکیب‌های آلی فسفره آفت‌کش‌هایی با خاصیت گوارشی، تماسی، نفوذی، سیستمیک و تدخینی وجود دارد که به دلیل اثرگذاری سریع، قابلیت متابولیسم سریع در بدن موجودات زنده، خاصیت نفوذی و سیستمیک برخی از آن‌ها و همچنین تجزیهٔ سریع در خاک، آب و ایجاد آلودگی محیطی کمتر به‌طور وسیعی استفاده می‌شوند (Cai *et al*., 2016). ترکیب‌های فسفره در معرض نور خورشید، هوا، خاک و غیره سم‌زدایی و هیدرولیز می‌شوند (Musa *et al*., 2011; Zheng *et al*., 2013). عامل‌های غیرزنده (مانند دما، رطوبت، اسیدیتهٔ خاک، و غیره)، جامعهٔ میکروبی، گونه‌های گیاهی، ویژگی‌های آفت‌کش‌ها، و واکنش‌های بیولوژیکی و شیمیایی نیز سرنوشت ترکیب‌های فسفره را در محیط تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kazemi *et al*., 2012). اکسیداسیون شیمیایی با ازن، تجزیهٔ نوری (Zertal *et al*., 2005)، ازن‌دهی (Hua *et al*., 2006)، فیلتراسیون غشایی (Hofman *et al*., 1997)، جذب (Daneshvar *et al*., 2007) و تخریب بیولوژیکی (Chen *et al*., 2009) برخی از روش‌های متعددی است که برای از بین بردن باقیماندهٔ آفت‌کش‌ها در محیط استفاده شده است. اما دراین‌بین استفاده از میکروارگانیسم‌ها (ریزجانداران) در سم‌زدایی این آلاینده‌ها به‌عنوان یک روش کم‌هزینه و بدون آسیب به زیست‌شناسی خاک و دوستدار محیط‌زیست در نظر گرفته شده است (Singh and Walker, 2006). تجزیهٔ آلاینده‌ها توسط میکروب‌ها و پاک‌سازی محیط‌های آلوده با استفاده از باکتری‌ها از اواخر دههٔ ۱۹۶۰میلادی مورد توجه قرار گرفت. برخی از گونه‌های باکتریایی همچون *Flavobacterium* sp. و *Pseudomonas* sp. با تولید آنزیم‌های فسفریک تری‌استر هیدرولاز ترکیب‌های فسفرهٔ آلی را تجزیه می‌کنند (Ewida, 2014). ارگانوفسفروس هیدرولاز[1] شناخته‌شده‌ترین آنزیم فسفریک تری‌استر هیدرولاز در دنیای باکتری‌هاست (Zheng *et al*., 2013). هیدرولیز آنزیمی ترکیب‌های آلی فسفره باعث سم‌زدایی و کاهش سمیت آن‌ها (تا حد معدنی شدن) می‌شود (Hsu *et al*., 2008; Harper *et al*., 2006). آنزیم OPH (E.C.8.1.3.1)، از برخی از میکروارگانیسم‌های خاک مانند *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas diminuta* (Serdar *et al*., 1982) و گونه‌های *Flavobacterium* spp. (Mulbry & Karns, 1989; Munnecke, 1980) جدا شده است. این آنزیم قادر به هیدرولیز تعدادی از ترکیب‌های فسفره است (Chae *et al*., 1994; Lai *et al*., 1995; Kolakowski *et al*., 1997) و یکی از آنزیم‌های اصلی در سم‌زدایی ترکیب‌هایی مانند

1. Organo Phoshorus Hydrolase (OPH)

پاراکسون، پاراتیون، متیل پاراتیون، دیازینون و کومافوس است (Zheng *et al.*, 2013). تا به امروز، نه توالی DNA برای رمزگذاری ارگانوفسفروس هیدرولاز در پایگاه‌های اطلاعاتی GenBank گزارش شده است (Chu *et al.*, 2006) که در این میان پژوهش‌های انجام‌شده با استفاده از ژن *opd* سهم بیشتری را به خود اختصاص داده‌اند. ژن *opd* با هدف‌های مختلفی و تحت سیستم‌های بیانی متعددی در *Escherichia coli* (Lan *et al.*, 2006; Shimazu *et al.*, 2001) *Moraxella* spp. (Shimazu *et al.*, 2001) *Saccharomyces cerevisiae* (Takayama *et al.*, 2006) و میکروارگانیسم‌های دیگری کلون شده است. در این تحقیقات بر تولید هیدرولاز پایدار و کارآمد توسط میکروارگانیسم‌های نوترکیب ژنتیکی برای زیست‌پالایی تمرکز شده است. در این زمینه می‌توان به نتایج بررسی Somara و همکاران (2002) اشاره کرد، توالی ژن *opd* را پایین‌دست سیگنال‌های رونویسی و ترجمه در دو وکتور pTrc99A و pET32A قرار دادند و این دو وکتور بیانی را به‌صورت مجزا به دو استرین BL21 و JM105 باکتری *E. coli* منتقل کردند. سپس با مشاهدهٔ سطح بالای بیان ژن، قطعهٔ ۶۰ کیلو دالتونی (شامل ژن *opd* ۴۰ کیلو دالتونی+ توالی برچسب هیستیدین به وزن ۲۰ کیلودالتون) را با استفاده از ستون‌های نیکل استخراج کرده و پروتئین خالص را از طریق هضم برچسب هیستیدین با ترومبین به دست آوردند که پس از فولدینگ این پروتئین خالص شده در حضور $Zn^{2+}$، توانایی تجزیهٔ پاراتیون توسط آن مشاهده شده است. یکی دیگر از ژن‌های رمزگذار OPH که از *Agrobacterium radiobacter* P230 از استرالیا جدا شده *opdA* بوده که قادر به هیدرولیز طیف گسترده‌ای از حشره‌کش‌های آلی فسفره است و توالی آن شبیه به ژن *opd* است (Horne *et al.*, 2002). باکتری تجزیه‌کنندهٔ متیل پاراتیون *Plesiomonas* sp. M6 در چین از خاک جداسازی شده است (Zhongli *et al.*, 2001) و ژن هیدرولیزکنندهٔ آن (به نام *mpd*، شمارهٔ دسترسی در بانک ژن AF338729) هیچ شباهت و همسانی با ژن *opd* ندارند (Ekkhunnatham *et al.*, 2012). هرچند که این استرین قادر به تجزیهٔ پاراتیون و دیگر آفت‌کش‌های آلی فسفره نیز است (Zhang *et al.*, 2006). ژن *mpd* روی کروموزوم قرار دارد (Zhongli *et al.*, 2001) درحالی‌که *opd* یک ژن پلازمیدی است. بررسی‌های متعددی در مورد بیان نوترکیب پروتئین تجزیه‌کنندهٔ ترکیب‌های فسفره که توسط این ژن و یا ژن‌های دیگر رمز می‌شود در میکروارگانیسم‌های مختلف و با هدف‌های مختلف صورت گرفته است. برای مثال در سال ۲۰۰۴ بررسی درزمینهٔ بیان پروتئین ارگانوفسفروس هیدرولاز، که توسط ژن *ophc2* رمز می‌شود، در *E. coli* صورت گرفت که سطح بیان پروتئین بسیار کم گزارش شد (Wu *et al.*, 2004). در سال ۲۰۰۶ همین محققان از مخمر *Pichia pastoris* به‌عنوان میزبان بیان همین ژن استفاده کردند (Chu *et al.*, 2006) که سال‌هاست به‌عنوان یک میزبان برای سطح بالای بیان پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود (Baumgartner *et al.*, 2002). این کار نخستین گزارش است که از سیستم *P. pastoris* و با استفاده از یک نسخهٔ کروموزومی ژن *opd* برای بیان ارگانوفسفروس هیدرولاز استفاده کرده است. سیستم‌های بیانی مختلفی برای تولید آنزیم ارگانوفسفروس هیدرولاز طراحی شده‌اند. در سال‌های گذشته ژن *mpdB* رمزگذار پروتئین MPH که یک پروتئین هیدرولیزکنندهٔ ترکیب‌های آلی فسفره است از باکتری *Burkholderia cepacia* بومی تایلند جداسازی شد و در وکتور pGEX-4T-2 کلون شد. این باکتری از متیل پاراتیون (MPH) به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده کرده و MPH را به‌صورت یک پروتئین متصل به غشا تولید می‌کند که بیان آن به‌صورت دائمی گزارش شده است (Keprasertsup *et al.*, 2001). در طراحی این وکتور بیانی، پروتئین ادغامی گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST) با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون (در انتهای آمینی) نیز تولید شده است. این سیستم بیانی امکان خالص‌سازی ساده‌تر و سریع‌تر (تنها در یک مرحله) پروتئین را در مقایسه با سایر روش‌های پرهزینه و زمان‌بر (سه مرحله‌ای) برای دستیابی به MPH خالص و طبیعی فراهم می‌کند

(Ekkhunnatham *et al.*, 2012). محققان در بررسی موفق به تولید یک باکتری نوترکیب شدند که افزون بر نشر نور فلورسنت قرمز، توانایی تجزیهٔ باقیماندهٔ آفت‌کش‌های فسفره را دارد (Li & Wu, 2014). این میکروارگانیسم‌های مهندسی‌شده می‌توانند یک منبع بالقوه برای آماده‌سازی آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ آفت‌کش‌های آلی فسفره باشند و می‌توان با توجه به بیان بالای پروتئین هدف EGFP-OPH این آنزیم را با کمک برچسب His6 جداسازی و خالص‌سازی کرد (Li *et al.*, 2014). Wu *et al.* (2000) موفق به تولید یک سویهٔ نوترکیب *E. coli* شدند که در آن دو ژن *oph* و *gfp* در پلازمید pTrcHis B تحت یک پروموتر با هم ادغام شده و بیان پروتئین OPH به‌صورت داخل سلولی صورت می‌گیرد. *Saccharomyces cerevisiae* نیز یک میکروارگانیسم مطلوب به‌عنوان عامل زیستی تشخیصی در حسگرهای زیستی است (Mulchandani & Rajesh, 2011). این قارچ برای بیان ژن *opd* از باکتری *Flavobacterium* sp. و توانایی هیدرولیز پارا اوکسون دستکاری و مهندسی شده است (Schofield *et al.*, 2007). در این پژوهش پروموترهای القایی توسط پارا اوکسون با ژن *gfp*، و پروموترهای مربوط به هیدرولیز این ترکیب با ژن *rfp* ادغام شدند. بنابراین توانایی این حسگر زیستی قارچی در تشخیص پارا اوکسون و هیدرولیز آن با القای بیان پروتئین‌های گزارشگر مختلف (به ترتیب پروتئین فلورسنت سبز و قرمز) به اثبات رسیده است. پیشرفت در زیست‌شناسی مولکولی و فن‌آوری DNA نوترکیب راهی را برای بهبود فعالیت آنزیم‌های موجود در میکروارگانیسم‌ها و یا بیان یک پروتئین/ آنزیم خارجی در سلول میزبان فراهم می‌کند (Mulchandani & Rajesh, 2011). ازآنجاکه سم‌زدایی آنزیمی باکتریایی آفت‌کش‌های آلی فسفره روشی مقرون‌به‌صرفه و مؤثر است، بررسی‌های بسیاری در این زمینه صورت گرفته است. Wu *et al.* (2001) به‌منظور افزایش تولید و بهره‌وری پروتئین OPH در کنار استفاده از مزایای پروتئین گزارشگر (GFP)، از دو نسخه ژن *opd* به‌صورت پشت سر هم و به دنبال ژن *gfp* برای همسانه‌سازی ژن استفاده کرده‌اند. نتایج پژوهش آن‌ها تحقق این هدف و دستیابی به میزان پروتئین بالاتر را به دنبال داشته و پروتئین حاصل از این ادغام همچنان توانایی فلورسنت را داشته است. در مقابل، هنگامی‌که دو ژن opd با دو منطقهٔ اتصال ریبوزوم مستقل با یکدیگر ادغام شد، افزایشی در محصول بیان‌شده توسط ژن دیده نشده است.

افزایش استفاده از آفت‌کش‌های آلی فسفره به‌عنوان سموم عصبی، در کنترل آفات کشاورزی باعث نگرانی‌های زیست‌محیطی و عمومی در رابطه با سمیت این ترکیب‌ها در موجودات غیرهدف شده است (Jabeen *et al.*, 2014; Diez, 2010). این اثرگذاری‌ها نیاز و تقاضا برای نوآوری روش‌های ساده، قابل‌اعتماد، سریع، حساس و کم‌هزینه را برای تشخیص و تجزیهٔ باقیماندهٔ سموم آشکار می‌سازد (Stoytcheva, 2010). نگرانی جوامع از نقش آفت‌کش‌های پایدار در محیط و راهیابی آن‌ها به چرخهٔ غذایی از موضوع‌های مهم بهداشت محیط‌زیست است که ضرورت انجام این پژوهش را برای تجزیهٔ ترکیب‌های سمی فسفره آشکار می‌سازند. در این بررسی، بهینه‌سازی کدون‌های توالی رمزکنندهٔ پروتئین OPD برای بیان در باکتری Escherichia coli انجام و سپس تحت کنترل پروموتر lac، در یک وکتور پروموتر-پروب (pTH1705) با چهار پروتئین نشانگر، به‌صورت ادغام الگوبرداری کلون شد. حذف پپتید نشانه منجر به بیان پروتئین به‌صورت محلول در باکتری تراریخت می‌شود. انتظار می‌رود که بتوان از این باکتری، که بیان‌کنندهٔ ژن *opd* ادغام شده با دو نشانگر پروتئینی است، برای تولید پروتئین به‌صورت انبوه به‌منظور تجزیهٔ ترکیب‌های آلی فسفره استفاده کرد.

## مواد و روش‌ها

### سنتز ژن

توالی ژن *opd* مربوط به باکتری *Flavobacterium* sp. ATCC27551 از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت و بررسی شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد، توالی این ژن در گونه‌های مختلف باکتریایی شباهت زیادی دارد. سپس به دلیل اینکه کدون‌های این ژن برای بیان در میزبان بیانی *E. coli* ارجحیت نداشت، کدون‌های توالی اصلی با کدون‌های ترجیحی در *E. coli* توسط نرم‌افزار آنلاین IDT (https://eu.idtdna.com) جایگزین شد.

در نهایت ژن بهینه‌سازی‌شده دوباره بررسی شد و هم‌ردیفی آن با این ژن در سایر گونه‌های باکتریایی انجام شد. برای انجام هم‌ردیفی از نرم‌افزار کاربردی MegAlign از پکیج نرم‌افزاری جامع DNASTAR Lasergene Suite و همچنین نرم‌افزار MEGA 5 استفاده شد. سپس توالی رمزگذار پپتید نشانهٔ حذف و اسیدآمینهٔ متیونین به‌جای سرین به‌عنوان کدون آغاز، جایگزین شد و توالی پروموتر *lac* در بالادست این ژن بهینه‌سازی‌شده قرار داده شد. بعد از آن این توالی برای انتخاب دو آنزیم برشی مناسب در ابتدا و انتهای قطعهٔ مورد نظر، با استفاده از نرم‌افزار آنلاین NEBcutter (http://nc2.neb.com/NEBcutter2) بررسی و جایگاه فعالیت دو آنزیم محدودگر *Apa*I و *Kpn*I در ابتدای قطعه و جایگاه فعالیت دو آنزیم محدودگر *Xho*I و *Nsi*I در انتهای آن قرار داده شد و در نهایت این توالی در وکتور حدواسط pUCIDT-KAN توسط شرکت IDT ایالات‌متحدهٔ آمریکا سنتز (ساخت) شد. این قطعهٔ سنتزشده ۱۱۵۷ جفت باز طول داشت که با ۳۳۶ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۳۶/۳ کیلودالتون قابل تشخیص بود.

**ساب کلون کردن *opd* در وکتور pTH1705**

برای تکثیر پلازمیدی که قطعهٔ سنتزشده در آن قرار داشت از دو استرین DH5α و XL1-blue باکتری *E. coli* استفاده شد. سپس پلازمید با استفاده از کیت استخراج پلازمید[1] تخلیص شد و توسط دو آنزیم محدودکنندهٔ *Apa*I و *Xho*I بریده شد. قطعهٔ هدف (با طول ۱۱۵۷ جفت باز) از روی ژل آگاروز ۱درصد برش داده شد و در جایگاه برش داده‌شدهٔ وکتور pTH1705 توسط دو آنزیم *Apa*I و *Xho*I وارد شد. در شکل ۲ تصویر شماتیکی از مراحل مختلف ساب کلونینگ قطعهٔ ژنی *opd* سنتزشده، در وکتور pTH1705 مشاهده می‌شود. سازهٔ وکتوری جدیدی که بدین ترتیب به دست آمد، از طریق ترانسفورماسیون به دو استرین DH5α و XL1-blue (استرین دارای ژن $lacI^Q$) باکتری *E. coli* منتقل شد. فهرستی از پلازمیدها و استرین‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده است. پس از آن آنالیز لایگیشن انجام گرفت و چهار کلنی به‌صورت تصادفی انتخاب و پس از کشت و استخراج پلازمید و برش توسط دو آنزیم محدودکنندهٔ *Apa*I و *Xho*I انجام شد.

**بررسی منحنی رشد باکتری**

به‌منظور بررسی رشد جمعیت سازهٔ باکتریایی به‌دست‌آمده و نیز بررسی تأثیر دیازینون به‌عنوان آلایندهٔ فسفره روی رشد سلول باکتری، پویایی رشد باکتری در زمان ارزیابی شد. این بررسی در محیط کشت لوریا برتانی (LB) و محیط کشت معدنی M9 (شامل: $Na_2HPO_4$ (۶ گرم در لیتر)، $KH_2PO_4$ (۳ گرم در لیتر)، NaCl (۰/۵ گرم در لیتر)، $NH_4Cl$ (۱ گرم در لیتر) به‌عنوان منبع نیتروژن، $MgSO_4$ (۱ میلی‌مولار)، $CaCl_2$ (۰/۱ میلی‌مولار)، $ZnCl_2$ (۰/۱ میلی‌مولار) و دی-مانیتول (۲۰ میلی‌مولار) به‌عنوان منبع کربن) در سه غلظت ۰، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون انجام شد. در این بررسی از دیازینون تکنیکال ۹۵درصد استفاده شد و استوک ۱۰۰۰ میلی-گرم در لیتر آن تهیه و با استفاده از فیلترهای سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی خالص شد. همچنین برای القای بیان ژن *opd* تحت کنترل پروموتر *lac* از IPTG[2] با غلظت ۱ میلی‌مولار استفاده شد. برای این بررسی از استرین V0 (*E. coli* DH5α- pTH1705-*opd*) به‌عنوان استرین شاهد استفاده شد. در بررسی منحنی رشد، از کشت ۱۶ ساعتهٔ هر استرین در محیط کشت مایع استریل، مقداری تلقیح شد تا $OD_{600}$ اولیه به ۰/۱ رسید و سپس در شرایط رشد مطلوب در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و دور ۲۰۰ rpm انکوبه شد. بدین ترتیب باکتری شروع به استفاده از اجزای محیط کرده و اندازه و تودهٔ سلولی آن افزایش خواهد یافت. پس از آن برای بررسی پویایی رشد باکتری هر دو ساعت یک‌بار کدورت یا چگالی نوری مربوط به مقدار نور جذب‌شده توسط سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از اسپکتروفتومتر (طیف‌سنج نوری) در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

1. Mini Plasmid Prep Kit

2. Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

جدول ۱. پلازمیدها و استرین‌های استفاده‌شده در این پژوهش

Table 1. Plasmids and strains used in this study

| plasmids | Features | Reference |
|---|---|---|
| pUCIDT-*opd*$^+$ | pUC with pMB1 origin, Km$^r$, | This study |
| pTH1705 | pTH1522 derivative with multiple cloning sites inserted at the position of the *Xho*I site and four reporter genes, Gm$^r$ | Cowie *et al*., 2006 |
| pVHN1100 | pTH1705 with 1157 bp optimized *opd* inserted into *Apa*I/*Xho*I restriction sites, Gm$^r$ | This study |
| Strains | Genotype | Reference |
| *E. coli* DH5α | F$^-$ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20* φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ$^-$ | Lab collection |
| *E. coli* XL1-blue | *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F′*proAB lac*IqZΔ*M15* Tn*10* (Tet$^r$)] | Lab collection |
| V0 | DH5α (pTH1705), Gm$^r$ | This study |
| V01 | XL1-blue (pTH1705), Gm$^r$ | This study |
| V100 | DH5α (pUCIDT-*opd*$^+$), Km$^r$ | This study |
| V101 | XL1-blue (pUCIDT-*opd*$^+$), Km$^r$, Tet$^r$ | This study |
| V102 | XL1-blue (pVHN1100), Gm$^r$, Tet$^r$ | This study |
| V103 | DH5α (pVHN1100), Gm$^r$ | This study |

**سنجش عملکرد سازهٔ باکتریایی تولیدشده**

پس از کلونینگ و بررسی منحنی رشد سازهٔ به‌دست‌آمده که توانایی هیدرولیز آفت‌کش‌های آلی فسفره را داشت، برای سنجش عملکرد باکتری تراریخت بیان‌کنندهٔ ژن *opd* (به‌صورت *in trans*) از نظر توانایی هیدرولیز، از محیط کشت معدنی M9 حاوی غلظت ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به‌عنوان آلایندهٔ فسفره استفاده شد و باکتری تراریخت در آن کشت داده شد و همچنین برای القای بیان ژن از IPTG استفاده شد.

**سنجش کمی فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز**

فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز با اضافه کردن ۶۰ میکرولیتر از محیط کشت ۱۶ ساعتهٔ باکتری به ۲۴۰ میکرولیتر بافر Z (شامل: ۶۰ میلی‌مولار $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$، ۴۰ میلی‌مولار $NaH_2PO_4$، ۱۰ میلی‌مولار KCl، ۱میلی‌مولار $MgSO_4$، ۰/۰۱۲۵درصد SDS، ۴۰ میلی‌مولار بتا- مرکاپتواتانول حاوی ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر۲-نیترو فنیل بتا-دی-گالاکتوپیرانوزید به‌عنوان سوبسترا) اندازه‌گیری شد (Cowie *et al*., 2006). سپس مخلوط واکنش در دمای اتاق به مدت یک ساعت انکوبه شد و پس از آن با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۱ مولار $Na_2CO_3$ واکنش آنزیم و سوبسترا متوقف شد و جذب محصول تولیدشده در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است از محیط کشتی که هیچ تلقیح باکتریایی در آن انجام نگرفته بود به‌عنوان نمونهٔ شاهد استفاده شد. برای محاسبهٔ فعالیت ویژه نیز از معادلهٔ زیر استفاده شد:

فعالیت ویژه (U/mg) =

(۱۰۰۰× $OD_{420}$) / ((min) زمان × $OD_{600}$ × (ml)

(حجم محیط کشت در مخلوط واکنش

**آماده‌سازی نمونه برای تزریق به کروماتوگرافی مایع**

برای بررسی عملکرد مطلوب سازهٔ میکروبی نوترکیب تولیدشده، اندازه‌گیری میزان آلاینده در نمونه توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز به‌عنوان روش استاندارد انجام گرفت. برای این کار محیط کشت معدنی حاوی غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون تهیه و باکتری نوترکیب در آن کشت شد. سپس ترکیب سمی باقیمانده در محیط استخراج و نمونه برای اندازه‌گیری میزان دیازینون به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Shimadzu, LC9A) تزریق شد. برای استخراج باقیماندهٔ آفت‌کش از محیط کشت باکتری از روش Cullington & Walker (1999) استفاده شد. بدین ترتیب که ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت باکتری با ۲ میلی‌لیتر اتیل‌استات با استفاده از ورتکس به‌خوبی مخلوط شد. با این کار ترکیب سمی به اتیل‌استات وارد می‌شود. پس از سانتریفیوژ این مخلوط، فاز رونشین که درواقع همان اتیل‌استات است، جدا شد و این حلال به‌طور کامل با کمک جریان گاز ازت تبخیر شد. سپس بی‌درنگ ۱ میلی‌لیتر متانول به لولهٔ آزمایش اضافه شد و باقیماندهٔ دیازینون موجود در جدار لوله در متانول محلول و

آمادهٔ تزریق شد. ستون مورد استفاده در دستگاه، C-18 و فاز متحرک استونیتریل و آب (به نسبت ۷۰:۳۰ حجمی/حجمی) بود. طول‌موج مورد استفاده برای آشکارساز ۲۵۴ نانومتر و سرعت فاز متحرک ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ستون ۴۰ درجهٔ سلسیوس تنظیم شد. برای رسم منحنی استاندارد (خط کالیبراسیون) دیازینون و به دست آوردن معادلهٔ خط برای محاسبهٔ میزان غلظت آفت‌کش در نمونه‌ها، و همچنین به دست آوردن زمان بازداری دیازینون ابتدا چند محلول با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون در متانول تهیه و به مقدار۲۰ میکرولیتر، به دستگاه تزریق شد. میزان آفت‌کش موجود در نمونه‌ها از طریق مقایسهٔ زمان بازداری و سطح زیر پیک‌های به‌دست‌آمده در کروماتوگرام حاصل از نمونه با کروماتوگرام حاصل از تزریق محلول‌های استاندارد انجام شد و غلظت آفت‌کش دیازینون با استفاده از مقدار عددی سطح زیر پیک هر نمونه و با استفاده از معادلهٔ خط به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

برای حصول اطمینان از درستی انجام و دقت روش استخراج آفت‌کش از محیط کشت باکتری، درصد بازیابی تعیین شد. ازآنجاکه به دلایل مختلفی مانند وجود ترکیب‌های مزاحم و یا وجود مقداری آب در محیط کشت، صد در صد باقیماندهٔ آفت‌کش موجود در محیط کشت استخراج نمی‌شود، برای استخراج آفت‌کش از محیط آبی در روش‌های جدید توصیه می‌شود که پیش از انجام عملیات روی نمونه‌های اصلی، ابتدا آزمایش بازیابی[1] انجام پذیرد. بدین‌صورت که همهٔ مراحل استخراج و خالص‌سازی به‌دقت با روش مورد نظر، روی نمونه‌ای که غلظت آفت‌کش موجود در آن مشخص است انجام و در شرایط یکسان به دستگاه تزریق شود. به‌این‌ترتیب با توجه به غلظت آفت‌کش اضافه‌شده به محیط کشت و غلظت به‌دست‌آمده توسط دستگاه، درصد بازیابی روش استخراج با استفاده از رابطهٔ زیر به دست آمد.

$$\text{درصد بازیابی} = \frac{\text{مقدار آفت‌کش اندازه‌گیری‌شده در نمونه آلوده}}{\text{مقدار آفت‌کش اندازه‌گیری‌شده در نمونه + مقدار آفت‌کش اضافه‌شده}} \times ۱۰۰$$

1. Recovery

**الکتروفورز**

در این آزمایش هدف تعیین بیان موفق آنزیم ارگانوفسفروس هیدرولاز در استرین V103 با استفاده از الکتروفورز بود. بدین منظور از الکتروفورز احیایی (SDS-PAGE) استفاده شد. برای به دست آوردن عصارهٔ آنزیمی ابتدا کشت ۱۶ ساعت از استرین V103 و V0 تهیه شد. پس از انجام سانترفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور g× ۴۰۰۰، رسوب باکتریایی با استفاده از محلول NaCl ۰/۸۵درصد شست‌وشو داده شد و در ۵ میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl حل شد. سپس این محلول به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط دمایی ۴ درجهٔ سلسیوس در حمام اولتراسونیک سونیکه شد. بدین ترتیب امواج الکتریکی با فرکانس بالا باعث تخریب دیواره‌های سلول می‌شود و پروتئین درون بافر آزاد می‌شود. سپس بقایای سلولی از طریق انجام سانترفیوژ در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس و در دور g× ۱۶۰۰۰ حذف و محلول رونشین با استفاده از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون استات سلولز تخلیص شد. ۲۴ میکرولیتر از عصارهٔ آنزیمی دو استرین V0 و V103 با ۶ میکرولیتر بافر نمونه (متشکل از: ۲ میلی‌لیتر بافر ۱/۵ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک با pH ۶/۸ ، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۲/۵ میلی‌لیتر بتا-مرکاپتواتانول و ۰/۰۱ درصد بروموفنول بلو) مخلوط شد و نمونهٔ به‌دست‌آمده در چاهک‌های ژل متراکم‌کننده (۵ درصد) لود شد. پس از برقراری جریان ۸۵ ولت، عصارهٔ آنزیمی در طول ژل جداکنندهٔ ۱۲/۵درصد برای جداسازی، به حرکت در آمد. بعد از پایان الکتروفورز و جداسازی ژل از شیشه‌ها، ژل در محلول متانول- استیک اسید- آب (۵۰: ۱۰: ۴۰) حاوی ۱ درصد (w/v) کوماسی بلو R-250 در مدت‌زمان ۴ ساعت روی شیکر رنگ‌آمیزی شد. در مرحلهٔ بعد ژل رنگ‌شده طی چند مرحله با محلول متانول- استیک اسید- آب (۱۰: ۵: ۸۵) شستشو داده شد تا رنگ‌بری صورت گیرد. بعد از پایان رنگ بری

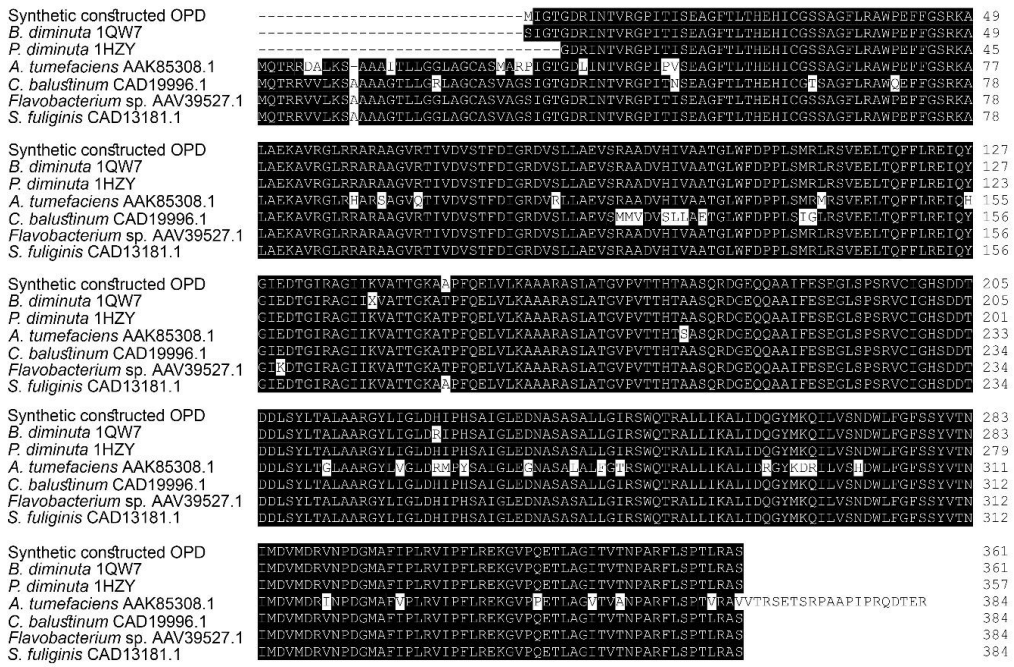
باندهای تیرهٔ پپتید درزمینهٔ آبی‌رنگ ژل نمایان شد. که تصویر دیجیتالی آن با استفاده از دستگاه ژل داک گرفته شد.

## نتایج و بحث

در این پژوهش ژن تجزیه‌کنندهٔ ترکیب‌های آلی فسفره (*opd*) بهینه‌شده برای بیان در باکتری *E. coli* برای این هدف استفاده شده است. این پروتئین در گونه‌های مختلف باکتریایی توالی آمینواسیدی به نسبت یکسانی دارد. بررسی‌های مختلفی در زمینه‌های متعدد با استفاده از ژن *opd* در گونه‌های باکتریایی صورت گرفته که توالی نوکلئوتیدی این ژن را در پایگاه‌های اطلاعاتی ارائه کرده‌اند. همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است نتایج هم‌ترازی پروتئین به‌دست‌آمده از ژن سنتزشده، با توالی این پروتئین در گونه‌های مختلف باکتریایی که از سایر بررسی‌ها و پژوهش‌ها به‌دست‌آمده است نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها توالی به نسبت یکسان و مشابهی دارند. این قطعهٔ ژنی (۱۱۵۷ جفت باز) پس از برش از وکتور pUCIDT-*opd*$^{+}$ (۴۵۶۶ جفت باز)، به وکتور pTH1705 برش داده شده منتقل شد و کانستراکت pVHN1100 به دست آمد (شکل ۲).

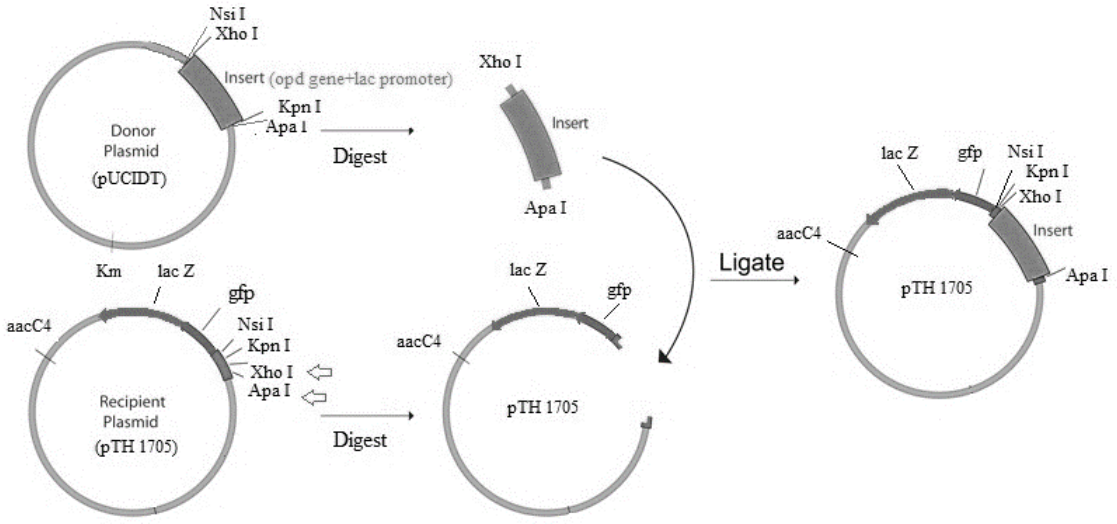
دلیل انتخاب وکتور pTH1705 وجود چهار مارکر پروتئینی برای بررسی بیان ژن منقل شده در آن است. این پلازمید در واقع یک مشتق به‌دست‌آمده از وکتور گزارشگر pTH1522 است که نقشهٔ آن در شکل ۳ آورده شده است.

همان‌گونه که در نقشهٔ این پلازمید مشاهده می‌شود ژن‌های گزارشگر *gfp*$^{+}$، *lacZ*، *gusA* و *tdimer2(12)* در این وکتور وجود دارند. دو ژن رمزکنندهٔ پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و ژن رمزکنندهٔ بتا-گالاکتوزیداز به‌عنوان آنزیمی که فعالیت آن به‌آسانی قابل اندازه‌گیری است (*gfp*$^{+}$ و *lacZ*) از محل کلونینگ *Xho*I در یک‌جهت رونویسی می‌شوند. در سمت دیگر جایگاه *Xho*I دو ژن گزارشگر دیگر (*gusA* و *tdimer2 (12)*) قرار دارند که رمزکنندهٔ آنزیم بتا-گلوکرونیداز و پروتئین فلورسنت قرمز هستند و در جهت مخالف دو ژن *gfp*$^{+}$ و *lacZ* رونویسی می‌شوند. این پلازمید حامل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک (پادزیست) جنتامایسین (*aacC4*) است. کدون پایان ترجمه نیز به‌صورت هر سه قالب خواندن، در بالادست نخستین ژن گزارشگر هر یک از طرفین جایگاه *Xho*I وجود دارد.



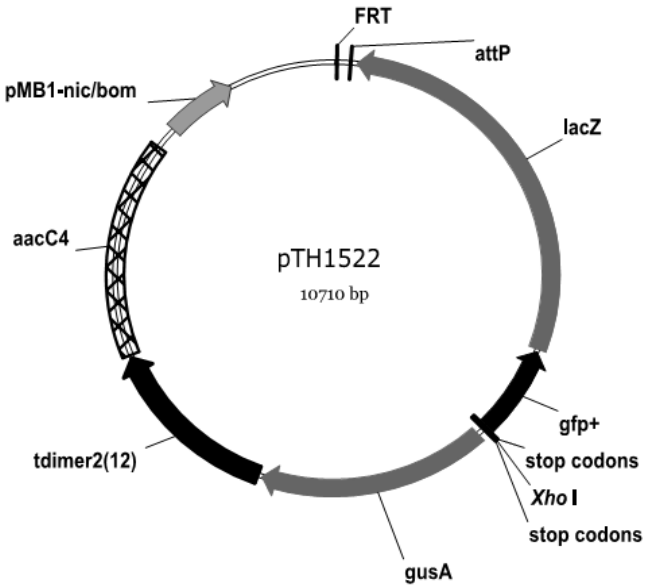

شکل ۱. نتیجهٔ هم‌ترازی پروتئین حاصل از ژن *opd* سنتزشده با توالی‌های به‌دست‌آمده از سایر گونه‌های باکتریایی

Figure 1. Sequence alignment of OPD from different bacterial species




شکل ۲. تصویر شماتیک ساب‌کلونینگ قطعهٔ ژنی *opd* سنتزشده در وکتور pTH1705

Figure 2. Schematic image of *opd* subcloning to pTH1705 vector

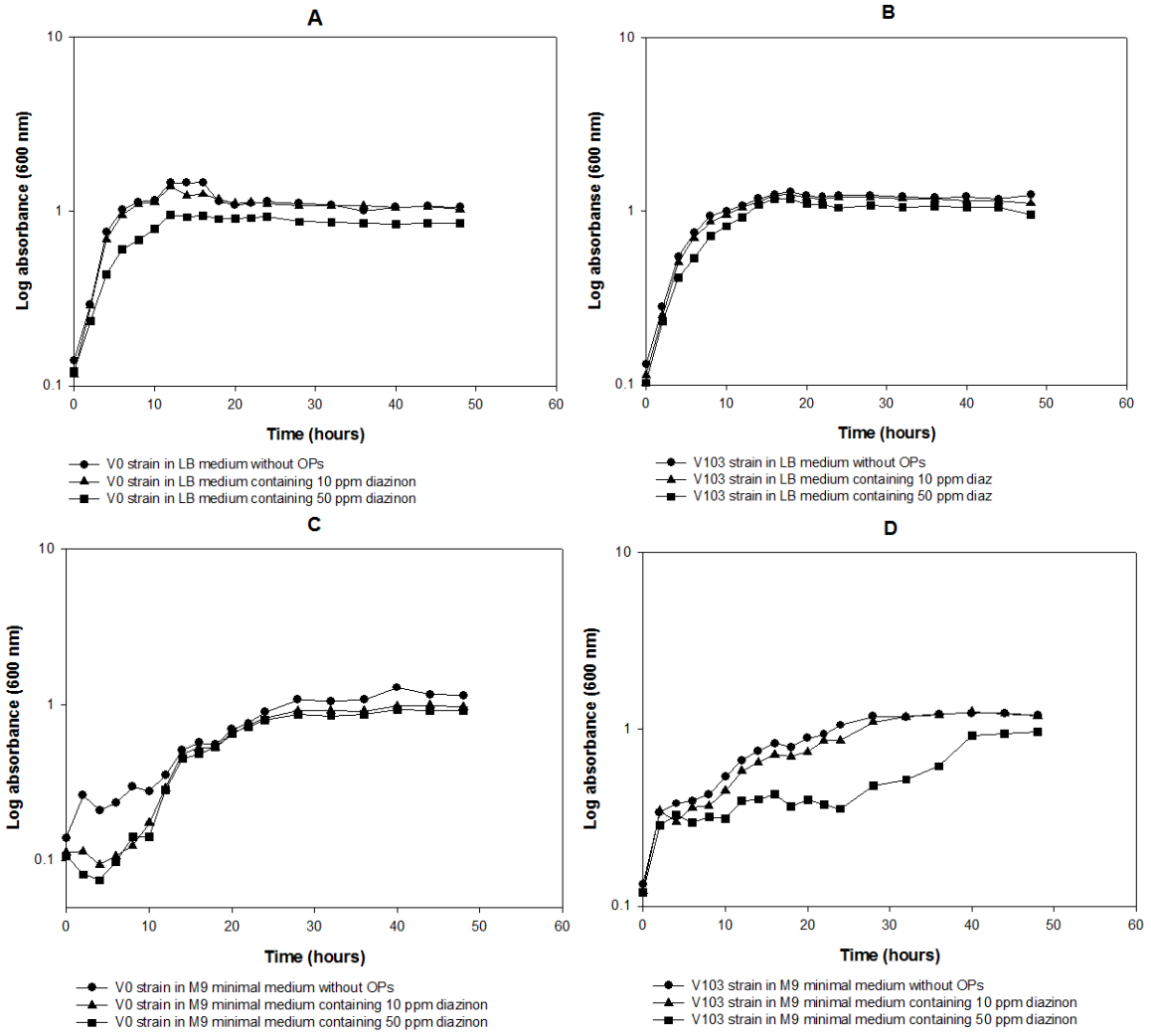



شکل ۳. نقشهٔ ژنی وکتور pTH1522. پلازمید pTH1705 از این پلازمید مشتق شده است و در جایگاه *Xho*I جایگاه‌های کلونینگ چندگانه دارد. این جایگاه‌های کلونینگ چندگانه برای pTH1705 به‌صورت: -*gfp*$^{+}$--*Bgl*II-*Swa*I-*Kpn*I-*Sph*I-*Not*I-*Sph*I-*Nsi*I-*Apa*I-*Pac*I-*Xho*I--*gus A* هستند (Cowie *et al*., 2006)

Figure 3. Plasmid pTH1522, with reporter genes shown as divergent operons from the *Xho*I cloning site. Multiple restriction enzyme sites inserted in pTH1705 as the pTH1522 derivative, is: *gfp*$^{+}$--*Bgl*II-*Swa*I-*Kpn*I-*Sph*I-*Not*I-*Sph*I-*Nsi*I-*Apa*I-*Pac*I-*Xho*I--*gus A* (Cowie *et al*., 2006)

پویایی رشد باکتری را می‌توان با رسم نمودار رشد سلول (جذب) در مقابل زمان و یا لگاریتم تعداد سلول در مقابل زمان بررسی کرد. منحنی رشد باکتری برای استرین V103 (*E. coli* DH5α-pTH1705-*opd*$^{+}$) و استرین V0 (*E. coli* DH5α- pTH1705-*opd*$^{-}$) به‌عنوان استرین شاهد بررسی شد. همان‌گونه که در شکل ۴-b مشخص است در محیط کشت LB وجود و یا نبود دیازینون تأثیر کمی بر رشد استرین V103 داشته است زیرا این محیط غنی از مواد غذایی لازم برای رشد باکتری است. اما رشد این استرین در محیط معدنی M9 که حداقل منابع غذایی برای رشد باکتری را دارد، در حضور غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر

دیازینون به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفته است درحالی‌که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر این ترکیب فسفره تأثیر زیادی بر رشد این استرین حاوی ژن *opd* نداشته است (شکل ۴-d). رشد استرین V0 به‌عنوان استرین شاهد (*E. coli* DH5α- pTH1705-*opd*⁻) در محیط کشت غنی LB در حضور غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفته است (شکل ۴-a)، درحالی‌که در محیط معدنی M9 که منابع غذایی کاملی در اختیار باکتری نبوده و از طرفی ژن تجزیه‌کنندهٔ دیازینون هم در این استرین وجود نداشته، حضور دیازینون حتی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تأثیر چشمگیری روی رشد این استرین داشته است (شکل ۴-c). به‌طورکلی بررسی‌ها و مقایسهٔ منحنی‌های رشد این دو استرین نشان می‌دهد که غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون دز مناسبی برای مراحل بعدی آزمایش‌ها نیست زیرا به‌شدت رشد باکتری را تحت تأثیر قرار داده است و این تأثیر در محیط معدنی M9 که برای باکتری از نظر غذایی محدودیت وجود دارد چشمگیرتر و واضح‌تر بوده است. بنابر نتایج به‌دست‌آمده از این مرحله غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به‌عنوان آلایندهٔ آلی فسفره برای مراحل بعدی آزمایش‌ها انتخاب شد.

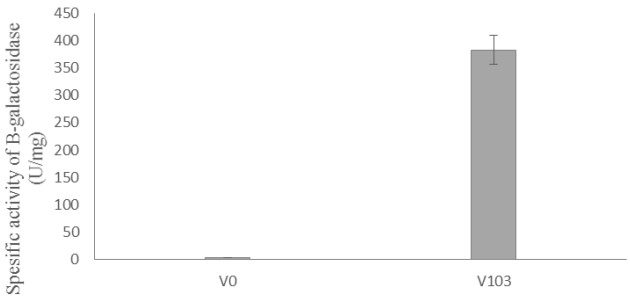



شکل ۴. منحنی رشد دو استرین V0 (DH5α- pTH1705-*opd*⁺) و V103 (DH5α- pTH1705-*opd*⁺) در دو محیط کشت LB (A و B) و M9 (C و D) حاوی سه غلظت ۰، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون

Figure 4. Growth curve of V0 (DH5α- pTH1705-*opd*⁺) and V103 (DH5α- pTH1705-*opd*⁺) strains in LB (A and B) and M9 minimal medium (C and D) containing 0, 10 and 50 mg/L diazinon

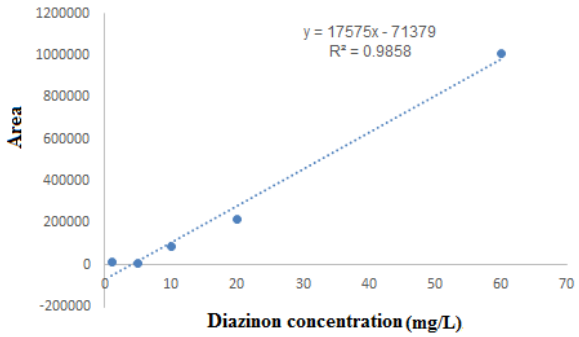
همان‌گونه که بیان شد وکتور پروموتر-پروب pTH1705 چهار مارکر پروتئینی دارد که توالی نوکلئوتیدی رمزکنندهٔ پروتئین OPD، تحت کنترل پروموتر *lac*، در آن به‌صورت ادغام الگوبرداری کلون شده است. این بدان معناست که پس از القای بیان ژن تحت کنترل پروموتر *lac* با IPTG دو مارکر پروتئینی پایین‌دست آن یعنی پروتئین فلورسنت سبز و پروتئین بتا-گالاکتوزیداز نیز بیان خواهند شد. بنابراین با اندازه‌گیری این دو پروتئین می‌توان از بیان ژن منتقل‌شده توسط این وکتور به استرین باکتریایی اطمینان به دست آورد. بتا گالاکتوزیدار که با ژن *lacZ* از اپرون *lac* رمزگذاری می‌شود، یک پروتئین بزرگ متشکل از ۱۰۲۴ اسیدآمینه و با وزنی معادل ۱۲۰ کیلودالتون است که یک تترامر را تشکیل می‌دهد. این آنزیم در سلول لاکتوز را می‌شکند و به گلوکز و گالاکتوز، که به‌عنوان منابع کربن (انرژی) استفاده می‌شوند، تبدیل می‌کند. ترکیب مصنوعی او-نیتروفنیل-بتا- دی- گالاکتوزید (ONPG) نیز به‌عنوان سوبسترای این آنزیم شناخته می‌شود که به گالاکتوز و او- نیتروفنل که ترکیبی زردرنگ است، شکسته می‌شود. شکل ۵ نتایج اندازه‌گیری این آنزیم را در دو استرین V103 و V0 (به‌عنوان استرین شاهد) نشان می‌دهد. این نمودار بر پایهٔ فعالیت ویژه (فعالیت آنزیم در میلی‌گرم پروتئین) رسم شده است و مشخص است که در استرین V0 همان‌گونه که انتظار می‌رفت تا حدودی هیچ فعالیت آنزیمی مشاهده نمی‌شود درحالی‌که در استرین V103 میزان فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز و بیان ژن *lacZ* به‌طور قابل توجهی بالاست، که این نمایانگر بیان ژن‌های بالادست *lacZ* که همگی تحت کنترل پروموتر *lac* بوده، است.

برای سنجش عملکرد باکتری نوترکیب ایجادشده در تجزیهٔ دیازینون به‌عنوان ترکیب فسفره، از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. در شکل ۶ منحنی استاندارد دیازینون و معادلهٔ خط به‌دست‌آمده برای تعیین غلظت باقیماندهٔ این ترکیب در نمونه‌ها مشاهده می‌شود. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا کاربرد وسیعی در اندازه‌گیری باقیماندهٔ آفت‌کش‌ها پیدا کرده است.



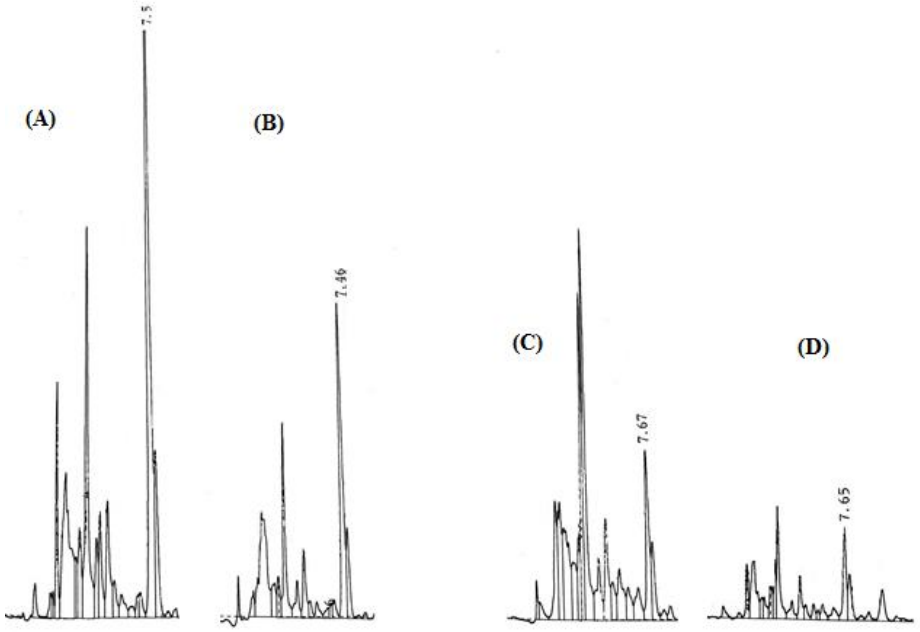

شکل ۵. سنجش کمّی آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در دو استرین V0 (DH5α- pTH1705-*opd*$^{-}$) و V103(DH5α- pTH1705-*opd*$^{+}$)

Figure 5. Quantitative measurement of β-galactosidase activity in V0 and V103 strains



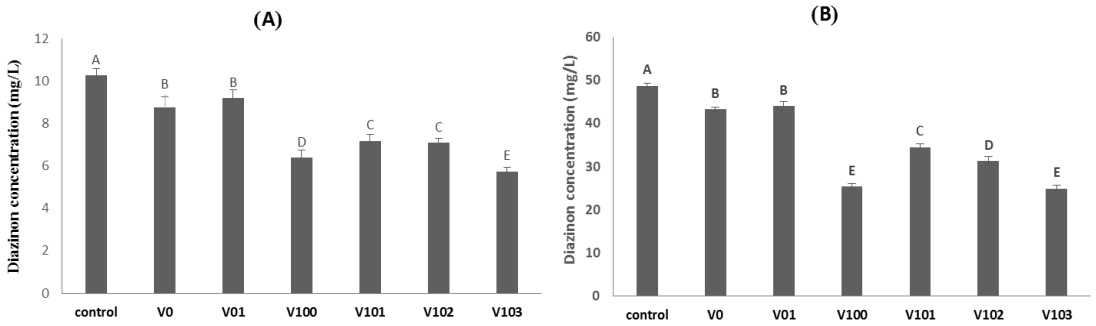

شکل ۶. منحنی استاندارد آفت‌کش دیازینون

Figure 6. Calibration curve of diazinon




شکل ۷. کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق باقیماندهٔ دیازینون استخراج‌شده از (A) محیط کشت شاهد (بدون تلقیح باکتری) حاوی غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، (B) محیط کشت استرین V103 حاوی غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، (C) محیط کشت شاهد (بدون تلقیح باکتری) حاوی غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، (D) محیط کشت استرین V103 حاوی غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، پس از ۲۴ ساعت

Figure 7. Chromatograms obtained from injection of diazinon residues extracted from (A) control medium (without bacterial inoculation) containing 50 mg/L of diazinon, (B) V103 medium containing 50 mg/L of diazinon, (C) control media (without bacterial inoculation) containing 10 mg/L of diazinon, (D) V103 medium containing 10 mg/L of diazinon, after 24 hours




شکل ۸. میانگین تجزیهٔ دیازینون توسط استرین‌های مختلف ± SE در غلظت‌های اولیهٔ ۱۰ (A) و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (B). مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت و حرف‌های متفاوت نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار است.

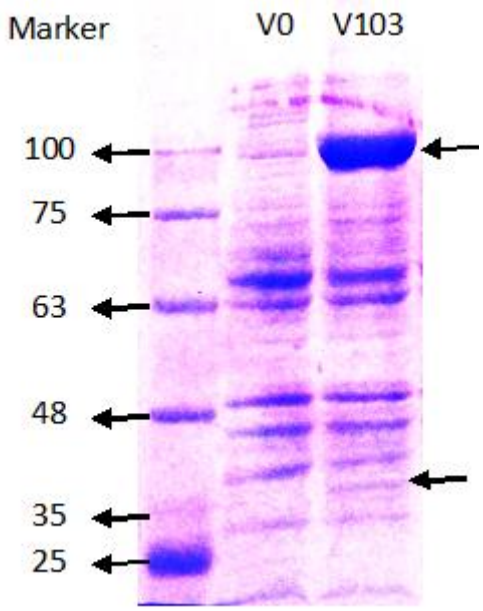
Figure 8. Diazinon degradation by different strains ±SE at 10 (A) and 50 (B) mg/L initial concentrations. Comparisons were done using Duncan's test at 0.05 level and different letters indicate significant difference

نتایج حاصل از تعیین درصد بازیابی نشان داد، روش جداسازی و خالص‌سازی دیازینون از محیط کشت تا حد بالایی صحیح صورت گرفته و این روش یک روش مناسب بوده است. این عامل برای استخراج باقیماندهٔ دیازینون از نمونه برابر با ۹۸/۴ درصد به دست آمد که مقدار قابل قبولی است و روش مورد استفاده را قابل اعتماد نشان می‌دهد. این نتایج از مقایسهٔ سطح زیر پیک مربوط به دیازینون در نمونهٔ استاندارد و نمونهٔ استخراج‌شده از محیط کشت با غلظت دیازینون مشخص به دست آمد. در شکل ۷ کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق دیازینون باقیمانده در محیط کشت شاهد (بدون تلقیح باکتری) و استرین

V103 نشان داده شده است. دیازینون باقیمانده در محیط کشت باکتری پس از ۲۴ ساعت استخراج شد و در این شکل میزان کاهش غلظت دیازینون و کروماتوگرام حاصل تنها در مورد استرین V103 نمایش داده شده است. در شکل ۸ نتایج حاصل از اندازه‌گیری دیازینون باقیمانده در محیط کشت هر استرین پس از ۲۴ ساعت با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مشاهده می‌شود در این کروماتوگرام ستون control نشان‌دهندهٔ میزان تجزیهٔ دیازینون در اثر هیدرولیز آبی در طول ۲۴ ساعت است. در واقع به‌منظور بررسی هیدرولیز خودبه‌خودی سم، این مقدار دیازینون از محیط کشتی جداسازی شده است که هیچ سلول باکتری در آن تلقیح نشده و فقط دیازینون در آن وجود داشته است. ستون V0 میزان تجزیه توسط استرین DH5α که فاقد ژن تجزیه‌کننده است را به‌عنوان استرین شاهد برای V100 و V103 و همچنین ستون V10 میزان تجزیه توسط استرین XL1-blue (*opd*$^-$) را به‌عنوان استرین شاهد برای V101 و V102 نشان می‌دهند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تفاوت در میزان تجزیهٔ آفت‌کش در آن‌ها معنی‌دار است. میزان تجزیه در دو غلظت اولیهٔ دیازینون اندازه‌گیری شد و به‌طور میانگین در غلظت اولیهٔ ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ۳۴ درصد از دیازینون، و در غلظت اولیهٔ ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌طور متوسط ۴۰ درصد از این ترکیب فسفره توسط هر یک از چهار استرین حاوی ژن *opd* پس از ۲۴ ساعت تجزیه شده است. وجود اختلاف در میزان تجزیه توسط دو استرین شاهد و چهار استرین حاوی ژن تجزیه‌کننده، نشان‌دهندهٔ بیان ژن و عملکرد پروتئین OPD است.

**الکتروفورز پروتئین**

همان‌گونه که اشاره شد، با هدف تأیید بیان موفق پروتئین OPD در استرین V103 از روش الکتروفورز استفاده شد. در واقع الکتروفورز برای جداسازی و مقایسهٔ پروتئین‌ها در عصارهٔ پروتئینی به‌دست‌آمده از دو استرین V0 (فاقد ژن *opd*) و V103 (دارای ژن *opd*) به کار گرفته شد. شکل ۹ تصویر ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو را نشان می‌دهد و همان‌طور که مشاهده می‌شود، در حدود ناحیهٔ باند ۳۵ کیلو دالتونی مارکر، در نمونهٔ پروتئینی V103 باند ضعیفی مشاهده می‌شود که در نمونهٔ V0 دیده نمی‌شود. این باند در واقع مربوط به پروتئین OPD است که با ۳۳۶ اسیدآمینه، وزن مولکولی ۳۶/۳ کیلودالتون را دارد. دلیل ضعیف بودن این باند به این دلیل است که این پروتئین تحت پروموتر *lac* کلون شد است و این پروموتر مانند پروموتر باکتریوفاژی T7 یک پروموتر قوی و فعال با عملکرد بیانی بسیار بالا نیست. از طرفی وکتور مورد استفاده (pTH1705) نیز جزو وکتورهای با تعداد نسخه‌های تکثیری بالا[1] طبقه‌بندی نمی‌شود. اما همان‌طور که دیده می‌شود در حدود ناحیهٔ باند ۱۰۰ کیلو دالتونی مارکر، در نمونهٔ پروتئینی V103 باندی با وضوح و شدت بالا مشاهده می‌شود که در نمونهٔ V0 بسیار ضعیف دیده می‌شود. این باند در حقیقت مربوط به پروتئین حاصل از بیان ژن *lacZ* است که در پایین‌دست ژن *opd* قرار گرفته و به دنبال آن بیان می‌شود.




شکل ۹. الکتروفورز عصارهٔ پروتئینی حاصل از دو استرین V0 (DH5α- pTH1705-*opd*$^-$) و V103 (DH5α- pTH1705-*opd*$^+$)

Figure 9. Gel electrophoresis of extracted protein from two strains V0 (DH5α-pTH1705-*opd*$^-$) and V103 (DH5α-pTH1705-*opd* $^+$)

1. High-copy number

سرنوشت آفت‌کش‌ها در محیط‌زیست توسط فرآیندهای بیولوژیک، شیمیایی و فیزیکی مختلفی که پایداری و تحرک آن‌ها را تعیین می‌کند، تحت تأثیر قرار می‌گیرد. بعضی از آفت‌کش‌ها از طریق جذب شدن به ذرات خاک یا مواد آلی موجود در خاک پایدار می‌مانند، بعضی دیگر از راه هوا یا ذرات خاک وارد جریان آب و پخش می‌شوند و بالاخره بعضی هم توسط میکروارگانیسم‌ها، متابولیزه شده و یا با تبدیل‌شدن به مواد سمی‌تر وارد چرخهٔ غذایی می‌شوند (Talebi-Jahromi, 2008). وارد شدن این ترکیب‌ها به داخل بدن موجودات از جمله انسان و تجمع آن‌ها منجر به اثر جبران‌ناپذیری می‌شود. نظر به نگرانی‌های زیادی که در مورد سمیت ترکیب‌های آلی فسفره وجود دارد، بررسی و به‌کارگیری ابزار و روش‌های جدید و نوآورانه از طرفی برای تشخیص و شناسایی سریع و از طرف دیگر برای تجزیه و کاهش سمیت این گروه از ترکیب‌های سمی به‌شدت ضروری و مورد نیاز است.

استفاده از میکروارگانیسم‌های مهندسی ژنتیک شده که می‌توانند ترکیب‌های فسفرهٔ آلی را تجزیه کنند، یک راه مؤثر برای کاهش باقیماندهٔ این ترکیب‌ها در محیط‌زیست خواهد بود. ازآنجاکه ارگانوفسفروس هیدرولاز طبیعی را نمی‌توان به‌راحتی به دست آورد، توسعهٔ تکنولوژی DNA نوترکیب، رویکرد امیدوارکننده‌ای است که برای تولید یک میکروارگانیسم مهندسی‌شده که قادر به بیان این پروتئین باشد، مناسب خواهد بود (Li *et al.*, 2014). میکروارگانیسم‌های مهندسی (دستکاری)شدهٔ بسیاری برای بیان یک پروتئین نوترکیب که عملکردهای متنوعی دارد، با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب ساخته شده است (Wang *et al.*, 2011). Rowland *et al.* (1991) سطح بالایی از بیان فسفوتری استراز نوترکیب را در *Streptomyces lividans* در نتیجهٔ کلونینگ ژن *mpdB* در یک سیستم ترشحی پروتئین گزارش کرده‌اند و این بررسی را برای دستیابی به سطح بالای MPH در آینده جالب توجه می‌دانند. هدف عمومی همسانه‌سازی ژن، دستکاری سنتز پروتئین به‌منظور تولید یک پروتئین در مقادیر زیاد، تغییر ساختار و عملکرد پروتئین (از طریق دستورزی ژن مربوطه)، و تغییر مسیرهای زیستی است (Wong, 2006). دستکاری مسیرهای زیستی از طریق جلوگیری از تولید یک آنزیم، و یا تولید یک آنزیم خارجی میسر می‌شود. از طریق وارد کردن یک ژن خارجی در موجود زنده، که منجر به تولید پروتئین‌های جدیدی می‌شود، می‌توان عملکردهای جدیدی را ایجاد کرد که پیش از این در آن موجود زنده وجود نداشته است (Wong, 2006). بیان ارگانوفسفروس هیدرولاز به‌صورت داخل سلولی در سیستم‌های بیانی *Escherichia coli* می‌تواند به توسعهٔ فرآیندهای سم‌زدایی در مقیاس وسیع منجر شود زیرا از این طریق پروتئین در مقادیر بالاتری نسبت به میزبان‌های اصلی بیان می‌شود (Chen & Mulchandani, 1998). OPH نوترکیب بیان‌شده در این بررسی، با توجه به عملکرد و فعالیت بالا و ویژگی‌های بیوشیمیایی خوب خود، می‌تواند انتخاب خوبی برای تولید انبوه و حذف آلاینده‌های فسفره، و همچنین کاربرد در زیست‌حسگرها و تشخیص مستقیم ترکیب‌های فسفره در آینده محسوب شود.

کاربرد *opd* باکتریایی نه تنها برای بیان در میکروارگانیسم‌های مختلف بررسی شده بلکه در سال‌های اخیر استراتژی‌های متنوعی برای استفاده از این ژن به کار گرفته شده است. برای مثال محققان چینی در سال‌های اخیر یک کاست بیانی برای ژن *opd* تحت کنترل پروموتر E8 طراحی و سپس آن را به میوهٔ گوجه‌فرنگی منتقل کردند. آن‌ها از رنگ‌آمیزی β-گلوکورونیداز (GUS)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR)، اسکن طول‌موج و واکنش فلورسنت برای بررسی بیان ژن *opd* و توانایی هیدرولیز کومافوس در گوجه‌فرنگی، استفاده کردند. نتایج تحقیقات آنان نشان می‌دهد، این گوجه‌فرنگی بیان‌کنندهٔ OPH حداکثر فعالیت هیدرولیز کومافوس را دارد. آن‌ها معتقدند که با استفاده از این نتایج می‌توان بر پرورش و تولید گیاهان تراریختی تمرکز کرد که نه تنها محصولشان توانایی تجزیهٔ ترکیب‌های آفت‌کش را دارد، بلکه هیچ تأثیر منفی بر کنترل آفات در مزارع ندارند (Zhao & Zhao, 2009). در دههٔ اخیر راهکار جدیدی با استفاده از یک وکتور برای بیان دو ژن برای سم‌زدایی

آفت‌کش‌های مختلف بررسی شده است (Lan *et al.*, 2006). در این بررسی دو ژن هدف ارگانوفسفروس هیدرولاز (*opd*) از *Flavobacterium* sp. و کربوکسیل استراز B1 (*b1*) از *Culex pipiens* برای بیان همزمان در وکتور pETDuet کلون شد و استرین *E. coli* BL-21 (DE3) به‌عنوان میزبان بیان استفاده شده است. بدین ترتیب این میکروارگانیسم به‌تنهایی قادر به تولید دو آنزیم OPH و B1 به ترتیب با وزن مولکولی تقریبی ۳۵ و ۶۵ کیلو دالتون، برای تجزیهٔ آفت‌کش‌های آلی فسفره و کاربامات بود. سویه‌های تولیدکنندهٔ OPH متعددی برای تصفیهٔ زیستی[1] آلاینده‌های فسفره به کار گرفته شده است. Mulchandani *et al.* (1999) در بررسی خود از باکتری نوترکیب تجزیه‌کننده با عنوان یک زیست‌کاتالیزور یاد می‌کنند و معتقدند استفاده از سلول کامل و تکنولوژی تثبیت سلول، راه را برای توسعهٔ روش‌های ساده، کارا و کم‌هزینه در سم‌زدایی از ترکیب‌های فسفره هموار می‌کند.

**نتیجه‌گیری کلی**

در این پژوهش بر تولید هیدرولاز پایدار و کارآمد توسط میکروارگانیسم‌های نوترکیب ژنتیکی برای پالایش زیستی دیازینون تمرکز شده است. استرین‌های نوترکیب حاصل توانایی بیان پروتئین OPH را دارند و این ادعا در مورد استرین V103 با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل آمید اثبات شد. در سال‌های اخیر، تثبیت آنزیم OPH روی مواد مناسب به‌عنوان حامل، توجه زیادی را در شاخه‌های مختلف محیط‌زیست به خود معطوف داشته است. همگام با توسعهٔ بیوشیمی و زیست‌شناسی مولکولی و دیگر تکنولوژی‌های زیستی مدرن مانند مهندسی ژنتیک، آنزیم‌شناسی، فرمنتاسیون و غیره تحقیقات بسیاری درزمینهٔ تغییر ویژگی‌های زیستی OPH و ایجاد یک باکتری‌های نوترکیب متنوع در حال انجام است که چشم‌انداز و آینده‌ای امیدوارکننده را در سم‌زدایی و تجزیهٔ آلاینده‌های فسفره متصور می‌شود.

## REFERENCES


1. Baumgartner, P., Raemaekers, R. J., Durieux, A., Gatehouse, A., Davies, H. & Taylor, M. (2002). Large-scale production, purification, and characterisation of recombinant *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin E-form expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 26, 394-405.
2. Cai, Z., Ma, J., Wang, J., Rong, Y., Chen, J., Li, S., Zhang, W. & Zhao, X. (2016) Aerobic biodegradation kinetics and pathway of the novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide Paichongding in yellow loam and Huangshi soils. *Applied Soil Ecology*, 98, 150-158.
3. Chae, M. Y., Postula, J. F. & Raushel, F. M. (1994) Stereospecific enzymatic hydrolysis of phosphorus–sulfur bonds in chiral organophosphate triesters. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 4, 1473-1478.
4. Chen, H., He, X., Rong, X., Cai, W. C. P., Liang, W., Li, S. & Huang, Q. (2009) Adsorption and biodegradation of carbaryl on montmorillonite, kaolinite and goethite. *Applied clay science*, 46: 102-108.
5. Chen, W. & Mulchandani, A. (1998). The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 71-76.
6. Chu, X. Y., Wu, N. F., Deng, M. J., Tian, J., Yao, B., Fan, Y. L. (2006) Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 49(1), 9-14.
7. Cowie, A., Cheng, J., Sibley, C. D., Fong, Y., Zaheer, R., Patten, C. L., Morton, R. M., Golding, G. B. & Finan, T. M. (2006) An integrated approach to functional genomics: construction of a novel reporter gene fusion library for *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7156-7167.
8. Cullington, J. E. & Walker, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(5), 677-686.
9. Daneshvar, N., Aber, S., Khani, A. & Rasoulifard, M. H. (2007) Investigation of adsorption kinetics and isotherms of imidacloprid as a pollutant from aqueous solution by adsorption onto industrial granular activated carbon. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5, 425-429.
10. Diez, M. C. (2010) Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 10(3), 244-267.


1. Bioremediation

11. Donarski, W. J., Dumas, D. P., Heitmeyer, D. P., Lewis, V. E. & Raushel, F. M. (1989) Structure–activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry*, 28, 4650-4655.
12. Ekkhunnatham, A., Jongsareejit, B., Yamkunthong, W. & Wichitwechkarn, J. (2012) Purification and characterization of methyl parathion hydrolase from *Burkholderia cepacia* capable of degrading organophosphate insecticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1739-1746.
13. Ewida, A. Y. (2014) Biodegradation of alachlor and endosulfan using environmental bacterial strains. *World Applied Sciences Journal*, 32, 540-547.
14. Harper, L. L., Mcdaniel, C. S., Miller, C. E. & Wild, J. R. (2006). Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC27551) contain identical *opd* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2586-2589.
15. Hofman, J., Beerendonk, E. F., Flolmer, H. C. & Kruithof, J. C. (1997) Removal of pesticides and other micro pollutants with cellulose-acetate, polyamide and ultra-low pressure reverse osmosis membranes. *Desalination*, 113, 209-214.
16. Horne, I., Sutherland, T. D., Harcourt, R. L., Russell, R. J. & Oakeshott, J. G. (2002) Identification of an *opd* (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3371-3376.
17. Hsu, T. S. & Bartha, R. (1979) Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 36-41.
18. Hsu, Y. T., Su, C. Y., Du, H. C., Jao, S. C., Li, W. S. (2008) Evaluation of organophosphorus chemicals-degrading enzymes: a comparison of *Escherichia coli* and human cytosolic aminopeptidase P. *Chemistry and Biodiversity*, 5, 1401-11.
19. Hua, W., Bennett, E. R. & Letcher, R. J. (2006) Ozone treatment and the depletion of detectable pharmaceuticals and atrazine herbicide in drinking water sourced from the upper Detroit River, Ontario, Canada. *Water Research*, 40, 2259-2266.
20. Jabeen, H., Iqbal, S., Anwar, S. (2014) Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN3. *Water and Environment Journal*, 15, 300-306.
21. Kazemi, M., Tahmasbi, A. M., Valizadeh, R., Naserian, A. A. & Soni, A. (2012) Organophosphate pesticides: a general review. *Agricultural Science Research Journal*, 2, 512-522.
22. Keprasertsup, C., Upatham, E. S., Sukhapanth, N. & Prempree, P. (2001) Degradation of methyl parathion in an aqueous medium by soil bacteria. *Scienceasia*, 27, 261-270.
23. Kolakowski, J. E., DeFrank, J. J., Harvey, S. P., Szafraniec, L. L., Beaudry, W. T., Lai, K. & Wild, J. R. (1997) Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 15, 297-312.
24. Lai, K., Stolowich, N. J. & Wild, J. R. (1995) Characterization of P–S bond hydrolysis in organophosphorothioate pesticides by organophosphorus hydrolase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318, 59-64.
25. Lan, W. S., Gu, J. D., Zhang, J. L., Shen, B. C., Jiang, H., Mulchandani, A., ... & Qiao, C. L. (2006) Coexpression of two detoxifying pesticide-degrading enzymes in a genetically engineered bacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58(2), 70-76.
26. Li, Q., Wang, P., Chen, R., Li, W., Wu, Y.J. (2014) Construction of genetically engineered bacteria that degrades organophosphorus pesticide residues and can be easily detected by the fluorescence. *Environmental Technology*, 35(5), 556-561.
27. Li, Q. & Wu, Y. J. (2014) A safety type genetically engineered bacterium with red fluorescence which can be used to degrade organophosphorus pesticides. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11, 891-898.
28. Mulbry, W. W., Karns, J. S. (1989) Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium opd* gene: relationship between the gene and protein. *Journal of bacteriology*, 171: 6740-6746.
29. Mulchandani, A. Rajesh. (2011) Microbial biosensors for organophosphate pesticides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 687-699.
30. Mulchandani, A., Kaneva, I. & Chen, W. (1999) Detoxification of organophosphate nerve agents by immobilized *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(2), 216-223.
31. Munnecke, D. M. (1980). Enzymatic detoxification of waste organophosphate pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 105-111.
32. Musa, S., Gichuki, J. W., Raburu, P. O. & Aura, C. M. (2011) Risk assessment for organochlorines and organophosphates pesticide residues in water and sediments from lower Nyando/Sondu-Miriu river within Lake Victoria Basin, Kenya. *Lakes and Reservoirs: Reserarch and Management*, 16, 273-280.

33. Rogers, K. R., Wang, Y., Mulchandani, A., Mulchandani, P. & Chen, W. (1999) Organophosphorus hydrolase-based fluorescence assay for organophosphate pesticides. *Biotechnology Progress*, 15, 517-522.
34. Rowland, S. S., Speedie, M. K. & Pogell, B. M. (1991) Purification and characterization of a secreted recombinant phosphotriesterase (parathion hydrolase) from *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 440-444.
35. Schofield, D. A., Westwater, C., Barth, J. L. & DiNovo, A. A. (2007) Development of a yeast biosensor–biocatalyst for the detection and biodegradation of the organophosphate paraoxon. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1383-1394.
36. Serdar, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, D. M. & Lancaster, J. H. (1982) Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 246-249.
37. Shimazu, M., Mulchandani, A. & Chen, W. (2001) Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and *p*-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(4), 318-324.
38. Singh, B. K. & Walker, A. (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 428-471.
39. Somara, S., Manavathi, B., Tebbe, C. C. & Siddavatam, D. (2002) Over-expression of parathion hydrolase of *Flavobacterium balustinum* in *E. coli*: Purification and characterization of His-tagged parathion hydrolase. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 39(2), 82-6.
40. Stoytcheva M. Enzyme vs. bacterial electrochemical sensors for organophosphorus pesticides quantification, Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería México. Source: Intelligent and Biosensors, Book edited by: Vernon S. Somerset, pp. 386, January 2010, InTech, Croatia. Fownloaded from SCIYO.COM.
41. Takayama, K., Suye, S. I., Kuroda, K., Ueda, M., Kitaguchi, T., Tsuchiyama, K., ... & Mulchandani, A. (2006) Surface display of organophosphorus hydrolase on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 22(4), 939-943.
42. Talebi-jahromi, Kh. (2008). *Pesticides toxicology* (2nd ed.) University of Tehran press. 492 pp.
43. Wang, H., Gong, Y., Xie, W., Xiao, W., Wang, J., Zheng, Y., Hu, J. & Liu, Z. (2011) Identification and characterization of a novel thermostable gh-57gene from metagenomic fosmid library of the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 1323-1338.
44. Wang, J., Chatrathi, M. P., Mulchandani, A. & Chen, W. (2001) Capillary electrophoresis microchips for separation and detection of organophosphate nerve agents. *Analytical Chemistry*, 73, 1804-1808.
45. Wong, D. (2006) The ABCs of Gene Cloning (2nd Edition). New York, NY: Springer. Springer, 196 pp.
46. Wu, C. F., Cha, H. J., Rao, G., Valdes, J. J. & Bentley, W. E. (2000) A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorus hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(1), 78-83.
47. Wu, C. F., Valdes, J. J., Rao, G. & Bentley, W. E. (2001) Enhancement of organophosphorus hydrolase yield in *Escherichia coli* using multiple gene fusions. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(1), 100-103.
48. Wu, N. F., Deng, M. J., Liang, G. Y., Chu, X. Y., Yao, B. & Fan, Y. L. (2004) Cloning and expression of *ophc2*, a new organphosphorus hydrolase gene. *Chinese Science Bulletin*, 49(12), 1245-1249.
49. Zertal, A., Jacquet, M., Lavedrine, B. & Sehili, T. (2005) Photodegradation of chlorinated pesticides dispersed on sand. *Chemosphere*, 58, 1431-1437.
50. Zhao, J. H. & Zhao, D. G. (2009) Transient expression of organophosphorus hydrolase to enhance the degrading activity of tomato fruit on coumaphos. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(2), 142-146.
51. Zheng, Y., Long, L., Fan, Y., Gan, J., Fang, J., Jin, W. (2013) A review on the detoxification of organophosphorus compounds by microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 2127-2134.
52. Zhongli, C., Shunpeng, L., Guoping, F. (2001) Isolation of methyl parathion-degrading strain M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4922-4925.