بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم رضوان کرمی رشته سم شناسی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « طراحی حسگر زیستی فلوریمتری جهت تشخیص پاراکسون با استفاده از کونژوگه کیتوزان – نانوذرات طلا- آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز » در تاریخ ۹۰/۱/۲۲ ارائه کردند.
بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر افشین محسنی فر	(استاد راهنما)
دکتر صادق حسن نیا	(استاد مشاور)
دکتر ملیحه سودی	(استاد ناظر)
دکتر محمود قاضی خوانساری	(استاد ناظر)
دکتر بهرام دارایی	(نماینده تحصیلات تکمیلی)

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 آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- 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 ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ 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 **رضوان کرمی** دانشجوی رشته **سم شناسی** 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 ۹۰/۴/۱۴

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 **سم شناسی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر افشین محسنی فر** ، مشاوره **دکتر حسن نیا** 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 ٥ : 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 **رضوان کرمی** دانشجوی رشته **سم شناسی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی رضوان کرمی

تاریخ و امضا

۹۰/٤/۱٤

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته سم شناسی

عنوان

طراحی حسگر زیستی فلوریمتری جهت تشخیص پاراکسون با استفاده از کونژوگه کیتوزان- نانوذرات طلا -آنزیم ارگانو فسفر هیدرولاز

نگارش

رضوان کرمی

استاد راهنما

دکتر افشین محستی فر

استاد مشاور

دکتر حسن نیا

بهار ۱۳۹۰

تقدیم به:

دو معلم عشق و ایثار و فداکاری پدر و مادر عزیزم

تشکر و قدردانی

در آغاز هیچ نبود... کلمه بود...

و آن کلمه خدا بود.

خلایق، آفریدگان، در انبوه ظلمات و نابینایی سرگردان شدند، در طلب و پژوهش!

و نمی دانند با علامت ها و اشاره ها چه کنند؟!

باری، پروردگار در میان آنان است، در هر دگرگونی حال، و در هر گردش احوال.

و حالات آنان را ساعت به ساعت، به شیوه ای درک نشدنی، دگرگون می کند.

به رسم ادب بر خود لازم می دانم در ابتدا از زحمات استاد راهنمای گرامی ام جناب آقای دکتر محسنی فر به خاطر تمامی زحمات، کمک ها و راهنمایی های صبورانه و همه آنچه از ایشان آموخته ام کمال تشکر و قدردانی را دارم

سپاسگزار استاد گرامی جناب آقای دکتر حسن نیا هستم که با قبول مشاورت این پروژه، از راهنمایی های شان بهره مند بوده ام .

از مساعدت و همکاری بی دریغ مدیریت گروه سم شناسی جناب آقای دکتر دارایی کمال تشکر را دارم .

از جناب آقای دکتر خرم آبادی به خاطر تمامی زحمات و راهنمایی های بی دریغشان سپاس گزارم.

و نهایتا والاترین درجات تشکر را از پدر و مادرم، که با چشم‌هایی پر از شوق، و زیبایی حضور برادراانم در کنارم، که خستگی‌های این راه را به امید و روشنی راه تبدیل کرده اند، دارم و امیدوارم بتوانم در آینده‌ی نزدیک جواب‌گوی این همه محبت آنها باشم.

چکیده
حشره کش های ارگانو فسفره به طور گسترده به عنوان سموم کشاورزی و عوامل عصبی مورد استفاده قرار میگیرند. حفاظت در برابر خطرات مواجه شده با انسان تحت عنوان حسگر زیستی که توانائی شناسائی سموم را دارد توصیف میشود. آنزیم ارگانو فسفر هیدرولاز بر روی بستر کیتوزان که با طلا پوشش داده شده قرار میگرد و در حضور کومارین ۱ سیستم بیوسنسوری بررسی میشود.
آنزیم OPH از منبعی باکتریائی استخراج شد و کونژوگه آنزیم-کیتوزان-طلا شکل گرفت. نانوذرات طلا به عنوان خاموش کننده سیستم فلورسانس عمل میکند. اتصال کیتوزان به آنزیم از طریق متصل کننده گلوتارالدهید صورت میگیرد. با افزودن ماده فلوروفور کومارین و غلظت های مختلف پاراکسون به عنوان سوبسترا عملکرد حسگر زیستی توسط دستگاه فلوریمتر سنجیده شد. ویژگی های فیزیکو شیمیائی نانوبیوکونژوگه از طریق اندازه گیری فعالیت در دما ها و pH های مختلف بررسی شد .همچنین پایداری و پارامتر های کینتیکی نانوبیوکونژوگه ارزیابی شد.
نتایج فلوریمتری نشان داد که نانوبیوکونژوگه سبب کاهش پیک کومارین میشود و با اضافه کردن سوبسترا پاراکسون، پیک نشر نانوبیوکونژوگه افزایش مییابد که این صحت عملکرد بیوسنسور را نشان میدهد. درصد کاهش فعالیت آنزیم در طی ۳۵ روز برای آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد به ترتیب ۱/۱٤ و ۲/۲۸ بوده است. بیشترین میزان فعالیت برای آنزیم آزاد و تثبیت شده pH =8 بوده است . فعالیت آنزیمی از pH =8 به pH =2 کاهش نشان میدهد .مشاهدات مشابهی در مورد بازه بازی و همچنین دماهای مختلف مشاهده شد. پارامتهای کینتیکی نیز بهبود یافت.

در عدم حضور پاراوکسون جایگاه فعال آنزیم توسط کومارین مهار میشود و پیک نشری کومارین در حضور نانو ذرات طلا کاهش مییابد. با اضافه کردن پاراکسون، جایگاه فعال آنزیم توسط سوبسترا اشغال میشود و پیک نانوبیوکونژوگه افزایش مییابد . افزایش پایداری و کاهش Km در آنزیم تثبیت شده به دلیل حفظ ساختار طبیعی آنزیم به دلیل پیوند کووالانسی در فرایند تثبیت میباشد.

واژه های کلیدی: ترکیبات ارگانوفسفره، ارگانوفسفات هیدرولاز، زیست حسگر، نانوذرات طلا، کومارین

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۳
۱-۱. ترکیبات ارگانوفسفره ۴
۱-۲. تاریخچه حشره کش ها و عوامل جنگی شیمیایی ارگانوفسفره ۶
۱-۳. ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره ۸
۱-۴. نحوه عمل ترکیبات OP ۸
۱-۵. نشانه ها وعلائم مسمومیت با حشرکش های آنتی کولین استراز ۹
۱-۶. آنزیم های هیدرولیز کننده ترکیبات ارگانو فسفره ۱۰
۱-۷. آنزیم OPH ۱۲
۱-۸. فرایند تثبیت ۱۴
۱-۸-۱. اثرات تثبیت بر آنزیم ۱۵
۱-۹. نانوفناوری ۱۷
۱-۹-۱. کاربرد نانوفناوری در حوزه زیست حسگرها ۱۷
۱-۱۰. حسگر های زیستی ۱۹
۱-۱۰-۱. زیست حسگرها ۲۰
۱-۱۰-۲. بخش زیستی ۲۰
۱-۱۱. مبدل ها ۲۱
۱-۱۲. مروری بر مطالعات گذشته ۲۲
۱-۱۳. نانو ذرات به عنوان مبدل جهت کاوش عوامل ۲۵
۱-۱۳-۱. نانو ذرات طلا برای یافتن عوامل OP ۲۶
فصل دوم: مواد و روش ها ۲۸
۲-۱. جداسازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۲۹
۲-۱-۱. طرز تهیه محیط کشت نمکی براث حاوی سم ۳۰
۲-۱-۲. طرز تهیه محیط کشت BHI ۳۰
۲-۱-۳. طرز تهیه محیط کشت نوترینت آگار (N.A) ۳۱
۲-۱-۴. طرز تهیه محیط کشت نمکی آگار حاوی سم ۳۱
۲-۲. نگهداری طولانی مدت باکتری و طرز تهیه ذخیره ۳۲
۲-۲-۱. طرز تهیه محیط کشت لوریا برتانی (LB) ۳۲
۲-۲-۲. طرز تهیه محیط کشت لوریا برتانی2XYT ۳۳

۲-۳. تخلیص آنزیم OPH یا ارگانوفسفرهیدرولاز از باکتری منتخب ۳۴
۲-۳-۱. تکثیر باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۳۴
۲-۳-۲. از بین بردن دیواره سلولی باکتری ۳۵
۲-۳-۳. افزایش حلالیت غشای سلولی باکتری ۳۵
۲-۳-۴. رسوب گذاری ۳۶
۲-۳-۵. جدا کردن نمکهای سولفات آمونیوم از پروتئین ۳۷
۲-۳-۶. کروماتوگرافی تعویض یونی توسطDEAE-Sepharose CL-6B ۳۷
۲-۴. سنجش فعالیت آنزیم ۴۰
۲-۵. آزمایش برادفورد ۴۰
۲-۶. الکتروفورز SDS- PAGE ۴۱
۲-۶-۱. رنگ آمیزی با کوماسی آبی R-250 ..... ۴۵
۲-۷. سنتز نانو ذرات طلا ۴۵
۲-۷-۱. ارزیابی و تأیید تشکیل نانوذرات طلا ۴۶
۲-۷-۲. ارزیابی مورفولوژی نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره ۴۶
۲-۸. فرایند تثبیت ۴۷
۲-۸-۱. روش اتصال گلوتارآلدهید به آنزیم ۴۷
۲-۸-۲. اتصال (محلول گلوتارآلدهید–آنزیم) به کیتوزان ۴۷
۲-۸-۳. اتصال محلول گلوتارآلدهید–آنزیم -کیتوزان به طلا ۴۸
۲-۹. بررسی اثر فلورسانس کومارین۱ در مجاورت با نانوبیوکونژوگه ۴۹
۲-۹-۱. یافتن بهترین طول موج تهییج و نشر کومارین۱ با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر ۴۹
۲-۹-۲. بررسی اثر فلورسانس کومارین۱ در مجاورت با نانوبیوکونژوگه ۴۹
۲-۱۰. ارزیابی ویژگی های فیزیکو شیمیایی آنزیم آزاد و نانو بیوکونژوگه ۵۰
۲-۱۰-۱. تعیین pH بهینه برای آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکنژوگه ۵۰
۲-۱۰-۲. تعیین دمای بهینه برای آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکنژوگه ۵۰
۲-۱۰-۳. بررسی کینتیک آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکنژوگه (Km, Vmax)و نانوبیوکنژوگه ۵۱
۲-۱۰-۴. ارزیابی تاثیر یون روی آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکنژوگه ۵۱
۲-۱۰-۵. ارزیابی پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه ۵۲
فصل سوم: نتایج و یافته ها..... ۵۳
۳-۱. جداسازی باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۵۴
۳-۲. مراحل تخلیص آنزیم ۵۶
۳-۲-۱. تکثیر باکتریهای تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره ۵۶

۳-۲-۲. از بین بردن دیواره سلولی باکتری ۵۶
۳-۲-۳. استفاده از تریتون X100 برای افزایش حلالیت غشا ۵۶
۳-۲-۴. رسوب دهی با سولفات آمونیم اشباع ۵۷
۳-۲-۵. کروماتوگرافی تعویض یونی ۵۷
۳-۳. نتایج کمی حاصله از تخلیص آنزیم ۵۹
۳-۴. رسم منحنی استاندارد ۵۹
۳-۵. نتایج مربوط به سنتز نانوذرات طلا ۶۰
۳-۵-۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات طلا سنتز شده ۶۰
۳-۶. تثبیت آنزیم ۶۱
۳-۶-۱. مطالعات مربوط به اتصال گلوتارآلدهید به آنزیم ۶۱
۳-۶-۲. مطالعات مربوط به اتصال کیتوزان به آنزیم حاوی گلوتارآلدهید ۶۳
۳-۶-۳. مطالعات مربوط به اتصال آنزیم – گلوتار آلدهید – کیتوزان به نانو پارتیکل طلا..... ۶۴
۳-۷. بررسی اثر فلورسانس کومارین۱ در مجاورت با نانوبیوکونژوگه ۶۵
۳-۷-۱. تعیین بهترین طول موج تهییج و نشر کومارین۱ ..... ۶۵
۳-۷-۲. بررسی اثر فلورسانس کومارین۱ در مجاورت با نانوبیوکونژوگه ۶۶
۳-۸. بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی آنزیم آزاد و نانوبیوکونژوگه ۶۶
۳-۸-۱. تعیین pH بهینه آنزیم آزاد و نانوبیوکونژوگه ۶۶
۳-۸-۲. تعیین دمای بهینه در فعالیت آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه..... ۶۷
۳-۸-۳. نتایج مربوط به پارامترهای کینتیکی(Km,Vmax) ۶۸
۳-۸-۴. بررسی اثر یون های گوناگون روی فعالیت آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه ۶۹
۳-۸-۵. ارزیابی پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه ۷۰
۴- فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات..... ۷۱
۴-۱. جداسازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره..... ۷۴
۴-۲. تخلیص آنزیم OPH از باکتری جدا شده..... ۷۶
۴-۲-۱. سونیکیت باکتری..... ۷۶
۴-۲-۲. اضافه کردن Triton X100..... ۷۶
۴-۲-۳. رسوب دهی با نمک سولفات آمونیوم ۷۶
۴-۲-۴. کروماتوگرافی تعویض یون ۷۷
۴-۳. بررسی نتایج کمی حاصل از تخلیص آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز و بررسی فرایند تخلیص آنزیم با استفاده از الکتروفورز SDS- PAGE ۷۷
۴-۴. سنتز نانوذرات طلا ۷۷

۴-۴-۱. تکنولوژی رزونانس پلاسمون سطحی ۷۹
۴-۵. فرایند تثبیت ۸۰
۴-۵-۱. اتصال لینکر گلوتارآلدهید به آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز ۸۰
۴-۵-۲. اتصال آنزیم حاوی گلوتارآلدهید به بستر کتیوزان ۸۱
۴-۵-۳. اتصال محلول کیتوزان – آنزیم به محلول نانوذرات طلا ۸۳
۴-۶. بررسی اثر فلورسانس کومارین۱ در مجاورت با محلول کلوئیدی نانوذرات طلا ۸۳
۴-۶-۱. بررسی اثر فلورسانس کومارین۱ در مجاورت با محلول کلوئیدی نانوذرات طلا ۸۴
۴-۶-۲. بررسی اثر فلورسانس کومارین۱ در مجاورت با نانوبیوکونژوگه ۸۵
۴-۷. اثرات فیزیکو شیمیایی در آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه ۸۶
۴-۷-۱. مطالعه اثرpH های اسیدی و قلیایی بر فعالیت آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه ۸۶
۴-۷-۲. تاثیر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز آزاد و نانوبیوکونژوگه ۸۷
۴-۷-۳. ارزیابی تاثیر یون روی فعالیت آنزیم آزاد و نانوبیوکونژوگه ۸۸
۴-۷-۴. ارزیابی پارامترهای کینیتیکی آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز(Km , Vmax) ۸۹
۴-۷-۵. بررسی پایداری ذخیره ای آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه ۹۰
۴-۸. نتیجه گیری ۹۰
۴-۹. پیشنهاد ها ۹۱
فهرست منابع ۹۲
ضمائم ۱۰۴
چکیده انگلیسی ۱۰۸

فهرست جداول

جدول ۱-۱. طبقه بندی WHO با توجه به خطرات آفت کش ها ۵

جدول ۱-۲. آنزیم های میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات ارگانوفسفره ۱۱

جدول ۲-۱ . مواد لازم برای تهیه محیط کشت نمکی براث حاوی سم ۳۰

جدول ۲-۲. مواد لازم برای تهیه محیط کشت نمکی آگار حاوی سم ۳۱

جدول ۲-۳. مواد لازم برای تهیه محیط کشت لوریا برتانی ۳۲

جدول ۲-٤. مواد لازم برای تهیه محیط کشت لوریا برتانیXYT۲ ..... ۳۳

جدول ۲-۵. مواد لازم برای ساخت استوک ٤۰ میلی مولار پاروکسون ٤۰

جدول ۲-٦ .مواد لازم برای تهیه ژل بالا در الکتروفورز ٤۳

جدول ۲-۷. مواد لازم برای تهیه ژل پایین در الکتروفورز ٤۳

جدول ۳-۱ . فعالیت آنزیمی در غلظت های مختلف NaCl ۵۷

جدول ۳-۲. داده های کمی حاصله از تخلیص آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز ۵۸

جدول ۳-۳. نتایج حاصله از رسم منحنی استاندارد با استفاده از روش برادفورد ۵۹

جدول ۳-٤. مقادیر Km و Vmax ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکونژوگه ٦۸

فهرست اشکال

شکل ۱-۱. ترکیبات ارگانوفسفره ۲

شکل ۱-۲. برخی ترکیبات ارگانوفسفره ٦

شکل ۱-۳. ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره ۸

شکل ۱-٤. نمای انتقال پیام عصبی توسط آنزیم استیل کولین استراز در پایانه های عصبی ۹

شکل ۱-۵. مهار مسیر هیدرولیز Ach ۹

شکل ۱-٦. ساختار کریستالی آنزیم OPH ۱۳

شکل ۱-۷. مکانیسم تجزیه ترکیبات OP توسط OPH. ۱٤

شکل ۱-۸. داستیلاسیون کیتین ۱٦

شکل ۱-۹. نمای کلی زیست حسگر ۲۰

شکل ۱-۱۰. اثر کومارین بر انزیم تثبیت شده ۲۷

شکل ۳-۱. نمونه های خاک کشت داده شده در محیط کشت نمکی مایع حاوی سم دیازینون ٥٤

شکل ۳-۲. نتایج محیط کشت غربالی و محیط نوتریت آگار ٥٥

شکل ۳-۳. محیط کشت نمکی آگار حاوی سم ٥٥

شکل ۳-٤. نمایی از دستگاه کروماتوگرافی تعویض یونیDEAE-Sepharose CL-6B ٥۷

شکل ۳-۵ ..... ٥۸

شکل ۳-٦ . منحنی استاندارد غلظتهای مختلف پروتئین BSA ٥۹

شکل ۳-۷. تصویر نانوذرات طلا توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره و با بزرگنمایی ۱٤۰۰۰۰ ۳ ..... ٦۰

شکل ۳-۸. طیف جذبی مربوط به نانوذرات طلا ٦۱

شکل ۳-۹. طیف FTIR گرفته شده از آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز تخلیص شده ٦۱

شکل ۳-۱۰. طیف FTIR گرفته شده از آنزیم OPH-گلوتارآلدهید. ٦۲

شکل ۳-۱۱. طیف FTIR گرفته شده از آنزیم OPH–گلوتارآلدهید- کیتوزان ٦٣
شکل ۳-۱۲. طیف FTIR گرفته شده از کیتوزان ٦٣
شکل ۳-۱۳. طیف FTIR گرفته شده از نانوذرات طلای سنتز شده ٦٤
شکل ۳-۱٤. طیف FTIR کیتوزان–طلا ٦٤
شکل ۳-۱۵. طیف FTIR گرفته شده از آنزیم OPH–گلوتارآلدهید- کیتوزان - طلا ٦٥
شکل ۳-۱٦. تعیین طول موج تهییج و نشر کومارین۱. با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر ٦٥
شکل ۳-۱۷. نتایج حاصل از حسگرزیستی فلوریمتریک ابداع شده. ٦٦
شکل ۳-۱۸. تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه..... ٦٧
شکل ۳-۱۹. : تعیین دمای بهینه در فعالیت آنزیم OPH آزاد و نانوبیوکونژوگه ٦٨
شکل ۳-۲۰ معادله لینویر–برک جهت محاسبه Vmax و Km آنزیم آزاد و تثبیت شده. ٦٩
شکل ۳-۲۱. اثر یون های مختلف بر روی فعالیت آنزیم آزاد ٦٩
شکل ۳-۲۲. اثر یون های مختلف بر روی فعالیت نانوبیوکونژوگه ۷۰
شکل ۳-۲۳. نمودار پایداری ذخیره ای آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز آزاد و نانوبیوکنژوگه..... ۷۰
شکل ٤-۱ ..... ۷۳
شکل ٤-۲. پیوند شیف باز ۸۲
شکل ٤-۳ . . مکانیسم عمل $NaBH_4$ ۸۲
شکل ٤-٤. بررسی شباهت ساختاری کومارین۱ و کومافوس به عنوان یک ترکیب ارگانوفسفره ۸۵

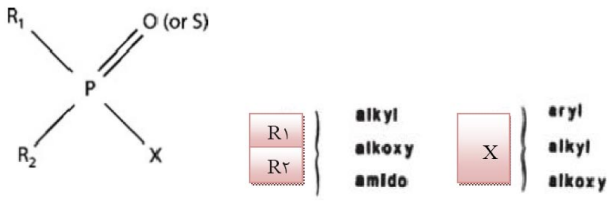
فصل اول:

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. ترکیبات ارگانوفسفره

ترکیبات ارگانوفسفره (OP)[1]، گروه بزرگی از ترکیبات هستند شامل فسفاته ها با ظرفیت های معمول که گروه های OH– یا O= آنها با ترکیبات متفاوت جاگزین می شود.

این جایگزینی ممکن است گروه آلکیل، آلکوکسیل، آریلوکسی، آمید، مرکاپتان، هالید، سیانید، تیوسیانید، فنوکسی، تیوفنوکسی، تیوکولین وبسیاری از گروه های شیمیایی دیگر باشد. بسیاری از این ترکیبات بازدارنده مناسبی برای کولین استراز می باشند.[۱].



شکل ۱-۱. ترکیبات ارگانوفسفره

استفاده گسترده از آفت کش‌ها در کشاورزی خطرات منحصر به فردی برای سلامت انسان و محیط دارند و شواهد اپیدمیولوژیکی، تماس شغلی با آفت کش‌ها را با افزایش بروز بعضی از انواع سرطان مرتبط می‌دانند[۲]. همچنین طی تحقیقاتی به اثبات رسیده است که از ترکیبات ارگانوفسفره ای که جهت کنترل آفات روی بدن حیوانات استفاده می شد به دلیل اینکه تعدادی از آنها قابل حل در چربی می باشند از پوست آنها عبور کردند و نهایتاً وارد شیر و گوشت آنها شده اند[۳]. در تحقیقات دیگر نیز آلودگی مواد غذایی مثل حبوبات ، غلات و سبزیجات و حتی میوه ها با ترکیبات ارگانوفسفره به اثبات رسیده است[۲].

ترکیبات ارگانوفسفره به طور خیلی وسیعی در کشاورزی استفاده می‌شوند به طوریکه ۸۰ ٪ کل حشره کش‌ها در بازار های جهانی را به خود اختصاص داده است . امروزه بیش از ۲۰۰ حشره کش از استرهای ارگانوفسفره و حدود ۲۵ حشره کش از استرهای کاربامات در بازارهای فروش موجود است. ترکیبات ارگانوفسفره تقریبا ۳۸٪ کل حشره کش های جهان را تشکیل می دهند. بنا به گزارشات EPA[2] در سال۲۰۰٤ ، سالانه در USA بیش از ٤۰ میلیون کیلو از ارگانوفسفاتها مورد استفاده قرار می گیرند. طبق

[1] Organophosphorus (OP) compounds
[2] Environmental Protection Agency

این گزارشات گلیفوسات[1] و کلرپیریفوس[2] پر استفاده ترین ترکیبات ارگانوفسفره مورد استفاده در US می باشند که به ترتیب ۲۰٪ و ۱۱٪ کل آفت کش مورد استفاده در این کشور را تشکیل می دهد.

ترکیبات ارگانوفسفره به دلیل اینکه مهار کننده قوی آنزیم استیل کولین استراز اند به عنوان سموم عصبی شناخته می شوند. مکانیسم سمیت آنها براساس آگاهی از مکانیسم عمل فیزوستیگمن می باشد که خیلی سریع کشف شد. این آلکالوئید در سال ۱۸٦٤ از باقلای کالابار[3]، دانه‌های فیزوستیگما ونوزیوم[4]، که یک گیاه جاودان در آفریقای غربی استوایی است، جداسازی شد؛ در سال ۱۹۲٦ مکانیسم عمل مشخصه آن یعنی فعالیت ممانعت کنندگی کولین استرازی[5] اش کشف شد.

سیستم عصبی مرکزی حشرات بسیار پیچیده است که شباهت های قابل توجهی با سیستم عصبی مرکزی پستانداران دارا می باشد، درحالیکه سیستم عصبی محیطی پیچیدگی کمتری نسبت به سیستم عصبی محیطی پستانداران دارد؛ و بنابراین حشره کش‌ها خیلی اختصاصی گونه[6] با توجه به تارگت های سمیت شان[7] عمل نمی کنند، و در این بین پستانداران ، شامل انسان نیز نسبت به اثرات سمیت آنها بسیار حساس می باشند. زمانی بحث اختصاصیت مطرح می شود که یا اختلاف در مسیر سمیت زدایی بین حشرات و پستانداران وجود دارد و یا فعل و انفعالات مختلفی در تارگت سمیت شان با همدیگر دارند.

دربین کلاس های گوناگون حشره کش‌ها ، ترکیبات ارگانوفسفره بطور چشمگیری هر ساله در انسان ها باعث مسمومیت و مرگ می شود .

راه های تماس ترکیبات ارگانوفسفره در انسان مختلف است که شامل جذب پوستی و تنفسی و خوراکی می شود .

ترکیبات ارگانوفسفره (OP)[8]، استر، آمید یا مشتقات تیولی فسفریک اسید هستند که در برگیرنده یک خانواده بزرگی (بیش از ۵۰۰۰۰ ترکیب) از حشره کش‌ها[9] و عوامل جنگی شیمیایی (CWA)[10]

[1] Glyphosate
[2] Chlorpyrifos
[3] Calabar beans
[4] Physostigma venenosum
[5] cholinesterase inhibitor
[6] species-selective
[7] toxicity.
[8] Organophosphorus (OP) compounds
[9] Insecticide
[10] Chemical warfare agents (CWA)

وترکیبات نرم کننده پلاستیک[1] و مـواد تشـکیل دهنـده سـوختگیری هـوایی مـی‌باشـند. حشـره کـش‌هـای ارگانوفسفره که امروزه مورد استفاده قرار می گیرند حاصل نسل چهارم پیشـرفت در دسـته ای از ترکیبـات بسیار سمی "nerve gases" شامل ترکیبات شیمیایی سومان، سارین وتابون می باشدبا توجـه بـه سـمیت بالای این ترکیبات و پایداری نسبی آنها در محیط زیست، تجزیه آنها به منظور سم زدایی مورد توجـه قـرار گرفته است و مطالعات وسیعی جهت کاهش و حتی حذف آنها به خصوص در مقادیر کـم صـورت گرفتـه است. نیمه عمر ترکیبات ارگانوفسفره به وجود فاکتورهای محیطی گونـاگون نسـبت داده مـی شـود کـه از مهمترین این فاکتورها می توان به pH خاک، دما، محتوای رطوبت، محتـوای کـربن آلـی و فورمولاسـیون آفت کش بکار رفته اشاره نمود. برای مثال نیمه عمر کلرپیریفوس در محـیط زیسـت بـین ۱۰ تـا ۱۲۰ روز گزارش شده است .

با توجه به نیمه عمر و پایداری ترکیبات ارگانو فسفره در محیط زیست، طبیعت خطرناک آنها و آسیب های ناشی از ماندگاری این ترکیبات، دستیابی به روش های مختلف جهت تجزیه آنها قابل تامل و ارزیابی می باشد. عوامل طبیعی نظیر عمل باد، نور خورشید، رطوبت هوا و بارش باران در سم زدایی و سالم سازی محیط زیست تاثیر بسزایی دارند اما با وجود این عوامل، تحقیقات برای استفاده از عوامل فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی به منظور پاکسازی ترکیبات OP موجود در خاک مورد توجه قرار گرفته است.

به طور کلی علاوه بر تأثیر عوامل طبیعی نظیر عمل باد، نور خورشید، رطوبت هوا و بارش باران، جهت سالم سازی و سم زدائی محیط زیست، می توان از سه روش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی استفاده کرد. استفاده از روش های فیزیکی و شیمیایی علاوه بر اینکه مستلزم هزینه گزاف است، می تواند آلودگیهای ثانویه را بوجود آورد و موجب از بین رفتن بسیاری از فعالیت های زیستی شود. در روش بیولوژیکی با استفاد از فعالیت های زیستی طبیعی موجود دراکوسیستم به حذف مواد سمی و یا کاهش سمیت آنها مبادرت می کنند. از جمله آنها فعالیت متابولیکی بعضی از میکروارگانیسم هاست. موجودات ذره بینی با داشتن آنزیم های خاص نظیر هیدرولازها، فسفاتازها و سیستم های اکسیداز، باعث تجزیه بعضی از سموم می گردند که نهایتاً باعث خنثی شدن یا کاهش سمیت آنها می شود.

ابعاد منفی موجود در روش های فیزیکوشیمیایی در روش های بیولوژیکی وجود ندارد بعلاوه از آنجـا که میکروارگانیسم ها فلور طبیعی خاک و آب و هوا می باشند و هزینه چندانی ندارند و چون قدرت تکثیر

[1] Plasticizers

و سازگاری میکروارگانیسم ها در شرایط مختلف اقلیمی نیز نسبتاً چشمگیر است، روش های بیولوژیکی از بازدهی مطلوبی برخوردار هستند

سمیت ترکیبات ارگانوفسفره با LD50 بیان می شود. LD مقداری از سوبسترا می باشد که منجر به مرگ ۵۰٪ از نمونه های مورد تست بعد از یک دوره ویژه از در معرض قرار گرفتن می شود که بطور کلی بر حسب mg/kg بیان می شود.

جدول ۱-۱. طبقه بندی WHO با توجه به خطرات آفت کش ها

		LD_{50} IN RAT (mg/kg body weight)			
		ORAL		DERMAL	
CLASS		SOLIDS	LIQUIDS	SOLIDS	LIQUIDS
Ia	Extremely hazardous	5 or less	20 or less	10 or less	40 or less
Ib	Highly hazardous	5–50	20–200	10–100	40–400
II	Moderately hazardous	50–500	200–2000	100–1000	400–4000
III	Slightly hazardous	Over 500	Over 2000	Over 1000	Over 4000
IV+	Unlikely to present hazard in normal use	Over 2000	Over 3000	Over 4000	Over 6000

از مهمترین ترکیبات ارگانوفسفره می توان به پاراتیون، متیل پاراتیون، پاروکسون، دیازینون، متامیدوفوس، ایزوکربوفوس، کلرپیریفوس، سومان، سارین و تابون و . . . اشاره کرد[۷و۸].