عصام فاضل الجميلي
Friday, December 24, 2010
2:56 PM

مجلة ام سلمة للعلوم **مجلد 6(2) 2009**

استخلاص وتنقية انزيم بيتا لاكتميز من العزلتين المحليتين *Proteus mirabilis* 4TF, 20TF

عصام فاضل الجميلي* ***هادي رحمن رشيد الطائي**** ***علاء شريف عباس*****

حسين حسن خانقاه***

تاريخ قبول النشر 8/ 4/ 2008

الخلاصة

أستخلص أنزيم البيتالاكتميز β-lactamase من العزلتين المحليتين *Proteus mirabilis* , الأولى تمثل جانب الكرخ (4TF) والثانية تمثل جانب الرصافة (20TF) وتمت تنقيته باستخدام كروموتوغرافيا عمود التبادل الايوني DEAE cellulose وعمود هلام Sepharose 4 B وقد بلغ عدد مرات التنقية 23.17 , 25.33 وبحصيلة 36.66 % , 37.5 % وفعالية نوعية (11.82 , 12.66) وحدة / ملغم للعزلتين4TF , 20TF على التوالي.

تم تعيين الوزن الجزيئي لانزيم بيتالاكتميز باستخدام طريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي على عمود Sepharose 4 B وقد بلغ 35500 دالتون لكلا الانزيمين المستخلصين من العزلتين 4TF, 20TF .

أشارت الدراسة إلى أن نقطة التعادل الكهربائي pI لانزيم بيتالاكتميز المنقى والمستخلص من العزلتين 20TFو 4TF هو 5.4 .

الكلمات المفتاحية: انزيم البيتا لاكتميز، *Proteus mirabilis* ،الترشيح الهلامي، الوزن الجزيئي، نقطة التعادل الكهربائي.

المقدمة

يعد أنزيم البيتالاكتاميز أحد الأنزيمات التابعة للمجموعة المميئة Hydrolases ذات الرقم التصنيفي (amino hydrolases E.C 3.5.2.6) وهو ينتمي ألى عائلة السيرين (Serine family) الحاوية على الحامض الاميني سيرين بمجموعته الهيدروكسيلية **[1,2]** .

تنتج هذه الأنزيمات من البكتريا فقط ولها صفة دفاعية متخصصة ضد مضادات البيتالاكتام التي تمنع تكوين طبقة الببتيدوكلايكلان (Peptidoglycan) في الجدار الخلوي **[3]** , تحطم هذه الأنزيمات أصرة الأمايد amide bond في حلقة البيتالاكتام الموجودة في نواتي البنسلينات والسيفالوسبورينات جاعلة منها جزيئات غير فعالة بايولوجيا**[4]** , وربما تكون أنزيمات البيتالاكتاميز مشتقة من أحد الأنزيمات الداخلة في تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان **[4]** . يعود أكتشاف هذه الأنزيمات الى الباحثين Abraham & Chain عام (1940) عند ملاحظتهما أن مستخلص سلالة *E.coli* قد حطم البنسلين ولهذا أطلق على هذا الأنزيم أسم البنسيلينيز (Penicillinase) **[5]**.

في عام 1942 تم تنقية أنزيم البنسيلينيز (البيتا لاكتميز) من بعض المكورات العنقودية المقاومة للبنسلين G ومع حلول عام 1947 أصبحت غالبية هذه العزلات مقاومة للمضاد المذكور **[6]** يعد عقدي الستينيات والسبعينيات مهمين من حيث أكتشاف البنسلينات نصف المصنعة (Semi synthetic penicillins) وخاصة الأمبسلين والأموكزاسلين وكذلك أكتشاف البنسلينات واسعة الطيف Broad Spectrum penicillin أضافة ألى أكتشاف الجيل الأول من السيفالوسبورينات **[7]** .

أستطاع الباحثان **[8]** من عزل أول أنزيم يعود لعائلة TEM من بكتريا *E.coli* من أصابة جلدية لفتاة يونانية تدعى (Temonera) راقدة في أحدى المستشفيات وأطلق أسم TEM أشتقاقاً من الأحرف الثلاثة الأولى للفتاة ثم تمكن هذان الباحثان في نفس العام من عزل أنزيم قادر على تحطيم مضادي Oxacillin , Cloxacillin وأطلق عليه OXA **[9]**.

توالت الأكتشافات حيث أستطاع الباحثان **[10]** من أكتشاف أنزيم ينتج من قبل بكتريا الزوائف *Ps.aeruginosa* ومن قبل جينات محمولة بلازميدياً وهو يشبه أنزيم TEM1 لكنه يختلف معه في أحد الأحماض الأمينية وهو اللايسين (Lysine) في الموقع 39 الذي حل بدلاً من الكلوتامين (Glutamine) وسمي هذا الأنزيم TEM-2 وبذلك أختلفت نقطة التعادل الكهربائي

* فرع التقنية الاحيائية سمعهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا- جامعة بغداد
**وزارة العلوم والتكنولوجيا
*** قسم التحليلات المرضية - كلية المامون الجامعة
**** رئيس جامعة كركوك-كركوك

Unfiled Notes Page 1

لكل منهما عن الآخر، ويشير هذا الأنزيم برفقة الأنزيمTEM-1 الأساس الأول الذي أشتقت منه بقية الأنزيمات العائدة لعائلة TEM **[11]** .

مع الأستعمال المفرط لمضادات البيتالاكتام وخاصة بين الأشخاص الراقدين في المستشفيات أنتشرت مقاومة هذه المضادات بين أفراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae فقد عزل أنزيم يشفر من قبل جينات محمولة على بلازميد أقتراني داخل بكتريا *Klebsiella pneumonia* وله صفات مغايرة لأنزيمات العائلة TEM من حيث تسلسل الأحماض الأمينية ونقطة التعادل الكهربائي PI وكذلك الحساسية لكواشف Sulfhydro reagent لذا أطلق عليه SHV-1 نسبة ألى تغيره بهذه الكواشف (Sulfhydryl variable) **[12]** .

في عقد السبعينيات والثمانينيات توسع أستعمال مضادات السيفالوسبورينات مما أدى ألى ظهور العديد من البكتريا المقاومة لهذه المضادات ففي عام 1983 تم تنقية أول أنزيم محلل لمضاد السيفوتاكيم في ألمانيا الغربية منتج من *Klebsiella ozuenae* وأطلق عليه أنزيم SHV-2 المشتق من SHV-1 ثم توالى الى يومنا هذا أكتشاف العديد من الأنزيمات المحللة لمضادات البيتالاكتام لذلك أصبح من الضروري التوجه الى أكتشاف مضادات حيوية مقاومة للتحلل بهذه الأنزيمات **[13]** .

المواد وطرائق العمل

استخلص البيتالاكتميز من العزلتان المحليتان *Proteus mirabilis* 4TF, 20TF بعد زرعهما على الوسط الزرعي مرق لوريا برتوني وحضنت بدرجة حرارة 37 م في حاضنة هزازه بسرعة 120 دورة / دقيقة ولمدة 12 ساعة وفق الطريقة الموصوفة **[14]** . تم تكسير الخلايا بالامواج فوق الصوتية لتحطيم الخلايا بعد ان تم اضافة انزيم اللايزوزام بتركيز 2 ملغم / غرام خلايا رطب . تم قياس فعالية البيتالاكتميز وفق الطريقة الموصوفة **[15]** على طول موجي 620 نانوميتر .اما تركيز البروتين فقد تم تقديره وفق الطريقة الموصوفة من قبل **[16]** .

عرفت الفعالية الانزيمية بانها عدد مايكرومولات المتحرر من مادة الاساس (البنسلين – G) بفعل الانزيم خلال ظروف القياس . تم تنقية البيتالاكتميز وذلك بترسيب الانزيم باستخدام كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (30-40%) ،وكروموتوغرافيا التبادل الايوني وباستعمال المبادل DEAE-Cellulose وبابعاد العمود (15 × 2.5) سم وتم استرداد الانزيم بتدرج الملحي من كلوريد الصوديوم (0-2) مولاري ، بعدها مرر الانزيم المنقى على عمود الترشيح الهلامي بهلام السيفاروز 4 ب بابعاد العمود (1.5 × 70) سم . تم تعيين الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي بعد امرار الانزيم المنقى على هلام السيفاروز 4 ب وأمرار البروتينات القياسية (Phosphorylase B 94000, ovalbumin ,43000; trypsine (23000 . تم تبئير تعادل الشحنة للانزيم وفق الطريقة الموصوفة **[17]** وباستخدام محلول الامفولايت (3.5-9.5) .

النتائج والمناقشة

تم تركيز بيتالاكتميز الخام المستخلص من العزلتين (4TF) و(20TF) للتخلص من نسبة كبيرة من الماء وللحصول على درجة من النقاوة بأستخدام أملاح غير عضوية مثل كبريتات الأمونيوم. استخدمت كبريتات الأمونيوم بنسب أشباع متدرجة تراوحت بين (0 - 100 %) لمعرفة أفضل نسبة أشباع من الملح عنده نحصل على اعلى فعالية نوعية للأنزيم، وقد بينت النتائج أفضل فعالية نوعية للأنزيم هي (1.03) وحدة/ملغم بروتين للعزلة (4TF) و (1.16) وحدة/ملغم بروتين للعزلة (20TF) , ذلك عند أستخدام نسبة أشباع بكبريتات الأمونيوم مقدارها (30-40)% . أما عدد مرات التنقية والحصيلة فقد بلغت حوالي 2.02 , 76 % ، 2.32 ، 77.63 % للعزلتين 4TF، 20TF على التوالي الجدولين (1و2).

أشار كل من **[14]** الى أستخدام كبريتات الامونيوم كخطوة اولى لتنقية Penicillinase المستخلص من بكتريا *Klebsellia pneumoniae* بنسبة اشباع 25 % ولم يتأثر الانزيم وكان مقدار الاسترداد 72.5 % . وجد الباحثان **[18]** أن أستخدام كبريتات الامونيوم في تنقية Penicillinase المستخلص من بكتريا *E.coli* W3310 أدى ألى أرتفاع في قيمة الفعالية النوعية للأنزيم ألى 66.83 وحدة /ملغم بروتين قياساً مع ما كانت عليه في المستخلص الخام 12.25 وحدة ملغم / بروتين .

Unfiled Notes Page 2

جدول (1) تنقية بيتالاكتميز المستخلص من العزلة المحلية 4TF لبكتريا *Proteus mirabilis*

خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية (وحدة/مليلتر)	البروتين (ملغم/مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	الحصيلة (%)	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	25	6.4	12.5	0.51	160	100	1
التركيز بكبريتات الأمونيوم (30-40%) بعد الديلزة	20	6.1	5.90	1.03	122	76	2.02
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose	15	5.4	1.03	5.24	81	50	10.27
كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Sepharose 4-B	15	3.9	0.33	11.8	58.5	36.66	23.17

جدول(2) تنقية بيتالاكتميز المستخلص من العزلة المحلية 20TF لبكتريا *Proteus mirabilis*

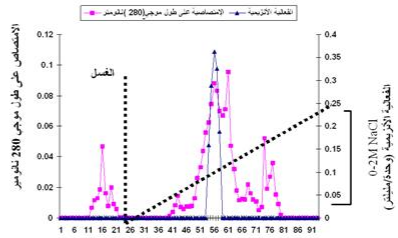
خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية (وحدة/مليلتر)	البروتين (ملغم/مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	الحصيلة (%)	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام	25	6.1	12.1	0.50	152	100	1
التركيز بكبريتات الأمونيوم (30-40%) بعد الديلزة	20	5.9	5.1	1.16	118	77.63	2.32
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Cellulose	15	5.3	1.06	5.0	79.5	52.30	10.0
كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Sepharose 4-B	15	3.8	0.30	12.66	57	37.5	25.33

أستخدم في هذه المرحلة من التنقية عمود المبادل الأيوني DEAE-cellulose وهو من المبادلات السالبة الشحنة Anion-exchange. أضيف محلول الأنزيم المأخوذ من الخطوة السابقة (التركيز بكبريتات الأمونيوم بنسبة أشباع (% 30-40) ألى عمود المبادل الأيوني وأستخدم دارئ الفوسفات بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 مع متدرج ملح كلوريد الصوديوم من 0 ألى 2 مولاري كدارئ أسترداد، وقد تم أسترداد بيتالاكتميز للعزلتين (20TF,4TF) كل على حدة عند التركيز الملحي 0.75 مولاري (أشكال 1, 2).

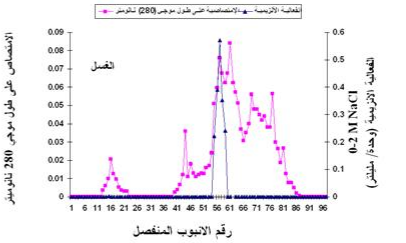
وقد ادى ذلك ألى زيادة الفعالية النوعية والتي بلغت (5.24) وحدة /ملغم بروتين وكان عدد مرات التنقية والحصيلة 10.27 و 50 % على التوالي للعزلة 4TF بينما بلغت الفعالية النوعية للعزلة 20TF ، (5.0) وحدة/ملغم و10.0 و 52.30 % لعدد مرات التنقية والحصيلة على التوالي (جدول1و2) . ويعود السبب في زيادة الفعالية النوعية هنا الى التخلص من نسبة كبيرة من البروتينات غير ذات العلاقة بيتالاكتميز أي البروتينات التي شحنتها معاكسة لشحنة Penicillinase فضلا" على البروتينات غير المشحونة.

أشارت العديد من البحوث الى أن أستخدام المبادل الأيوني DEAE-cellulose يعد من الطرائق الفعالة والحساسة لعملية فصل وتنقية البيتالاكتميز، أذ أستخدم الباحثان **[19]** هذا العمود في تنقية بيتالاكتميزالمستخلص من بكتريا *E.coli* وكان مقدار الفعالية النوعية 44.2 وحدة / ملغم بروتين واسترداد مقداره 60.6 % ,و استخدم الباحث **[20]** عمود DEAE-cellulose في تنقية بيتالاكتميز المعزول من بكتريا *Clostridium butyricum* اذ بلغ عدد مرات التنقية 1.13 مرة وبأسترداد 26 % وقد أستخدم التدرج الملحي الخطي بوساطة كلوريد الصوديوم فكان الأسترداد عند التركيز 1.0 مولار من الملح المذكور.

Unfiled Notes Page 3

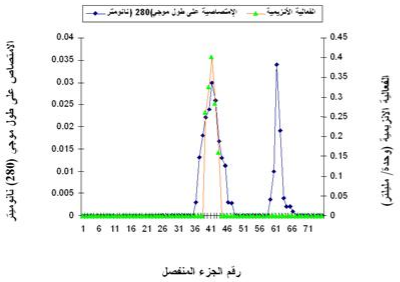


شكل (1) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية بيتالاكتميزالمستخلص من العزلة 4TF باستخدام عمود التبادل الأيوني DEAE-Cellulose (15×2.5) سم الذي تمت موازنته بدارىء الفوسفات بتركيز 0.05 مولار و رقم هيدروجيني 7 ثم الإسترداد بنفس الدارئ مع متدرج ملح كلوريد الصوديوم من 0 إلى 2 مولاري. سرعة جريان 30 مليلتر/ساعة.(حجم الجزء المسترد 5 مليلتر)

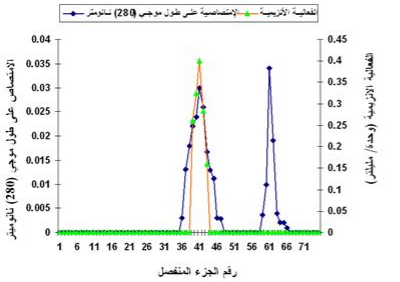


شكل (2) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية بيتالاكتميزالمستخلص من العزلة20TF بإستخدام عمود التبادل الأيوني DEAE-Cellulose (15×2.5) سم الذي تمت موازنته بدارىء الفوسفات بتركيز 0.05 مولار و رقم هيدروجيني 7 ثم الإسترداد بنفس الدارئ مع متدرج ملح كلوريد الصوديوم من 0 إلى 2 مولاري. سرعة جريان 30 مليلتر/ساعة.(حجم الجزء المسترد 5 مليلتر)

أجريـــــت عملية كروتوغرافيا الترشيح الهلامي للقمة الحاوية على فعالية نوعية عالية لأنزيم β -lactamase والناتجة من عمود التبادل الأيوني وبأستخدام عمود الترشيح Sepharose4B , اذ أضيف المحلول الأنزيمي والناتج من تجميع الأجزاء القريبة من القمة والحاوية على فعالية أنزيمية وبعد تركيزها ألى عمود الترشيح. وقد أدى أستخدام هذا العمود في زيادة نقاوة بيتالاكتميز للعزلتين(20TF,4TF) الجدوليـــن(1و2) والشكلين (3و4) إذ بلغت الفعالية النوعية 11.82 وحدة/ملغم بروتين و 12.66 وحدة/ملغم وعدد مرات تنقية 23.17 , 25.33 والحصيلة الأنزيمية 36.66% و 37.5% للعزلتين 4TF و20TF على التوالي. أستخدم [21] كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي في تنقية البنسلينيز من بكتريا *E.coli* و حصلوا على 1.44 مرة تنقية وبأسترداد أنزيمي مقداره29 %. كما أستخدم الباحث[20] المبادل الهلامي Sephacryl S-300 في تنقية أنزيم البنسلينيز المستخلص من بكتريا *Clostridium butyricum* وقد بلغ عدد مرات التنقية 121 مرة وبأسترداد أنزيمي مقداره 68.5 %.



شكل (3) الترشيح الهلامي لتنقية بيتالاكتميزالمستخلص من العزلة 4TF باستخدام عمود هلام Sepharose 4-B (70×1.5) سم الذي تمت موازنته بدارىء الفوسفات بتركيز 0.05 مولار و رقم هيدروجيني 7. سرعة جريان 30 مليلتر/ساعة. (حجم الجزء المسترد 3 مليلتر)



شكل (4) الترشيح الهلامي لتنقية بيتالاكتميز المستخلص من العزلة20TF باستخدام عمود هلام Sepharose 4-B (70×1.5) سم الذي تمت موازنته بدارء الفوسفات بتركيز 0.05 مولار و رقم هيدروجيني 7. سرعة جريان 30 مليلتر/ساعة. (حجم الجزء المسترد 3 مليلتر).

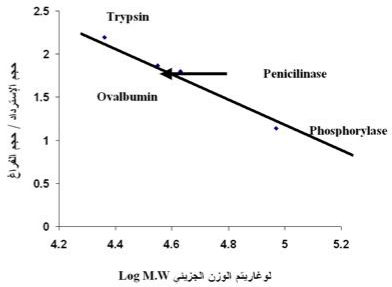
تم حساب الوزن الجزيئي بيتالاكتميز المنقى والمستخلص من العزلتين 4TF و 20TF ليكتريا _*Proteus mirabilis* بطريقة الترشيح الهلامي بأستخدام عمود Sepharose 4B وبالمقارنة مع البروتينات القياسية وقد بلغ الوزن الجزيئي لانزيم البيتالاكتميز المستخلص والمنقى من كلا العزلتين قيد الدراسة **35500 دالتون** شكل (5) .

وتفق هذه النتيجة مع ما أشار أليه الباحثان **[22]** من أن الوزن الجزيئي لأنزيم البيتالاكتاميز

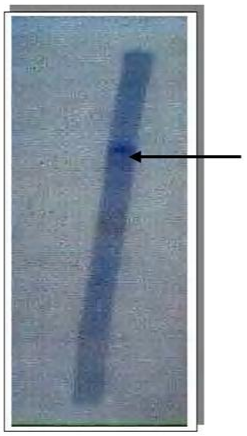
المستخلص من بعض البكتريا السالبة لصبغة غرام يتراوح ما بين (30,000-25000) دالتون, وتتفق النتيجة مع ما توصل أليه الباحثان **[23]** من أن الوزن الجزيئي لأنزيم البيتالاكتاميز لبعض البكتريا السالبة لصبغة غرام العائدة للعائلة المعوية حوالي 40,000 دالتون، بينما الوزن الجزيئي لأنزيم البيتالاكتاميز المستخلص من بكتريا *Pseudomonase aeruginosa* ATCC 8203 بحدود 42000-4400 دالتون , وأظهرت نتائج الدراسة التي أجراها **[24]** أن البيتالاكتاميز المستخلص من بكتريا *Proteus rettgeri* ذي وزن جزيئي بحدود 42,000 . نتائج الدراسة الحالية تطابق النتائج التي توصل أليها**[25]** عندما وجدا أن الوزن الجزيئي البيتالاكتاميز المستخلص من بكتريا*Proteus vulgaris* كان بحدود (32,000) دالتون .

أستخدمت طريقة تبئير الشحنة Isoelectric Focusing (IEF) لتعيين نقطة التعادل الكهربائي للشحنة (pI), والتي تعد احدى الطرق الاساسية لتشخيص وتفريق انزيمات البيتالاكتاميز المشفرة بلازميديا"**[26]** .

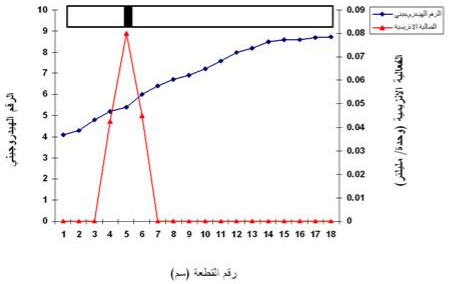
تظهر نتائج الدراسة الحالية وجود حزمة واحدة على الهلام ذات قيمة 5.4 للرقم الهيدروجيني لكلا الأنزيمين المستخلصين من العزلتين 4TF، 20TF ، وبذلك تبين أن نقطة التعادل الكهربائي (pI) لانزيم بيتالاكتميز تكون عند pH (5.4) شكل (6و7و8) , وهو الرقم الهيدروجيني الذي تكون فيه محصلة الشحنة التي يحملها الأنزيم صفراً أي النقطة التي يترسب عندها البروتين مما يسبب وقف حركته في هلام الترحيل الكهربائي ويظهر بشكل حزمة في ذلك الموقع **[17]** . أن ظهور حزمة واحدة من الهلام عند الرقم الهيدروجيني (5.4) عند تصبيغ الهلام بصبغة البروتين يعد دليلا" آخر على نقاوة الأنزيم الذي أخضع لخطوات التنقية السابقة.



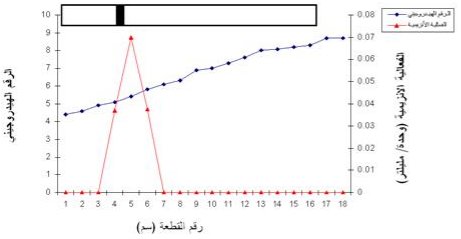
شكل (5) تعيين الوزن الجزيئي بيتالاكتميز المنقى المستخلص من العزلتين 4TF و 20TF كل على حدة بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام عمود هلام Sepharose 4-B (70×1.5) سم. سرعة جريان 30 مليلتر/ساعة.



شكل (6) نقطة التعادل الكهربائي بيتالاكتميز المنقى المستخلص من العزلتين 4TF,20TF بطريقة تبئير الشحنة .



شكل (7) نقطة التعادل الكهربائي للبيتالاكتميز المستخلص من العزلة4TF .



شكل (8) نقطة التعادل الكهربائي بيتالاكتميز المستخلص من العزلة20TF .

تتفق النتيجة التي توصلت أليها هذه الدراسة مع ما أشار أليه (Roy) **[27]** من أن معظم البكتريا المعوية السالبة لصبغة غرام والتي تمتلك مقاومة مضاد الأمبسلين و تشفر ألى أنزيمات البيتالاكتاميز نوع TEM-1 وبالذات Penicillinase من خلال جينات تدعى *bla*TEM فأنها تمتلك نقطة تعادل كهربائي تساوي 5.4 بأستثناء بكتريا *Klebsiella spp* فهي تشفر لأنزيمات من نوع SHV-1 ذات نقطة تعادل 7.6 . اشار الباحث **[28]** الى ان عزلات *Proteus mirabilis* تقاوم مضاد الاموكزاسلين بواسطة انزيم Penicillinase المشفر بلازميدا" وانه يعود الى TEM – 1 ذي نقطة التعادل الكهربائي 5.4 .أوضح الباحث **[29]** من خلال دراسة أجروها على بكتريا *Proteus mirabilis* معزولة سريرياً أن بعض أنواع هذه البكتريا تنتج البيتالاكتاميز من خلال جينات محمولة كروموسومياً تدعى *ampC* وأن هذه الأنزيمات لها نقطة تعادل كهربائي (5.6) وهي انزيمات من نوع TEM 2وأن بعضها الأخرمنها يمتلك جينات محمولة بلازميدياً تشفر ألى أنزيمات البيتالاكتاميز من نوع TEM 1 ذات نقطة تعادل كهربائي تساوي 5.4 , وبنفس الأتجاه أشار الباحث**[21]** الى أن عزلات *E.coli* التي خضعت للدراسة كانت تنتج البيتالاكتاميز من نوع TEM وهو يشفر من خلال جينات محمولة على بلازميد من نوع R-Plasmid وان هذه الأنزيمات تمتلك نقطة تعادل كهربائي تساوي 5.4 .

نستنتج مما سبق من الدراسات التي أجريت والمتضمنة دراسة عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من مرضى مصابين بالتهابات المجاري البولية ولفئات عمرية مختلفة والساكنين في مناطق مختلفة من بغداد لجانبي الكرخ والرصافة , ثم نتائج الدراسة الكيموحيوية التي شملت على تنقية انزيم **- β** lactamase والتي بينت تشابه الانزيمين المنقيين والمستخلصين من عزلتين مختلفتين لمريضين يسكن احدهما جانب الكرخ والاخر جانب الرصافة نستنتج من كل ما سبق أن عزلات *Proteus mirabilis* التي تمت دراستها تعود الى اصل واحد وهذا دليل على وبائية هذه البكتريا المنتشرة في بيئتنا المحلية **[30]**.

المصادر:

1. Bush, K.; Jacoby, G.A.; and Medeirose, A.A.(1995), A Functional classification scheme for β -lactamase and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents. Chemother . 39(6) : 1211-1233.
2. Sanders, C.C.; Thomoson, K.S. and Bradford. D.A. (1993)- Problems with the detection of β. lactam resistance among non-fastidious gram- negative bacilli. Infect. Dis. Clin. North. AM. 7 (2) : 411-424.
3. Amyes, S.G.and Gemmell, C.G. (1997), Antibiotic resistance. J. Med. Microboil, 96: 436-470.
4. Koch, A.L. (2000), Penicillin binding proteins β - Lactamase, and Lactamases: offensive, Attacks and Detersive counter measures, Microbiol. 26 (4) : 205-220.
5. Ambler. R.P. (1980), The Structure of β -Lactamases. Philos. Trans. R.Soc London. Biol. Sci. 289: 321-331.
6. Philippon, A.; Labia, Roger and Jacob, G.(1989), Extended-spectrum B- Lactamas- Antimicrob. Agents. Chemoth. 33 (8) : 1131-1136.
7. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; and Ginsberg, H.S. (1990), Microbiology. (4^{th}) ed. Philadelphia.
8. Datta, N & Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by Infections R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 208 (5007): 239 – 241.
9. Medeiros, A.A.(1997), Evolution and dissemination of B-Lactamases accelerated by generation of β -Lactam antibiotics. Clin. Infect. Dis.24 (1) : 519-549.
10. Sykes, R. B. and Richmond, M.H. (1971), R-Factors, β - lactamase and Carbenicillin resistent *Pseudomonas aeruginosa.* Lancet. 14 : 342 – 344.
11. Chaibi, E.B., Sedigheh, F., Peduzzi, J, and Labia, R (1996), An additional ionic bond Suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2 β

butyricum. Antimicrob. Agents. Chemother. 33 (8): 1302-1307.

21. Mathew, M.;Hed, ges, R.W.and Smith, J.T. (1979), Types of **β**-lactamases determines by plasmid in gram-negative bacteria. J. of Bacteriology. 138 (3) :657-662.

22. Richmond, M. and Sykes, N. B. (1973), In advances in Micrabal Physiology (A. H. Rose , ed) : PP . 31 – 88. Academic press, London & New York.

23. Hamilton, M.J.M. and Smith, J.T. (1979), Beta – Lactamase Academic Press, London, New York.

24. Matsura. M.; Nakazawa, H.; Inoue, M& Mitsuhashi, S. (1990). Purification and biochemical properties of beta Lactamase produced by *Proteus rettgeri*. Antimicrob. Agents. Chemother. 18 (5) : 687-690.

25. Yang **,** Y .& Livermor , D. (1988). Chromosomal beta –Lactamase expression and resistance to beta lactam antibiotics in *Proteus vulagaris* and *morganella morganili*. Agent. Chemother .32 (9) : 1385 – 91.

26. Huovines, S. (1988), Rapid isoelectric Focusing of plasmid – metiated β -Lactamases with pharmacia phast system. Antimicrob. Agents. Chemother. 32 (11) :1730-1732.

27. Roy, C.; Egura, S.; Triado, R.R.; Herminda, D. and Foz, A. (1985), Frequency of plasmid – determined-beta lactamases in 680 consecutivly isolated strain of Enterobactericease. Eur. J. Clin. Microbiol . 4 :146-147.

28. Philippon,A.;Arlet,G. and Iagrane, H. (1994), Origin and impact of plasmid-mediated extended – Spectrum B-lactamase gene produce by a clinical isolate of *Proteus mirabilis.* Antimicrob. -Lactamases. FEMS. Microbiol. Lett.143 : 121-125.

12. Neu**,** H.C.; Richmond, M.; Mitsuhashi, S.; Nord, C.E.; Knowles, J.R. and Sutherland, R.(1980), Beta-Lactamase amajor from bacterial resistance cited by Mitsuhashi, S.(edt) R-factor. University of Tokyo. Press. Tokyo : 73-88.

13. Weideman, B.; Klieloe; C. and Kreskn, M. (1989), The epidemiology of β -lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 24 (suppl B) : 1-22.

14. Date, J. W. and Smith, J.T. (1971), The purification and properties of the β-Lactamase specified by resistance factor R –1818 in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Biochem. J. 123: 493-500.

15. Novick, P. P. (1962), Micro – Iodometric assay for penicillinase. Biochem. J. 83 : 236 – 240.

16. Lowery, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the phenol reagent. J. Bio;. Chem.193 :265-275.

17. Wrigley, C.W. (1971), Electrofocusing. In: Methods in Enzymology (ed. Jokoby, W.B.) 22: 559-565. Academic Press. New York.

18. Melling, J & Scott, G.K. (1972), Prepartion gram Quantities of a purified R- Factor- Mediated penicillinase from *E.coli s*train W 3310. Biochem. J. 130 : 55-62

19. Datta, N and Kontomichalou, P. (1965), Penicillinase synthesis controlled by Infections R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature. 208 : 239 – 241.

20. Kesado.T. ; Lindovist. L; Hedlbergo, M.; Tuner, Kand Nord, C. E. (1989), Purification and charecterization of new β -Lactamase from *Clostrdium*

Agens. Chemother. 27 (5) : 715-719.

29. Bret,L.; Claris, C.; Sirot, D.; Chaibi, E.B., Labia, R. and Sirot, J. (1998), Chromosomally enconded AmpC-Type B- lactamase in a Clinical isolate of *Proteus mirabilis* . Antimicrobial Agents. Chemother. 43 : 2051-5.

30. الطـائي ، هـادي رحمـن (2005) . دراسـة بكتريولوجيـة كيموحيويـة وجزيئيـة لبكتريـا *Proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجـاري البوليـة فـي بعض مستشـفيات مدينـة بغداد . أطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة المستنصرية .

Isolation and Purification of β-lactamase from *Proteus mirabilis* local isolates 4TF and 20TF

Essam F. Al-Jumaily* ***Hadi R.R. Al-Taai****

Ala'a S. Abbas** ***Hussan H. Khanaeqah******

* Biotechnology Dept. Genetic Engineering and Biotechnology Institute for post studies –Baghdad University

** Ministry of Science and Technology

*** Clinical analysis, Dept-Al-Maamon college university.

**** The President of Kirkuk University –Kirkuk

Key words: **β** –lactamase, ***Proteus mirabilis***, gel filtration, Molecular, isoelectric point**.**

Abstract

Proteus mirabilis **β** -lactamase of local isolates number 4TF represent karkh side and 20TF represent rusafa side of Baghdad were extracted and purified 23.17, 25.23 fold with yield of 36.66 %, 37.5% and specific activity 11.8, 12.6 of unit/ mg protein by DEAE –cellulose and Sepharose 4B (respectively).Molecular weight of both enzyme was about 35500 Dalton determined by gel filtration. The study indicated that the isoelectric point of purified **β** -lactamase that extracted from isolate number 4TF and 20TF was 5.4.