



Original Article

بررسی فعالیت سیتوسیدالی توکسین کریستالی باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی CCRF-CEM

الهام معظمیان^{۱*}، نیما بهادر^۱، منوچهر رسولی^۲، نگار آذرپیرا^۲، مهدی کلانی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، فارس، ایران.

۲- بخش ایمونولوژی مرکز تحقیقات میکروبیولوژی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۳- مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضاء، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۲۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۷/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: پاراسپورین، پروتئین پاراسپورال باسیلوس تورنجینسیس بوده و فعالیت سیتوسیدالی ویژه‌ای در برابر سلول‌های سرطانی انسان داراست. این توکسین مشابه توکسین‌های کریستالی حشره‌کش باسیلوس تورنجینسیس، به طور اختصاصی به بافت هدف اتصال یافته و در غشاء سلولی آسیب ایجاد می‌کند. در این تحقیق، سویه‌های مختلف باسیلوس تورنجینسیس از نقاط مختلف جغرافیایی ایران جداسازی شده و فعالیت سیتوسیدالی آن‌ها بر علیه سلول‌های رده CCRF-CEM و اریتروسیت‌های انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، ۵۰ نمونه خاک از استان‌های مختلف ایران تهیه شد و جداسازی سویه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته سازمان بهداشت جهانی انجام گردید. شناسایی نمونه‌های جداسازی شده، بر اساس بررسی ساختار کریستالی پروتئین Cry با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست و نوع توکسین پروتئینی Cry بر اساس SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. بعد از هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم پروتئیناز کال، فعالیت پروتئین بر روی رده سلولی بررسی گردید.

نتایج: پروتئین‌های انکلوژن پاراسپورال، سیتوتوکسیسیته متفاوتی را نسبت به رده سلولی CCRF-CEM نشان دادند ولی نسبت به سلول‌های لنفوسیت نرمال هیچ تاثیری نداشتند. پاراسپورین‌های جداسازی شده، فاقد فعالیت همولیتیکی در برابر اریتروسیت‌های انسانی بودند. به نظر می‌رسد این پروتئین‌ها توانایی افتراق بین لنفوسیت نرمال و سلول‌های سرطانی خون را دارا می‌باشد و دارای گیرنده اختصاصی بر روی رده سرطانی هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که توکسین پاراسپورین باسیلوس تورنجینسیس، در مناطق مختلف ایران یافت می‌شود.

کلمات کلیدی: باسیلوس تورنجینسیس، پاراسپورین، سلول سرطانی، پروتئین‌های Cry.

مقدمه

شناسایی شده و تحت عنوان پاراسپورین-۱، -۲، -۳ و -۴ دسته بندی شده اند (۳،۴).

مطالعات زیادی بر روی ویژگی‌های پاراسپورین‌ها و مکانیسم عمل آن‌ها بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی انجام شده است. مشخص گردیده که مکانیسم عمل این توکسین‌ها متفاوت بوده و بسته به نوع توکسین و ایزوله باکتری باعث ایجاد تاول در سطح سلول، تخریب میتوکندری و تخریب اسکلت سلولی می‌گردد (۵،۶).

در دو دهه گذشته، مطالعات اکولوژیکی وسیعی بر روی سویه‌های باسیلوس تورنجینسیس از محیط‌های طبیعی انجام شده و مشخص شده است که خاک، بهترین منبع برای جداسازی این ارگانیسم می‌باشد. خاک آسیا، بیشترین میزان باکتری باسیلوس تورنجینسیس و بالاترین تنوع را داراست (۷،۸).

در این تحقیق، سویه‌های مختلف باسیلوس تورنجینسیس از خاک مناطق مختلف جغرافیایی ایران جداسازی شده و تاثیر توکسین کریستالی پاراسپورین این باکتری بر روی رده سلولی سرطان خون

باسیلوس تورنجینسیس، یک باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است که در فاز اسپورزایی خود، انکلوژن‌های پاراسپورال کریستالی را تولید می‌کند. این انکلوژن‌ها حاوی یک یا چند پروتئین ضد حشرات هستند که برای لارو برخی از حشرات خاص و همچنین برای بعضی از نامتودها، کنه‌ها و پروتوزوئرها سمیت دارند. سویه‌های متنوعی از باسیلوس تورنجینسیس با پروتئین‌های انکلوژن مختلف شناسایی شده اند. در مطالعات مختلف تعداد زیادی از سویه‌های باسیلوس تورنجینسیس جداسازی شده‌اند که فاقد ویژگی حشره کشی بوده و پراکندگی آن‌ها از باسیلوس تورنجینسیس‌های حشره‌کش بیشتر است (۱،۲).

در سال ۱۹۹۹ برای اولین بار میزوکی دانشمند ژاپنی سویه‌هایی از باسیلوس تورنجینسیس را جداسازی نمود که توکسین آن‌ها غیرهمولیتیک بوده اما ویژگی سیتوسیدالی بر علیه سلول‌های سرطان انسانی نشان می‌داد. این دسته از توکسین‌های کریستالی، در دسته جدیدی به نام پاراسپورین نامگذاری شدند. چهار گروه از پاراسپورین‌ها شناسایی شده

* نویسنده مسئول: الهام معظمیان، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران. تلفن همراه: ۰۹۱۷۷۱۱۰۹۹۴
Email: elhammoazian@gmail.com

مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی باسیلوس تورنجینسیس: ۵۰ نمونه خاک از مناطق جغرافیایی مختلف ایران تهیه گردید. جداسازی ایزوله‌ها بر اساس روش تغییر یافته سازمان بهداشت جهانی انجام شد. در این روش ۵ گرم از خاک، در فویل آلومینیومی در دمای 80°C و به مدت ۵ ساعت در آون خشک، گرمخانه گذاری شد. سپس به 1°C گرم از نمونه خاک، ۱۰ میلی لیتر سرم نمکی اضافه شد و ور تکز گردید. ۱ میلی لیتر از این محلول در 80°C به مدت ۱۲ دقیقه گرمخانه گذاری و سپس ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده و رقت های ۱-۱۰ تا ۳-۱۰ از آن تهیه گردید. ۰/۱ از هر نمونه بر روی محیط لوریا آگار کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای 37°C ، کلنی‌های شبیه به باسیلوس تورنجینسیس جداسازی شدند. ایزوله‌ها از نظر تست بیوشیمیایی و تولید پروتئین کریستالی مورد بررسی قرار گرفت (۹).

مشاهده توکسین کریستالی: Cry به منظور مشاهده توکسین کریستالی Cry، باکتری در محیط نوترینت آگار حاوی ۲۰٪ آگار و ۲٪ نمک به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد تا وارد مرحله اسپورزایی گردد. به دنبال آن، توکسین با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده گردید (۱۰، ۱۱).

جداسازی پروتئین کریستالی و بررسی آن بر اساس SDS-PAGE خالص سازی و جداسازی کریستال‌های پروتئینی بر اساس روش بل و همکارانش انجام گرفت. ایزوله‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد تا باکتری‌ها وارد فاز اسپورزایی شوند. سپس دو لوپ از کلنی باکتریایی به لوله‌های اپندروف استریل حاوی یک میلی لیتر هیدروکسید سدیم سرد اضافه گردید. سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۵ دقیقه در دور 13000 rpm سانتریفوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد. سپس رسوب با ۱۴۰ میکرولیتر از ۱٪ SDS و ۱۰٪ مرکاپتواتانول به حالت سوسپانسیون در آمده و به مدت ۱۰ دقیقه به منظور جداسازی کریستال‌ها در دمای جوش قرار داده شد. پس از آن نمونه برای بار دوم به مدت ۱۰ دقیقه در دور 13000 rpm سانتریفوژ شده و ۱۴۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ جهت رسوب گذاری پروتئین به پلت اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ نگه داری شد. رسوب که اکنون به حالت سوسپانسیون در آمده، برای ۱۵ دقیقه در دور 10000 rpm سانتریفوژ شده و مایع رویی به آرامی برداشته شد. در نهایت SDS-PAGE (شامل بافر ۰/۱۵ مولار Tris/Cl با pH ۸/۸، ۳/۷۵ میلی مولار EDTA، ۰/۷۵ مولار سوکرز، ۰/۰۷۵٪ بروموفنل بلو، ۲/۵٪ SDS و ۷/۴ میلی مولار دی تیوتریتول) انجام گرفت. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرار داده شد و الکتروفورز با ۱۰٪ ژل پلی آکریل آمید در ۷۱۰۰ انجام پذیرفت. سپس ژل با محلول‌های استیک اسید، متانول و آب مقطر استریل تثبیت گردید و در نهایت به کمک رنگ کوماسی بریلینت بلو، رنگ آمیزی و مورد بررسی قرار گرفت (۱۲، ۱۳).

بررسی فعالیت همولیتیک: فعالیت همولیتیک توکسین بر روی اریتروسیت‌های انسان مورد آزمایش قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر خون انسانی را با محلول حاوی Tris-HCl با pH برابر با ۸ و NaCl ۰/۸٪ سه بار شستشو داده و اریتروسیت‌های رسوب داده شده در محلول ۲٪

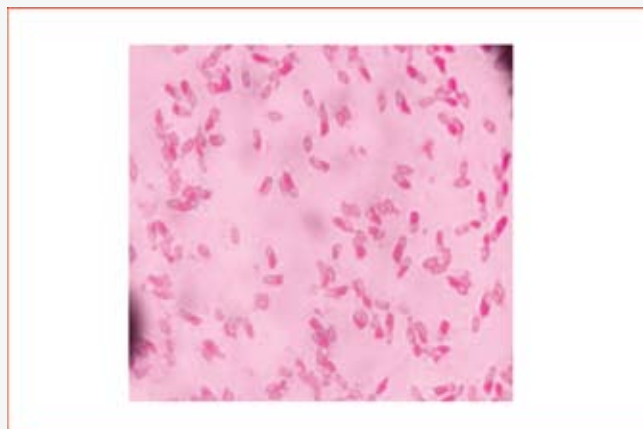
Tris-HCl و NaCl حل گردید. به منظور بررسی اثر توکسین کریستالی بر روی اریتروسیت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر اریتروسیت ۲٪ را در پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و به آن ۵۰ میکرولیتر محلول پروتئین خالص سازی شده با غلظت 1 mg/ml اضافه گردید. این مخلوط، به مدت ۱۸ ساعت در ۲۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد و درجه فعالیت همولیتیک آن با کمک الیزا ریدر و در جذب ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (۱۴).

کشت رده سلولی خون: رده سلولی خون از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. سلول‌ها در محیط کشت 1640R-MI حاوی ۱۰٪ آلبومین سرم گاوی، ۲ میلی مولار آل-گلوتامین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین کشت داده شدند. شمارش سلول‌ها با کمک هموسایتومتر انجام گردید. درصد سلول‌های زنده با تریپان بلو تعیین گردید (۱۵).

سنجش MTT و اثرات سیتوپاتیک: میزان سیتوتوکسیسیته پروتئین‌های کریستالی جداسازی شده، بر اساس تکثیر سلولی و با استفاده از تست MTT (۳-۵ و ۴-۵ دی متیل-۲-تترازولیل-۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید) مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در پلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد. هر چاهک حاوی ۹۰ میکرولیتر سلول (2×10^4 سلول) و ۱۰ میکرولیتر محلول پروتئینی تیمار شده با پروتئیناز کا (PK)، با غلظت‌های ۱۰۰ تا ۰/۰۰۱ میکرولیتر توکسین بوده و هر رقت توکسین در سه چاهک سنجش شد. سه چاهک دارای سلول و محیط کشت کامل ولی فاقد توکسین به عنوان کنترل استفاده گردید. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد و شامل ۵٪ دی اکسید کربن انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر محلول MTT به تمامی چاهک‌ها افزوده شد و پلیت به مدت ۳ ساعت گرمخانه گذاری گردید. در پایان، پس از برداشت محلول کشت، کریستال‌های رنگ فورمازان رسوب یافته در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن DMSO به هر چاهک حل گردید. شدت رنگ با دستگاه الیزا در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید (۱۶، ۱۷).

نتایج

جداسازی باسیلوس تورنجینسیس و مورفولوژی انکلوژن پاراسپورال: بعد از کشت باکتری بر روی محیط اسپورزا، باکتری‌های تولید کننده اسپور با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست به منظور تولید توکسین



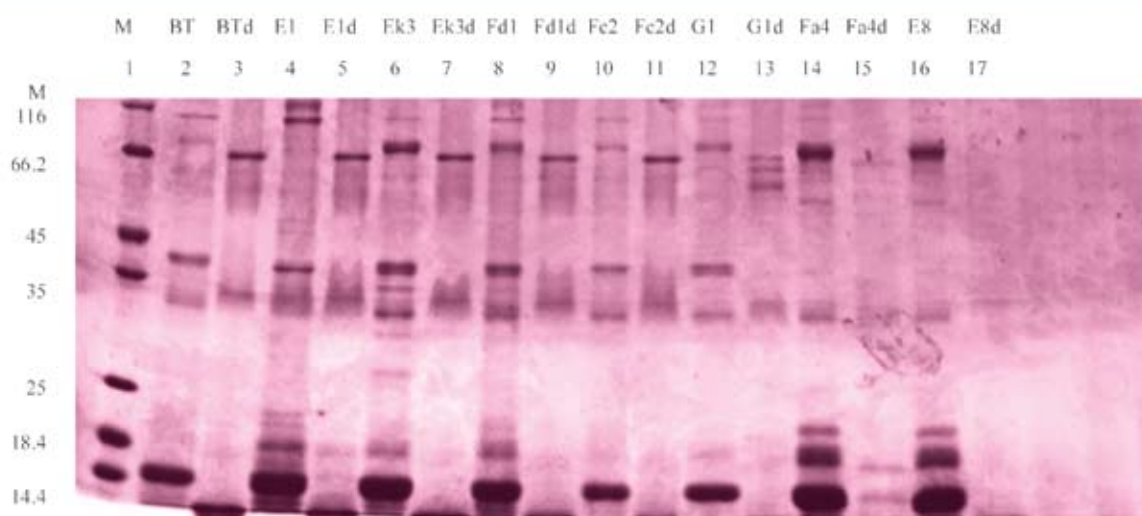
شکل ۱ - ساختار توکسین کریستالی باسیلوس تورنجینسیس اسپور این باکتری، شفاف و توکسین تیره رنگ دیده می‌شود.

کیلودالتون حاصل گردید (شکل ۲).

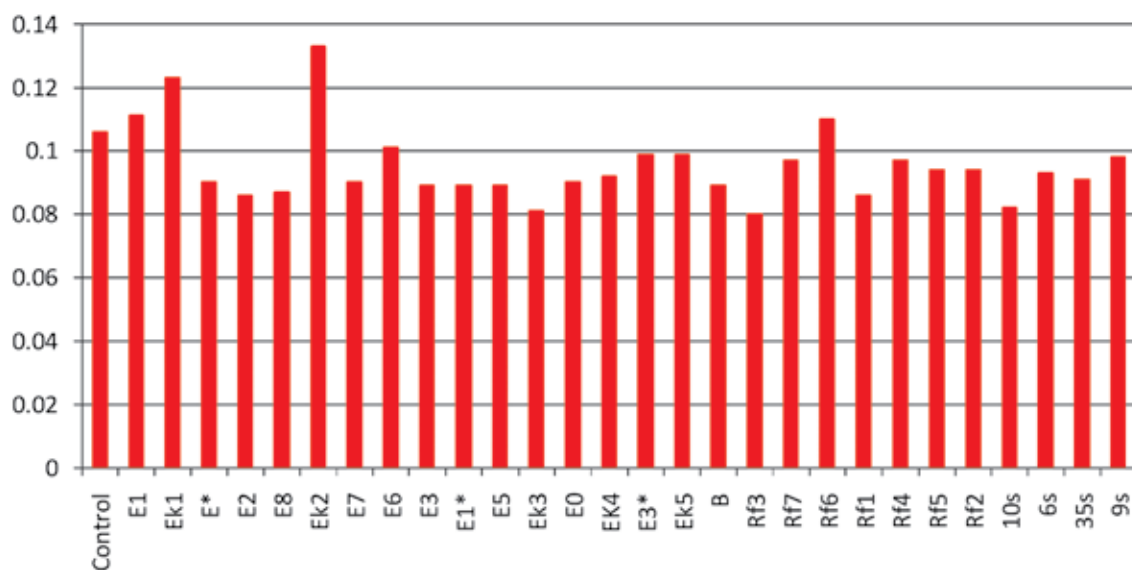
بررسی همولیز توکسین جداسازی شده: به منظور بررسی اثر توکسین کریستالی بر روی اریتروسیت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر اریتروسیت ۲٪ را در پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و به آن ۵۰ میکرولیتر از محلول پروتئین خالص سازی شده با غلظت 1mg/ml اضافه گردید. نمونه کنترل منفی در این آزمایش، اریتروسیت فاقد توکسین می‌باشد. پس از ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری در ۲۷ درجه سانتیگراد، جذب در ۵۴۰ نانومتر با کمک الیزا ریدر قرائت گردید. جذب بیشتر از ۱ به این معنی است که نمونه‌ها به شدت همولیتیک هستند. جذب بین ۰/۵ تا ۱، متوسط و بین ۰/۵ تا ۰/۲ نشانگر فعالیت همولیتیکی پایین است.

مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی ایزوله‌ها دارای توکسین کریستالی به شکل لوزی چسبیده به اسپور و در بعضی از نمونه‌ها توکسین به دو شکل لوزی و کروی کوچک تر از اسپور دیده شدند (شکل ۱).

فرآیندهای پروتئولیتیک و فعال نمودن توکسین: پروفایل پروتئینی پارسپورال‌های خالص سازی شده و حل شده در محلول قلیایی از ایزوله‌های باسیلوس تورنجینسیس با استفاده از SDS-PAGE بررسی گردید. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، انکلوژن‌های خام حاوی چندین پروتئین با الگوی متفاوت و وزن مولکولی ۱۲۰، ۱۰۳، ۸۸، ۴۰، ۳۲، ۲۰ و ۱۵ می‌باشند. بعد از تیمار با آنزیم پروتئیناز کا با غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، باندهایی با اندازه‌های ۶۴ و ۳۰



شکل ۲ - الکتروفورز پروتئین نمونه استاندارد تهیه شده از انگلستان (BT) و نمونه‌های باسیلوس تورنجینسیس جداسازی شده از اصفهان (E)، فسا (Fd, Fa, Fe) و گوهر دشت (G). ردیف M مارکر استاندارد وزن مولکولی {در کلیه نمونه‌ها، پروتئین کریستالی خالص سازی شده است. d: نمونه‌های پروتئینی خالص شده با آنزیم پروتئیناز کا با غلظت 60 µg/ml برش خورده است}.



نمودار ۱ - بررسی همولیز نمونه‌های باسیلوس تورنجینسیس جداسازی شده. Control: نمونه کنترل، E: نمونه‌های جداسازی شده از اصفهان، Rf: نمونه‌های جداسازی شده از رفسنجان، S: نمونه‌های جداسازی شده از شیراز.

شدند. سپس به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه تعداد 2×10^4 سلول اضافه شد. سپس دوزهای مختلف از توکسین به سلول‌ها اضافه گردید. توکسین تمامی نمونه‌های باسیلوس تورنجینسیس جداسازی شده، با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر به سلول‌های رده خون اضافه گردید. به دنبال آن، ایزوله‌هایی که تاثیر مثبت داشتند، انتخاب شده و با غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفتند (نمودار ۲).

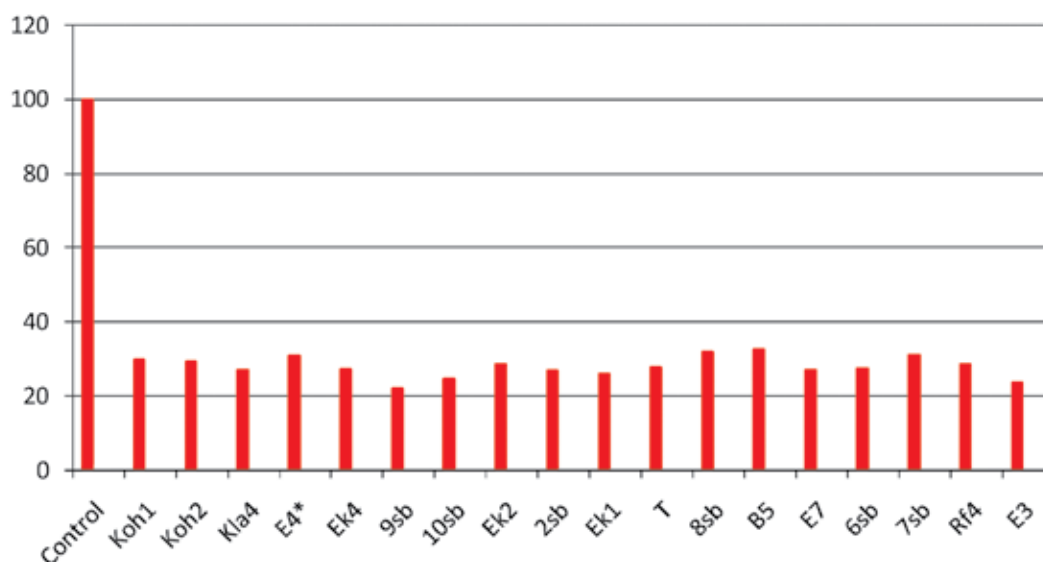
۱۸ نمونه‌ای که تاثیر مثبت سیتوتوکسیسیته بر روی رده سلولی خون داشتند، بر روی رده‌های سلول‌های لنفوسیت نرمال اثر داده شدند. پس از جداسازی سلول‌های لنفوسیت نرمال و شمارش آن‌ها، در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه به تعداد 2×10^4 سلول به حجم ۹۰ میکرولیتر و ۱۰ میکرولیتر توکسین از نمونه‌های جداسازی شده با

سویه‌هایی که شدت جذب نوری آنها کمتر یا مساوی ۰/۲ باشد، غیر همولیتیک هستند. کلیه سویه‌های جداسازی شده در این تحقیق دارای جذب نوری کمتر از ۰/۲ بودند و از این رو غیر همولیتیک می‌باشند (نمودار ۱).

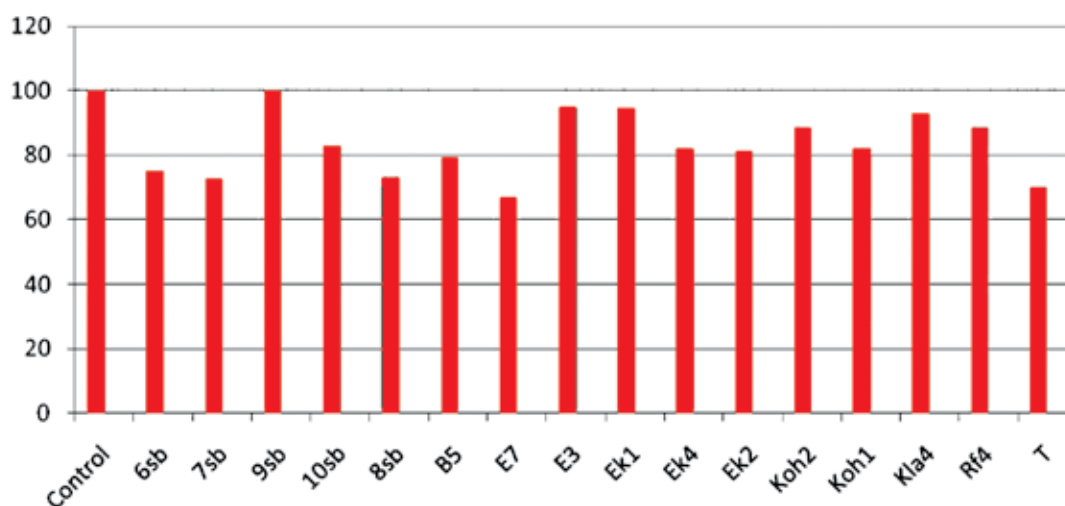
تأثیر توکسین باسیلوس تورنجینسیس بر روی رده سلولی خون: به منظور آنالیز نتایج درصد رشد و تکثیر سلول‌ها در هر رقت از توکسین، با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

درصد سلول‌های زنده = $100 \times (\text{شدت جذب بلانک} - \text{شدت جذب کنترل}) / \text{شدت جذب بلانک}$ (شدت جذب توکسین)

برای بررسی فعالیت سیتوتوکسیسیته توکسین پروتئینی کریستالی باسیلوس تورنجینسیس، ابتدا سلول‌های CCRF-CEM کشت داده



نمودار ۲- بررسی تاثیر ایزوله‌های جداسازی شده بر روی رده سلولی خون با غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر.



نمودار ۳- بررسی تاثیر ایزوله‌های جداسازی شده بر روی سلول‌های نرمال لنفوسیت با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر.

داشتند و کمترین میزان زنده ماندن در سلول ها ۶۵٪ حاصل گردید که مربوط به Ek1 می باشد. این ایزوله از خاک اصفهان جداسازی گردید. در این تحقیق، ایزوله‌هایی از *باسیلوس تورنجینسیس* از خاک ایران تهیه گردید که توکسین کریستالی آن‌ها تاثیر سیتوتوکسیسیته بر روی سلول های لنفوسیت نرمال نداشته ولی بر روی رده های سرطانی خون دارای حدود ۳۵٪ سیتوتوکسیسیته است. به نظر می‌رسد توکسین دارای گیرنده اختصاصی بر سطح سلول‌های سرطانی است ولی بر روی لنفوسیت‌های نرمال، فاقد گیرنده است. Namba و همکاران در سال ۲۰۰۳، فعالیت سیتوتوکسیسیته *باسیلوس تورنجینسیس* را بر روی سلول‌های T لوکمیای انسانی، لنفوسیت نرمال و رده HeLa مورد مطالعه قرار دادند. این گروه گزارش دادند که توکسین ایزوله جداسازی شده، دارای فعالیت سیتوتوکسیسیته ۱۰۰٪ در سلول های لوکمیای انسانی و ۲۵٪ بر روی لنفوسیت نرمال است (۲۱). بر روی سلول‌های رده HeLa میزان سیتوتوکسیسیته تنها ۸٪ است. Uemori در سال ۲۰۰۷، سویه‌ای از *باسیلوس تورنجینسیس* جداسازی نمود که دارای فعالیت سیتوتوکسیسیته قوی بر روی سلول های رده HeLa بود (۲۲). با توجه به تحقیقات انجام شده توسط محققان در سراسر جهان، مشخص است که سویه‌های جداسازی شده از مناطق جغرافیایی مختلف، دارای گیرنده‌ها و عملکردهای متفاوتی بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشند. به نظر می‌رسد که توکسین این باکتری به صورت اختصاصی عمل می‌نماید. امید است که تداوم این تحقیقات، منجر به استفاده از باکتری غیر بیماریزای *باسیلوس تورنجینسیس* در اهداف پزشکی گردد.

نتیجه گیری

باکتری *باسیلوس تورنجینسیس*، یک باکتری غیر بیماریزا برای انسان بوده ولی به عنوان حشره‌کش مورد استفاده تجاری می باشد. درصد فراوانی سویه‌های غیرحشره‌کش *باسیلوس تورنجینسیس* ۹۰٪ بیشتر از سویه‌های حشره‌کش است. در این تحقیق، سویه‌های *باسیلوس تورنجینسیس* از مناطق جغرافیایی ایران جداسازی شدند و فعالیت سویه‌های غیر همولیتیک این باکتری بر روی لنفوسیت نرمال و رده سلولی خون مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. در این میان، سویه‌ای جداسازی گردید که میزان سیتوتوکسیسیته آن بر روی رده سلول خونی ۳۵٪ بود ولی بر روی لنفوسیت نرمال هیچ گونه اثر سیتوتوکسیسیته نشان نداد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دکتر البرزی و مرکز تحقیقات پیوند و ترمیم اعضا به دلیل حمایت های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1- Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mekada E. Parasporin-1, a Novel Cytotoxic Protein from *Bacillus thuringiensis*, Induces Ca₂ Influx and a Sustained Elevation of the Cytoplasmic Ca₂ Concentration

غلظت 1 mg/ml و حجم ۱۰ میکرولیتر مورد آزمایش قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون آزمایش MTT انجام شد و میزان جذب نوری با الیزا ریدر قرائت گردید. نتایج در نمودار ۳ آمده است. توکسین سویه‌هایی که کمترین تاثیر را بر روی سلول‌های لنفوسیت نرمال داشته انتخاب شدند، که شامل نمونه‌های 9sb، Ek1 و E3، E4 می‌باشد. این نمونه‌ها بر روی رده سلولی خون با غلظت‌های مختلف (0.001g/ml تا 100mg/ml) به میزان ۱۰ میکرولیتر توکسین و ۹۰ میکرولیتر سلول به تعداد 2×10^4 بر روی رده سلولی سرطانی خون در پلیت ۹۶ خانه مورد آزمایش قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون آزمایش MTT انجام شده و میزان جذب نوری با کمک الیزا ریدر قرائت شد.

نتایج این مطالعه، حساسیت متفاوت توکسین ایزوله‌های مختلف را به رده سلولی خون نشان می‌دهد. توکسین ایزوله Ek1 در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین تاثیر را بر روی سلول‌ها نشان می‌دهد، در صورتی که توکسین ایزوله 9s کمترین میزان سیتوتوکسیسیته را داراست. توکسین مربوط به ایزوله‌های E4 و E3 تاثیرات مشابهی را نشان می‌دهند.

بحث

در این تحقیق، فعالیت سیتوتوکسیسیته توکسین کریستالی *باسیلوس تورنجینسیس* بر روی رده سلولی CCRF-CEM که از رده‌های سلولی سرطان خون می‌باشد، مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های خاک جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران دارای درصد بالایی *باسیلوس تورنجینسیس* بوده و دارای توکسین لوزی شکل و کروی می‌باشند. نسبت *باسیلوس تورنجینسیس*‌های غیر همولیتیک به نمونه‌های همولیتیک، ۹۰٪ است که این نتایج مشابه نمونه‌های جداسازی شده در کشور ژاپن توسط میزوکا و همکاران می‌باشد (۴). توکسین این ایزوله‌ها دارای الگوی پروتئینی متفاوتی بوده و با نتایج گزارش شده توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۰۰ از کشور ژاپن و Poornima و همکاران در سال ۲۰۱۰ از کشور هند مشابه است (۱۸، ۱۹). بعد از تیمار با پروتئیناز کا، دو قطعه با اندازه‌های ۶۴ و ۳۰ کیلودالتون حاصل گردید. طبق بررسی‌های انجام شده توسط Ohba و همکاران در سال ۲۰۰۹، پاراسپورین‌ها را به چهار گروه دسته بندی نموده و اندازه های آنها مشخص گردید. پاراسپورین ۲ و ۳ دارای اندازه ۳۷ و ۸۸ کیلودالتون بوده و بعد از تیمار با پروتئیناز کا دارای اندازه‌های ۳۰ و ۶۴ کیلودالتون می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد که ایزوله‌ها دارای پاراسپورین ۲، ۳ و ۴ به همزمان دارای هر دو نوع پاراسپورین باشند (۲۰).

تاثیر توکسین ایزوله‌های *باسیلوس تورنجینسیس* غیرهمولیتیک بر روی رده خون مورد بررسی قرار گرفت و نتایج جالبی در پی داشت. ۴ ایزوله، سیتوتوکسیسیته متفاوتی بر روی رده سلولی خون

tration in Toxin-sensitive Cells. J of Biolo. Chem. 2007; 282(10):7742-7752.

2- Rampersad J, and Ammons D. *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and



- high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol.* 2005; 24(5):52-58.
- 3- Wong R, Mohamed S, Nadarajah D. Characterisation of the Binding Properties of *Bacillus Thuringiensis* 18 Toxin on Leukaemic Cells. *J of Experiment & Clinical Cancer Res.* 2010; 30(29):86-97.
- 4- Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J Appl Microbiol.* 1999; 86(3):477-486.
- 5- Nadarajah VD, Ting D, Mohamed SM, Lee HL. Selective cytotoxic activity against leukemic cell lines from Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions. *Southeast Asian Trop Med public Health.* 2008; 39(2):235-243.
- 6- Yasutake K, Binh ND, Kagoshima K, Uemori A, Ohgushi A, Maeda M, et al. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Can. J. Microbiol.* 2006; 52(4):365-372.
- 7- Chatterjee SN, Bhattacharya T, Dangar TK, Chandra G. Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *African Journal of Biotechnology.* 2007; 6(13):1587-1591.
- 8- Quist JC, Castanera P, Cabrera JG. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. *J Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(8):749-759.
- 9- Santana MA, Moccia CC, Gillis AE. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. *J. of Microbiol. Methods.* 2008; 75(2):357-358.
- 10- Hayakawa T, Kanagawa R, Kotani Y. Parasporin-2Ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology.* 2007; 55(4):278-283.
- 11- Salehi Jouzani G, Pourjan Abad A, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008; 35(10):83-94.
- 12- Bel Y, Granedo F, Alverola TM, Martinez-Sebastian MJ, Ferre J. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environment in Spain. *Systematic of Applied Microbiology.* 1997; 20(4):652-658.
- 13- Sevim A, Eryüzlü E, Demirba Z. A Novel cry2Ab Gene from the Indigenous Isolate *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 22(1):133-140.
- 14- Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K & et al. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic laboratory Immunology.* 2000; 7(4):625-634.
- 15- Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H & et al. Cytocidal action of parasporin-2, an anti tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J of Biological Chemistry.* 2006; 281(36):26350-26360.
- 16- Jung YC, Mizuki E, Akao T, Cote JC. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *J Appl Microbiol.* 2007; 103(1):65-70.
- 17- Okumura S, Akao T, Higuchi K, Saitoh H, Mizuki E, Ohba M & et al. *Bacillus thuringiensis* serovar shadongiensis strain 89-T34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. *Letters in Applied Microbiology.* 2004; 39(1):89-92.
- 18- Kim HS, Yamashita S, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Park YS & et al. In vitro cytotoxicity of non-Cyt inclusion proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate against human cells, including cancer cells. *J Appl Microbiol.* 2000; 89(1):16-23.
- 19- Poornima K, Selvanayagam P, Shenbagarathai R. Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. *J Appl Microbiol.* 2010; 109(1):348-354.
- 20- Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, a new anti-cancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res.* 2009; 29(1):427-433.
- 21- Namba A, Yamagiwa M, Amano H, Akao T, Mizuki E, Ohba M & et al. The cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *coreanesis* A1519 strain against the human leukemic T cell. *Biochemica et Biophysica Acta.* 2003; 1622(1):29-35.
- 22- Uemori A, Maeda M, Yasutake K, Ohgushi A, Kagoshima K, Mizuki E & et al. Ubiquity of parasporin-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural populations of Japan. *Naturwissenschaften.* 2007; 94(1): 34-38.



Original Article

Investigation of Cytocidal Activity of *Bacillus Thuringiensis* Parasporal Toxin on CCRF-CEM Cell Line

Moazamian E^{1*}, Bahador N¹, Rasouli M², Azarpira N³, Kalani M²

1. Department of Microbiology, Science and Research, Islamic Azad University, Fars, Iran.

2. Immunology Department, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

3. Organ Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 15 Dec 2012

Accepted: 25 Nov 2012

Abstract

Background & Objectives: Parasporin is a parasporal protein of *Bacillus thuringiensis* and exhibits special cytocidal activity against human cancer cells. Similar to other insecticidal *Bacillus thuringiensis* crystal toxins, parasporin shows target specificity and damages the cellular membrane. In this study, different strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from various regions of Iran and their cytocidal activity against CCRF-CEM cell line and human erythrocyte were investigated.

Material & Methods: Fifty soil samples were collected from different Iranian provinces, and characterization was performed based on protein crystal morphology by phase-contrast microscope and variations of Cry protein toxin using SDS-PAGE. After parasporin was processed with proteinase K, the active form was produced and protein activity on the cell line was evaluated.

Results: Parasporal inclusion proteins showed different cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia cells (ALL), but not against normal lymphocyte. Isolated parasporin demonstrated no hemolytic activity against human erythrocyte. It appears that these proteins have the ability to differentiate between normal lymphocytes and leukemia cells and have specific receptors on specific cancer cell lines.

Conclusion: Our results provide evidence that the parasporin-producing organism is a common member in *Bacillus thuringiensis* populations occurring in the natural environments of Iran.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Parasporin, Cancer cell, Cry proteins

* **Corresponding author:** Moazamian Elham, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

Tel: +98 9177110994

Email: elhammoazamian@gmail.com