# کلونینگ و بیان ژن آنزیم پنی سیلین آسیلاز از باکتری *Arthrobacter viscosus* در *Escherichia coli*

غلامحسین ابراهیمی پور[1*]، بیژن بمبئی[1]، مهوش خدابنده[2] و فهیمه ترکی نژاد[1]

[1] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

[2] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: 86/9/7 تاریخ پذیرش: 87/6/17

## چکیده

پنی سیلین آسیلاز (پنی سیلین آمیداز یا PAC; EC 3. 5 .1. 11) آنزیمی کلیدی است که در تولید صنعتی آنتی بیوتیک های نیمه سنتتیک بتا لاکتام نقش دارد. این آنزیم واکنش تبدیل پنی سیلین G (بنزیل پنی سیلین) را به 6-APA و PAA از طریق هیدرولیز زنجیر آسیل جانبی کاتالیز می کند. نکته حائز اهمیت در مورد این آنزیم انجام واکنش به صورت دو طرفه با دو ویژگی هیدرولازی و ترنسفرازی است. این تحقیق با هدف کلون و بیان ژن پنی سیلین G آسیلاز از باکتری *A.viscosus* در *E. coli* به منظور رسیدن به افزایش سطح بیان انجام گردید. پس از تکثیر ژن *pac* از ژنوم *A.viscosus*، محصول PCR در وکتور بیانی pET-26b(+) طوری کلون شد که (6xHis tag) موجود در انتهای MCS نیز بیان شود. بعد از تعیین توالی سکانس کلون شده، کلونهای مثبت بر اساس ایجاد هاله در سلولهای *Serratia marcescens* حساس به پنی سیلین G غربال شد. به علاوه SDS-PAGE و وسترن بلات با آنتی بادی مونوکلونال علیه توالی شش هیستیدین انتهایی، پردازش اتوکاتالیتیکی را در سیتوپلاسم *E. coli* تأیید کرد. نتایج این تحقیق، توانایی سویه میزبانی *E. coli* (*BL21*) را در بیان ژن *pac* متعلق به باکتری گرم مثبت نشان داد. به علاوه، نتایج نشان داد پروموتور T7 و القاء آن بوسیله IPTG برای افزایش سطح بیان آنزیم پنی سیلین آسیلاز متعلق به *A.viscosus* در میزبان *E . coli* مناسب است.

واژه های کلیدی : *Arthrobacter viscosus*، پنی سیلین آسیلاز، بیان پروتئینهای نوترکیب

* نویسنده مسئول : تلفن تماس : 021-29903209 پست الکترونیک :G-Ebrahimi@sbu.ac.ir

## مقدمه

آنزیم پنی سیلین آسیلاز (PAC; EC 3. 5 .1. 11) آنزیم مهمی در صنعت داروسازی است و از نظر میزان تولید بعد از آنزیم گلوکز ایزومراز در رده دوم قرار دارد (1، 5 و10). پنی سیلین آسیلاز (Penicillin acylase) در صنعت داروسازی جهت تولید آنتی بیوتیکهای نیمه سنتتیک خانواده بتا لاکتام استفاده می شود. مولکول پنی سیلین توسط این آنزیم به (6-APA) و یک زنجیره جانبی شکسته می شود. اختلاف پنی سیلین های مختلف در واقع به علت متفاوت بودن زنجیره های جانبی آنها است (2). از جمله پنی سیلین های نیمه سنتتیک آموکسی سیلین، آمپی سیلین و اکساسیلین را می توان نام برد. فعالیت پنی سیلین آسیلاز در تعداد زیادی از میکروارگانیسم ها از جمله باکتریها، قارچها و مخمرها دیده شده است (3، 11 و14). باکتریهای گرم منفی مانند *Escherichia coli* و*Alcaligenes feacalis* این پروتئین را در فضای پری پلاسمیک ذخیره کرده در حالی که باکتریهای گرم مثبت مانند *Arthrobacter viscosus* و *Bacillus megaterium* آن را به خارج ترشح می کنند (8 و9). اگرچه نقش پنی سیلین آسیلاز در باکتریها مشخص نیست، اما به نظر می رسد در تجزیه منابع کربنی حاوی فنیل استیل نقش دارد

(13). نحوه پردازش این پروتئین همانند پری پروهورمون های (preprohormones) پروتئینی پستانداران است که در پروکاریوت ها نادر است. پنی سیلین G آسیلاز در فرم بالغ، پروتئینی است هترودیمر، شامل یک زیرواحد کوچک α و یک زیرواحد بزرگ β که از پردازش اتوکاتالیتیکی پلی پپتید پیش ساز ساخته می شود. در سال 1994 سکانس ژن کدکننده *pac* در باکتری *Arthrobacter viscosus* ATCC 15294 تعیین شد. ژن *pac* در این میکروارگانیسم شامل 2406 نوکلئوتید با محتوای ژنتیکی 37G+C درصد می باشد. این سکانس، پلی پپتید پیش سازی (preproPAC) با وزن ملکولی 92 kDa (802 اسیدآمینه) را کد می کند که 26 اسیدآمینه اول آن متعلق به سیگنال پپتید (signal peptide) بوده و زیرواحد α و β بوسیله یک پپتید جداکننده (spacer peptide) از هم جدا می شوند. زیرواحد α شامل 208 اسیدآمینه با وزن ملکولی 24.۳ kDa و زیرواحد β شامل 537 اسیدآمینه با وزن ملکولی 61.4 kDa می باشد (7 و 8). پس از انجام پردازشهای اتوپروتئولیتیکی و حذف سیگنال پپتید، فرم پیش سازproPAC با وزن ملکولی 89 kDa ساخته می شود و در نهایت با حذف پپتید جدا کننده و اتصال دو زیرواحد بوسیله پیوندهای غیرکوالانت، PAC بالغ با وزن ملکولی 85.7 kDa ایجاد می شود (8 و 9). در تنها گزارش مربوط به کلونینگ ژن *pac* از *A.viscosus*، این ژن بطور اختصاصی جدا نشده است بلکه قطعات ژنی مختلفی از DNA کروموزومی (gene library) با استفاده از یک آنزیم برش دهنده، که فاقد جایگاه برش در ژن *pac* باشد، تهیه و کلون گردیده است. سپس کلونها از نظر تولید PAC غربال شدند. رایج ترین روش کلونینگ این ژن استفاده از پلاسمیدهای چند نسخه ای (plasmid vectors multicopy) است. با توجه به اهمیت این آنزیم در صنعت داروسازی و عدم تولید آن در داخل کشور، در تحقیق حاضر اقدام به کلونینگ ژن آنزیم پنی سیلین آسیلاز از باکتری *A.viscosus* و سپس بیان آن در سیستم *E. coli* گردید.

## مواد و روشها

باکتری حاوی ژن پنی سیلین G آسیلاز به نام *Arthrobacter viscosus* با شماره DSM NO.20159 از کشور آلمان تهیه شد. همچنین باکتری *Serratia marcescens* ATCC27177 از طرف دکتر C. Perry Chou از دانشگاه Waterloo کشورکانادا هدیه داده شد. در این تحقیق از باکتری *E. coli* به عنوان میزبان کلونینگ و میزبان بیانی استفاده گردید.

**استخراج DNA ژنومی *Arthrobacter viscosus*** : ابتدا یک کلونی در 5 ml از محیط کشت Luria-Bertani (LB) مایع در دمای 37 درجه سانتی گراد و دور 200 rpm به مدت 18 ساعت گرماگذاری گردید. 1/5 ml از کشت شبانه مذکور با دور 3500rpm (683× g) در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ و رسوب داده شد و به رسوب سلولی 600µl محلول لیزکننده تازه (محلول آبی حاوی 3 میلیگرم لیزوزیم،10 میکروگرم RNase و 100EDTA میکرومول) اضافه و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه انکوبه شد. سپس 25µl 10 درصد SDS اضافه و در دمای 50 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه انکوبه گردید. در مرحله بعد 600µl فنل اشباع شده اضافه و به آرامی مخلوط شد. مخلوط حاصل در 15000 rpm (12633× g) و دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید. µl 400 از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. به منظور خالص سازی DNA استخراج شده µl 400 مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (1:24) اضافه و به آهستگی با هم مخلوط و مجدداً به مدت 5 دقیقه با سرعت 15000 rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. µl 200 از مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. به اندازه 0/1 حجم محلول، استات سدیم 3 مولار (pH 5/2) و 2 حجم

اتانول 95 درصد به آن اضافه و با وارونه نمودن محتویات لوله به آرامی مخلوط شد. محلول به مدت 1 ساعت دردمای 20- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس محلول به مدت 5 دقیقه با دور 15000 rpm در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. برای حذف نمکهای اضافی به رسوب حاصل 400 µl اتانول 70 درصد اضافه شد و پس از مخلوط نمودن به مدت 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس به مدت 5 دقیقه در دور 15000 rpm سانتریفیوژ و مایع رویی توسط سمپلر خارج شد. پس از تبخیر کامل اتانول، رسوب حاصل در 30µl TE bufferحل و تا زمان استفاده در دمای20- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

**تکنیک DNA نوترکیب** : پس از تهیه توالی ژن پنی سیلین آسیلاز از دو پرایمر Avis-F و Avis-R برای دو انتهای این ژن براساس توالی موجود (NCBI،L04471) طراحی گردید. پرایمر Avis-F و Avi-R به ترتیب دارای جایگاه برش برای آنزیمهای محدودالاثر *NdeI* و *SalI* می باشند.

*NdeI*

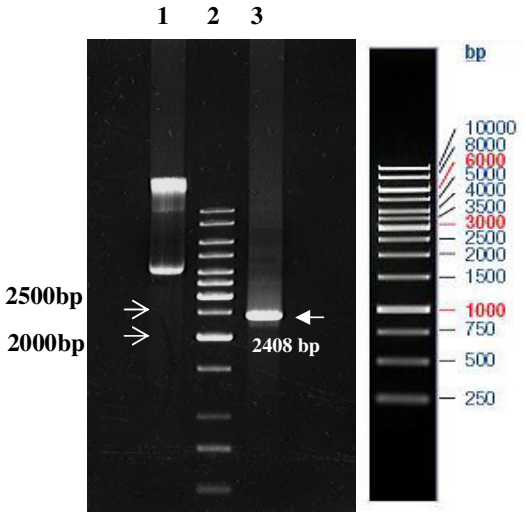
Avis-F 5'_GGTGGAAATGTACATATGAAGATG_3'

Avis-R 5'_ATTCAAATCGTTACGTCGACCTTACTC_3'

*SalI*

برای تکثیر ژن *pac* از DNA ژنومی استخراج شده به عنوان DNA الگو استفاده شد. آنزیم استفاده شده برای تکثیر *Pfu DNA* Polymerase (از شرکت Fermentase) بوده که دارای خاصیت اگزونوکلئازیی '5 → '3 (-Proof reading) می باشد. پس از انجام PCR و تکثیر ژن مورد نظر، محصول PCR توسط High Pure PCR Purification Kit (شرکت Roche) طبق دستور العمل شرکت سازنده خالص گردید و در وکتور (Promega) pGEM-5zf که با آنزیم *EcoRV* خطی گردیده بود، طبق روش ذیل کلون شد. واکنش اتصال (Ligation) بین پلاسمید خطی شده و محصول PCR در دمای 16°C به مدت 16 ساعت با کمک آنزیم T4 DNA ligase (شرکت Roche) صورت گرفت. محصول واکنش اتصال با روش شوک حرارتی به داخل سلولهای مستعد $DH_5\alpha$ منتقل گردید. پلاسمید نوترکیب حاصل pGEM-*pac* نامگذاری شد. تعدادی کلنی سفید حاصل جهت بررسی پلاسمید نوترکیب همراه با یک کلنی آبی بعنوان کنترل انتخاب و بر روی محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. DNA پلاسمیدی باکتریها به روش لیز قلیایی استخراج و بر روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز گردید. DNA پلاسمیدی را که نسبت به کنترل (پلاسمید pGEM) وزن مولکولی بالاتر داشت را انتخاب و با روشهای PCR و برش آنزیمی با آنزیم *BstXI* (شرکت Roche) مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید صحت کلونینگ به منظور بررسی بیان این آنزیم، ژن *pac* بوسیله برش با دو آنزیم *NdeI* و *SalI* از وکتور نوترکیب pGEM-*pac* جدا گردیده و خالص شد. پلاسمید pET-26b(+) (Novagen) نیز با همین دو آنزیم خطی گردید تا انتهای چسبنده (Sticky ends) قطعه ژنی و وکتور خطی به کمک آنزیم T4 DNA ligase به هم متصل شوند. محصول اتصال به داخل سلولهای باکتری مستعد $DH_5\alpha$ منتقل شد. سپس باکتریهای فوق بر روی پلیت LB حاوی کانامایسین کشت داده شدند. تعدادی از کلونها انتخاب شده و استخراج پلاسمید طبق روش قبلی انجام شد. به منظور تأیید وجود ژن *pac* در وکتور نوترکیب یکی از پلاسمیدهای نوترکیب انتخاب گردید. پلاسمید نوترکیب حاصل pET26b-*pac* نامگذاری شد (شکل 1). سپس از روش برش آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *SalI* (شرکت Fermentase) برای تأیید مورد استفاده قرار گرفت. جهت تأیید نهایی کلونینگ ژن *pac* پلاسمید نوترکیب pET26b-*pac* برای تعیین توالی ارسال و این تعیین توالی از دو جهت برای ژن *pac* بوسیله پرایمرهای T7 promoter و Avi-R انجام شد. سپس توالی

نوکلئوتیدی ژن مذکور با توالی نوکلئوتیدی موجود درGenBank بوسیله برنامه BLAST مقایسه گردید.




شکل 1. **جداسازی و تکثیر ژن *pac* با استفاده از DNA ژنومی** 1- DNA ژنومی استخراج شده متعلق به باکتری *Arthrobacter viscosus* 2- مارکر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder) 3- محصول PCR (ژن *pac*) با استفاده از پرایمرهای A.visF و A.visR(2408 bp)

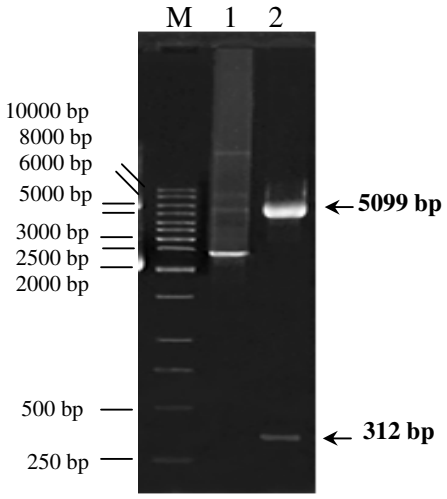
**غربالگری بیولوژیکی کلونهای مثبت تولید کننده پنی سیلین G آسیلاز بوسیله Overlay test** : پس از تأیید حضور ژن پنی سیلین آسیلاز در وکتور بیانی pET-26(b)، پلاسمید نوترکیب pET26-*pac* به سلولهای (*BL21*) *E. coli* منتقل شد. با این آزمایش از طریق باکتری *Serratia marcescen* (ATCC27177) کلونهای مثبت تولید کننده پنی سیلین آسیلاز شناسایی گردید. *S. marcescens* مقاوم به پنی سیلین G و حساس به 6-آمینوپنی سیلانیک اسید (6-APA) می باشد. چنانچه کلون(های) مورد نظر بتواند آنزیم پنی سیلین آسیلاز را تولید کند، پنی سیلین G به 6-APA تبدیل شده و در اطراف کلون های مثبت هاله عدم رشد تشکیل می شود (6).

**روش انجام Overlay test**: در این آزمایش از طریق باکتری *S. marcescen* کلون های مثبت تولید کننده پنی سیلین آسیلاز جداسازی گردید. *S. marcescens* مقاوم به پنی سیلین G و حساس به 6-APA می باشد. ابتدا کلون های نوترکیب بر روی محیط جامد حاوی 5g/l NaCl، 5g/l Beef extract، 10 g/l Yeast extract و 15 g/l Agar کشت داده شده و پلیت ها در دمای 28 درجه سانتی گراد حداقل به مدت 12 ساعت انکوبه گردید. S. marcescens در محیط حاوی 10 گرم در لیتر پپتون و 5 گرم در لیتر نمک طعام به مدت یک شبانه روز در دمای 26 درجه سانتی گراد کشت داده شد. سپس 500 میکرولیتر سلولهای سراشیا با 250 µl پنی سیلین G (100 mg/ml) و5 میلی لیتر melt nutrient soft agar شامل 3 گرم در لیتر عصاره گوساله، 5 گرم در لیتر پپتون و 7/5 گرم در لیتر آگار سریع مخلوط شده و بر روی پلیت فوق پخش گردید. پلیت ها بهمراه کنترل منفی در دمای 28 درجه سانتی گراد انکوبه گردید. هاله عدم رشد به معنای توانایی سلولها در تبدیل پنی سلین به 6-APA می باشد (11).

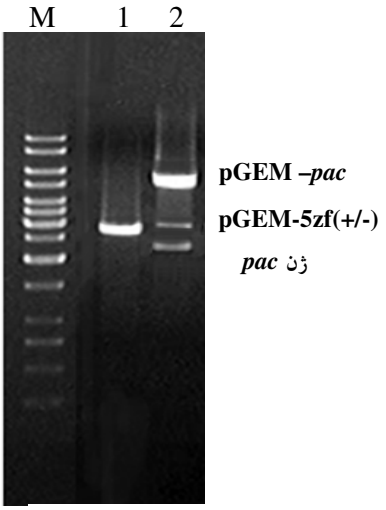
**بررسی بیان آنزیم نوترکیب پنی سیلین G آسیلاز در سلولهای (*BL21*) *E.coli* : القاء بیان پروتئین نوترکیب**: جهت بیان پروتئین نوترکیب از روش شیمیایی برای القا استفاده شد. ابتدا یک کلنی از کشت تازه سلولهای (*BL21*) *E .coli* حاوی وکتور pET26-*pac* در محیط کشت LB مایع حاوی 50 mg/ml آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شده و پس از 16 ساعت کشت (دما 37 درجه سانتی گراد و 200rpm)، رقت 5 درصد در محیط M9minimal +Kan (1g/l $NH_4Cl$، 12/8 g/l $Na_2HPO_4$، g/l NaCl 0/5 و 3 g/l $KH_2PO_4$ بعلاوه 2 میلی مولار $MgSO_4$ و 100 میکرومولار $CaCl_2$) حاوی 10 درصد گلوکز تهیه و در انکوباتور37 درجه سانتی گراد با 200 rpm قرار داده شد تا جذب نوری آن در طول موج 600 نانومتر به 0/8 برسد. سپس بیان پروتیین با اضافه نمودن IPTG با غلظت نهایی 1 میلی مولار به مدت 16 ساعت در دمای 28 درجه سانتی گراد القاء شد. جهت بررسی بیان پروتئین

نوترکیب در زمانهای مختلف قبل و بعد القاء از محیط کشت نمونه برداری شد. نمونه ها (رسوب و روشناور) تا آماده سازی در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند (7 و 17).

**استخراج محتوای پروتئینی تام سلولها:** سلولهای باکتریایی به دست آمده از یک میلی لیتر از کشت سلولی، پس از سانتریفوژ در (893×g) 4000 rpm به مدت 5 دقیقه، در حجم مناسبی از (2x) Sample solvent شامل 0/2Bromophenol Blue درصد ، 2-Mercaptoethanol 10 درصد، Glycerol 20 درصد، SDS 4 درصد با 6/8 pH حل شده و به مدت یک دقیقه جوشانده شد.




شکل 2- الف

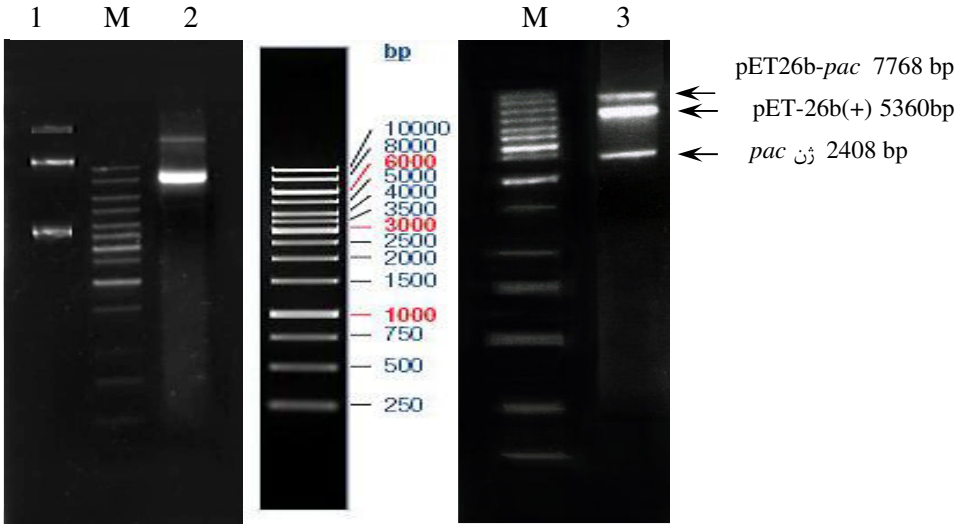



شکل 2- ب

شکل2- الف. شناسایی کلون ترنسفورم شده با وکتور نوترکیب *pac* -pGEM. M- مارکر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder) 1- تأیید کلونینگ *pac*- pGEM بوسیله PCR (2408 bp)، 2- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pGEM-*pac* با آنزیم *BstxI* (312 bp، 5099 bp). شکل2- ب. جداسازی ژن *pac* از وکتور نوترکیب pGEM-*pac* (5411 bp) با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *SalI*. M- مارکر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder)، 1- پلاسمید خطی pGEM-5zf(+/-) (3003 bp) پس از برش با دو آنزیم *NdeI* و *SalI* (3000 *bp*)، 2- جداسازی ژن *pac* از پلاسمید نوترکیب pGEM-*pac* با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *SalI*

**تفکیک پروتئینهای پری پلاسمی، سیتوپلاسمی و اینکلوژن بادی:** باکتری (*BL21*) *E. coli* حامل وکتور نوترکیب در 50 میلی لیتر محیط کشت LB مایع کشت داده شد. سلولهای باکتریایی با سانتریفوژ در دور rmp 5000 به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق رسوب شده و این رسوب در بافر TES سرد (0/5 mM EDTA، M Sucrose 0/5و 0/2M Tris-HCl با pH 5/8) به میزان 15 میکرولیتر به ازای هر1/5 میلی لیتر محیط کشت باکتری سوسپانسون شد. سوسپانسون باکتری به مدت 30-15 دقیقه روی یخ تکان داده شده و به ازای 1/5 میلی لیتر محیط کشت باکتری 22/5 میکرولیتر آب دو بار تقطیر سرد به مخلوط فوق اضافه گردید. محلول 30 دقیقه دیگر روی یخ تکان داده شد. سپس سانتریفوژ در دور (6605×g) 13000 rpm به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد انجام گرفت. محلول رویی محتوی پروتئین پری پلاسمی نتیجه شوک اسمزی بوده و رسوب حاوی پروتئینهای سیتوپلاسمی است. به ازای هر میلی لیتر مایع رویی 120 میکرولیتر TCA صد در صد اضافه و به آرامی تکان داده تا به خوبی مخلوط گردید، سپس به مدت 15 دقیقه روی یخ گذاشته، سانتریفوژ در دور rmp

13000 به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد انجام و پروتئینهای پری پلاسمی رسوب داده شد. بعد از خارج کردن روشناور، به رسوب حجم مناسبی از 2x Sample Solvent اضافه و به مدت 1 دقیقه جوشانده شد. در صورت نیاز با اضافه کردن چند میکرولیتر NaOH غلیظ، pH محیط قلیایی گردید. نمونه های تهیه شده توسط SDS-PAGE بررسی شده و جهت بررسی پروتئینهای سیتوپلاسمی رسوب به دست آمده در حجم مناسبی از Lysis buffer (8/7 g/l NaCl ، EDTA 4/46g/l، Tris-Base 0/6 g/l و Triton 100X 1 درصد با pH 8/5) (هفت برابر حجم رسوب) حل گردید. محلول فوق در دو مرحله منجمد و ذوب و سپس با استفاده از دستگاه سونیکاتور، سلولهای باکتری شکسته شد. سونیکاسیون روی یخ به مدت 5 دقیقه و هر بار 30 ثانیه انجام شد. سپس سانتریفوژ در دور (7660×g) rpm 14000 به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد صورت گرفت. محلول رویی که شامل محتویات سیتوپلاسم بود به فالکون دیگری منتقل شده و جهت SDS-PAGE نمونه آماده گردید. در این مرحله برای آماده سازی نمونه از آنجا که میزان بیان پروتئین سیتوپلاسمی بالا بود از TCA استفاده نشد و مستقیماً Sample solvent (6x) اضافه شد. رسوب حاصل از مرحله قبل (پروتئینهای نامحلول سیتوپلاسمی یا انکلوژن بادی) با حجم مناسبی از Sample solvent حل شده و پس از جوشاندن به مدت 1 دقیقه با استفاده از تکنیک SDS-PAGE بررسی گردید. محتویات پری پلاسمی، سیتوپلاسمی و اینکلوژن بادی از یکدیگر جدا شده و بطور جداگانه توسط SDS–PAGE و وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفت.




شکل 3. تأیید حضور ژن *pga* در وکتور نوترکیب pET26b-*pga* 1- وکتور pET-26b(+) بدون قطعه خارجی 2- وکتور نوترکیب pET26b-*pac* (7768 bp) 3- برش آنزیمی وکتور نوترکیب pET26b-*pac* با دو آنزیم NdeI و SalI. پس از برش آنزیمی ژن *pac* (2408 bp) و وکتور pET-26b(+) (5360bp) جدا می شود. M- مارکر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder)

## نتایج و بحث

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز 1 درصد، تک باندی را در ناحیه 2400 جفت باز نشان داد که از لحاظ اندازه معادل قطعه مربوط به ژن پنی سیلین آسیلاز در NCBI sequence (L04471) می باشد (شکل 1، خط 3).

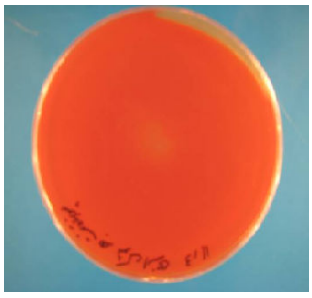
جایگاههای برش که برای دو آنزیم *NdeI* و *SalI* در پرایمرها در نظر گرفته شده بود، پس از واکنش PCR در ابتدا و انتهای ژن *pac* قرار می گیرد اما از آنجایی که دو انتهای محصول PCR آزاد است بنابراین اتصال آنزیم برش دهنده به محصول PCR به خوبی امکان پذیر نیست. به این

دلیل قبل از انتقال مستقیم محصول PCR به وکتور بیانی (Expression vector) لازم است در یک کلونینگ وکتور (Cloning vector) مناسب کلون گردد تا جایگاه اتصال آنزیم و برش فراهم شود. وکتور کلونینگ استفاده شده در این تحقیق pGEM-5zf (+/-) می باشد. وکتور-pGEM 5zf(+/-) دارای 3003 جفت باز است که بعد از اتصال ژن *pac* به آن وکتور نوترکیب pGEM-*pac* با اندازه 5411 bp ایجاد شد. به منظور تأیید وجود قطعه ژن *pac* در وکتور نوترکیب pGEM-*pac*، از واکنش PCR و برش آنزیمی با آنزیم محدودالاثر *BstxI* دردمای 45 درجه سانتی گراد به مدت 3 ساعت استفاده گردید. در واکنش PCR از *pac* pGEM- به عنوان الگو استفاده شد و پرایمرهای استفاده شده همان Avis-R وAvis-F بودند (شکل 2–الف خط 1). آنزیم *BstxI* دارای دو جایگاه برشی است که یکی در نوکلئوتید شماره 103 از توالی ژن *pac* و دیگری در نوکلئوتید شماره 2291 از وکتور pGEM قرار دارد. در صورت وجود ژن مورد نظر دو قطعه با اندازه های bp 312 و 5099bp بدست خواهد آمد (شکل2–الف خط 2). هر دو تست صحت کلونینگ را نشان داد (شکل 2–الف). پس از کلون شدن ژن *pac* در این وکتور و تأیید آن به منظور بررسی بیان، ژن پنی سیلین آسیلاز از وکتور نوترکیب pGEM–*pac* با استفاده از دو آنزیم *NdeI* و *SalI* خارج شده تا در وکتور بیانی pET26(b) در پایین دست پروموتور T7 کلون شود. شکل 2–ب ژن *pac* را پس از هضم همزمان با *NdeI* و *SalI* نشان می دهد. همانطور که در این شکل ملاحظه می شود در lane3 بخشی از پلاسمید نوترکیب برش یافته و قطعه مربوط به ژن *pac* ( 2408bp) از آن جدا شده است و باند بالایی با اندازه bp 5411 متعلق به پلاسمید نوترکیب pGEM–*pac* برش نیافته است (شکل2– ب خط 2). وجود ژن مقاومت به آمپی سیلین یا بتالاکتاماز (*bla*) در وکتور بیانی باعث اختلال در ساختار سوبسترای آنزیم یعنی پنی سیلین G شده و بر روی نتایج سنجش آنزیم اثر منفی می گذارد.

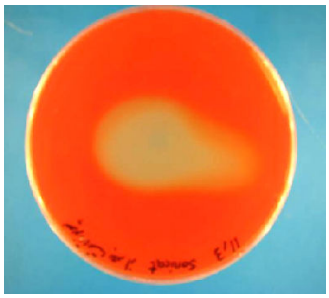
بنابراین در این تحقیق از وکتور بیانی pET26(b) که دارای ژن مقاومت به کانامایسین است، استفاده شد. با توجه به اینکه شناسایی توالی سیگنال پپتید باکتری آرتروباکتر از سوی سیستم ترشحی باکتری اشرشیاکولی نیز مورد نظر بود اقدام به حذف توالی PelB موجود در وکتور pET26(b)گردید تا پروتئین با توالی سیگنال پپتید طبیعی بیان گردد. برای این کار پرایمر Avis-F به گونه ای طراحی گردید تا با ایجاد جایگاه برش برای آنزیم *NdeI* توالی کدکننده PelB حذف گردد. همچنین ساخت پلاسمید بیانی نوترکیب حاوی ژن *pac* با توالی His-tag در انتهای ناحیه کربوکسیل صورت پذیرفت تا امکان بررسی اثر His-tag بر روی میزان ترشح آنزیم و انجام وسترن بلات توسط آنتی بادی علیه His-tag فراهم شود (شکل 3 خط 2). کلونینگ در وکتور بیانی نوترکیب pET26-*pac* بوسیله برش آنزیمی با آنزیمهای *NdeI* و *SalI* تأیید گردید (شکل 3 خط 3). قطعه مربوط به ژن *pac* از وکتور نوترکیب pET26b-*pac* جدا و وکتور خطی pET-26b(+) با اندازه 5360bp باقی مانده است. جهت تأیید نهایی، نمونه ای از وکتور pET26b-*pac* برای تعیین توالی ژن کلون شده ارسال شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی نوکلئوتیدی موجود در GenBank بوسیله برنامه Blast همانندی کامل توالی کلون شده را تأیید کرد. سپس بیان آنزیم پنی سیلین آسیلاز در میزبان *E. coli* (*BL21*) با استفاده از آزمایش Overlay و تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات اخیر مشخص شده است که تولید پنی سیلین آسیلاز نسبت به سوبستراهایی با ترکیبات پیچیده پروتئینی حساس است و چنانچه از محیطهای حداقل (minimal medium) با منابع کربن مختلف استفاده شود، تولید آنزیم افزایش می یابد(5). در این تحقیق به منظور تولید آنزیم نوترکیب از محیط M9 minimal که فاقد ترکیبات پیچیده آلی است، استفاده شد. به نظر می رسد، استفاده از سویه ای که از نظر پروتئیناز دارای نقص است (proteinase- deficient strain) برای

افزایش محصول پیش سازهای حساس به تجزیه پروتئولیتیکی مناسب باشد. به این منظور از سویه تجاری *E. coli BL21(DE3)* که بطور طبیعی در پروتئیناز وابسته به ATP, Lon و پروتئیناز غشای خارجی ompT نقص دارد، استفاده شده است (16). تولید آنزیم پنی سیلین G آسیلاز عموماً در طول فاز نمایی صورت می پذیرد و با رسیدن ارگانیزم به فاز سکون، تولید آنزیم متوقف می گردد (4). در این تحقیق میزان (v/v) 5 درصد از کشت شبانه باکتری جهت تلقیح استفاده شد. زمان لازم برای رسیدن به فاز سکون با استفاده از منحنی رشد میکروارگانیزم بدست آمد و OD0/8 به عنوان تراکم سلولی مناسب انتخاب گردید. معمولاً 24-16 ساعت رشد جهت تولید آنزیم کافی می باشد و در طی این مدت میزان تولید به حداکثر ممکن می رسد. در این تحقیق با توجه به گزارشات داده شده از 170 rpm استفاده گردید. هر چند درجه حرارت اپتیموم رشد اکثر باکتریهای مزوفیل 37 درجه سانتی گراد است، اما تحقیقات نشان داده است که پنی سیلین آسیلاز یک آنزیم وابسته به دما است و تولید آن در دمای30- 25 درجه سانتی گراد صورت می گیرد و در دماهای بالاتر پلی پپتید پیش ساز بطور صحیح فولد نمی شود و پردازشهای پروتئولیتیکی بطور کامل انجام نمی شود (12). لذا تست Overlay در سه دمای 28 درجه سانتی گراد، 30 درجه سانتی گراد و 37 درجه سانتی گراد انجام شد که تنها در دمای 28 درجه سانتی گراد هاله عدم رشد مشاهده شد(شکل 4- الف). همچنین با توجه به شکل 4- الف سلولهای حاوی وکتور نوترکیب pET26-*pac* قادر به تولید آنزیم پنی سیلین آسیلاز می باشند. بعلاوه تست Overlay برای نمونه سیتوپلاسمی مثبت (شکل 4- ب) و برای نمونه پریپلاسمی منفی بود (شکل 4-ج) که نشان دهنده تجمع آنزیم تولیدی در سیتوپلاسم و عدم ترشح آن به فضای پریپلاسمی می باشد. همچنین بررسی تولید آنزیم بوسیله تکنیک وسترن بلات با αHis HRP Conjugate بیان دو فرم پروسه نشده (باند بالایی) و پروسه شده (باند پایینی) را بخوبی نشان می دهد (شکل 5). وجود باند سبک تر، با وزن مولکولی حدود 61 کیلو دالتون، این فرضیه را تأیید می کند که آنزیم نوترکیب تولید شده تحت فرآیند پردازش، قطعه پپتید میانی را از دست داده و زنجیر بتا (که بخاطر وجود شش باقیمانده هیستیدینی شناسایی شده) و آلفای آن (که در وسترن مشاهده نمی شود) بوجود آمده است. نظریه Xu و همکاران (2005) در مورد پیش بینی دو سیستم پردازش یکی درون سیتوپلاسمی و دیگری پریپلاسمی این نتایج را تأیید می نماید (15). البته جدا شدن زیرواحد بتا و آزاد شدن رزیدوی کاتالیتیک می تواند نتیجه پردازشهای اختصاصی توسط فرآیند خود فعال سازی و یا نتیجه عمل پروتئازهای طبیعی درون سلولی باشد. یکی از مهمترین نتایج این تحقیق بعد از نشان دادن امکان بیان ژن آسیلاز یک باکتری گرم مثبت در سیستم باکتریایی گرم منفی، نمایش فعالیت خود پردازیشی این آنزیم در سیتوپلاسم باکتری اشرشیا کولی می باشد.

**شکل 4- الف**. overlay test برای سلولهای BL21 حامل وکتور نوترکیب pET26b-*pac* در دمای درجه سانتی گراد 28



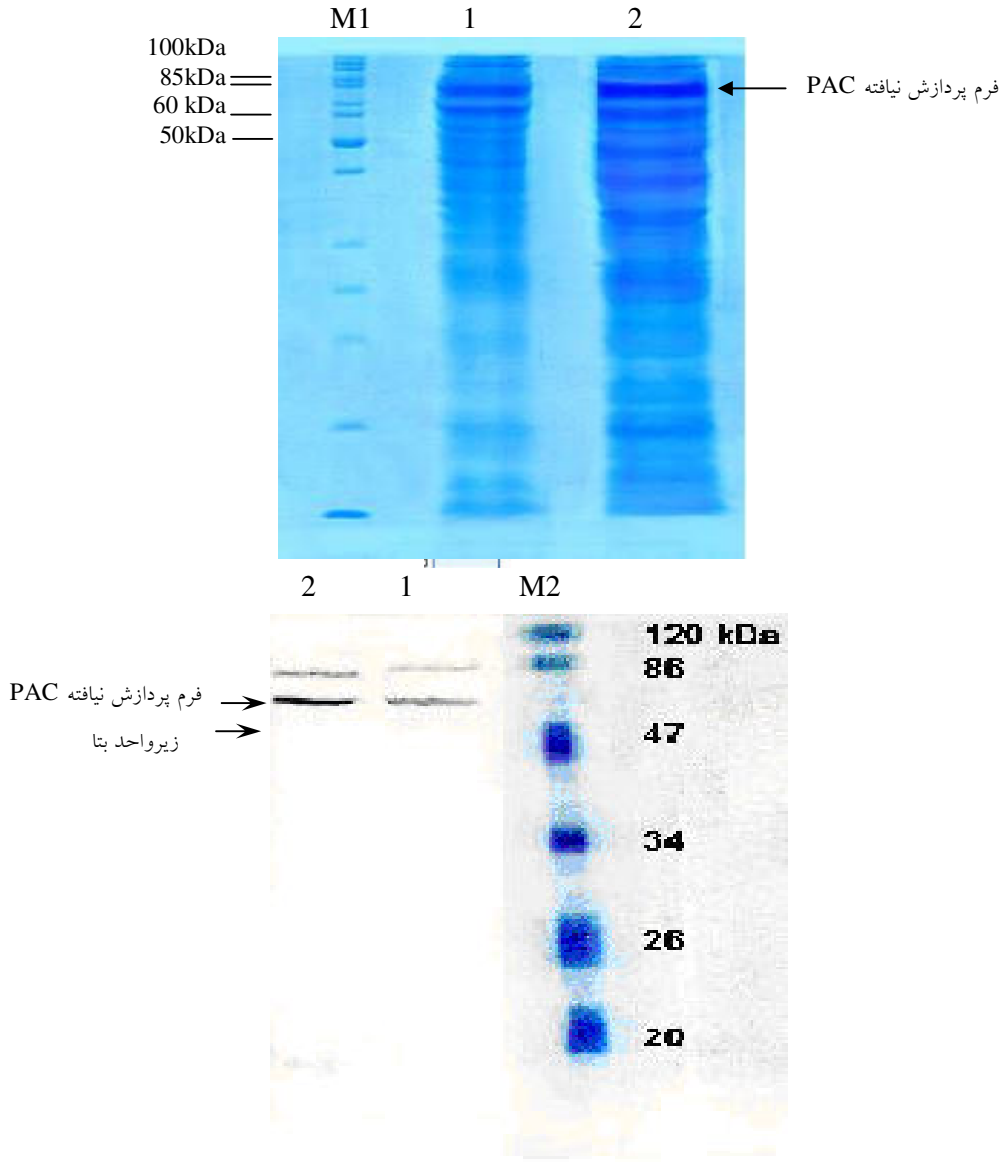
**شکل 4-ب**. overlay test برای نمونه پریپلاسمی حاصل از سلولهای نوترکیب حامل pET26b-*pac*



**شکل 4- ج**. overlay test برای نمونه سیتوپلاسمی حاصل از سلولهای نوترکیب حامل pET26b-*pac*

*S. marcescens*

سلول BL21 حاوی وکتور نوترکیب pET26-*pga*




شکل 5. نتایج الکتروفورز پروتئین و وسترن بلات برای شناسایی فرم فعال آنزیم در بخش محلول سیتوپلاسمی
M1- پـروتئین مـارکر Prestained Protein Molecular Weight Marker -M2 (#SM0661) 10 -200kDa 1- نمونـه محلـول سیتوپلاسمی 2- نمونه تغلیظ شده محلول سیتوپلاسمی

در پایان، تحقیق حاضر از دو بعد علمی و کاربردی راه را برای مطالعه بیان پروتئینها به شکل نوترکیب در سیستمهای هترولوگ باز نموده و از سوی دیگر امکان تولید این آنزیم را برای مصارف داروسازی صنعتی هموار می کند. البته هنوز سؤالات مختلفی بر سر راه این اهداف وجود دارد، نظیر نقش توالی سیگنال طبیعی این آنزیم و جایگزینی آن با توالی سیگنال آنزیم آسیلاز از منبع *E. coli* که می تواند به ترشح خارج سلولی این آنزیم منجر شود.

**تشکر و قدردانی**: مؤلفان بدینوسیله از آقای دکتر C. Perry Chou از دانشگاه Waterllo بخاطر ارسال سویه *Serratia marcescens* (ATCC 27177) و ارائه روش تست Overlay تشکر و قدردانی می نمایند.

## منابع

1-Arroyo, M., De la Mata, I., C, Acebal., and Pilar Castillon,M (2003) Biotechnological application of penicillin acylase:state-of-the-art.Appl Microbiol Biotechnol 60:507-514

2-Batchelor, FR., Chain, EB., Richards , and M., Rolinson GN (1961) Formation of 6-APA from penicillin by enzymatic hydrolysis.Proc R Soc Lond B Biol Sci 154:522-531

3-Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson,E. J., Dodson, G., and Moody,P.C (1995) Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center.Nature 373,264-268

4-Ignatova,Z., S.O.Enfors,M. Hobbie,S.Taruttis,C.Vogt, and V.Kasche (2000) The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli. Enzyme Microb.Technol.*26:165-170

5-Lindsay,C.D., and Pain, R.H (1991) Refolding and assembly of penicillin acylase, an enzyme composed of two polypeptide chains that result from proteolytic activation. *Biochemistry*.30: 9034-9040

6-Meevootisom,V., P.Somsuk, R.Prachaktam,and T.W.Flegel (1983) simple screening method for isolation of penicillin acylase-producing bacteria.Appl.Environ.Microbiol. 46:1227-1229

7-Mnghua, Dai .,Yingmin, Zhu., Yunliu ,Yang., Enduo ,Wang .,Yong, Xie.Guoping Zhao and Weihong, Jiang (2001) Expression of Penicillin G acylase from the cloned pac gene of *Escherichia coli* ATCC 11105. Eur.J.Biochem.268,1298-1303

8-Ohashi,H.,katsuta,Y.,Nagashima,M.,Kamei,T.,and Yano,M (1988) Molecular Cloning of the Penicillin G acylase Gene from *Arthrobacter viscosus*. Appl.Environ.Microbiol.p. 2603-2607

9-Ohashi,H.,katsuta,Y.,Nagashima,M.,Kamei,T.,and Yano,M(1989)Eepression of the *Arthrobacter viscosus* penicillin acylase gene in *Escerichia coli* and *Bacillius subtilis*.Appl.Environ.Microbiol., 55,351-356

10-Rrajendharan, J., Gunasekaran, P (2004)Recent Biotechnological Intervention for developing Improved Penicillin G acylase.Bioscience and Bioengineering vol. 97.No.1,1-13.

11-Savidge, T.A., and M.cole.1975. Penicillin acylase (bacterial). Methods Enzymol .43: 705-721

12-Shewalej,G., and Sivaraman,H. Penicillin acylase: Enzyme production and it's application in the manufacture of 6-APA.*Process Biochem* 1989, 24: 146-154

13-Valle, F., Balbs, P., Merino, E., and Bolivar,F.(1991)The role of penicillin amidase in nature and industry.Trend Bio-chem.Sci., 16,36-40

14-Verhaert, R. m., Riemens, A.M., Van der Laan, J.M., Van Duin, J., and Quax, W.J (1997) Molecular Cloning and Analysis of the Gene Encoding the Thermostable Penicillin G Acylase from *Alcaligenes faecalis.* Appl.Environ.Microbiol. 63,3412-3418

15-Xu,Y., Weng,Ch., Narayanan,N., Hsieh,M., Anderson,W., Scharer,J., Moo-Young,M., and Chou.C (2005) Chaperon-mediated folding and maturation of the

16-Yali,Xu, Stefan,Rosenkranz., Chiao-ling Weng., Murray-Moo and C.Perry,Chou (2006) Characterization of the T7 promoter system for expressing penicillin acylase in *Escherichia coli*. Appl Microbial Biotechnological 72: 529-536

17-Yang,Yang.,Rebekka, Biedendieck.,Wei ,Wang., and Martin, Gamer (2006) High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*.Microbial Cell Factories 5:36

# Cloning And Expression of Penicillin acylase from *Arthrobacter viscosus* in *E. coli*

**Ebrahimipour Gh.[1], Bambai B.[1], Khodabande M.[2], Torkynejad F.[1]**

[1] **Biology Dept., Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of IRAN**

[2] **National Research center for Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran, I.R. of IRAN**

## Abstract

Penicillin acylase (penicillin amidase, PAC ; EC 3.5.1.11) is the key Enzyme used in the industrial production of β-lactam antibiotics. This enzyme cleaves Penicillin G to 6-amino penicillanic acid (6-APA) and PAA by hydrolysis of acyle side chain. It can process this reaction in both directions (hydrolysis and synthesis). Here, we sought to clone and express the penicillin G acylase gene from *A. viscosus* in *Escherichia coli,* to improve expression level. Following PCR amplification of PAC gene from genome of *A. viscosus*, PAC gene was cloned in pET26(b) expression vector in frame with DNA sequence coding for 6xHis tag presented at 3′ of MCS of the vector. After sequencing and confirmation of gene identity with published sequence (L04471), positive clones were screened based on differencial response of *Serratia marcescens* (ATCC27177) to penicillin G and 6-APA (resisitance to penicillin G and susceptibility to 6-APA). Furthermore, SDS-PAGE and western blotting with anti.His.HRP.Conjugate antibodies confirmed the autocatalytic processing in cytoplasm to produce the active enzyme. Our results shows the ability of *E.coli(BL21)* strain in expression of active *pac* gene from a gram positive bacterium in the cytoplasm.. Furthermore, our results show the benefit of T7 promoter and IPTG induction in obtaining high expression levels in *E.coli* for penicillin G acylase from a gram positive bacterium.

**Keywords**: *Arthrobacter viscosus*, Penicillin G acylase, Recombinant expression