بیان ترشحی آنزیم تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره با کاربرد نظامی و صنعتی در باکتری باسیلوس سوبتیلیس

فرشاد نجومی[1] ، حمید مرادی فیروزجاه[2]

۱- گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران.۲-گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران. نویسنده مسئول.

اطلاعات مقاله

نوع مقاله
پژوهشی

تاریخچه مقاله
دریافت : ۹۶/۲/۹
پذیرش : ۹۶/۵/۱۱

کلید واژگان
ترکیبات ارگانوفسفره،
B. subtillis WB800،
بیان ترشحی، آنزیم opdB

نویسنده مسئول
Email:
h.m.firozjaee@gmail.com

چکیده

مقدمه: ارگانوفسفات نام عمومی استرهای اسید فسفریک است که در زمینه های مختلف بخصوص حوزه نظامی کاربرد دارند. با توجه به اینکه تولید و استفاده از سلاح های شیمیایی در جنگ های نوین چشمگیر می باشد، لذا مطالعه و پژوهش در زمینه شناسایی، پیشگیری و درمان آلودگی با این ترکیبات امری ضروری است. این ترکیبات اثرات منفی زیادی بر سیستم بیولوژیک بدن موجودات زنده دارند. مطالعات نشان داده تجزیه بیولوژیک این ترکیبات بهینه ترین روش برای امحای این ترکیبات است. آنزیم های مختلفی از جمله آنزیم opdB، برای تجزیه این ترکیبات شناسایی شده اند.

مواد و روش ها: ژن این آنزیم با تکنیکPCR از ژنوم باکتری لاکتوباسیلوس برویس ATCC367تکثیر شد. محصول PCR بدست آمده در وکتور pWB980 کلون گردید. سوش باکتریایی باسیلوس سوبتیلیس مستعد با وکتور نوترکیب ترانسفرم شدند. بیان ترشحی پروتئین در محیط بسیار غنی، به کمک تکنیک SDS- PAGE بررسی شد. فعالیت آنزیم به کمک اندازه گیری جذب ترکیب ارگانوفسفره کلروپیریفوس مصرفی و تخمین میزان مصرفی آن در مدت زمان تعیین شده در طول موج ۲۷۶ نانومتر بررسی شد.

نتایج: باند پروتئینی۲۷ کیلودالتون برروی ژل SDS-PAGE مشاهده شد. فعالیت آنزیم ۱۰/۸۳Unit/mL تخمین زده شد.

بحث: سوش نوترکیب حاصل، قادر به تولید ترشحی آنزیم کارآمد و فعال می باشد.

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفات گروه گسترده ای از عوامل شیمیایی هستند که تشکیل خانواده ای با بیش از ۵۰،۰۰۰ نوع ترکیب شیمیایی را می دهند(۱). از این ترکیبات در حوزه های مختلف نظامی و صنعتی استفاده می شود. از جمله ترکیبات ارگانوفسفره که در حوزه نظامی کاربرد دارند، عوامل اعصاب هستند. گازهای اعصاب مثل سومان، سارین، تابون، VX از جمله این عوامل هستند. عوامل اعصاب به دو دستهGوV تقسیم می شوند(۲).

مهمترین و معمول‌ترین راه آلودگی با این سموم، تماس پوستی و از طریق اپی تلیوم پوست است. دومین راه برای آلودگی، استنشاق این ترکیبات بصورت گاز می باشد(۳). آمارها نشان می دهد که سالانه تقریبا سه میلیون مورد مسمومیت و سیصد هزار مورد مرگ در جهان در اثر آلودگی با ترکیبات ارگانوفسفره گزارش می شود(۴). ارگانوفسفات ها برروی سیستم های متعدد بیولوژیکی بدن انسان مؤثر می باشد که می توان به موارد زیر اشاره کرد.

سیستم عصبی یکی از سیستم های مهم فیزیولوژیک جانوران است که ارگانوفسفات ها بیشتر بر روی این سیستم اثر می کنند (۵). این ترکیبات و یا متابولیت های آنها، مثل DDT (۶) بر روند اسپرماتوژنز یا گامتوژنز هم اثر می گذارند(۷). ترکیبات ارگانوفسفاته می توانند سبب تشکیل مواد واکنش گر بسیار فعال (ROS) می گردند(۸).

سلاح های حاوی این ترکیبات جزء سلاح های کشتار جمعی محسوب می شوند لذا ضروری است تا در طب رزم روش درمانی کارآمد برای درمان افراد آلوده توسعه یابد. تزریق پوستی و داخل وریدی فسفوتری استراز باکتریایی به حیوانات آزمایشگاهی اثرات درمانی خوبی نشان داد. علارغم این دستاوردها، در درمان مسمومیت انسانی باید بر دو مشکل غلبه کرد: ۱. واکنش های ایمنی که بعد از تزریق پروتئین خارجی رخ می دهد، ۲. غیرفعال شدن پروتئازهای خون(۹). با توجه به واکنش هایی که این آنزیم ها کاتالیز می کنند می توان از آنها در طب رزم در شناسایی محل های آلوده و همچنین میزان آلودگی استفاده کرد. مثلا آنزیم ارگانوفسفروس اسید

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2024-09-19]

انهیدرولاز(OPAA) پیوندP-F ترکیبات ارگانوفسفری واجد فلور را هیدرولیز می کند که بعنوان بیوسنسور برای تشخیص این ترکیبات استفاده می شود(۱۰).

بهینه ترین روش برای رفع آلودگی این ترکیبات تجزیه بیولوژیک می باشد. میکروارگانیسم هایی برای این منظور شناسایی شدند. مطالعات نشان داد آنزیم های تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره به این میکروارگانیسم ها این قابلیت را داده است. از بین آنزیم هایی که توانایی تجزیه این ترکیبات را دارند، آنزیم OPDB با دارا بودن شاخص هایی نظیر ویژگی سوبسترایی وسیع، عملکرد در دامنه بالایی از PH و همچنین پایداری در دماهای بالا، یکی از آنزیم های بسیار مهم برای این منظور می باشد. در مطالعه ای که قبلا توسط ایسلام و همکارانش انجام شده بود، این آنزیم به صورت درون سلولی در E.coli تولید شده بود(۱۱). تولید درون سلولی این آنزیم در E.Coliدارای معایبی نظیر سختی جداسازی آنزیم و همچنین تولید اجسام درون سلولی می باشد. لذا ما در این تحقیق از باکتری باسیلوس سوبتیلیس WB800 جهت تولید ترشحی این آنزیم استفاده کردیم، که می تواند در آینده به منظور تولید صنعتی این آنزیم و کاربرد آن در زمینه های شناسایی، تجزیه این ترکیبات و درمان مسمومیت مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و رو ش ها

از باکتری لاکتوباسیلوس برویس ATCC۳۶۷ بعنوان منبع ژن opdB و به منظور بیان ترشحی آنزیم OPDB، از باکتری باسیلوس سوبتیلیس WB۸۰۰ استفاده شد. از محیط کشت MRS Broth(محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیلوس ها) جهت کشت باکتری لاکتوباسیلوس برویس ATCC۳۶۷ استفاده شد. جهت کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس به منظور بررسی کلونینگ از محیط کشت BH broth استفاده شد.

باکتری لاکتوباسیلوس برویس ATCC۳۶۷ در محیط کشت MRS Broth در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکباتور Co۲ دار کشت داده شد. از باکتری رشد یافته در محیط MRS Broth با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج ژنوم انجام شد.به منظور تکثیر ژن کد کننده ی آنزیم opdB، واکنش PCR با کمک پرایمرهای طراحی شده و ژنوم تخلیص شده لاکتوباسیلوس (الگو)، انجام شد.

جهت تکثیر ژن opdB از ژنوم باکتری لاکتوباسیلوس برویس از جفت پرایمر پیشرو

5□TTTTGGATCCATGCCAGTTATCTTTTATATTCAT-3 و پیرو 3- TTTTAAGCTTTTGATTGTTACGTTGCAA استفاده شد. از نرم افزار های oligo و Gene Runner برای طراحی پرایمر استفاده شد. واکنش PCR با جفت پرایمر های اختصاصی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل : بافر PCR ۱X– ۰/۲ میلی مولار dNTP– ۰/۱ میکرومولار از هر پرایمر- U ۲/۵ آنزیم Taq پلیمراز و DNA الگو ۰/۱ میکروگرم در هر واکنش انجام شد. از گرادیانت دمایی ۵۶ تا ۶۷ درجه سانتی گراد برای بررسی دمای اتصال بهینه پرایمر با الگو استفاده شد. از پلاسمید PWB۹۸۰ بعنوان وکتور بیانی در باکتری باسیلوس سوبتیلیس WB۸۰۰ استفاده شد. باکتری باسیلوس سوبتیلیس دارای پلاسمید PWB۹۸۰ را به مدت ۱۷ ساعت در محیط کشت مایع، با دمای ۳۵ درجه و دور ۱۵۰rpm انکوبه گردید. با استفاده از کیت استخراج پلاسمیدNano-plus با روش ستونی (AccuPrep Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit) تخلیص پلاسمید صورت گرفت. به منظور ایجاد پلاسمید نوترکیب برش محصول PCR و وکتور با استفاده از آنزیم محدودگر BamHI و HindIII هر کدام بطور جداگانه انجام شد.

برای تخلیص محصولات برش خورده از کیت تخلیص محصول PCR با استفاده از روش ستونی(AccuPrep PCRPurification Kit) استفاده شد. تخلیص پلاسمید برش خورده نیز صورت گرفت. برای این هدف، از کیت تخلیص اسیدهای نوکلئیک از ژل به روش ستونی(AccuPrep Gel Purification Kit) طبق دستورالعمل استفاده شد. تعیین غلظت مواد واکنش دهنده با استفاده از دستگاه نانودرآپ انجام شد. محصول PCR و وکتور برش خورده در حضور آنزیم لیگاز و بافر مخصوص این آنزیم به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه و بعد به مدت یک شب در دمای ۱۳ درجه قرار گرفت تا واکنش اتصال صورت گیرد. برای انجام واکنش انتقال وکتور نوترکیب به باکتری، باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت ترانسفورم رشد داده شد. پلاسمید نوترکیب به این محیط اضافه شده تا ترانسفورماسیون صورت گیرد. از محیط کشت انتخابی حاوی ۱۰µg/ml کانامایسین برای بررسی صحت ترانسفورماسیون استفاده شد. جهت بررسی توانایی سوش های نوترکیب در استفاده از ترکیبات ارگانوفسفره، محیط حداقلMSM حاوی ترکیب ارگانوفسفره کلرپیریفوس تهیه شد. محیط نمکیMSM فاقد منبع کربنی و فسفر می باشند و تنها منبع کربن و فسفر آن در این مطالعه کلرپیریفوس می باشد .

جهت بیان آنزیم opdB باکتری باسیلوس نوترکیب در محیط کشت غنی شده (super rich) کشت داده شد. بعد از۷۲ ساعت انکوباسیون محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ می شود و مایع رویی عاری از سلول به عنوان منبع آنزیم خارج سلولی استخراج شد. همچنین رسوب و تغلیظ پروتئین با سولفات آمونیوم ۵۰ درصد انجام شد. برای بررسی بیان پروتئین مورد نظر، الکتروفورز نمونه ها بر روی ژل SDS-PAGE انجام شد. فعالیت آنزیم با استفاده از اندازه

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2024-09-19]

گیری میزان کاهش جذب کلرپیریفوس به عنوان سوبسترا در طول موج ۲۷۶ نانومتر با استفاده از روش اسپکتوفتومتری UV/VIS در بافر PBS بررسی شد.

نتایج

کشت باکتری لاکتوباسیلوس برویس ATCC۳۶۷ در محیط MRS Broth در انکباتور Co۲ دار با موفقیت انجام شد. استخراج ژنوم باکتری لاکتوباسیلوس برویس با روش فنل-کلروفرم انجام شد وکیفیت DNA استخراجی روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد که باند خوبی مشاهده شد(شکل ۱-۳-۱). واکنش PCR برای تکثیر قطعه ۷۲۳ جفت بازی ژنopdB انجام شد. نتایج حاصل از به کارگیری گرادیانت دمایی ۶۷°C-۵۶ در مرحله اتصال واکنشPCR نشان داد اتصال بهینه پرایمر و DNA الگو در دمای ۶۰°C صورت می گیرد(شکل ۱-۳-۲). پس از کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس واجد پلاسمید PWB۹۸۰ و انجام مراحل تخلیص پلاسمید نمونه پلاسمید مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد که باندهای حاصله نشان دهنده موفقیت تخلیص پلاسمید بود (شکل ۱-۳-۳). غلظت محصولات PCR و پلاسمید برش خورده با نانودراپ اندازه گیری شد که غلظت محصول PCR را ۸/۳ ng/µL و غلظت پلاسمید PWB۹۸۰ تخلیص شده را ۴/۸ ng/µL نشان داد.

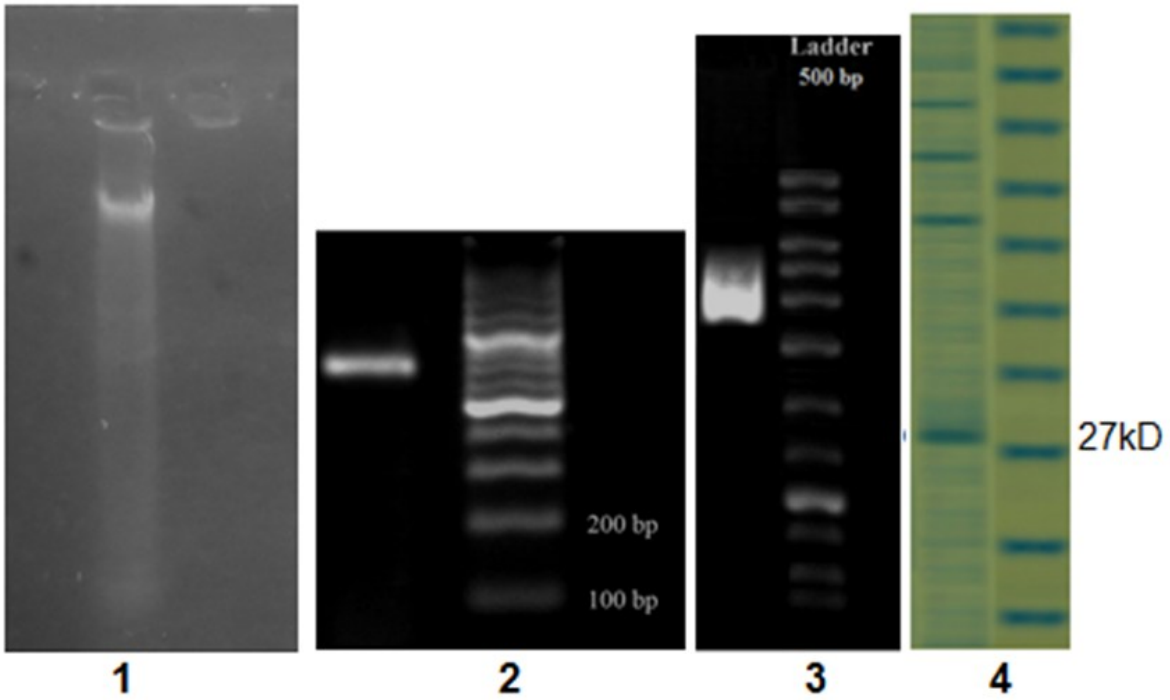
در محیطی که کلروپیروفوس به عنوان تنها منبع کربنی و فسفر بود، فقط باکتری باسیلوس سوبتیلیس واجد پلاسمید PWB۹۸۰- opdB رشد کرد(جدول ۱). بخاطر اینکه واجد آنزیم تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره بود و می توانست از کربن تولیدی جهت رشد استفاده کند.

جدول ۱: رشد باکتری ترانسفورم شده در محیط حداقل حاوی ترکیب ارگانوفسفره

باکتری / محیط کشت حداقل	باکتری حامل PWB۹۸۰	باکتری حامل PWB۹۸۰-OPDB
حاوی کلروپیروفوس (منبع فسفر و کربن)	عدم رشد	رشد
فاقد کلروپیروفوس	عدم رشد	عدم رشد

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول حاصل از بیان آنزیم در محیط super rich بر روی ژل ۱۲ درصد SDS- PAGE نشان دهنده بیان آنزیم می باشد. باند با اندازه تقریبی ۲۷ کیلودالتون در نتایج حاصل از SDS-PAGE مشاهده شد (شکل ۱).

شکل۱: استخراج DNA ژنومی از لاکتوباسیلوس برویس ۲)محصول PCR ژن opdB ۳) الکترفورز وکتور PWB۹۸۰ ۴)SDS-PAGE مخلوط پروتئینی حاوی آنزیم OPDB



[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2024-09-19]

فعالیت آنزیم opdB بوسیله مانیتورینگ هیدرولیز کلرپیریفوس بوسیله اندازه گیری جذب آن در طول موج ۲۷۶ نانومتر در pH=۷ بررسی شد. بررسی فعالیت آنزیم در بافر ۲۰۰ میلی مولار PBS انجام شد(جدول ۲).

جدول ۲: بررسی فعالیت آنزیم OPDB در تجزیه کلرپیریفوس

	در زمان صفر(فاقد CP)	۱دقیقه	۲دقیقه	۵دقیقه
جذب محلول حاوی آنزیم	۱/۲۳	۰/۸۶۲	۰/۵۳۲	۰/۳۰۲
فعالیت آنزیم (Unit/mL)	-	۱۳/۱۹	۱۲/۶۷	۶/۶۵
میانگین	۱۰/۸۳Unit/mL			

بحث

یکی از شایع ترین مسمومیت ها در دنیا مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره می باشد. با توجه به اینکه امروزه کمتر از سموم کلره استفاده می شود و بیشتر از سموم ارگانوفسفره استفاده می گردد، مسمومیت با سموم ارگانوفسفره از شیوع بیشتری برخوردار می باشد. از جمله ترکیبات ارگانوفسفره که در حوزه نظامی کاربرد دارند، عوامل اعصاب هستند. مسمومیت با عوامل اعصاب در جنگ ها و یا در حملات تروریستی مشاهده می شود. دلیل این مسئله هم سخت بودن تشخیص آنها می باشد که اغلب بی رنگ و بی بو و بیشتر بصورت گاز کاربرد دارند و فرار می باشند. از این دسته از ترکیبات ارگانوفسفره بطور قابل ملاحظه ای در جنگ عراق علیه ایران مورد استفاده قرار گرفت. در طی این جنگ در منطقه عملیاتی جزیره مجنون از ترکیبات فسفره تابون علیه سربازان ایرانی استفاده شد. همچنین در سال ۱۹۸۷و ۱۹۸۸ در زمان حمله به حلبچه استفاده از بمب های شیمیایی حاوی ترکیب سارین توسط ارتش عراق گزارش شد(۱۲). این آنزیم های تجزیه کننده علاوه براینکه در امحای این ترکیبات کاربرد دارند می توانند در تشخیص مناطق آلوده بصورت بیوسنسور بکار روند. ترکیبات ارگانوفسفره آنزیم استیل کولین استراز را مهار می کند و از این طریق مشکلات فراوانی برای انسان بوجود می آورد. بدین جهت دانشمندان در سال های اخیر به دنبال سمیت زدایی این ترکیبات می باشند که تجزیه آنزیمی، از بین روش های ارائه شده، به عنوان یکی از بهترین روش های سازگار با محیط زیست توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب نمود(۱۳).

در بین آنزیم هایی که برای سمیت زدایی آفت کش های ارگانوفسفره بکار می روند آنزیم opdB بعنوان یکی از آنزیم هایی که از پایداری بالایی و ویژگی سوبسترایی وسیع برخوردار است مورد توجه می باشد. ژن این آنزیم از لاکتوباسیلوس برویسATCC۳۶۷ استخراج گردید. این آنزیم ترکیبات ارگانوفسفره ای که خطرات زیادی برای سلامتی حیات دارند را تجزیه می کند. ویژگی اختصاصی آن برای ترکیبات ارگانوفسفره بالاست(۱۴).

شاه و همکاران(۱۱) تولید درون سلولی این آنزیم را با استفاده از سیستم باکتریایی E.coli انجام دادند، پلاسمیدهای مختلفی در مطالعه آن ها، برای بیان آنزیم، مورد بررسی قرار گرفت که در آن ها از پروموتر T۷ بعنوان پروموتر بیانی استفاده شد. از آنجایی که این پروموتر دارای قدرت بیانی بالایی است سبب بیان بالا از این آنزیم می گردد. ولی بیان بالای این آنزیم ایجاد مشکلاتی نظیر تشکیل انکلوژن بادی (اجسام داخل سلولی) می کند (۱۵). مراحل پیچیده و هزینه جداسازی آنزیم یکی دیگر از معایب استفاده از Ecoli می باشد. از دیگر مشکلات تولید آنزیم توسط اشریشیاکلای تجزیه پروتئولیتیکی، تولید مقدار کم از محصول مورد نظر می باشد(۱۶و۱۷).

استفاده از باسیلوس سوبتیلیس به منظور تولید ترشحی آنزیم می تواند راه کار بسیار مناسبی باشد، زیرا یک باکتری غیر بیماری زا بوده و توانایی ترشح خارج سلولی محصولات تولیدی را دارا می باشد و در صورتی که آنزیم به صورت ترشحی تولید گردد با توجه با اینکه سلول فاقد غشای خارجی است بنابراین به راحتی به محیط کشت ترشح می گردد. پلاسمید PWB۹۸۰، به عنوان وکتور بیانی در باسیلوس سوبتیلیس WB۸۰۰ استفاده شد. پلاسمید های PWB از PUB۱۱۰ مشتق شدند که واجد منطقه تنظیمی sacB، توالی نشانه sacB و توالی کد کننده TEM β-lactamase می باشد که آنزیم با این قابلیت به بیرون سلول ترشح می گردد(۱۸). در این پلاسمید، ژن مورد نظر تحت پروموتر P۴۳ قرار می گیرد. این پروموتر قابلیت بسیار بالایی جهت بیان آنزیم را دارا می باشد.

پلاسمید با دارا بودن توالی نشانه(sacBnprB)پروتئین تولیدی در باکتری را به بیرون سلول ترشح می نماید. در حین خروج پروتئین از غشای سلول پپتید نشانه برش خورده و آنزیم به صورت جدا شده از این پپتید، به بیرون ترشح می گردد، در این حالت پروتئین بصورت خالص در محیط کشت تولید می گردد و نیازی به مراحل اضافی تخلیص پروتئین که در E.coli انجام می گیرد، نمی باشد. در این صورت آنزیم می تواند دارای عملکرد بهتری باشد(۱۹). در این مطالعه بیان آنزیم در باکتری باسیلوس سوبتیلیس ترشحی بوده که دارای فعالیت هیدرولازی برای سوبستراهای ارگانوفسفره کلرپیریفوس می باشد. چون این ترکیبات دارای پیوند استری می باشند و از آنجایی که این آنزیم یک استراز می باشد برای ترکیبات مختلف خانواده ارگانوفسفات کارایی دارد. همچنین می توان در مطالعات آینده از آن بصورت کاربردی برای رفع آلودگی ها و شناسایی آلودگی محیطی آنها استفاده شود.

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2024-09-19]

References

1-Katz D, & Braly K. Racial stereotypes of one hundred college students. The Journal of Abnormal and Social Psychology.1933; 28(3):280.

2-Delfino RT, Ribeiro TS, Figueroa-Villar JD. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2009; 20:407-428.

3-Peter JV, Sudarsan TI, & Moran JL. Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches. Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine.2014; 18(11):735.

4-Brown MA, Brix KA. Review of health consequences from high-, intermediate-and low-level exposure to organophosphorous nerve agents. J Appl Toxicol.1998; 18(6):393–408

5-Scaps P, Demuynck S, Descamps M, & Dhainaut A. Effects of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities of the polychaete Nereis diversicolor. Archives of environmental contamination and toxicology.1997; 33(2):203-208.

6-Jin Y, Wang L, Ruan M, Liu J, Yang Y, Zhou C, Xu B, Fu Z. Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. Chemosphere. 2011; 84:124-130.

7-Scippo M, Argiris C, Weerdt VD, Muller M, Willemsen P, Martial J, Maghuin-Rogister G. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. Anal. Bioanal. Chem.2004;378: 664-669.

8-Galloway T, & Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. Ecotoxicology.2003; 12(1-4):345-363.

9-Balali-Mood M, & Saber H. Recent advances in the treatment of organophosphorous poisonings. Iranian journal of medical sciences.2012; 37(2):74.

10-Istamboulie G, Marty JL, Andreescu S, & Noguer T. Biosensor-controlled Degradation of Organophosphate Insecticides in Water. Biosensors and Environmental Health.2012; 60.

11-Islam SMA, Math RK, Cho KM, Lim WJ, Hong SY, Kim JM & Yun HD. Organophosphorus hydrolase (OpdB) of Lactobacillus brevis WCP902 from kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. Journal of agricultural and food chemistry. (2010); 58 (9):5380-5386.

12-Haines DD & Fox SC. Acute and long-term impact of chemical weapons: lessons from the Iran-Iraq war. Forensic Sci. Rev.2014; 26:97-114.

13-Jintana S, Sming K, Krongtong Y & Thanyachai S. Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates. International archives of occupational and environmental health.2009; 82(7):833-842.

14-Farag AT, Eweidah MH & El-Okazy AM. Reproductive toxicology of acephate in male mice. Reproductive Toxicology, 14(5), 457-462.18.Barbara D. Di Sioudi, C.E.M., Kaihua Lai, Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities. Chemico-Biological Interactions. 1999; 119–120:211–223.

15-Barbara D, Di Sioudi CEM, Kaihua Lai. Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities. Chemico -Biological Interactions, 1999; 119–120:211–223.

16-Mukesh Kapoor, R.R., Enzymatic bioremediation of organophosphorus insecticides by recombinant organophosphorous hydrolase. International Biodeterioration & Biodegradation.2011; 65:896-901.

17-Wong WKR, Ali AB & Ma MC. Cloning, expression, and characterization of diuretic hormone Manduca diuresin from Manduca sexta in Escherichia coli. Protein expression and purification.2003; 29(1):51-57.

18-Georgiou G & Segatori L, Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. Current opinion in biotechnology, 2005; 16(5): 538-545.

19-Wu XC, Lee WILS, Tran LOU & Wong SL. Engineering a Bacillus subtilis expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. Journal of Bacteriology.1991; 173(16):4952-4958.

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2024-09-19]

The secretory expression of the organophosphorus compound degrading enzyme with industrial and military uses in Bacillus subtilis bacteria

Nojoomi F (PhD), Moradi-Firoozjah H (MSc)*

Abstract

Introduction: Organophosphate is the common name for phosphoric acid esters that are used in various fields, especially in military productions. Considering the production and use of chemical weapon in recent wars, researches for identifying, preventing and treating pollution with these compounds is essential. These compounds have a lot of negative effects on the biological system. Studies have shown that the biodegradation of these compounds is the most effective method for eliminating these compounds. Various enzymes including the opdB enzyme have been identified for the degradation of these compounds.

Method: The opdB gene was amplified by PCR from the genome of Lactobacillus brevis ATCC367. The PCR product was cloned in pWB980 vector. Susceptible B. subtilis WB800 strains were transformed by recombinant vector. Secretion expression of protein in superrich medium was investigated using SDS PAGE technique. The enzyme activity was determined by a spectrophotometeric method using chlorpyrifos as the substrate.

Result: When we analyzed protein fractions with SDSPAGE, a 27 kDa protein band was presented. Enzyme activity was estimated at 10/83 unit/mL.

Discussion: The results show that the recombinant strain is capable of producing an efficient and active secretory enzyme.

---

*Corresponding Author: Department of molecular and cellular, Faculty of basic sciences, Mazandaran University, Iran. Email: h.m.firozjaee@gmail.com

[Downloaded from npwjm.ajaums.ac.ir on 2024-09-19]