بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای سعید نژاوند رشته بیوشیمی بالینی رساله دکتری خود را با عنوان: « سنجش ترکیبات ارگانوفسفره در نمونه های سرم انسانی از طریق طراحی بیوسنسور ارگانوفسفر هیدرولاز – کوئنچر » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۲/۳ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر عباس صاحبقدم لطفی	
استاد مشاور	دکتر افشین محسنی فر	
استاد ناظر	دکترسیده زهرا بطحایی	
استاد ناظر	دکتر فاطمه رهبری زاده	
استاد ناظر	دکترمحسن فیروز رای	
استاد ناظر	دکتر سامان حسین خانی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سید علیرضا مصباح نمین	

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 می‌باشد 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 می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به صورت 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 دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، 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 یافته‌ها 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 **سعید نژاوند** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی ۸۶-۸۵ مقطع **دکترا** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم 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 ۱۳۹۰/۱۲/۳

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 **رساله دکتری** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر عباس صاحبقدم لطفی** ، مشاوره **دکتر افشین 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 ۴ : 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 ۴ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **سعید نژاوند** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **دکترا** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی سعید نژاوند

تاریخ و امضا ۱۳۹۰/۱۲/۲۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

سنجش ترکیبات ارگانوفسفره در نمونه های سرم انسانی از طریق طراحی بیوسنسور ارگانوفسفر هیدرولاز-کوئنچر

نگارش

سعید نژاوند

استاد راهنما

دکتر عباس صاحبقدم لطفی

استاد مشاور

دکتر افشین محسنی فر

زمستان 1390

تقدیم به :

همسر عزیز

و

پدر و مادر 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 ثنای پروردگارم بر خود واجب می دانم از کلیه عزیزانی که در مراحل مختلف این تحقیق مرا یاری دادند تشکر نمایم. از استاد علم و اخلاق جناب آقای دکتر لطفی که امر نظارت و راهنمایی این رساله را بر عهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر محسنی فر (استاد محترم مشاور)، مسئولین محترم آزمایشگاه سرکار خانم اعتمادی و خانم افشار، اساتید و پرسنل محترم گروه دام و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، مسئولین و پرسنل گروه بیوتکنولوژی انستیتو پاستور خصوصا جناب آقای دکتر مهبودی و سرکار خانم برخورداری، از سرکار خانم دکتر ارجمند، از همکاران و دوستان عزیزم آقای علی مطاع، علیرضا خوشدل، بهزاد ادیبی، وحید رزبان، مجید مهاجر میلانی و تمام همکلاسی های عزیزم، کمال تشکر و قدردانی را دارم و از خداوند منان برای این عزیزان توفیق روزافزان و مدارج بالای علمی را خواستارم.

چکیده

ترکیبات ارگانوفسفره متعلق به دسته‌ای از نوروتوکسین های بسیار سمی هستند که معمولا به عنوان حشره کش، جونده کش و ترکیبات شیمیایی جنگی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مهم‌ترین موارد کاهش خطرات ترکیبات ارگانوفسفره برای انسان و محیط، مانیتورینگ این ترکیبات در آب، خاک و مایعات بیولوژیک می‌باشد. تا کنون بیوسنسورهای مختلفی برای شناسایی ترکیبات ارگانوفسفره ایجاد شده‌اند، که در این میان حسگرهای زیستی بر پایه آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز (OPH) از اهمیت فوق العاده ای برخوردار می‌باشد. آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز قادر به هیدرولیز طیف وسیعی از ترکیبات ارگانوفسفره می باشد. در این مطالعه آنزیم هم به صورت نوترکیب در مخمر *پیکیا پاستوریس* تولید شد و هم از باکتری‌هایی که از خاک‌های تیمار شده با ترکیبات ارگانوفسفره بدست آمده بودند، جداسازی گردید. آنزیم نوترکیب پایداری دمایی و pH بالایی از خود نشان می‌داد و به لحاظ Km (45/96) پایین‌تر از موارد نوترکیب مشابه بود. گونه باکتریایی جدا شده به لحاظ مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و در سطح مولکولی به دنبال تعیین توالی 16S rRNA به عنوان *سودوموناس آئروژینوزا* NL01 شناسایی و تایید شده و در GenBank تحت شماره سریال *JF331665* قرار گرفت. در این تحقیق از تکنیک FRET بر اساس میانکنش بین فلوروفور کومارین1 (آنالوگ ساختاری کومارین و مهارکننده رقابتی آنزیم OPH) و مولکول‌های دابسیل (خاموشگر) برای تشخیص آنزیمی ترکیبات ارگانوفسفره استفاده گردید. خاموشگرها (quenchers) به طور کووالان به آنزیم نوترکیب متصل شدند و قادر به خاموش سازی نشر حاصل از مهارکننده فلورسانسی آنزیم، کومارین1 ، در طول موج مشخص بودند. در غیاب سوبسترای ارگانوفسفره مهارکننده فلورسانسی به آنزیم متصل شده و توسط خاموشگر های متصل به آنزیم خاموش گردید. افزایش شدت فلورسانسی نمونه، زمانیکه سوبسترای پاراکسون اضافه شد، نشان دهنده جابجایی کومارین1 به وسیله سوبسترای پاراکسون بود. با افزایش پاراکسون، شدت فلورسانسی نمونه افزایش یافت. منحنی کالیبراسیون (بر اساس شدت فلورسانس نسبی،RFI) برای پاراکسون نشان داد که حداقل غلظت پاراکسون تشخیص داده شده در حدود 12 میکرومولار می‌باشد که کمتر از Km آنزیم برای این سوبسترا بود. حالت خطی مناسبی در منحنی کالیبراسیون تا غلظت 200 میکرومولار مشاهده گردید. در نمونه‌های سرم Spike شده با غلظت‌های مشخص پاراکسون نیز نتایج مشابهی مشاهده گردید. به طوریکه حدود 80% پاراکسون موجود در سرم توسط کونژوگه آنزیم-دابسیل مورد شناسایی قرار گرفت. علت این امر شاید اتصال سم ارگانوفسفره به برخی پروتئین‌های خونی نظیر آلبومین و خارج شدن از دسترس آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز موجود در بیوکونژوگه باشد.

واژگان کلیدی: ترکیبات ارگانوفسفره، ارگانوفسفرهیدرولاز، *پیکیا پاستوریس*، FRET

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

1-1 سموم ارگانوفسفره.....1

1-1-1 ساختار سموم ارگانوفسفره.....3

1-1-2 مکانیسم سمیت زایی و متابولیسم ارگانوفسفره ها در بدن.....5

1-1-3 سم زدایی ترکیبات ارگانوفسفره.....8

1-2 آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز (OPH).....11

1-2-1 ساختار و مکانیسم عمل آنزیم OPH ... .12

1-2-2 تولید آنزیم توسط باکتری‌های خاک زی.....16

1-2-3 تولید فرم نوترکیب آنزیم.....16

1-2-4 تولید فرم نوترکیب آنزیم در مخمر پیکیا *پاستوریس*.....17

1-2-4-1 تاریخچه مخمر پیکیا *پاستوریس*.....17

1-2-4-2 سوش ها و پلازمیدهای بیانی مخمر پیکیا *پاستوریس*.....18

1-2-4-3 ترانسفورماسیون و اینتگریت شدن به درون ژنوم.....21

1-2-4-4 انتخاب شرایط مناسب برای بیان.....24

1-2-4-5 برچسب پلی-هیستیدین برای تخلیص پروتئین.....24

1-3 تشخیص سموم ارگانوفسفره و مسمومیت ناشی از آن‌ها.....25

1-3-1 تشخیص بیوشیمیایی مسمومیت.....25

1-3-2 شناسایی ترکیبات ارگانوفسفره.....26

1-3-3 مکانیسم‌های تشخیص ترکیبات ارگانوفسفره.....26

1-3-4 حسگرهای زیستی بر پایه آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز.....28

1-3-4-1 انتقال انرژی رزونانس فلورسانسی (FRET).....29

1-4 مروری بر مطالعات پیشین.....31

فصل دوم: مواد و روش‌ها

2-1 کلونینگ (Cloning) 36

2-1-1 مقدمه‌ای بر کلونینگ..... 36

2-1-1-1 طراحی cDNA مربوط به ژن ارگانوفسفرهیدرولاز به منظور بیان در سیستم مخمری *پیکیا پاستوریس*..... 36

2-1-1-2 انتخاب وکتور بیانی..... 37

2-1-1-3 استراتژی کلون..... 38

2-1-1-4 مراحل کلونینگ..... 40

2-1-2 مراحل انجام کلونینگ..... 40

2-1-2-1 تکثیر وکتور pPICZαB و PUC57 حاوی قطعه ژنی از طریق ترانسفورماسیون به گونه‌های Ecoli endA1 ،recA نظیر TOP10 و DH5α..... 40

2-1-2-1-1 تهیه سلول‌های مستعد DH5α (competent cell)..... 41

2-1-2-1-2 ترانسفورماسیون سلول‌های مستعد با پلازمیدهای PUC57 و pPICZαB 42

2-1-2-1-3 استخراج پلازمید..... 43

2-1-2-2 هضم وکتورها با آنزیم‌های XhoI و XbaI واتصال (Ligation) ژن OPH به وکتور pPICZαB..... 45

2-1-2-2-1 مرحله اول هضم با آنزیم XbaI 45

2-1-2-2-2 مرحله شستشو (Clean up) 46

2-1-2-2-3 مرحله دوم هضم با آنزیم XhoI..... 47

2-1-2-2-4 بازیافت و استخراج DNA از ژل (DNA Recovery)..... 48

2-1-2-2-5 فرآیند اتصال (Ligation) 49

2-1-2-3 ترانسفورماسیون محصول اتصال به ´Top10F و انتخاب نمونه‌های ترانسفورم بر روی پلیت LSLB حاوی زئوسین 25 µg/ml و تتراسایکلین 15 µg/ml..... 50

2-1-3-1 تهیه سلول‌های مستعد تازه (Fresh) از سلول‌های Top10 مقاوم به تتراسایکلین

(Top10F´).....50
2-1-2-3-2 ترانسفورماسیون محصولات اتصال و انتخاب نمونه‌های ترانسفورم.....51
2-1-2-4-2 آنالیز 10 تا 20 کلون به وسیله نقشه گذاری آنزیمی, PCR و تعیین توالی برای تایید کلون و اتصال در قالب (in-frame) ژن با سیگنال ترشحی α-فاکتور.....52
2-1-2-4-1 نقشه گذاری آنزیمی (Restriction mapping) با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده مربوط به کلونینگ (XbaI و XhoI) 52
2-1-2-4-2 نقشه گذاری آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده XbaI و EcoRI.....52
2-1-2-4-3 واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای یونیورسال پلازمید pPICZαB.....53
2-1-2-4-4 تعیین توالی (Sequencing) وکتور کلون شده با استفاده از آغازگرهای یونیورسال پلازمید pPICZαB 54
2-2 بیان (Expression) 55
2-2-1 تخلیص و خطی کردن پلازمید نوترکیب به منظور ترانسفورم به مخمر پیکیا *پاستوریس*(*Pichia Pastoris*) سوش X.33 55
2-2-2 ترانسفورماسیون سلول‌های مخمری با پلازمید کلون شده (Transformation) 56
2-2-2-1 تهیه سلول‌های مستعد (Competent cell) از سوش X.33 پیکیا *پاستوریس* 56
2-2-2-2 ترانسفورم سلول‌های مخمری با روش Electroporation 57
2-2-3 انتخاب نمونه‌های ترانسفورم مقاوم به زئوسین و تایید ورود ژن OPH به درون ژنوم مخمر.....59
2-2-3-1 روش دستی (فنول) استخراج DNA ژنومی مخمر: 59
2-2-3-2 PCR از DNA مخمری استخراج شده: 61
2-2-4 بررسی تولید و ترشح OPH فعال به محیط با استفاده از سنجش فعالیت آنزیمی و تکنیک‌های آشکارسازی نظیر SDS-PAGE 62
2-2-4-1 کشت و القای متانولی نمونه‌ها.....62
2-2-4-2 آزمایش بررسی فعالیت آنزیمی (Functional assay) 63
2-2-4-3 الکتروفورز SDS PAGE به منظور آشکارسازی پروتئین نوترکیب.....64

2-2-4-3-1 رسوبدهی نمونه‌های محلول رویی با اسیدتری کلرواستیک (20% TCA) 64
2-2-4-3-2 طرز تهیه ژل 10% پلی اکریل آمید و الکتروفورز SDS PAGE نمونه‌ها 65
2-2-4-3-2-1 رنگ آمیزی کوماسی بلو G-250 67
2-2-4-3-2-2 رنگ آمیزی نیترات نقره..... 67
2-2-4-3-3 آنالیز زایموگرام..... 68
2-2-5 بهینه سازی زمان انکوباسیون برای تولید آنزیم و القای مناسب نمونه‌ها..... 69
2-2-5-1 بهینه سازی زمان انکوباسیون برای تولید آنزیم..... 69
2-2-5-2 بررسی و تعیین درصد مناسب متانول برای القای نمونه‌ها..... 69
2-3 تخلیص و تعیین ویژگی‌های سینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم OPH..... 70
2-3-1 تخلیص آنزیم با استفاده از ستون نیکل..... 70
2-3-1-1 سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد.. 72
2-3-2 تعیین ویژگی‌های سینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم..... 74
2-3-2-1 رسم منحنی میکائیلیس- منتون و منحنی لینویور برک برای تعیین ثابت میکائیلیس (Km) و سرعت حداکثر آنزیم (Vmax) ثابت تفکیک (Ki) مهارکننده کومارین 1..... 74
2-3-2-2 تعیین دما و pH مناسب برای فعالیت آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز:..... 75
2-3-2-3 تعیین پایداری آنزیم در دما و pH های مختلف..... 75
2-3-2-4 بررسی اثر یون های مختلف و ترکیبات شیمیایی بر فعالیت آنزیم..... 76
2-4 جداسازی و تخلیص آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز از باکتری‌های تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره در خاک..... 76
2-4-1 جمع آوری نمونه و غربالگری باکتری‌های تجزیه کننده سموم..... 76
2-4-2 جداسازی باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره 77
2-4-3 تعیین ماهیت بیوشیمیایی و مولکولی گونه باکتریایی ایزوله شده..... 78
2-4-3-1 تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری ایزوله شده..... 78
2-4-3-2 تست‌های مولکولی برای تعیین ماهیت باکتری ایزوله شده..... 79
2-4-4 تخلیص آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز از باکتری ایزوله شده 80

2-4-4-1 تکثیر باکتری‌های تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره.....80
2-4-4-2 استفاده از سونیکاتور و تریتون X_{100} برای لیز باکتری به منظور جداسازی آنزیم.....81
2-4-4-3 استفاده از محلول سولفات آمونیوم برای رسوب گذاری پروتئین‌ها.....82
2-4-4-4 کروماتوگرافی تعویض یونی توسط DEAE-Sepharose CL-6B.....83
2-5 ساخت بیوکونژوگه و تشخیص سوبسترای ارگانوفسفره.....84
2-5-1 ساخت بیوکونژوگه آنزیم- دابسیل (Enzyme-Dabcyl).....84
2-5-1-1 فعال سازی دابسیل (quencher) برای اتصال به آنزیم.....85
2-5-1-2 ارزیابی اتصال 86
2-5-2 اندازه گیری فلورسانسی.....86
2-5-2-1 روش تشخیص و اندازه گیری سوبسترای ارگانوفسفره (پاراکسون).....87
2-5-2-2 رسم منحنی استاندارد (بر اساس شدت فلورسانس نسبی) برای سوبسترای پاراکسون.....87
2-5-2-3 بررسی تاثیر پاراکسون بر فلورسانس سیگنال زمینه.....88
2-5-2-4 بررسی تاثیر سموم غیر ارگانوفسفره بر عملکرد بیوسنسور.....88
2-5-3 تشخیص و اندازه گیری سوبسترای پاراکسون در نمونه‌های سرم انسانی.....88
2-5-3-1 Spike نمونه‌های سرم با غلظت‌های مشخص پاراکسون 88
2-5-3-2 تشخیص و اندازه گیری سوبسترای پاراکسون.....88
2-5-3-3 بررسی تاثیر سرم بر فلورسانس سیگنال زمینه.....89
2-5-3-4 استخراج سم پاراکسون از نمونه‌های سرم انسانی و اندازه گیری آن توسط دستگاه HPLC..... 89
2-5-3-4-1 استخراج سم پاراکسون از نمونه سرم.....89
2-5-3-4-2 اندازه گیری سم پاراکسون توسط دستگاه HPLC 90

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها

3-1 نتایج مربوط به کلون ژن OPH در وکتور بیانی pPICZαB (Cloning).....92
3-1-1 نتایج مربوط به تکثیر و استخراج وکتورهای pPICZαB و PUC57 92
3-1-2 نتایج مربوط به هضم وکتورها با آنزیم‌های XhoI و XbaI 93
3-1-3 نتایج مربوط به Recovery و استخراج قطعه ژنی OPH و وکتور خطی pPICZαB از ژل آگارز.....93
3-1-4 نتایج مربوط به ترانسفورماسیون محصول Ligation به 'TOP10F و انتخاب نمونه‌های ترانسفورم بر روی پلیت Low Salt LB حاوی زئوسین 25 µg/ml.....95
3-1-5 نتایج مربوط به تایید کلونینگ و اتصال در قالب ژن OPH با وکتور بیانی pPICZαB.....95
3-1-5-1 نتایج مربوط به نقشه گذاری آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده مربوط به کلونینگ.....95
3-1-5-2 نتایج مربوط به نقشه گذاری آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر XbaI و EcoRI.....96
3-1-5-3 نتایج مربوط به PCR قطعه ژنی OPH با استفاده از آغازگرهای یونیورسال وکتور pPICZαB.....97
3-1-5-4 نتایج مربوط به تعیین توالی وکتور کلون شده با استفاده از آغازگرهای یونیورسال وکتور pPICZαB.....98
3-2 نتایج مربوط به بیان ژن OPH در مخمر پیکیا *پاستوریس*.....101
3-2-1 نتایج مربوط به تخلیص و خطی کردن پلازمید نوترکیب با آنزیم SacI به منظور ترانسفورم به مخمر پیکیا *پاستوریس*.....101
3-2-2 نتایج مربوط به ترانسفورماسیون (Transformation) سلول‌های پیکیا *پاستوریس* با پلازمید کلون شده و انتخاب نمونه‌های ترانسفورم بر روی پلیت Low Salt LB حاوی زئوسین µg/ml 100.....101
3-2-3 نتایج مربوط به استخراج ژنوم مخمری و تایید ورود ژن OPH به داخل ژنوم 102
3-2-3-1 نتایج مربوط به استخراج ژنوم مخمر به روش دستی (فنول) 102

3-2-2-2 نتایج مربوط به PCR نمونه‌های مخمری.....102
3-2-4 نتایج مربوط به کشت و القا متانولی نمونه‌ها.....103
3-2-4-1 تعیین زمان انکوباسیون لازم برای تولید آنزیم.....103
3-2-4-2 تعیین درصد مناسب متانول برای القاء و تولید آنزیم.....104
3-2-5 الکتروفورزSDS PAGE و آشکارسازی آنزیم نوترکیب تولید شده.....105
3-3 نتایج مربوط به تخلیص و تعیین ویژگی‌های سینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم OPH.....106
3-3-1 تخلیص آنزیم با استفاده از سیستم اولترافیلتر و ستون نیکل (Ni-NTA Agarose).....106
3-3-1-1 رسم منحنی استاندارد برای سنجش میزان پروتئین نمونه در مراحل تخلیص.....106
3-3-1-2 جدول مربوط به تخلیص آنزیم از محلول رویی محیط کشت.....107
3-3-1-3 الکتروفورز نمونه تخلیص شده و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره.....107
3-3-1-4 آنالیز زایموگرام.....108
3-3-2 تعیین ویژگی‌های سینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم OPH.....108
3-3-2-1 رسم منحنی میکائیلیس- منتون و منحنی لینویور بورک برای تعیین ثابت میکائیلیس (Km) و سرعت حداکثر آنزیم (Vmax) و محاسبه ثابت تفکیک مهارکننده.....108
3-3-2-2 تعیین pH مناسب برای فعالیت آنزیم.....110
3-3-2-3 تعیین دمای مناسب برای فعالیت آنزیم.....110
3-3-2-4 اثر یون ها و ترکیبات شیمیایی مختلف بر فعالیت آنزیم.....111
3-4 نتایج مربوط به جداسازی و تعیین سوش باکتری تجزیه کننده سموم ارگانوفسفره 112
3-4-1 نتایج مربوط به تعیین ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری ایزوله شده.....112
3-4-2 نتایج مربوط به تست‌های مولکولی تعیین سوش باکتری.....113
3-4-2-1 نتایج مربوط به تعیین توالی ژن 16S rRNA باکتری ایزوله شده با استفاده از آغازگرهای یونیورسال یوباکتریال 27F و 1492R 113
3-4-2-2 رسم درختچه فیلوژنتیک مربوط به باکتری بر اساس توالی 16S rRNA باکتری ایزوله شده و توالی باکتری‌های هم خانواده بدست آمده از Blast.....115
3-5 نتایج مربوط به تخلیص و تعیین ویژگی‌های سینتیکی و بیوشیمیایی آنزیم.....116

3-5-1 نتایج مربوط به استخراج و تخلیص آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* NL01 116
3-5-2 تعیین وزن مولکولی آنزیم با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE..... 117
3-5-3 تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم تخلیص شده از باکتری..... 117
3-5-4 تاثیر دما ، pH و یون های فلزی بر فعالیت آنزیم..... 118
3-6 ساخت بیوکونژوگه آنزیمی..... 120
3-6-1 ارزیابی اتصال..... 120
3-6-1-1 نتایج مربوط به روش جذب اسپکتروسکوپی برای ارزیابی اتصال مولکول‌های دابسیل به واحدهای لیزین سطحی آنزیم..... 120
3-6-1-2 نتایج مربوط به روش طیف سنجی IR (FTIR) برای ارزیابی اتصال دابسیل به واحدهای آمین..... 121
3-6-1-3 نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت آنزیم پس از اتصال مولکول‌های دابسیل..... 122
3-6-2 تشخیص سوبسترای پاراکسون..... 123
3-6-2-1 فلورسانس کومارین1 به تنهایی ودر حضور غلظت‌های مختلف پاراکسون..... 123
3-6-2-2 پاسخ بیوسنسور به غلظت‌های مختلف پاراکسون..... 124
3-6-2-3. ارزیابی اختصاصیت روش در پاسخ به ترکیبات سمی غیر ارگانوفسفره..... 126
3-6-3 تشخیص سوبسترای پاراکسون در نمونه‌های سرمی..... 127
3-6-3-1 نتایج فلوریمتری مربوط به تشخیص پاراکسون در نمونه‌های سرمی..... 127
3-6-3-2 نتایج HPLC مربوط به غلظت‌های مختلف پاراکسون در نمونه‌های سرمی..... 128

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها

4-1 آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز.....132
4-2 تولید فرم نوترکیب آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز در مخمر *پیکیا پاستوریس*.....134
4-3 جداسازی آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* NL01.....143
4-4 ساخت بیوکونژوگه آنزیم-دابسیل و تشخیص ترکیبات ارگانوفسفره.....146
4-5 نتیجه گیری و پیشنهادات.....155
فهرست منابع 157

فهرست جداول

جدول 1-1 تقسیم بندی حشره کش‌ها و آفت کش‌ها.....2
جدول 1-2 پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در مخمر *پیکیا پاستوریس*.....18
جدول 1-3 سوش های *پیکیا پاستوریس* با ویژگی‌های ژنوتیپی و فنوتیپی.....18
جدول 1-4 ویژگی‌های عمومی ترانسفورماسیون به *پیکیا پاستوریس*.....23
جدول 2-1 مراحل اساسی لازم برای کلون ژن OPH در وکتور pPICZαB.....40
جدول 2-2 نام و محل برش تعدادی آنزیم برای خطی کردن پلازمید در ناحیه ´5 *AOX1* 55
جدول 2-3 مقادیر لازم برای تهیه ژل پلی اکریل آمید 10 درصد در حجم‌های مختلف.....66
جدول 2-4 مقادیر لازم برای رسم منحنی استاندارد مربوط به غلظت‌های مختلف آلبومین.....73
جدول 2-5 مقدار آمونیوم سولفات لازم برای رسوب پروتئین.....82
جدول3-1 نتایج مربوط به تخلیص آنزیم نوترکیب.....107
جدول 3-2 فعالیت آنزیم نوترکیب در حضور یونها و ترکیبات شیمیایی مختلف.....112
جدول 3-3 نتایج مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و آنتی بیوگرام باکتری جدا شده از خاک‌های آلوده به سموم.....113
جدول 3-4 مراحل و نتایج تخلیص آنزیم باکتریایی.....116
جدول 3-5 تاثیر یونها و مواد شیمیایی مختلف بر فعالیت آنزیم باکتریایی.....120
جدول 3-6 درصد فعالیت آنزیم را در حالت آزاد و کونژوگه.....122
جدول 3-7 مقادیر IF1، IF2، RFI و غلظت پاراکسون اندازه گیری شده توسط سیستم بیوسنسوری در نمونه‌های سرمی و غیر سرمی.....127

فهرست نمودارها

نمودار 3-1 میزان فعالیت آنزیم در روزهای مختلف بعد از القاء.....104
نمودار 3-2 میزان فعالیت آنزیم با درصدهای مختلف متانول.....104
نمودار 3-3 منحنی استاندارد برادفورد برای مقادیر 10 تا 100 میکروگرم در میلی لیتر.....106
نمودار 3-4 منحنی استاندارد برادفورد برای مقادیر 100 تا 1000 میکروگرم در میلی لیتر.....106
نمودار 3-5 منحنی لینویور برک مربوط به آنزیم OPH نوترکیب.....109
نمودار 3-6 تعیین pH مناسب برای فعالیت آنزیم نوترکیب.....110
نمودار 3-7 تعیین دمای مناسب برای فعالیت آنزیم نوترکیب.....111
نمودار 3-8 منحنی لینویور برک مربوط به آنزیم باکتریایی (پاراکسون به عنوان سوبسترا).....118
نمودار 3-9 الگوی دمایی مربوط به فعالیت آنزیم باکتریایی.....118
نمودار 3-10 الگوی pH مربوط به فعالیت آنزیم باکتریایی.....119
نمودار 3-11 نتیجه جذب اسپکتروسکوپی مربوط به کونژوگه آنزیم دابسیل قبل و بعد از حذف مولکول‌های دابسیل آزاد از محیط.....121
نمودار 3-12 نتیجه طیف سنجی مربوط به نمونه آنزیمی خالص.....121
نمودار 3-13 نتیجه طیف سنجی مربوط به نمونه کونژوگه آنزیم-دابسیل.....122
نمودار 3-14 فلورسانس مربوط به مهارکننده فلورسانسی کومارین1 (سیگنال فلورسانسی زمینه).....123
نمودار 3-15تاثیر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر سیگنال فلورسانس زمینه در غیاب آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز.....124
نمودار 3-16 شدت فلورسانسی بعد از اضافه شدن کونژوگه آنزیم-دابسیل.....125
نمودار 3-17 تاثیر غلظت‌های مختلف پاراکسون بر فلورسانس محلول حاوی مخلوط کومارین1-آنزیم-دابسیل.....125
نمودار 3-18 منحنی کالیبراسیون (بر اساس شدت فلورسانس نسبی (RFI)) برای غلظت‌های مختلف پاراکسون.....126
نمودار 3-19 تاثیر سموم غیرارگانوفسفره بر سیگنال فلورسانسی 127

نمودار 3-20 گراف HPLC مربوط به غلظت 100 میکرومولار پاراکسون.....129
نمودار 3-21 منحنی استاندارد HPLC مربوط به غلظت‌های مختلف پاراکسون.....129
نمودار 3-22 HPLC مربوط به نمونه استخراج شده از سرم با غلظت 80 میکرومولار پاراکسون.....130