بسم الله
الرحمن الرحیم

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای مجید مهاجر میلانی رشته: بیوشیمی بالینی گرایش: --- تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر عباس صاحبقدم لطفی (استاد راهنما)

دکتر افشین محسنی فر (استاد مشاور)

دکتر سیده زهرا بطحایی (استاد ناظر)

دکتر ابوالفضل گلستانی (استاد ناظر) ۱۳۸۹/۸/۱۷

دکتر محمد تقی خانی (نماینده تحصیلات تکمیلی) ۸۹/۸/۱۷

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مجید مهاجر میلانی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۸۷** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال **۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر عباس صاحبقدم لطفی** ، مشاوره **دکتر اقشین محسنی فر** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **مجید مهاجر میلانی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را رقبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

جداسازی، استخراج و تخلیص آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (OPH) از منبع باکتریایی و تثبیت آن روی بیوپلیمر کیتوزان

نگارش

مجید مهاجر میلانی

استاد راهنما

دکتر عباس صاحبقدم لطفی

استاد مشاور

دکتر افشین محسنی فر

پاییز ۱۳۸۹

تقدیم به :

پدر و مادر عزیزم

و همسر مهربانم

تشکر و قدردانی

منت خدای را عزوجل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت. هر نفسی که فرو می رود ممد حیات است و چون بر می آید، مفرح ذات. پس در هر نفسی دو نعمت موجود است و بر هر نعمت شکری واجب.

پس از حمد و سپاس پروردگار، بر خود واجب می دانم از کلیه عزیزانی که در مراحل مختلف این تحقیق مرا یاری نمودند،تشکر نمایم. از اساتید محترم جناب آقای دکتر لطفی(استاد محترم راهنما)، جناب آقای دکتر محسنی فر(استاد محترم مشاور)، مسئولین محترم آزمایشگاه سرکار خانم اعتمادی کیا، خانم افشار و سرکار خانم بناصادق خانمها و آقایان نژاوند، مطاع، کاملی پو ، قاسمی، یزدانی ،الطافی، ستوده، ضیغمی، خاکسار، پهلوان و ...

چکیده

ترکیبات ارگانوفسفره، گروهی از ترکیبات استر، آمید یا مشتقات تیولی فسفریک سمی هستند که بطور گسترده در کنترل حشرات و آفات بکار می‌روند. پس‌مانده‌های ترکیبات ارگانوفسفره در آبهای زیرزمینی، منابع آبی و غذاها، پس از جذب در بدن، باعث غیرفعال شدن آنزیم استیل کولین استراز و ایجاد عوارضی در موجود زنده می کنند. آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز (OPH) یا فسفوتری استراز (PTE)، آنزیم تجزیه کننده طیف وسیعی از ترکیبات ارگانوفسفره می باشد. این آنزیم که برای اولین بار از فلاووباکتریوم جدا شد، متالوآنزیمی همودایمر با وزن مولکولی kD ۷۲ و ۳۳۶ واحد اسید آمینه و موجود در غشای سیتوپلاسمی است که عضوی از سوپر فامیلی آمیدوهیدرولاز بوده و از یون دو ظرفیتی برای حمله نوکلئوفیلی استفاده می کند. میکروارگانیسم‌های موجود در خاک اعم از باکتریها و قارچها، که توانایی تجزیه و استفاده از ترکیبات ارگانوفسفره بعنوان منبع C و N و P برای رشد را دارند، حاوی این آنزیم می باشند. این میکروارگانیسم‌ها قادر به هیدرولیز پیوندهای P-O ، P-F ، P-CN و P-S موجود در نوروتوکسینهای ارگانوفسفره می باشند.

تثبیت آنزیم OPH روی سطوح مختلف، یکی از موثرترین روش ها جهت توسعه سم زدایی و حسگرها می باشد. کیتوزان بعنوان بیو پلیمری که شامل گروههای آمین و هیدروکسیل واکنش دهنده بوده و نیز به علت وجود گروههای آمین بعنوان پلی الکترولیت کاتیونیک، از اهمیت خاصی برخوردار بوده وکاربرد فراوانی را بویژه در زمینه تثبیت پیدا کرده است.

در این مطالعه باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره از خاکهای کشاورزی تیمار شده با این سموم جدا و سپس آنزیم OPH از آن تخلیص شد. مراحل تخلیص شامل سونیکیت، استفاده از تریتون X_{100}، رسوب گذاری با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یونی با DEAE بود. آنزیم تخلیص شده روی بیدهای کیتوزان تثبیت شد. در این تثبیت از گلوتارآلدهید بعنوان کراس لینکر استفاده گردید. اتصال آنزیم به بیدهای کیتوزان با سیستم طیف سنجی مادون قرمز و سنجش فعالیت آنزیمی تایید شد. فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در دماهای ۲۵-۳۷-۴۵-۶۰-۷۰و ۸۰ درجه سانتیگراد برای یافتن دمای بهینه بررسی شد. همچنین پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده در دماهای مذکور ارزیابی گردید. pH بهینه و پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH های ۱۲-۲ مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای کینیتیکی K_m وV_{max} نیز از معادله لینویور- برک محاسبه شد. اثر یون های SDS ، LiCl ، $FeCl_3$ ، $MgCl_2$ ، NaCl ، Cobalt ، ZnCl ، EDTA روی آنزیم آزاد بررسی گردید. ارزیابی استفاده از آنزیم آزاد و تثبیت شده در تشخیص سم در سرم های تیمار شده با سم پاروکسون نیز انجام شد. پایداری ذخیره ای آنزیم آزاد و تثبیت شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در نهایت ارزیابی قابلیت استفاده دوباره از آنزیم تثبیت شده نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که pH بهینه برای فعالیت آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و تثبیت شده pH=۸ بوده و کمترین فعالیت آنزیمی نمونه های ذکر شده در pH اسیدی مشاهده شد. بررسی بهینه دما نشان داد که دمای بهینه برای آنزیم آزاد و تثبیت شده به ترتیب ۳۷ و ۴۵ درجه سانتیگراد می باشد. در بررسی پارامترهای کینیتیکی مشخص شد که K_m و Vmax آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد به ترتیب کمتر و زیادتر می شود. نتایج بررسی میزان پایداری ذخیره ای آنزیم حاکی از آن بود که تثبیت آنزیم باعث افزایش پایداری ذخیره ای آن شده است. از طرف دیگر ارزیابی استفاده دوباره از آنزیم تثبیت شده نشان داد که حداقل ۳ بار می توان از آنزیم تثبیت شده استفاده کرد بدون اینکه فعالیت آن کاهش یابد. بررسی کارآیی آنزیم آزاد و تثبیت شده در تشخیص سم در سرم ، نشان داد که تشخیص با آنزیم تثبیت شده، سریعتر وبا خطای کمتری همراه است. نتایج حاصل از این پروژه حاکی از نقش مثبت تثبیت آنزیم در افزایش فعالیت و پایداری آنزیم می باشد؛ بطوریکه روش مذکور جهت تثبیت آنزیم های مشابه روی بیدهای کیتوزان بسیار مناسب بوده و بیوکونژوگه سنتز شده جهت کاربردهای مختلف پیشنهاد می شود.

لغات کلیدی: ترکیبات ارگانوفسفره، بیوپلیمر کیتوزان، تخلیص آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز، کراس لینکر گلوتارآلدهید

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری برمطالعات گذشته..... ۱

۱-۱.مقدمه..... ۲

۱-۱-۱.معرفی کلی ترکیبات ارگانوفسفره..... ۲

۱-۱-۲. ترکیبات ارگانوفسفره..... ۵

۱-۱-۳. تاریخچه حشره کش ها و عوامل جنگی شیمیایی ارگانوفسفره..... ۹

۱-۱-۴. ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره..... ۱۱

۱-۲. آشنایی با سیستم اعصاب کولینرژیک..... ۱۳

۱-۲-۱. نحوه عمل ترکیبات ارگانوفسفره در پستانداران..... ۱۵

۱-۲-۱-۱. نشانه ها و علائم مسمومیت با حشره کش های آنتی کولین استراز..... ۱۶

۱-۲-۱-۱-۱. سندرم کولینرژیک یا حاد..... ۱۶

۱-۲-۱-۱-۲. سندرم حد وسط ۱۷

۱-۲-۱-۱-۳. مسمومیت عصبی تأخیری القاء شده-ارگانوفسفات..... ۱۸

۱-۲-۱-۱-۴. انواع آنزیم های مهار شده توسط ترکیبات ارگانوفسفره ۱۹

۱-۲-۱-۲. مکانیسم ملکولی اتصال ترکیبات ارگانوفسفره به آنزیم استیل کولین استراز..... ۱۹

۱-۳. پاکسازی ترکیبات ارگانو فسفره..... ۲۳

۱-۳-۱. آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (OPH) ۳۱

۱-۳-۱-۱. بررسی کریستالوگرافی ساختار آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز با استفاده از روش تفرق اشعهX..... ۳۱

۱-۳-۱-۲. مکانیسم کاتالیتیکی توسط آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز..... ۳۵

۱-۴. تثبیت آنزیم..... ۳۹

۱-۴-۱. تغییرات ناشی از تثبیت آنزیم..... ۴۳
۱-۴-۲. کاربرد آنزیم تثبیت شده..... ۴۳
۱-۵. مطالعات انجام شده..... ۴۴
۱-۶. پروسه تخلیص..... ۵۱
۱-۶-۱. روش های اصلی جداسازی آنزیم ۵۴
۱-۶-۱-۱. مواد رسوب دهنده ۵۴
۱-۶-۱-۲. استفاده از املاح معدنی..... ۵۴
۱-۶-۱-۳. استفاده از حلالهای آلی (اتانول) ۵۴
۱-۶-۱-۴- استفاده از پلی مرهای محلول (پلی اتیلن گلیکول)..... ۵۴
۱-۷. کروماتوگرافی..... ۵۵
۱-۷-۱. انواع کروماتوگرافی ۵۵
۱-۷-۱- ۱. کروماتوگرافی سهمی ۵۶
۱-۷-۱- ۲. کروماتوگرافی جذبی ۵۷
۱-۷-۲. خصوصیات بافرهای رایج در کروماتوگرافی جذبی ۵۷
۱-۷-۲-۱. خصوصیات بافر تریس..... ۵۷
۱-۷-۲-۲. بافر فسفات ۵۸
۱-۷-۳. انتخاب ماتریکس ۵۸
۱-۷-۴.کروماتوگرافی تعویض یونی..... ۵۸
۱-۷-۴-۱. عوامل موثر در انتخاب نوع ماتریکس کروماتوگرافی تعویض یونی..... ۶۰
۱-۷-۴-۲. انتخاب ستون ۶۱
۱-۷-۴-۳. ظرفیت ژل..... ۶۲
فصل دوم: مواد و روش‌ها..... ۶۴
۲-۱. جداسازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۶۵

۲-۱-۲. نحوه تهیه محیط‌های مورد استفاده در مرحله جداسازی باکتری..... ۶۵
۲-۱-۲-۱. طرز تهیه محیط کشت نمکی مایع حاوی سم ۶۵
۲-۱-۲-۲. طرز تهیه محیط کشت نمکی آگار حاوی سم ۶۶
۲-۱-۲-۳. طرز تهیه محیط کشت نوترینت آگار (N.A)..... ۶۷
۲-۱-۲-۴. طرز تهیه محیط کشت لوریا برتانی (LB)..... ۶۷
۲-۱-۲-۵. طرز تهیه محیط کشت لوریا برتانی 2X ۶۸
۲-۱-۳. نمونه برداری از خاکهای حاوی باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره..... ۶۸
۲-۱-۴. جداسازی باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره..... ۶۹
۲-۱-۵. نگهداری طولانی مدت باکتری و طرز تهیه استوک از آن..... ۶۹
۲-۱-۶. مشاهده باکتری در زیر میکروسکوپ ۷۰
۲-۱-۷. طرز عمل آزمایشات شیمیایی ۷۱
۲-۱-۷-۳. آزمایش ۱۶ sRNA ۷۲
۲-۲. تخلیص آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز از باکتری منتخب ۷۲
۲-۲-۱. تکثیر باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره..... ۷۲
۲-۲-۱-۱. طرز تهیه بافر Tris-Hcl ۵۰ میلی مولار ۷۳
۲-۲-۱-۲. طرز تهیه استوک PMSF ۷۳
۲-۲-۲. از بین بردن دیواره سلولی باکتری..... ۷۴
۲-۲-۳. افزایش حلالیت غشای سلولی باکتری ۷۴
۲-۲-۴. رسوب گذاری ۷۵
۲-۲-۵. جدا کردن نمکهای سولفات آمونیوم از پروتئین..... ۷۶
۲-۲-۵-۱. استفاده از روش دیالیز..... ۷۶
۲-۲-۵-۱-۲- روش آماده سازی کیسه دیالیز..... ۷۶
۲-۲-۵-۲. استفاده از ستون ژل فیلتراسیون(ستون دسالتینگ)..... ۷۷

۲-۲-۶. کروماتوگرافی تعویض یونی توسط DEAE-Sepharose CL-6B ۷۷
۲-۲-۶-۲. مشخصات ستون کروماتوگرافی ۷۸
۲-۲-۶-۳. پر کردن ستون توسط ژل ۷۸
۲-۲-۶-۴. قرار دادن نمونه ۷۸
۲-۲-۶-۵. شستشو دادن ۷۸
۲-۲-۶-۶. جدا کردن ۷۸
۲-۳. سنجش فعالیت آنزیم ۷۹
۲-۴. آزمایش برادفورد ۸۱
۲-۴-۲. طرز تهیه محلول برادفورد ۸۱
۲-۴-۳. روش کار آزمایش برادفورد ۸۲
۲-۵. الکتروفورز SDS- PAGE ۸۲
۲-۵-۳. رنگ آمیزی ژل با کوماسی آبی R-250 ۸۶
۲-۶. ایجاد بیدهای کیتوزان ۸۶
۲-۶-۳. طرز تهیه محلول بازی ۸۷
۲-۷. اضافه کردن کراس لینگر گلوتارآلدهید به بیدهای کیتوزان ۸۸
۲-۸. اتصال آنزیم به بیدهای کیتوزان حاوی گلوتار آلدهید ۸۸
۲-۹. تعیین pH بهینه برای فعالیت آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۸۹
۲-۱۰. تعیین دمای بهینه برای آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۹۰
۲-۱۱. ارزیابی پایداری pH آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۹۰
۲-۱۲. ارزیابی پایداری دمایی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۹۱
۲-۱۳. ارزیابی تاثیر یون روی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد ۹۲
۲-۱۴. بررسی کینتیک آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده (Km, Vmax) ۹۳
۲-۱۵. بررسی پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۹۳

۲-۱۶. ارزیابی قابلیت استفاده دوباره از آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز تثبیت شده ۹۳
۲-۱۷. ارزیابی کارآیی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده جهت تشخیص و تعیین میزان سم در سرم.....۹۴
فصل سوم: نتایج ۹۵
۳-۱. جدا سازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانو فسفره ۹۶
۳-۲. نتایج مربوط به رنگ آمیزی گرم و آزمایشات بیوشیمیایی و sRNA ۱۶.....۹۸
۳-۳. مراحل تخلیص آنزیم.....۱۰۱
۳-۳-۱. از بین بردن دیواره سلولی باکتری.....۱۰۱
۳-۳-۲. استفاده از تریتون X_{100} برای افزایش حلالیت غشا.....۱۰۲
۳-۳-۳. رسوب دهی با سولفات آمونیم.....۱۰۲
۳-۳-۴. کروماتوگرافی تعویض یونی توسطDEAE-Sepharose CL-6B.....۱۰۳
۳-۴. نتایج فرایند تخلیص آنزیم با استفاده از الکتروفورزSDS-PAGE.....۱۰۴
۳-۵. نتایج کمی حاصله از تخلیص آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز.....۱۰۵
۳-۶. رسم منحنی استاندارد.....۱۰۶
۳-۷. تثبیت آنزیم.....۱۰۶
۳-۷-۱. مطالعات مربوط به اتصال گلوتارآلدهید به بیدهای کیتوزان.....۱۰۷
۳-۷-۲. مطالعات مربوط به اتصال آنزیم به بید کیتوزان حاوی گلوتارآلدهید.....۱۰۷
۳-۸. تعیین pH بهینه در فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۰۸
۳-۹. تعیین دمای بهینه در فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۱۰
۳-۱۰. ارزیابی پایداری PH آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۱۱۱
۳-۱۱. ارزیابی پایداری دمایی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۱۳
۳-۱۲. ارزیابی تاثیر یون روی فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد.....۱۱۴

۳-۱۳. نتایج مربوط به پارامترهای کینتیکی(Km,Vmax) آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۱۵
۳-۱۴. بررسی پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۱۶
۳-۱۵. ارزیابی قابلیت استفاده دوباره از آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز تثبیت شده.....۱۱۷
۳-۱۴. ارزیابی فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده برای تشخیص آلودگی سرم به سموم ارگانو فسفره ۱۱۸
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۲۰
۴-۱. بحث ، نتیجه گیری ۱۲۱
۴-۲. جداسازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره و تخلیص آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز از آن.....۱۲۲
۴-۳. تثبیت آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز روی بیدهای کیتوزان.....۱۲۶
۴-۳-۱. اتصال گلوتار آلدهید به بید کتیوزان.....۱۲۷
۴-۳-۲. اتصال آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز به بید کتیوزان حاوی گلوتارآلدهید.....۱۲۸
۴-۴. آزمایشات انجام شده روی آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۱۲۹
۴-۴-۱. بررسی اثر pH ۱۲۹
۴-۴-۱-۱. اثر pH بر سرعت واکنش های آنزیمی ۱۲۹
۴-۴-۱-۲. اثر pH بر پایداری آنزیم ۱۲۹
۴-۴-۱-۳. بررسی پایدار pH آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و تثبیت شده بر روی بیدهای کیتوزان در pH ها و زمانهای مختلف.....۱۲۹
۴-۴-۱-۴. اثر pH بر فعالیت کاتالیزوری آنزیم ۱۳۰
۴-۴-۱-۵. مطالعه اثرpH های مختلف بر فعالیت آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۳۰
۴-۴-۲. اثر دما بر واکنش های آنزیمی.....۱۳۲
۴-۴-۲-۱. تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۳۲

۴-۴-۲-۲. بررسی پایداری حرارتی ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده در دماها و زمانهای مختلف.....۱۳۳
۴-۴-۳. ارزیابی تاثیر یون روی فعالیت آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز آزاد.....۱۳۵
۴-۴-۴. ارزیابی پارامترهای کینیتیکی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (K_m , V_{max}) ۱۳۷
۴-۴-۴-۱. اهمیت اندازه گیری K_m.....۱۳۷
۴-۴-۴-۲. مطالعه پارامترهای کینیتیکی(K_m , V_{max}) آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۱۳۷
۴-۴-۵. بررسی پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده ۱۳۸
۴-۴-۶. ارزیابی قابلیت استفاده دوباره از آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز تثبیت شده.....۱۳۹
۴-۴-۷. ارزیابی فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده جهت تشخیص سموم ارگانوفسفره در سرم.....۱۴۰
۴-۵. نتیجه گیری.....۱۴۱
۴-۶. پیشنهادها.....۱۴۲
منابع.....۱۴۴
چکیده انگلیسی.....۱۵۷

فهرست جداول

جدول۱-۱. کلاس بندی حشره کش ها.....۳

جدول۱-۲. تارگت ملکولی کلاس های اصلی حشره کش ها.....۴

جدول۱-۳. تعدادی از ترکیبات ارگانوفسفره به همراه LD50 آنها.....۶

جدول۱-۴. طبقه بندی WHO با توجه به خطرات آفت کش ها.....۸

جدول ۱-۵ .نشانه ها و علائم مسمومیت با حشرکش های آنتی کولین استراز(سندرم کولینرژیک).....۱۷

جدول ۱-۶. آنزیم های میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره.....۲۶

جدول ۱-۷ انواع میکروارگانیسم های تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره.....۲۷

جدول ۱-۸. عناصر تشکیل دهنده ساختار دوم آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز.....۳۲

جدول۱- ۹. فاکتورهای موثر در adsorption آنزیم به بستر.....۴۲

جدول ۱-۱۰. کاربردهای اصلی کیتوزان.....۵۱

جدول۱-۱۱. روش جداسازی یک آنزیم و مراحل آن.....۵۳

جدول ۱ـ۱۲. ظرفیت کل و قابل دسترس ژل DEAE ـ سفاروز CL6B ، در مورد هموگلوبین و آلبومین.....۶۲

جدول ۲-۱. تهیه ۱۲ میلی لیتر محلول ژل پایین با غلظت های مختلف.....۸۴

جدول ۲-2. تهیه ۵ میلی لیتر ژل بالا با غلظت ۳،۴ یا ۵ درصد.....۸۵

جدول۳-۱. نتایج حاصل از آزمایشات تشخیصی باکتری.....۱۰۰

جدول ۳-۲.نسبت OD فعالیت آنزیمی بر OD پروتئین در درصدهای مختلف رسوب گذاری.....۱۰۳

جدول۳-۳. داده های کمی حاصله از تخلیص آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز.....۱۰۵

جدول ۳-۴. بررسی ارزیابی تاثیر یون روی فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد.....۱۱۵

جدول۳-۵. مقادیر Km و Vmax ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و ارگانوفسفرهیدرولاز تثبیت شده.....۱۱۵

جدول ۳-۶. نتایج تعیین میزان سم در سرم تیمار شده با آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و SD و CV آن..... ۱۱۸
جدول ۳-۷. نتایج تعیین میزان سم در سرم تیمار شده با آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز تثبیت شده و SD و CV آن..... ۱۱۹

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. فرمول عمومی ترکیبات ارگانوفسفره و مسیر اصلی سم زدایی آنها.....۱۲
شکل ۱-۲. ساختار شیمیایی تعدادی از ترکیبات ارگانوفسفره.....۱۳
شکل ۱-۳. مهار مسیر هیدرولیز استیل کولین.....۱۵
شکل ۱-۴ . مکانیسم هیدرولیز استیل کولین توسط استیل کولین استراز.....۲۰
شکل ۱-۵ . دیاگرام مهار استیل کولین استراز با ترکیبات ارگانوفسفره.....۲۲
شکل ۱-۶ . (A) هیدرلیز استیل کولین بوسیله آنزیم استیل کولین استراز (B) هیدرلیز کلرپیریفوس (یک ترکیب ارگانوفسفره) بوسیله آنزیم استیل کولین استراز ۲۳
شکل ۱-۷. ساختار کریستالی آنزیم OPH و جایگاه فعال آن.....۳۲
شکل ۱-۸. جایگاه فعال آنزیم OPH ۳۴
شکل ۱-۹. مکان اتصال سوبسترایی.....۳۵
شکل ۱-۱۰. مدل عملکردی فعالیت کاتابولیکی آنزیم OPH جهت هیدرولیز ترکیبات ارگانوفسفره.....۳۶
شکل ۱-۱۱. مکانیسم تجزیه ترکیبات OP توسط OPH.....۳۶
شکل ۱-۱۲. مسیر پیشنهاد شده جهت تجزیه کلرپیریفوس بوسیله میکروارگانیسم ها و ورود محصولات تجزیه شده به سیکل کربس.....۳۷
شکل ۱-۱۳. مسیر پیشنهاد شده تجزیه پاراتیون و متیل پاراتیون توسط میکرارگانیسم ها و ورود محصولات تجزیه شده به سیکل کربس.....۳۸
شکل ۱-۱۴. تاثیرات pH روی بار خالص یک پروتئین.....۶۰
شکل ۲-۱. سنجش فعالیت آنزیم.....۸۰
شکل ۲-۲. آزمایش برادفورد و سنجش میزان جذب نور با استفاده از میکروپلیتهای الایزا ریدر.....۸۲
شکل ۳-۱. نمونه های خاک کشت داده شده در محیط کشت نمکی مایع حاوی سم دیازینون پس از گذشت ۱۵ روز.....۹۷

شکل ۳-۲. نمونه های ۸-۵ تلقیح شده در محیط نوترینت آگار به منظور استخراج کلنی های واحد از باکتری های رشد یافته در محیط های کشت نمکی مایع حاوی سم دیازینون.....۹۷
شکل ۳-۳. نمونه شماره ۷ تلقیح شده در محیط کشت نمکی آگار حاوی سم دیازینون.....۹۷
شکل ۳-۴. کشت باکتری در محیط نوترینت آگار.....۹۹
شکل ۳-۵. کشت تک کلنی نهایی از باکتری تجزیه کننده سم دیازینون در محیط کشت مولر هینتون آگار.....۱۰۱
شکل ۳-۶. رسوب حاصل از رسوب گذاری سولفات آمونیم ۶۰٪.....۱۰۳
شکل ۳-۷. اسکن ژل الکتروفورز از مراحل تخلیص و تعیین وزن مولکولی آنزیم تخلیص شده.....۱۰۵
شکل ۳-۸.منحنی استاندارد محلولهای استاندارد آلبومین با غلظتهای۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم.....۱۰۶
شکل ۳-۹. نمونه ای از معادله لینویر-برک جهت محاسبه Vmax ، Km آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد.....۱۱۶
شکل۳ -۱۰. نمونه ای از معادله لینویر-برک جهت محاسبه Vmax ، Km آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز تثبیت شده.....۱۱۶

فهرست نمودارها

نمودار ۳ – ۱ نتایج سنجش فعالیت آنزیم برای فرکشنهای خارج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی.....۱۰۴

نمودار ۳ – ۲. نمودار طیف FTIR گرفته شده از بید کیتوزان متصل به کراس لینکر گلوتارآلدهید.....۱۰۷

نمودار۳-۳. نمودار طیف FTIR گرفته شده از آنزیم متصل به بید کیتوزان حاوی کراس لینکر گلوتارآلدهید.....۱۰۸

نمودار ۳-۴. نمودار تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم OPH آزاد و تثبیت شده روی بید کیتوزان.....۱۰۹

نمودار ۳-۵. نمودار تعیین دمای بهینه در فعالیت آنزیم OPH آزاد و تثبیت شده روی بید کیتوزان.....۱۱۱

نمودار ۳-۶. نمودارارزیابی پایداری pH آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۱۲

نمودار ۳-۷ . نمودار ارزیابی پایداری دمایی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده.....۱۱۴

نمودار ۳-۸. نمودارببررسی ارزیابی تاثیر یون روی فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد.....۱۱۷

نمودار ۳-۹. نمودارمقایسه پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد وتثبیت شده.....۱۱۷

نمودار ۳-۱۰. نمودار قابلیت استفاده دوباره آتزیم ارگانوفسفر هیدرولاز تثبیت شده ۱۱۸

نمودار ۳-۱۱. نمودارمقایسه کارایی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و تثبیت شده در تعیین سم در سرم تیمار شده.....۱۱۹