دانشگاه سمنان

پردیس علوم و فناوری‌های نوین

دانشکده زیست‌فناوری

گروه زیست فناوری میکروبی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد

رشته‌ی: بیوتکنولوژی

گرایش: میکروبی

عنوان پایان نامه:

کلون و بیان ترشحی آنزیم DFPase در باسیلوس سوبتیلیس

نگارش

صفرعلی احمدی زادفیروزجائی

تحت راهنمایی:

خانم دکتر شمس الضحی ابوالمعالی، آقای دکتر علی محمد لطیفی

مهر ۱۳۹۳

دانشگاه سمنان

پردیس علوم و فناوری‌های نوین

دانشکده زیست فناوری

گروه زیست فناوری میکروبی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان

کلون و بیان ترشحی آنزیم DFPase در باسیلوس سوبتیلیس

دانشجو

صفرعلی احمدی زادفیروزجائی

پردیس علوم و فناوری های نوین

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

پایان‌نامه آقای **صفرعلی احمدی‌زاد** به شماره دانشجویی **۹۰۲۱۹۳۲۰۰۱** برای اخذ درجه کارشناسی‌ارشد **زیست‌فناوری - میکروبی**

تحت عنوان : **کلون کردن و بیان ترشحی آنزیم دی‌ایزوپروپیل فلوروفسفاتاز**

در جلسه مورخ **۹۳/۷/۱۶** بررسی شد و با نمره

عدد	۱۹/۵
حروف	نوزده و پنج

مورد تایید قرار گرفت.

اعضای هیئت داوران :

- استاد راهنمای اول : **دکتر شمس‌الضحی ابوالمعالی** امضاء
- استاد راهنمای دوم : **دکتر محمدعلی تقیفر** امضاء
- استاد داور : **دکتر حمید استاجی** امضاء
- استاد داور : **دکتر شکیبا درویش‌علیپور**

مدیر تحصیلات تکمیلی پردیس علوم و فناوری های نوین

مهر و امضاء

در جلسه مورخ ۹۳/۷/۱۶ توسط کمیته‌ی تخصصی زیر مورد بررسی و با درجه ..عالی..... و نمره ۱۹/۵ به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد/استادان راهنمای پایان نامه: دکتر ابوالمعالی ..... امضا .....

آقای دکتر علی محمد لطیفی .....

۲- استاد/استادان مشاور پایان نامه: دکتر ..... امضا .....

۳- استاد داور داخل گروه: دکتر ..... امضا.....

۴- استاد داور خارج از گروه: دکتر ..... امضا .....

امضای کارشناس گروه

تقدیم به

یگانه منجی عالم بشریت، قطب عالم امکان، حضرت صاحب الزمان (عج) و جد طاهرینش، به امام و شهدا و عموی شهیدم که درست زندگی کردن

را به ما یاد دادند.

امیدوارم یار و مددکارمان در طول زندگیمان باشند.

تقدیم به

پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم

به مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر

تقدیر

با سپاس و شکرگذاری بی نهایت به درگاه خداوند منان که توفیق انجام این پایان نامه را به بنده عنایت فرمود. بر خود لازم می دانم که از زحمات اساتید عزیز و گرانقدر، سرکار خانم دکتر ابوالمعالی و جناب آقای دکتر لطیفی که با راهنمایی های ارزنده ی خویش مرا در طی این مسیر یاری نمودند، کمال تشکر داشته باشم. از خداوند متعال، مزید توفیقات را برای ایشان خواهانم.

از خانواده ام که علاوه بر این پایان نامه، همیشه یار و مددکار این حقیر در طول زندگی ام هستند و همچنین از زحمات سرکار خانم خودی که در انجام این پروژه از ذخایر علمی و تجربه ارزشمند ایشان استفاده نمودم، کمال تشکر و سپاس دارم، و از خداوند توفیقات روزافزون را برای ایشان خواستارم.

چکیده

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره برای کنترل آفت‌های کشاورزی استفاده می‌شوند و ۳۸٪ کل آفت کش های موجود در جهان را شامل می شوند. این ترکیبات استیل کولین استراز را مهار می کنند که منجر به تجمع استیل کولین و در نهایت نقص در اندام و حتی مرگ می گردند. یکی از آنزیم‌هایی که دارای ویژگی سوبسترایی وسیع برای تجزیه ارگانوفسفات‌هاست آنزیم دی ایزوپروپیل فلوروفسفاتاز([1]DFPase) می‌باشد که در مغز ماهی مرکب(Loligo vulgaris) یافت شده است. تیمار ترکیبات ارگانوفسفره با استفاده از سوش‌های مهندسی شده حاوی آنزیم DFPase روش مناسبی برای حذف این ترکیبات می‌باشد. در این مطالعه به منظور تسریع تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره بیان ترشحی آنزیم DFPaase برای اولین بار در میزبان B. subtilis WB600 بررسی شد. این مدل از بیان آنزیم باعث میگردد محل آلوده مورد نظر سریعتر و با ایمنی بالاتر رفع آلودگی شود. ژن *dfpase* به کمک PCR از وکتور pET28-inaV/N-*dfpase* تکثیر یافت. محصول PCR بدست آمده در وکتور pWB980 کلون گردید. سوش باکتریایی B. subtilis WB600 مستعد با وکتور نوترکیب ترانسفرم شدند. بررسی بیان ترشحی پروتئین در محیط بسیار غنی[2] به کمک تکنیک SDS PAGE باند پروتئینی حدود ۳۵ کیلودالتون را پس از ۷۲ ساعت گرمادهی در دمای ۳۵ درجه و دور ۱۵۰ rpm نشان داد. مطالعه فعالیت به روش مانیتورینگ فلوراید آزاد شده از تجزیه DFP، ۳۳۳۳ U/l فعالیت را نشان داد. نتایج به دست آمده نشان می دهد سوش نوترکیب به منظور تولید تجاری این آنزیم، بسیار کارآمد باشد.

کلمات کلیدی: "ترکیبات ارگانوفسفره"،" B. subtillis WB600"، "بیان ترشحی"، "دی ایزوپروپیل فلوروفسفاتاز (DFPase) "

[1] Di isopropylplorophosphatase
[2] . super rich

فهرست مطالب ..... ک
فهرست جدول‌ها ..... Error! Bookmark not defined.
فهرست شکل‌ها ..... س

"پیشگفتار" ۲
۱-۱ ساختار ترکیبات ارگانوفسفره ۲
۱-۲ طبقه بندی ترکیبات ارگانوفسفره ۳
۱-۳ تأثیر ترکیبات ارگانوفسفاتی برروی انسانها ۵
۱-۳-۱ اختلال درسیستم عصبی ۵
۱-۳-۲ اختلال در قدرت تولید مثلی ۷
۱-۳-۳ تاثیر بر ماکرومولکولهای زیستی ۸
۱-۳-۴ تأثیر ترکیبات ارگانوفسفاتی بر محیط زیست ۹
۱-۴ دلایل استفاده از ترکیبات ارگانوفسفره ۱۰
۱-۵ آفت کش ها ۱۱
۱-۶ تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره ۱۱
۱-۶-۱ تجزیه غیر زیستی ۱۱
۱-۶-۱-۱ سوزاندن ۱۱
۱-۶-۱-۲ دفن ۱۱
۱-۶-۱-۳ تجزیه شیمیایی ۱۲
۱-۶-۱-۴ تجزیه نوری ۱۲
۱-۶-۲تجزیه زیستی ترکیبات ارگانوفسفره ۱۳
۱-۶-۳ آنزیم های با قابلیت تجزیه ترکیبات ارگانوفسفره ۱۴
۱-۶-۳-۱ کربوکسیل استرازها(CBES) ۱۴
۱-۶-۳-۲ فسفوتری استرازها(PTES) ۱۵
۱-۶-۳-۲-۱ اگانوفسفروس هیدرولاز(OPH) (EC.3.1.8.1) ۱۶

۱-۶-۳-۲-۲ ارگانوفسفروساسید انهیدریداز (3.1.8.2) (OPAA) ۱۷
۱-۶-۳-۲-۳ دیایزوپروپیلفلوروفسفاتاز(DFPASE) ۱۸
۱-۶-۳-۲-۴ پاراکسوناز(PON1) ۱۸
۱-۷- کاربردهای تجاری آنزیمهای تجزیه کننده ارگانوفسفاتها ۱۹
۱-۷-۱ صنعت بازیافت زیستی مواد ۱۹
۱-۷-۲ کاربردهای درمانی ۲۰
۱-۷-۳ بیوسنسور ۲۰
هدف از تحقیق: ۲۰
۲-۱ مواد ۲۳
۲-۱-۱ محیط های کشت و آنتی بیوتیک ۲۳
۲-۱-۲ پلاسمیدها ۲۳
۲-۱-۳ آنزیمها ۲۴
۲-۱-۴ بافرها و ژلهای مورد استفاده در بررسی محصولات واکنشها ۲۴
۲-۱-۵ باکتریهای مورد استفاده ۲۴
۲-۱-۶ مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی ۲۴
۲-۱-۷ دستگاهها و وسائل مورد نیاز ۲۵
۲-۲ روش کار ۲۵
۲-۲-۱ تهیه محیط کشت LB- BROTH ۲۵
۲-۲-۲ کشت ***E.COLI*** واجد وکتور در محیط LB BROTH ۲۵
۲-۲- ۳ طراحی پرایمر ۲۵
۲-۲- ۴ تخلیص پلاسمید PET28-INAV/N-DFPASE ۲۷
۲-۲-۵ بررسی محصول تخلیص پلاسمید بوسیله ژل الکتروفورز ۲۷
۲-۲-۶ تکثیر ژن *DFPASE* از پلاسمید PET28-INAV/N-*DFPASE* ۲۷
۲-۲-۷ تایید صحت محصولات PCR ۲۸
۲-۲-۸ تخلیص پلاسمید PWB980 ..... ۲۸
۲-۲-۹ برش محصولات PCR و پلاسمید PWB980 ..... ۲۸

۲-۲-۱۰ تخلیص پلاسمید PWB980 برش خورده ۲۹
۲-۲-۱۱ تخلیص محصولات PCR برش خورده ۳۰
۲-۲-۱۱ همسانه سازی ژن *DFPASE* در پلاسمید PWB980 ..... ۳۱
۲-۲-۱۱-۱ تعیین غلظت مواد واکنش دهنده ۳۱
۲-۲-۱۱-۲ اتصال محصولات PCR با پلاسمید ۳۱
۲-۲-۱۲ انتقال وکتور نوترکیب به درون باکتری باسیلوس سوبتیلیس WB600 ..... ۳۱
۲-۲-۱۲-۱ ساخت محیط ترانسفورم ۳۱
۲-۲-۱۲-۲ کشت باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت ترانسفورم ۳۲
۲-۲-۱۲-۳ انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری باسیلوس سوبتیلیس ۳۲
۲-۲-۱۲-۴ کشت باکتری ترانسفورم شده بر روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک ۳۲
۲-۲-۱۲-۵ کشت باکتری بر روی محیط MSM+DFP ۳۳
۲-۲-۱۲-۶ بررسی جهت صحت کلونینگ ۳۳
۲-۲-۱۲-۶-۱ انجام PCR ۳۳
۲-۲-۱۲-۶-۲ برش پلاسمیدهای تخلیص شده ۳۴
۲-۳ کشت باکتری جهت بیان آنزیم DFPASE ۳۵
۲-۴ بررسی بیان آنزیم DFPASE ۳۶
۲-۴-۱ بررسی بیان آنزیم DFPASE با استفاده از SDS-PAGE ۳۶
۲-۴-۲ رنگ آمیزی ژل الکتروفورز با رنگ کوماسی بلو ۳۷
۲-۴-۳ تخلیص پروتئین با استفاده از سولفات آمونیوم ۳۷
۲-۴-۴ تهیه محیط کشت جهت رشد سوش نوترکیب و ارزیابی بیان آنزیم ۳۷
۲-۵ بررسی فعالیت آنزیم DFPASE ترشح شده به محیط کشت ۳۹
۳-۱ تخلیص پلاسمید PWB980-*DFPASE* ۴۱
۳-۲ تکثیر ژن *DFPASE* با فرآیند PCR ۴۱
۳-۳ تخلیص پلاسمید PWB980 ..... ۴۲
۳-۴ الکتروفورز محصول حاصل از برش پلاسمید PWB980 بر روی ژل آگارز ۴۲
۳-۵ همسانه سازی ژن *DFPASE* درون وکتور PWB980 ..... ۴۳

۳-۵-۱ تعیین غلظت محصول PCR و پلاسمید جهت ساخت واکنش لیگاسیون ۴۳
۳-۵-۲ بررسی صحت انتقال سازه نوترکیب پلاسمید به باسیلوس سوبتیلیس ۴۴
۳ – ۶ تعیین دقیق باکتری های واجد پلاسمید نوترکیب ۴۵
۳-۶ -۱ بررسی توانایی سوش نوترکیب در استفاده از ترکیبات ارگانوفسفره ۴۵
۳-۷ تأیید کلونینگ در باسیلوس سوبتیلیس ۴۶
۳-۷-۱ PCR ۴۶
۳-۷-۲ هضم آنزیمی سازه PWB980-*DFPASE* ۴۶
۳-۸ بررسی بیان آنزیم بر روی SDS-PAGE ۴۷
۳-۹ بهینه سازی زمان بیان آنزیم DFPASE ۴۸
۳-۱۰ بررسی فعالیت آنزیم DFPASE در تجزیه DFP ۴۹
۴-۱ بحث ۵۱
۴-۲ نتیجه گیری ۵۳
پیشنهادات ۵۴
منابع و مآخذ ۵۶
۶- پیوست ها ۶۵
پیوست ۶-۱ ۶۵
تهیه بافر TBE ۶۵

عنوان **صفحه**

جدول شماره ۱-۲: مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۲-۲: دستگاه هی مورد نیاز..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول۳-۲: ترکیب واکنش گرهای PCR با استفاده از ACCUPOLDNAPOL جهت همانندسازی قطعه ژنی**.OOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۴-۲: برنامه دستگاه ترموسایکلر..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۵-۲: مواد مورد نیاز جهت برش پلاسمید..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۶-۲: مواد مورد نیاز جهت برش محصولات PCR..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۷-۲: مواد مورد نیاز جهت اتصال محصولات PCR و پلاسمید..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۸-۲: مواد مورد نیاز جهت ساخت محیط ترانسفورم..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۹-۲: مواد مورد نیاز جهت ساخت محیط MSM+DFP..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۱۰- ۲: مواد مورد نیاز جهت انجام PCR..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۱۱- ۲: برنامه دستگاه ترموسایکلر..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۱۲-۲: مواد مورد نیاز جهت برش پلاسمیدهای تخلیص شده..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۱۳-۲: مواد مورد نیاز جهت ساخت محیط کشت بیانی باکتری..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول ۱۴-۲ : محیط کشت حداقل معدنی..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۱۵-۲: مواد مورد نیاز جهت ساخت محلول تیزاب..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

جدول شماره ۱-۳: فعالیت آنزیم DFPASE در تجزیه DFP..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

شکل۱-۱ ساختار کلی ترکیبات ارگانوفسفره:..... ۲

شکل۲-۱ ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره گروه اکسونها..... ۳

شکل۳-۱ ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره گروه تیونها..... ۴

شکل۴-۱: نقش استیل کولین استراز..... ۶

شکل۵-۱ : اثرات حشره کش های ارگانوفسفره بر سیستم عصبی..... ۷

شکل ۶-۱: نمایی از اثرات ارگانوفسفات ها بر روند ایجاد دیابت..... ۹

شکل۷-۱ : زنجیره تاثیرات ترکیبات ارگانوفسفره بر محیط زیست و در نهایت بر روی انسان ۱۰
شکل۸-۱ انواع روش های تجزیه ارگانوفسفره ۱۲
شکل۹-۱ : مکانیسم مهاری کربوکسیل استراز توسط ارگانوفسفات ها ۱۵
شکل۱۰- ۱ برخی واکنشهای کاتالیز شده توسط فسفوتریاسترازهای معروف ۱۶
شکل۱-۱۱: تجزیه آریل فسفات ها توسط OPH ۱۷
شکل ۱-۱۲: چگونگی تجزیه ارگانوفسفات ها توسط OPAA ۱۷
شکل۳ ۱–۱: ساختار کریستالی ترکیبات DFPASE ۱۸
شکل۱۴-۱ : ساختار کریستالی پاراکسوناز ۱۹
شکل ۱–۲ : نقشه پلاسمید PWB980-*DFPASE* ۲۳
شکل۱-۳ الکتروفورز محصولات تخلیص پلاسمید بر روی ژل آگارز ۱ درصد ۴۱
شکل ۲-۳ : محصول PCR از روی پلاسمیدPET28-INAV/N-DFPASE ۴۱
شکل ۳-۳: مربوط به پلاسمید استخراج شده از باسیلوس سوبتیلیس ۴۲
شکل ۴-۳: الکتروفورز برش پلاسمید PWB980 بر روی ژل آگارز ۱ درصد ۴۳
شکل ۵-۳: نمودار مربوط به غلظت محصول PCR ۴۳
شکل ۶- ۳: نمودار مربوط به غلظت پلاسمید PWB980 تخلیص شده ۴۴
شکل۷-۳ : کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس WB600 بعد از انتقال پلاسمید نوترکیب ۴۴
شکل ۸-۳ : پلیت حاوی محیط MSM که تنها منبع کربنی و فسفری آن سم DFP می باشد ۴۵
شکل ۹-۳: الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد ۴۶
شکل ۱۰- ۳: الکتروفورز محصولات برش آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱ درصد ۴۷
شکل ۱۱-۳: الکتروفورز محصولات حاصل از بیان پروتئین بر روی ژل SDS PAGE ۱۲ درصد ۴۷
شکل ۱۲-۳: الکتروفورز نمونه های حاصل از بیان پروتئین در زمان های مختلف ۴۸

فصل
اول
مقدمه

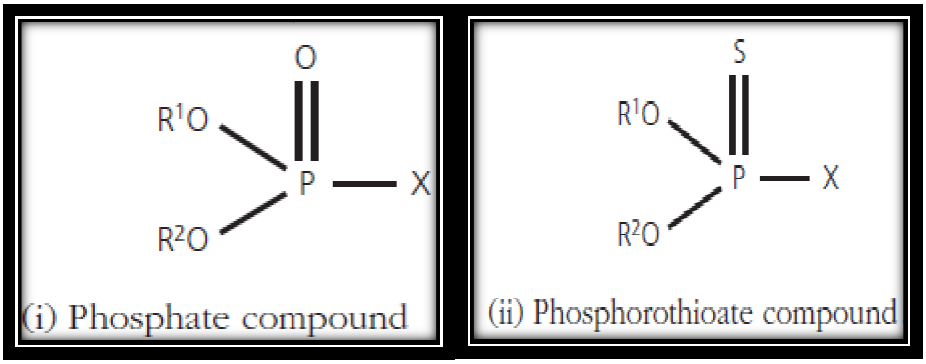
"پیشگفتار"

از اواخر جنگ جهانی دوم ترکیبات ارگانوفسفره به‌طور وسیع به عنوان حشره‌کش، مواد افزودنی در صنعت نفت و پلاستیک در جهان بکار گرفته شدند[۱]. استفاده زیاد و مکرر از این ترکیبات باعث آلودگی اکوسیستم‌های آبی و خاکی در سرتاسر جهان با این ترکیبات شد[۲]. اگرچه این ترکیبات تجزیه پذیرند، اما سمیت بالایی برای پستانداران، و برای دیگر حیوانات و نیز برای بی مهرگان و مهره‌داران دارند[۳]. سالانه تقریبا سه میلیون مسمومیت و سیصدهزار مورد مرگ در جهان در اثر ترکیبات ارگانوفسفره اتفاق می افتد[۴]. مسمومیت با این ترکیبات در اثر حملات تروریستی، نشت این مواد به محیط، موقعیت شغلی مثلا برای کارگران و کشاورزان اتفاق می افتد. سمیت حاد این ترکیبات طیف وسیعی از اختلالات را در سیستم عصبی و عضلانی ایجاد می کند[۵]. اکثر ترکیبات ارگانوفسفره ساختار شیمیایی یکسانی دارند، بنابراین مکانیسم مسمومیت‌زایی مشابهی نیز دارند[۶].

سموم ارگانوفسفره برای اولین بار حدود سال ۱۸۵۰، زمانی که موچنین(Moschenine) تتراتیل پیروفسفات (TEPP) را سنتز کرد، معرفی شدند. بعد از گذشت سال‌ها، لانگ و وان روگر(Lange and Von Krueger) حشره کش های ارگانوفسفاته را معرفی کردند و سنتز اولین ترکیبات ارگانوفسفاتی شامل پیوندهای P-F بود که در DFP وجود داشت به احتمال بسیار زیادگروس(Gross) در سال ۱۹۵۲ اولین کسی است که عملکرد سمی ارگانوفسفاتها را که غیر فعال کردن آنزیم استیل کولین استراز(AChE)می‌باشد را بیان کرد[۷].

۱-۱ ساختار ترکیبات ارگانوفسفره

حشره‌کش‌های ارگانوفسفاتی استرها یا تیولهای مشتق شده از فسفریک، فسفوتیک، فسفونیک و یا فسفورامیدیک-اسید هستند.



شکل۱-۱ ساختار کلی ترکیبات ارگانوفسفره: (i) ترکیبات فسفاته: در این گروه از ترکیبات، فسفر با یک پیوند دوگانه به گروه اکسیژن متصل می باشد (ii) ترکیبات فسفوروتیوآت : در این گروه از ترکیبات فسفر با یک پیوند دوگانه به گوگرد متصل می باشد[۸].

معمولا گروه R1 و R2 گروه آریل یا آلکیل هستند که به اتم فسفر، مستقیما(تشکیل می دهد فسفینات) یا غیر مستقیم به واسطه یک اکسیژن یا اتم سولفور(تشکیل می دهد فسفات یا فسفوروتیوآت) و در موارد دیگر R1 مستقیما به اتم فسفر متصل می شود و R2 به یک اتم اکسیژن یا سولفور اتصال می‌یابد(تشکیل می دهد فسفونات یا تیو فسفونات). در فسفورامیدات یکی از این گروه ها، NH2 گروه آمینوی می‌باشد. گروه X ممکن است

متعلق به یک طیف وسیع از هالوژن، آلیفاتیک، آروماتیک یا گروه هتروسایکلیک باشد. به گروه X متصل شده به اتم فسفر بواسطه یک اکسیژن یا سولفور، گروه ترک کننده گفته می شود. بدلیل اینکه این گروه وقتی که OP در معرض فسفوتری استرازها(PTEs) قرار می گیرد و یا وقتی با پروتئین هدف واکنش می دهد، از اتم فسفر جدا می شود[۹].

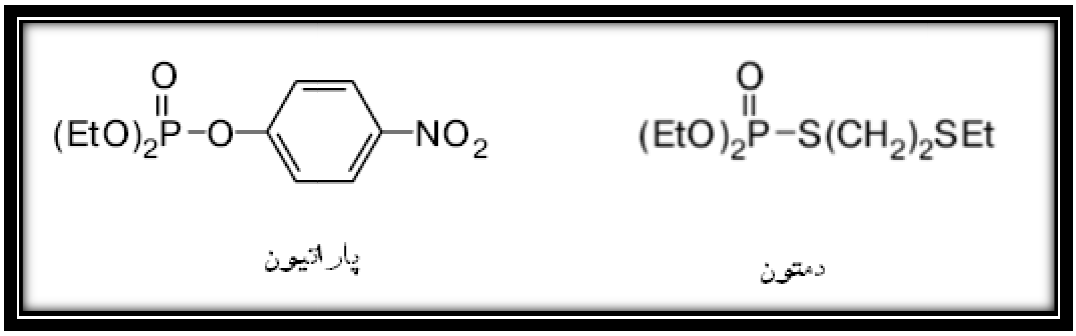
۱-۲ طبقه بندی ترکیبات ارگانوفسفره

ترکیبات ارگانوفسفره از نظر ساختاری به دو دسته اصلی طبقه بندی می‌شوند:

الف. آکسون‌ها[1] : در ساختار ارگانوفسفره های این گروه فسفر با پیوند دوگانه به یک اکسیژن متصل شده است. این دسته شامل فسفوتری استرازها و فسفوروتیولات‌ها می‌باشد.

۱ . فسفوتری استرها[2]: آفت‌کش‌های ارگانوفسفره اولیه تری استری از اسیدفسفریک بودند و در حال حاضر به عنوان نوع استاندارد در نظر گرفته می‌شوند. در تری استرها همه چهار اتم اطراف فسفر، اکسیژن است. این ترکیبات بسیار فعال می‌باشند و کمی قبل از دروی محصولات کشاورزی می‌توانند استفاده گردند مانند پاراکسون.

۲ . فسفوروتیولات‌ها[3]: علاوه بر پیوند دوگانه فسفر و اکسیژن، فسفر با پیوند یگانه به یک سولفور متصل شده است. اعضای این دسته سمی‌تر بوده و معمولا بعنوان حشره‌کش‌های سیستمیک گیاهی یا خاکی به کار می‌روند مانند دمتون.



شکل ۱-۲ ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره گروه اکسون‌ها.

ب. تیون‌ها[4]: در ساختار ارگانوفسفره‌های این گروه فسفر با پیوند دوگانه به یک سولفور متصل شده است. این دسته شامل فسفوروتیونات‌ها و فسفوروتیونوتیولات‌ها می‌باشند.

---

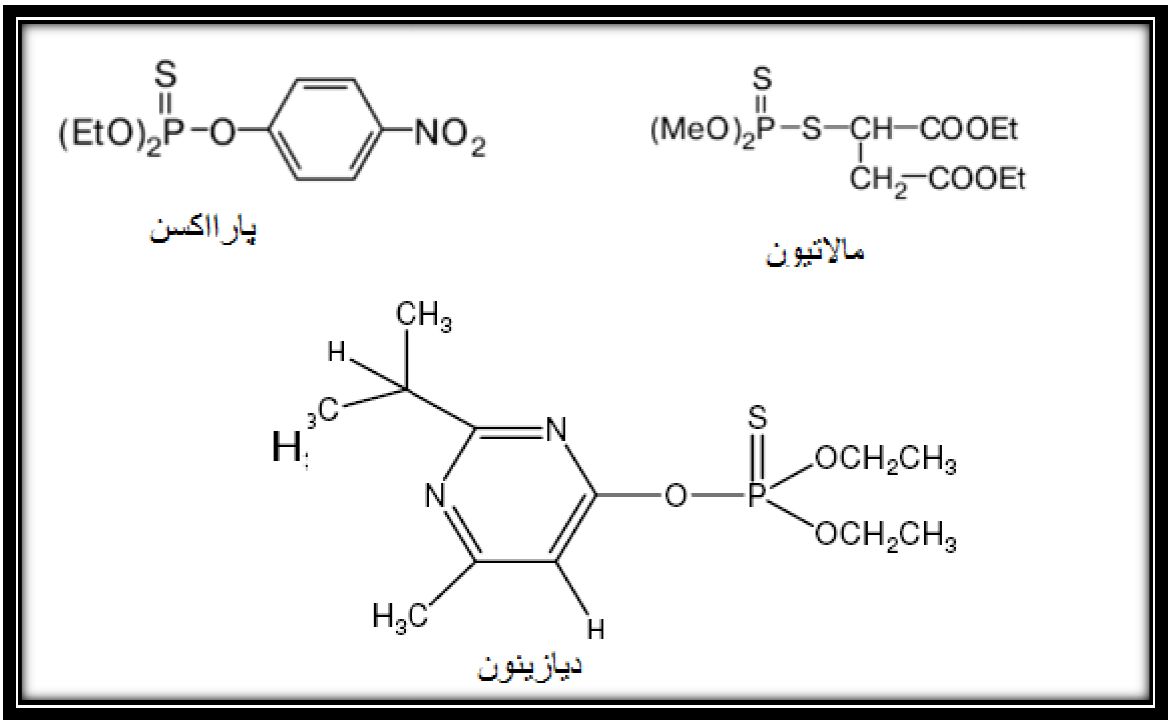
[1]. oxon
[2]. phosphotriesters
[3]. phosphorothiolates
[4]. thiones

۱ . فسفوروتیونات‌ها[1]: در ساختار ارگانوفسفره‌های این زیرگروه، یک پیوند دوگانه فسفر- سولفور و سه پیوند فسفر- اکسیژن دیده می‌شود مانند پاراتیون، دیازینون و کلرپیریفوس.

۲ . فسفوروتیونوتیولات‌ها[2]: در ساختار ارگانوفسفره‌های این زیر گروه یک اتم سولفور با پیوند دوگانه و یک سولفور دیگر به عنوان تیواستر به فسفر مرکزی متصل شده است. فورات، تربوفوس و مالاتیون نمونه‌هایی از این زیرکلاس بسیار سمی می‌باشند.

۳ . آمیدهای ارگانوفسفره: مشتقات آمیدی اسیدفسفریک می‌باشند مانند فسفرآمیدها و فسفرآمیدوتیونات‌ها.

ساختارهای دیگری از ترکیبات ارگانوفسفره نیز وجود دارند که از ترکیبات فوق مشتق می‌شوند مانند فسفونات‌ها(P-C)، فسفروفلوریدات‌ها (P-F) فسفروسیانیدات‌ها(P-CN) که از دیگر مشتقات مهم ترکیبات ارگانوفسفره به شمار می‌آیند[۱۰].



شکل۱-۳ساختار شیمیایی ترکیبات ارگانوفسفره گروه تیون‌ها: پاراکسون، مالاتیون و دیازینون با دارا بودن گوگرد در ساختارشان در این گروه قرار می گیرند. گوگرد موجود در ساختار این ترکیبات از طریق پیوند دوگانه با گروه فسفر اتصال دارد.

[1] . phosphorothionates
[2]. phosphorothionothiolates

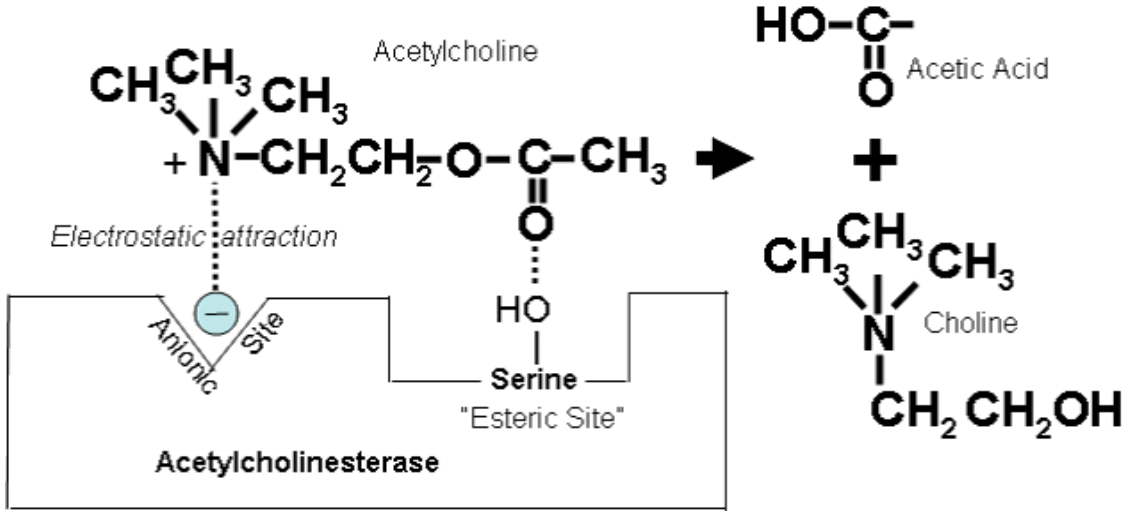
۱-۳ تأثیر ترکیبات ارگانوفسفاتی برروی انسان‌ها

ارگانوفسفات‌ها بطور موثری از طریق دهان، استنشاق وهمچنین از طریق واکنش با گروه رزیدوی تیروزین کراتین‌های موجود در اپیتلیوم پوست می‌توانند وارد بدن انسان شوند و به عنوان یکی از شایع‌ترین عامل مسمومیت‌ها در سطح جهان می‌باشند[۱۱-۱۲]. معرفی یا شناخت واکنش‌های ارگانوفسفاتی برای تشخیص پروتئین‌های هدف، ارزیابی پتانسیل مهاری و طراحی استراتژی‌هایی برای جلوگیری و درمان، مورد نیاز است[۱۳-۱۵] ارگانوفسفاتها بر روی سیستم های متعدد بیولوژیکی بدن انسان مؤثر می باشد. که برخی از آن ها مثل:

۱-۳-۱ اختلال درسیستم عصبی

یکی از سیستم های مهم بیولوژیکی جانوران که ارگانوفسفات‌ها بر روی آن مؤثر می‌باشد سیستم عصبی آن‌ها می باشد که با روش‌های مختلفی باعث اختلال در عملکرد سیستم عصبی می‌شود. در مهم‌ترین و مؤثرترین روشی که باعث اختلال در عملکرد سیستم عصبی می‌شود به مهار کولین‌استراز برمی‌گردد[۱۶]. در مهره داران کولین استرازها به دو گروه عمده تقسیم می شوند: استیل کولین استراز (AChE) و سودوکولین استراز یا بوتیریل کولین استراز(BChE) (بازدارنده ارگانوفسفت های با کاربرد نظامی)، که براساس ویژگی‌های کاتالیتیکی آن ها،ویژگی های سوبسترایی و یا قابلیت مهار توسط مهارکننده‌های خاص تقسیم بندی می‌شوند[۱۷-۲۰].

استیل کولین‌استراز، یک سرین هیدرولازی است که نقش فیزیولوژیکی اصلی‌اش، هیدرولیز نوروترانسمیتر استیل-کولین در سیناپس‌های کولینرژیک می باشد. استیل کولین استراز با این هیدرولیز انتقال پیام عصبی را در سیناپس‌ها خاتمه می‌دهد با تخریب هیدرولیتیک، استیل‌کولین(Ach) به محصولات غیر فعال کولین و اسید استیک تبدیل می‌شود[۲۱].



شکل۱-۴: نقش استیل کولین استراز: استیل کولین استراز در فضای سیناپسی استیل کولین را به کولین و استیک اسید تجزیه می کند[۲۲].

قرار گرفتن در معرض ارگانوفسفات‌ها سبب می‌شود تا این ترکیبات با ایجاد پیوند کووالانسی و فسفریلاسیون گروه هیدروکسیل سرین موجود در جایگاه فعال آنزیم باعث مهار آنزیم استیل‌کولین استراز شود که منجر به تجمع استیل‌کولین در سیناپس‌ها می‌گردد(۱۳).

مسیر کولینرژیک(فعالیت بخش کولینرژیک سیستم عصبی خود مختار آن دسته از اعمالی هستند که با جنبه‌های نباتی زندگی روزمره سروکار دارند) در مغز با انواع مختلفی از رفتارها و عملکردها از جمله گرسنگی، تشنگی، تعرق، تنفس، پرخاشگری و فهم در ارتباط است[۲۳]. همه‌ی این موارد به عملکرد و حضور آنزیم مربوط می‌شود که به وضعیت بیولوژیکی داخل سلول ارتباط دارد. مثل تغییرات غلظت یونی که بر طبق رسپتورهای مختلف فرق می‌کند. مهار استیل کولین استراز در گیرنده‌های موسکارینی(mAChR) (یک نوع گیرنده‌ی استیل‌کولین که به موسکارین واکنش نشان می‌دهد) باعث تغییرات در غلظت یون کلسیم هم در داخل و هم در خارج سلول می-گردد[۲۴-۲۵]. و این تغییر غلظت کلسیم بر سایر شرایط سلولی مثل تغییر غلظت یون‌های دیگر و شرایط اسمولاریته و عملکرد آنزیم‌ها و پروتئین‌های موجود در شبکه اندوپلاسمی و غشا مؤثر می‌باشد(لنینجر و لودیش) تجمع استیل‌کولین منجر به فعالیت بالای mAChR مرکز می‌گردد. تحریک بالای mAChR در تعادل فعالیت گلوتاماترژیک و گاباارژیک اختلال ایجاد می‌کند[۲۶-۲۸]. تجمع استیل کولین نیز سبب آسیب‌های نورولوژیکی می‌شود[۲۹-۳۱]. تشنج ممکن است نتیجه تحریک بالای mAChR مرکزی باشد[۳۲]. و ترشح بیش از حد گلوتامات(یک انتقال دهنده تحریکی عصبی) از نورون های گلوتاماترژیک ، باعث تحریک ترشح بالای کلسیم در سلول پس‌سیناپسی می‌گردد. چنین ترشحی می‌تواند منجر به آسیب‌های سلول‌های عصبی گردد[۳۰]. این‌ها نشان‌دهنده این است که قرار گرفتن در معرض مقدار بالای ارگانوفسفات‌ها می‌تواند اثرات مضر و طولانی مدت بر ساختار مغز و عملکرد آن داشته باشد[۳۳]. آسیب‌های ثانویه‌ای که ارگانوفسفات‌ها بر اعصاب دارند شامل از دست دادن حافظه، ناتوانی در تمرکز، مشکلات گفتاری و مشکلات رفتاری و کاهش حس می‌باشد[۳۴]. از دست دادن حافظه معمولا بعد از ۲-۳ هفته در معرض قرار گرفتن با ترکیبات ارگانوفسفره صورت می‌گیرد و از دیگر علامت-های آن مثل سوزش دست و پا، از دست‌دادن حس، ضعف پیش‌رونده، سستی عضلات و آتاکسیا می‌باشد[۳۵-۳۶]. ارگانوفسفات‌ها سبب تغییر در فعالیت کالمودولین‌کیناز وابسته به Ca^{2+} (CaMK2) می شوند. این آنزیم فسفریلاسیون پروتئین‌های سیتواسکلت، توبولین آلفا و بتا و میکروتوبول مرتبط با پروتئین‌های سه گانه پروتئین ۲ و نوروفیلامنت که درگیر در پاتوژنیسیته ترکیبات ارگانوفسفره می باشد را عهده‌دار است[۳۷-۳۸].