Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 2 (05-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Identification and Purification of a hemolysin from *Bacillus* group by Zymography method

Niloofar Sasani[1], Hassan Mohabatkar [1], Giti Emtiazi[2]

1. Department of Biotechnology, Faculty of advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2014/09/11
Accepted: 2015/01/02
Available online:2015/06/10

**Article Subject:**
Microbial Biotechnology

**IJMM 1394; 9(2): 63-68**

**Corresponding author at:**

**Dr. Giti Emtiazi**

**Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.**

**Email:**
**emtiazi@yahoo.com**

## *Abstract*

**Background and Aim:** Hemolysin is an extracellular protein which is secreted by many pathogenic and non-pathogenic bacteria. This protein is mostly active on plasma membrane of red blood cells. The objective of this study was to extract hemolysin from *bacillus* strains producing it, measure the molecular weight, and identify the functional characteristics of this enzyme.

**Materials and Methods:** At first, hemolysin-producing *bacillus* strains were identified and then the strongest one was isolated. The hemolysin produced by this bacterium was extracted using Zymography and the effect of lysing it on blood agar medium was studied. Finally, SDS-PAGE method was used to measure the molecular weight of hemolysin. A new method was applied for purification and analysis of properties of the produced hemolysin.

**Results:** Among the 8 studied strains, M3, with the access number of KC577596.1, was the best and strongest strain degrading blood on blood agar medium. The hemolysin produced by this strain was extracted and its lysis properties were studied. SDS-PAGE method showed that this strain of *bacillus* is able to produce two types of hemolysin with molecular weights of 13 and 23 kDa.

**Conclusions:** According to the results, the studied strain, which was firstly isolated at Microbiology laboratories of University of Isfahan, contains a strong type of hemolysin with a high lysis power. Given the high power of lysis of this hemolysin and as M3 strain of *bacillus* is non-pathogenic, various applications of this protein can be used in industrial and medical sectors.

**Key Words:** Bacillus, Hemolysin, Zymography

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

Sasani N, Mohabatkar H. Identification and Purification of a hemolysin from Bacillus group by Zymography method. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (2) :63-68

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

# شناسایی و خالص‌سازی همولیزین گروهی از باسیلوس‌ها به روش زایموگرافی

نیلوفر ساسانی[۱]، حسن محبت کار[۱]، گیتی امتیازی[۲]

۱. گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

*اطلاعات مقاله*

**تاریخچه مقاله**

**دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۲۰**

**پذیرش:۱۳۹۳/۱۰/۰۴**

**انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۳/۲۰**

**موضوع:**

بیوتکنولوژی میکروبی

**IJMM 1394; 9(2): 63-68**

**نویسنده مسئول:**

**دکتر گیتی امتیازی**

**گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.**

**تلفن:** ۰۳۱۳۷۹۳۲۴۵۷

**پست الکترونیک:**

**emtiazi@yahoo.com**

## چکیده

**زمینه و اهداف:** همولیزین یک پروتئین خارج سلولی است که توسط بسیاری از باکتری های بیماری‌زا و غیر بیماری زا ترشح می شود. سطح فعالیت همولیزین غشای پلاسمایی گلبول های قرمز خون می باشد. در این مطالعه استخراج همولیزین از سویه های باسیلوس تولید کننده آن، تعیین وزن مولکولی و بررسی خصوصیات عملکردی این آنزیم مورد بررسی قرار گرفته شده است.

**مواد و روش کار:** باسیلوس‌های تولیدکننده‌ی همولیزین شناسایی شدند، سپس قویترین سویه تولید کننده جداسازی گردید و همولیزین تولیدی توسط این باکتری استخراج شد. با استفاده از روش زایموگرافی اثر لیز این سم بر محیط بلاد آگار مشخص شد. در نهایت با استفاده از روش SDS-PAGE وزن مولکولی آن تعیین گردید. در این مطالعه روش جدیدی برای خالص‌سازی و بررسی خاصیت همولیزین به کارگرفته شده‌است.

**یافته‌ها:** از میان ۸ سویه مطالعه شده، سویه *M3* با شماره دسترسی *KC577596.1* بهترین و قوی-ترین سویه تجزیه کننده‌ی خون در محیط آگار خون‌دار بود. همولیزین تولیدی توسط این باکتری استخراج شد و خصوصیات لیز کنندگی آن بررسی گردید روش *SDS-PAGE* نشان داد این سویه قادر به تولید دو همولیزین با وزن مولکولی ۱۳ و ۲۳ کیلو دالتون می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** این سویه اولین بار در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان جداسازی شده است. این باکتری دارای همولیزین قوی با قدرت لیز کنندگی بالایی می‌باشد. با توجه به قدرت بالا ی لیز این همولیزین و عدم بیماری‌زایی سویه *M3* این پروتئین می‌تواند به اهداف گوناگون در زمینه‌های صنعتی و درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی :** باسیلوس، همولیزین، زایموگرافی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

باسیلوس‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبتی هستند که در هر سلول اندوسپورهای مقاوم به شرایط نامساعد تشکیل می‌دهند. شکل ظاهری و اندازه کلنی در باسیلوس‌ها بسیار متغیر است. اعضای این جنس قادر به ترشح محدوده‌ی وسیعی از آنزیم‌ها و سموم به محیط پیرامون خود هستند. به طور کلی باسیلوس‌ها به دو گروه عمده و اصلی تقسیم می‌شوند که شامل گروه *باسیلوس سرئوس* و گروه *باسیلوس سوبتلیس* می‌باشند (۱، ۲). همولیزین‌ها کلاس بزرگی از سموم پروتئینی و معمولاً فاکتورهای بیماریزای مهمی به حساب می‌آیند، این سموم حفره‌هایی را در غشای پلاسمایی سلول‌های یوکاریوتی ایجاد می‌کنند که این حفرات باعث از بین رفتن تعادل یونی غشاء و در نتیجه مرگ سلولی می‌شود (۳، ۴). به این سموم، سموم آسیب‌زننده به غشا یا MDT نیز گفته می‌شود (۵) و در میان آنها گروه گسترده‌ای از سموم ایجاد کننده‌ی حفره یا PFT وجود دارند. جالب اینجاست که توانایی تولید سموم ایجاد کننده‌ی حفره در طول تکامل در بین کرم‌ها، گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی اخیراً انسان‌ها

نشان داده شده است (۶، ۷). مهمترین اعضای PFT نوعی سموم وابسته به کلسترول است که در غشاء سلولی فقط در حضور کلسترول قادر به اولیگومریزاسیون می‌باشد که به آنها Cholesterol Depending Toxin گفته می‌شود. ساختار و عملکرد مرتبط با CDTها در چهار گونه‌ی باکتریایی از جمله استرپتوکوک، لیستریا، کلستریدیوم و باسیلوس شناخته شده است (۸، ۹). در واقع کلسترول به عنوان گیرنده برای این سموم عمل می‌کند، جایگاه اتصال این سم در لیپوزوم و غشای سلولی از این نظریه حمایت می‌کند که کلسترول به عنوان یک گیرنده برای این سموم عمل می‌کند (۱۰). اهدافی که در این تحقیق دنبال شد شامل بررسی باسیلوس‌هایی با قویترین همولیزین‌ها با استفاده از Hemolysin assay و جداسازی بهترین سویه‌ها، زایموگرافی آنزیم مورد نظر و در نهایت تعیین وزن مولکولی آن می‌باشد. هدف اصلی از این پروژه بهره‌برداری از این آنزیم به عنوان ماده‌ایی کاربردی در آینده‌ایی نه چندان دور در صنایع شوینده برای رفع لکه‌های خونی بر روی پارچه‌ها و همچنین برای لیز و از بین بردن لخته‌های خونی در گرفتگی عروق می‌باشد با وجود قدرت تجزیه‌کنندگی بالای این پروتئین بر روی ترکیبات خونی و عدم بیماری‌زایی این نوع همولیزین در انسان، می‌تواند به عنوان ماده‌ایی مفید و کاربردی مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی سویه‌ها

در ابتدای این پژوهش، ۸ سویه باسیلوس اسپوردار شامل *باسیلوس پامیلوس* ZED17، *باسیلوس پامیلوس* SB3002، *باسیلوس سوبتلیس* و سویه‌های M14، M11، M19، M3 و S10 از آب دریا جداسازی و مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. این سویه‌ها در محیط بلاد آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. پس از این زمان، پلیت‌ها به منظور توانایی لیز سلول‌های خونی و ایجاد هاله همولیز مورد بررسی قرار گرفتند.

### غربالگری همولیزین

روش سنجش همولیزین (Hemolysin assay) برای بررسی میزان قدرت همولیزین در تجزیه گلبول‌های قرمز خون به کار می‌رود، و با این روش قوی‌ترین همولیزین با درصد لیز بالا شناسایی می‌شود. طبق این آزمایش سویه‌های فوق را، به ۲۵ میکرولیتر از ۱۰٪ خون شسته شده‌ی گوسفند اضافه و سپس این مخلوط در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از آن ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط را به ۱۰۰ میکرولیتر بافر سالین اضافه کرده و در دور g× ۱۳۰۰۰ برای ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شد. در نهایت جذب مایع رویی در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازگیری شد. برای به دست آوردن درصد تجزیه گلبول‌های قرمز خونی مقدار جذب هر نمونه را بر میزان جذب کنترل تقسیم کرده، در اینجا کنترل شامل خون شسته شده به همراه آب می‌باشد که قادر به تجزیه‌ی ۱۰۰٪ گلبول‌های قرمز خونی است (۱۱).

### استخراج همولیزین به روش زایموگرافی

پس از شناسایی بهترین سویه با قوی‌ترین آنزیم تولیدی با کمک روش سنجش همولیزین، استخراج پروتئین مورد نظر از باکتری انجام گرفت. برای این کار ابتدا محیط کشت بلاد آگار با سرم فیزیولوژی شسته و سپس این ترکیب سانتریفوژ شد. مایع رویی با استفاده از نمک آمونیوم سولفات ۶۰٪ اشباع گردید، نمک به آرامی به مایع رویی اضافه شده تا به حالت اشباع برسد (تا جایی نمک را اضافه می‌کنیم که دیگر قابل حل شدن در محیط نباشد). پس از ۲۴ ساعت ترکیب حاصل را سانتریفوژ کرده تا نمک از مخلوط پروتئینی جداسازی شود سپس مایع رویی را دور ریخته و رسوب ته ظرف با سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد. بعد از آن محلول به دست آمده را در درون کیسه دیالیز ریخته تا پروتئین‌ها جداسازی شوند این کیسه غشائی است نیمه تراوا، که یون‌ها به راحتی از میان جداره آن عبور می‌کنند، ولی مولکول-های بزرگی مثل پروتئین‌ها قابلیت عبور از این جداره را نداشته، درون کیسه باقی می‌مانند. بعد از ۲۴ ساعت مایع رویی زردرنگی به دست آمد که حاوی پروتئین مورد نظر است برای حصول اطمینان از حضور همولیزین و جداسازی آن از سایر پروتئین‌های ترشحی باکتری SDS-PAGE و زایموگرافی انجام شد (۱۲). اندازه‌گیری پروتئین تام به روش برادفورد یک آزمایش مهم برای سنجش میزان غلظت پروتئین تولیدی می‌باشد و قبل از انجام SDS-PAGE و زایموگرافی میزان غلظت پروتئین مورد استفاده باید مشخص گردد. در اینجا ۲۰۰ میکرولیتر مایع رویی محیط که به اندازه کافی رقیق شده است با ۸۰۰ میکرولیتر از محلول برادفورد ترکیب و کاملاً مخلوط شدند و جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تهیه نمونه شاهد منفی

(Blank) مقدار ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۸۰۰ میکرولیتر از محلول برادفورد ترکیب شد (۱۳). برای انجام زایموگرافی از الکتروفورز ژل ۱۲٪ استفاده شده است. پس از الکتروفورز، ژل به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در درون تریتون X-100 ۲/۵ درصد قرار گرفت تا SDS موجود در درون ژل شسته شود. سپس با آب مقطر ژل را به طور کامل شستشو داده تا این دترجنت به صورت کامل حذف گردد. در ادامه ناحیه‌ی مورد نظر که محل حضور پروتئین همولیزین است را بر اساس مشاهده‌ی هاله‌ی لیز شده در بلاد آگار با استفاده کاتر از ژل جدا کرده و در درون بافر محلول کننده (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم-کلراید و ۰/۱ میلی‌مولار EDTA در pH ۷/۵ می‌باشد) ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه گردید. بعد از آن محلول حاوی ژل و بافر سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی را برداشته و برای اطمینان از اینکه پروتئین از ژل SDS-PAGE جداسازی شده، و این ماده خاصیت همولیتیک خود را حفظ کرده است بر روی سوبسترای خود یعنی خون دفیبرینه‌ی گوسفند ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. حضور ناحیه‌ی لیز شده بیانگر جداسازی پروتئین مورد نظر از ژل بود. برای تخمین وزن مولکولی همولیزین جداسازی شده از تکنیک سدیم دودسیل- پلی‌آکریل‌آمید ۱۲٪ ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده گردید.

## یافته‌ها

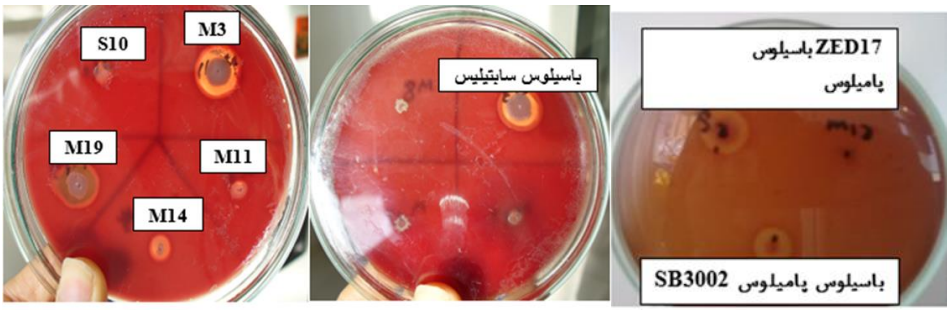
از ۸ باکتری مورد مطالعه، همه باکتری‌ها در حضور سوبسترای خود یعنی خون دفیبرینه گوسفند قادر به تولید همولیزین بودند و الگوی همولیز را در محیط بلاد آگار ایجاد می‌کردند (شکل ۱). در نتیجه تمامی ۸ سویه همولیزین را تولید کرده اما برخی سویه‌ها بیشتر و با توانایی قدرت تجزیه حداکثر این سم پروتئینی را تولید می‌کنند. همولیز خون توسط باسیلوس‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که بیشترین همولیز خون به ترتیب مربوط M3، M19، *باسیلوس سوبتلیس*، *باسیلوس پامیلوس* ZED17، *باسیلوس پامیلوس* SB3002، M14، M11 می‌باشد. در جدول ۱ قطر هیدرولیز باکتری‌های مورد مطالعه بیان شده است، پس از مشاهده‌ی قدرت همولیز بر اساس الگوی تجزیه خون در محیط بلاد آگار ۴ سویه اول از میان ۸ سویه اصلی جداسازی گردید. برای شناسایی بهترین سویه از بین ۴ سویه‌ی فوق با استفاده از آزمایش سنجش همولیزین، میزان همولیزین تولیدی توسط این باکتری‌ها بررسی شد و قوی‌ترین همولیزین توسط بهترین سویه که قادر به لیز میزان بیشتری از گلبول‌های قرمز خون بود جداسازی گردید. طبق نتایج به‌دست آمده در جدول ۲ همولیزین سویه M3 که در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان شناسایی و جداسازی شده بالاترین درصد تجزیه گلبول‌های قرمز خونی را در بین سایر سویه‌های مورد مطالعه داراست. برای استخراج همولیزین از روش زایموگرافی استفاده شد. در این بخش چندین هاله‌ی شفاف بر روی بلاد آگار ظاهر گردید، که این نواحی نشانگرحضور پروتئین مورد نظر بود. برای استخراج از ژل از این نواحی استفاده شد. نواحی حاوی آنزیم که با استفاده از زایموگرافی به دست آمده در شکل ۲ نشان داده شده است. پس از مشاهده‌ی هاله‌ی قوی همولیز در اطراف باندهای ژل زایموگرافی، نواحی حاوی آنزیم را که در شکل مشخص شده، از باقی مانده‌ی ژل جداسازی کرده و همولیزین تولیدی از بخشی از ژل استخراج گردید. پس از استخراج برای اطمینان از به دست آوردن پروتئین همولیزین مورد نظر، این آنزیم استخراج شده را بر روی بلادآگار ریخته و با مشاهده‌ی تجزیه خون و هاله‌ی لیز شدگی در اطراف محل ریختن محلول پروتئین از استخراج ۱۰۰٪ این پروتئین اطمینان حاصل شد. براساس اندازه‌گیری غلظت پروتئین به دست آمده به روش برادفورد، میزان همولیزین استخراجی ۲۲ µg/ml بوده است. پس از استخراج همولیزین از ژل زایموگرافی و سنجش فعالیت تجزیه‌کنندگی آن بر روی بلاد آگار نوبت به تعیین وزن مولکولی پروتئین مورد نظر رسید. برای تعیین وزن مولکولی از ژل SDS-PSGE، ۱۲٪ استفاده گردید، باندهای پروتئینی به صورت نوارهای آبی رنگ بر روی ژل ظاهر شد، وزن مولکولی دو باند اصلی به ترتیب ۱۳ کیلو دالتون و ۲۳ کیلو دالتون طبق شکل ۳ می‌باشد.

جدول ۱: نتایج همولیز باسیلوس‌های موردمطالعه و اندازه‌گیری قطر هاله

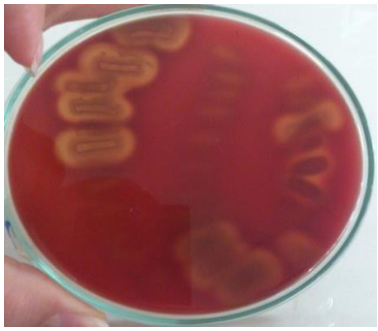
| قطر هاله (mm) | همولیز | باکتری |
|---|---|---|
| ۲ | + | M14 |
| ۳ | + | سویه‌باسلیوس‌پامیلوس ZED17 |
| ۳ | + | سویه باسیلوس *سوبتلیس* |
| ۴ | + | M3 |
| – | - | S10 |
| ۳ | + | M19 |
| ۲ | + | باسیلوس پامیلوس SB3002 |
| ۱ | + | M11 |

جدول ۲: میزان همولیزین تولیدی در باسیلوس‌های مورد مطالعه در طول موج ۴۹۰ نانومتر

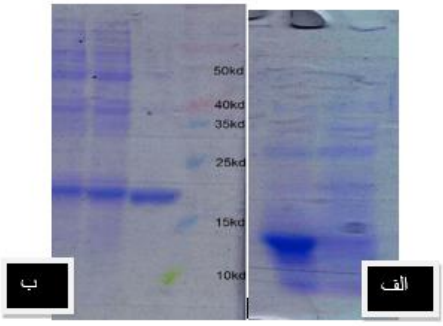
| ترکیب مورد نظر برای سنجش در طول موج ۴۹۰ نانومتر | میزان جذب‌به نانومتر | درصدتجزیه هموگلوبین |
|---|---|---|
| سویه M3 | ۰/۲۱۶ | ٪۵۷ |
| سویه‌باسلیوس‌پامیلوس ZED17 | ۰/۱۸۴ | ٪۴۹ |
| سویه‌باسیلوس *سوبتلیس* | ۰/۱۴۳ | ٪۳۸ |
| سویه M19 | ۰/۱۰۹ | ٪۲۹ |
| کنترل (خون شسته شده + آب) | ۰/۳۷۵ | ٪۱۰۰ |




شکل ۱: کشت باسیلوس های مورد مطالعه در محیط بلاد آگار به صورت سوزنی برای اندازگیری قطر هاله‌ی لیز در اطراف محل رشد باکتری و بررسی قدرت همولیز خون در آن‌ها



شکل ۲: قرار دادن قطعات ژل حاصل زایموگرافی در محیط بلاد آگار به عنوان سوبسترای آنزیم همولیزین و مشاهده هاله¬ی لیزکنندگی قوی در اطراف باند های به دست آمده.




شکل ۳: ژل SDS-PAGE برای تعیین وزن مولکولی پروتئین مورد نظر پس از استخراج. دو باند اصلی مربوط به همولیزین و بقیه باندها ایزوآنزیم های مرتبط با همولیزین هستند. الف) مربوط به باند انتهایی ژل ۱۳ کیلو دالتون و ب) مربوط به باند میانی ژل۲۳ کیلودالتون

## بحث

بسیاری از اعضای خانواده‌ی باسیلوس قادر به تولید همولیزین هستند. شباهت‌های بسیاری بین همولیزین‌های تولید شده توسط خانواده‌ی باسیلوس وجود دارد از این رو نمی‌توان از همولیزین به عنوان معیاری برای شناسایی باکتری مورد نظر در این خانواده استفاده کرد (۱۴). شناخته شده‌ترین همولیزین‌ها در خانواده‌ی باسیلوس‌ها مربوط به *باسیلوس سرئوس* می‌باشد، که شامل انواع مختلف از همولیزین‌ها می‌باشد. از جمله سرولیزین O یا همان همولیزین یک، که در سال ۱۹۶۷ توسط Gradinski شناسایی و خالص‌سازی گردید (۱۵).

برخی از مطالعات نشان داده است که میزان پتاسیم و روبیدیوم آزاد شده از گلبول‌های قرمز آغشته به سم می‌تواند به عنوان یک عامل برای بررسی میزان تجزیه گلبول‌های قرمز خون استفاده شود (۱۶). یک روش حساس دیگر برای اندازه‌گیری میزان تجزیه‌ی گلبول‌های قرمز خون تعیین میزان ATP رها شده از اریتروسیت‌ها با روش بیولومینسانس می‌باشد که توسط Fehrenbach در سال ۱۹۸۰ توضیح داده شد و از این روش برای بررسی کینتیک گلبول‌های قرمز خون تجزیه شده به وسیله‌ی همولیزین‌های تولیدی توسط باکتری‌ها استفاده می‌شود (۱۷).

مطالعات زیادی بر روی انواع همولیزین‌ها و روش‌های استخراجی آن‌ها در طول دوره‌های مختلف توسط محققین انجام گرفته است. Berk در سال ۱۹۶۲ موفق به استخراج همولیزین *سودموناس آئروژینوزا* گردید، Jenkins و همکارانش در سال ۱۹۶۴ همولیزین *لیستریا مونوسیتوژنز* را استخراج کردند (۱۸)، Haque و همکارانش در سال ۱۹۹۱ موفق به استخراج همولیزین *کلستریدیوم بوتولینوم* شدند (۱۲)، Miyoshi و همکارانش در سال ۱۹۹۷ موفق به جداسازی همولیزین از *ویبریو می‌میکوس* شدند (۱۹)، در سال ۲۰۰۲ Kothary و همکارانش موفق به استخراج همولیزین *ویبریو فلوویالیس* شدند (۲۰)، Lim و همکارانش در سال ۲۰۰۵ همولیزین *بورخودلیا سودومالئی* را استخراج کردند (۲۱)، در سال ۲۰۰۶ Zhong و همکارانش همولیزین *ویبریو هاروای* را استخراج کردند (۲۲)، Jia و همکارانش در سال ۲۰۱۰ همولیزین *ویبریو آلژینولیتیکوس* را استخراج کردند (۲۳) و در سال ۲۰۱۳ Ong و همکارانش موفق به استخراج همولیزین از *سالمونلا انتریکا* شدند. در این پژوهش ما بر روی همولیزین سویه‌ای جدید از خانواده‌ی باسیلوس‌ها که یک سویه ای بومی می‌باشد و با عدد دسترسی KC577596.1 در NCBI ثبت شده است تمرکز کرده‌ایم. همولیزین تولیدی توسط سویه‌ی M3 قادر به تجزیه کامل گلبول‌های قرمز در محیط بلاد آگار بوده و الگوی همولیز این سویه از نوع همولیزβ می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده، در این تحقیق دو نوع همولیزین از باندهای زایموگرافی سویه M3 استخراج شده است که دارای وزن مولکولی ۲۳ و ۱۳ کیلو دالتون می‌باشند. وزن مولکولی بسیاری از همولیزین‌های تولیدی توسط سایر باسیلوس‌ها از جمله *باسیلوس سرئوس* که شامل چهار نوع همولیزین می‌باشد به ترتیب زیر است، سرولیزین دارای وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون همولیزین دو دارای وزن مولکولی ۴۲ کیلو دالتون، همولیزین ۳ دارای وزن مولکولی ۲۴ کیلو دالتون و سیتوتوکسین K دارای وزن مولکولی ۳۴ کیلو دالتون می‌باشد (۲۴)، انترولیزین O دارای وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون است و وزن مولکولی تورنجیولیزین O ۵۲ کیلو دالتون می‌باشد (۲۵). این اندازه‌ها نشان می‌دهد همولیزین استخراج شده وزن مولکولی تقریباً نزدیکی به سایر اعضای خانواده‌اش دارد. تاکنون روش‌های بسیاری برای استخراج همولیزین باکتری‌های مختلف به کار رفته است، ما در این تحقیق روش متفاوت و جدیدی را برای جداسازی این پروتئین با استفاده از زایموگرافی به کار برده‌ایم. استفاده از این روش، کم هزینه و آسان بوده و می‌تواند جایگزین روش‌های استخراج قبلی مانند استخراج با استفاده از انواع ستون کروماتیوگرافی گردد. از زایموگرافی در بسیاری از پژوهش‌ها از گذشته تا به امروز برای بررسی فعالیت آنزیم و سوبسترای آن از جمله کازئین، کلاژناز، پروتئاز و ... بخصوص همولیزین استفاده شده است، اما تکنیک استخراج پروتئین همولیزین از ژل زایموگرافی تاکنون گزارش نشده است. ما برای اولین بار در این تحقیق توانستیم همولیزین نوعی باسیلوس را با استفاده از این تکنیک استخراج و خالص-سازی کنیم. همولیزین استخراج شده در این پژوهش می‌تواند بهینه‌سازی گردد و به منظور تولید انبوه برای استفاده درصنعت مورد بهره برداری قرار گیرد.

## تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل آزمایشگاه تحقیقات دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان به خاطر فراهم کردن شرایط مناسب برای انجام این پروژه کمال تشکر را دارند.

## تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

## References

1. Østensvik Ø, From C, Heidenreich B, O'sullivan K, Granum P. Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the B. cereus and B. subtilis groups in Norwegian surface waters. J Appl Microbiol. 2004;96(5): 987-993.

2. Priest FG, Goodfellow M, Todd C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. J Gen Microbiol. 1988; 134(7): 1847-1882.

3. Zdanovsky A, Zdanovskaya M, Yankovsky N. Bacterial toxins and their application. Mole Biol. 2000;34(2):168-174

4. Alouf J. Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. Folia Microbiol. 2003 ;48(1): 5-16.

5. Bernheimer AW, Rudy B. Interactions between membranes and cytolytic peptides. BBA-Rev Biomembranes. 1986;864(1):123-141.

6. Bischofberger M, Gonzalez MR, van der Goot FG. Membrane injury by pore-forming proteins. Curr Opin Cell Biol. 2009;21(4):589-595.

7. Iacovache I, van der Goot FG, Pernot L. Pore formation: an ancient yet complex form of attack. BBA-Biomembranes. 2008;1778(7-8):1611-1623.

8. Alouf JE, Geoffroy C. Production, purification, and assay of streptolysin O. Method Enzymol. 1988 Oct;165(2):52-59.

9. Billington SJ, Songer JG, Jost BH. Molecular characterization of the pore-forming toxin, pyolysin, a major virulence determinant of Arcanobacterium pyogenes. Vet Microbiol. 2001;82(3): 261-274.

10. Ohno-Iwashita Y, Iwamoto M, Mitsui K-i, Ando S, Iwashita S. A cytolysin, θ-toxin, preferentially binds to membrane cholesterol surrounded by phospholipids with 18-carbon hydrocarbon chains in cholesterol-rich region. J Biochem. 1991;110(3):369-375.

11. Beecher DJ, Macmillan J. Characterization of the components of hemolysin BL from Bacillus cereus. Infect Immun. 1991;59(5):1778-1784.

12. Haque A, Sugimoto N, Horiguchi Y, Okabe T, Miyata T, Iwanaga S, Matsuda M. Production, purification, and characterization of botulinolysin, a thiol-activated hemolysin of *Clostridium botulinum*. Infect Immun. 1992;60(1):71-78.

13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-254.

14. Beecher DJ, Wong A. Identification of hemolysin BL-producing *Bacillus cereus* isolates by a discontinuous hemolytic pattern in blood agar. Appl Environ Microbiol. 1994;60(5):1646-1651.

15. Gradinski-Vrbanac B, Stojevic Z, Milinkovic-Tur S, Balenovic T, Pirsljin J, Zdelar-Tuk M. In vitro susceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. Vet Med-Czech. 2002;47:303-308.

16. Blumenthal R, Habig W. Mechanism of tetanolysin-induced membrane damage: studies with black lipid membranes. J Bacteriol. 1984;157(1): 321-323.

17. Niedermeyer W. Interaction of streptolysin-O with biomembranes: kinetic and morphological studies on erythrocyte membranes. Toxicon. 1985;23(3): 425-439.

18. Jenkins E, Njoku-Obi A, Adams E. Purification of the soluble hemolysins of Listeria monocytogenes. J Bacteriol. 1964;88(2):418-424.

19. Miyoshi S-i, Sasahara K, Akamatsu S, Rahman MM, Katsu T, Tomochika K-i, Shinoda S. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. Infect Immun. 1997;65(5):1830-1835.

20. Kothary MH, Lowman H, McCardell BA, Tall BD. Purification and characterization of enterotoxigenic El Tor-like hemolysin produced by *Vibrio fluvialis*. Infect Immun. 2003;71(6): 3213-3220.

21. Lim K-P, Mohamed R, Embi N, Nathan S. Purification of A Burkholderia pseudomallei Antigen Via Antibody Mediated Affinity Chromatography. Asia-Pac J Mol Biol. 2005;13(2):71-78.

22. Zhong Y, Zhang X-H, Chen J, Chi Z, Sun B, Li Y, Austin B. Overexpression, purification, characterization, and pathogenicity of *Vibrio harveyi* hemolysin VHH. Infect Immun. 2006;74(10):6001-6005.

23. Jia A, Woo N, Zhang X-H. Expression, purification, and characterization of thermolabile hemolysin (TLH) from *Vibrio alginolyticus*. Dis Aquat Organ. 2010 ;90(2): 121-127.

24. Ramarao N, Sanchis V. The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus Cereus*: A Review. Toxins. 2013;5(6):1119-1139.

25. Alouf JE, Billington SJ, Jost BH. In: The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Joseph E. Alouf, Michel R. Popoff, editors. 3rd ed. Elsevier: Repertoire and general features of the family of cholesterol-dependent cytolysins. 2006. p. 643-658.