بررسی الگوی پروتئینی واریتهٔ پیگمانته اپیدرموفیتون فلوکوزوم به روش SDS-PAGE

کیوان پاک‌شیر، دانشجوی دوره دکترای (Ph.D) قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر فریده زینی، استاد قارچ‌شناسی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر اسماعیل علی آخوتی، دانشیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

The Protein Profiles of Epidermophyton Floccosum Var. Pigmented by SDS-PAGE

ABSTRACT

In the present study, we investigated total cell protein patterns of ten isolates of Epidermophyton Floccosum var. Pigmented by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide resolving gels.

Densitometric analysis of the gels allowed to detect more than 31 clearly detectable mycelial protein bands with molecular weights in the range of 12 to 98 KD proteins of 12.5, 13.5, 14.4, 16, 18.4, 19.7, 20.1, 23.5, 26, 27, 29, 30,32.5,34,35.5,37,39.5,40.5,43,47.5,50,63,68,75,79,82.5,74.5,90,94,96,97-5 KD were present but their frequencies varied among the isolates.

Protein bands of 18.4,19.7,20.1,27,29,34,37,43,47.5,50,63,79,94, KD were stronger and common among the isolates and could be specific to recognize genus differences. Protein analysis by SDS-PAGE could be considered an useful technique in identifying differences among the dermatophyte isolates.

Key Words: Epidermophyton floccosum; SDS-PAGE; Protein analysis; Dermatophyt

چکیده

در این مطالعه الگوی پروتئینهای داخل سلولی ده ایزوله از واریتهٔ پیگمانته اپیدرموفیتون فلوکوزوم به روش SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات ـ پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز) بر روی ژل ۱۰٪ آکریلامید مورد بررسی قرار گرفت. در آنالیز باندهای پروتئینی بوسیله دانسیتومتر، بیش از ۳۱ باند پروتئینی با وزنهای مولکولی بین ۹۸-۱۲ کیلودالتون شناسایی گردید. پروتئینهای ۱۲/۵، ۱۳/۵، ۱۴/۴، ۱۶، ۱۸/۴، ۱۹/۷، ۲۰/۱، ۲۳/۵، ۲۶،۲۷،۲۹، ۳۰، ۳۲/۵، ۳۴، ۳۵/۵، ۳۷، ۳۹/۵، ۴۰/۵، ۴۳ ، ۴۷/۵، ۵۰، ۶۳، ۶۸، ۷۵، ۷۹، ۸۲/۵، ۸۴/۵، ۹۰، ۹۴، ۹۶ و ۹۷/۵ کیلودالتون جداگردیده ولی فراوانی آنها در بین ایزوله، متفاوت بوده است. از این میان باندهای پروتئینی با وزنهای ۱۸/۴، ۱۹/۷، ۲۰/۱، ۲۳/۵، ۲۷،۲۹،۳۰ ، ۳۴،۳۷،۴۳، ۴۷/۵، ۵۰، ۶۳ ، ۷۹ و ۹۴ اختصاصی در تشخیص جنس اپیدرموفیتون استفاده گردد.

آنالیز پروتئینها به روش SDS-PAGE بعنوان یک تکنیک مناسب می‌تواند جهت تشخیص اختلاف بین گونه‌های درماتوفیتها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی : اپیدرموفیتون فلوکوزوم؛ درماتوفیت؛ سدیم دودسیل سولفات پلی‌اکریلامید ژل الکتروفورز؛ آنالیز پروتئینی

مقدمه

درماتوفیتوزیس عفونت قارچی پوست و ضمائم آن است که توسط گونه‌های مختلف درماتوفیت ایجاد شده و در بافتهای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

عفونتهایی با علائم بالینی خفیف یا شدید گردند. درماتوفیتها برحسب مشخصات ریزبینی خود به سه جنس میکروسپوروم، ترایکوفایتون و اپیدرموفیتون تقسیم می‌شوند. اپیدرموفیتون فلوکوزوم یک قارچ انسان‌دوست است که به پوست و ناخن حمله کرده ولی توانایی ابتلا مو را ندارد. این قارچ یکی از عوامل ایجاد کنندهٔ کچلی بدن، پا و ناخن بوده و از شایعترین عوامل مسبب کچلی کشاله ران در بالغین محسوب می‌شود(۱).

مطالعات زیادی که با استفاده از روشهای الکتروفورتیک بر روی درماتوفیت‌ها صورت گرفته نشاندهندهٔ وجود باندهای پروتئینی اختصاصی در گونه‌هاست(۲). W. Jeffries با استفاده از روش ایزوالکتریک فوکوسینگ توانست اختلاف بین گونه‌های میکروسپوروم کانیس را شناسایی کند(۳). اپیدرموفیتون فلوکوزوم دارای ۲ واریتهٔ پیگمانته و آلبینو بوده که در این تحقیق الگوی پروتئینی واریتهٔ پیگمانته مورد بررسی قرار گرفته است.

روش و مواد

ارگانیزم مورد آزمایش

تعداد ده ایزوله از واریتهٔ پیگمانته اپیدرموفیتون فلوکوزوم از بیماران مراجعه کننده به بخش قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا گردید. و هر یک از آنها بر روی پلیتهای حاوی محیط سابورو دکستروز آگار بهمراه کلرامفنیکل ۵۰mg و سیکلوهگزامید ۵۰۰ mg کشت داده شد و مدت ۱۵ روز در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

از کلنی‌های جدا شده در Tissue-grinder حاوی سرم فیزیولوژی، سوسپانسیون یکنواخت تهیه شد. سپس سوسپانسیون حاصل به ارلنهای حاوی ۱۵۰ ml سابورو گلوکز برات ۲٪ منتقل گردید و ارلنها به مدت ۱۰ روز در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و در طول این مدت جهت جلوگیری از ایجاد ورقه میسلیومی sheet ارلنها روزی چند مرتبه تکان داده می‌شدند.

طرز تهیه عصارهٔ سوماتیک

پس از مدت فوق تودهٔ میسلیومی با استفاده از صافی میلی‌پور (۰/۲۲μ) از محیط کشت جدا گردیده و فیلتره کشت بطور جداگانه جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. آنگاه توده میسلیومی با آب مقطر استریل دوبار شسته شده و وزن گردیده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای تهیه عصارهٔ سوماتیک از شن (Sand) استفاده گردید. بدین ترتیب که درون هاون چینی، توده میسلیومی هر یک از ایزوله‌ها در سرم فیزیولوژی حاوی کوکتلی از مهارکننده‌های پروتئاز شامل NEM(1mM)[1]، Bh(10μM)[2]، EDTA(1mM)، PMSF(1mM)[3] و TPCK(0.1mM)[4] و Bestatin (1μgml)$^{-1}$ و Pepstatin A(0.1μM) بصورت سوسپانسیون در آمد. سپس مقداری شن به سوسپانسیون اضافه گردیده و توده میسلیومی در دمای ۴ درجه سانتیگراد خرد شد تا محلول شیری رنگی بدست آید.

سپس محلول هموژنیزه بدست آمده در دمای ۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰g سانتریفوژ گردید، محلول رویی مجدداً با دور ۲۵۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و نهایتاً محلول رویی جمع‌آوری و بمدت ۲۴ ساعت بر علیه آب مقطر در دمای ۴ درجه سانتیگراد دیالیز شده و محلول حاصل لیوفیلیزه گردید.

الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریلامید

ابتدا میزان پروتئین هر یک از نمونه‌ها (۰/۸ mg عصاره لیوفیلیزه در ۱ ml) بروش برادفورد Bradford تعیین گردید. سپس هر یک از عصاره‌ها را درون بافر نمونه loading buffer (۰/۱۲۵ mol Tris-HCl ، ۰/۰۰۲٪ bromophenol blue ، ۲٪ mercaptoethanol، ۲٪ sodium dodecyl sulphate ، ۱۰٪ glycerol). حل کرده و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده و مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰g سانتریفوژ کرده سپس از محلول صاف شده رویی جهت الکتروفورز استفاده گردید.

۲۰-۱۵ میکرولیتر حاوی حدوداً ۱۲-۸ μg پروتئین از هر نمونه به همراه یک مارکر وزن مولکولی (low molecular weight marker) بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰٪ و ژل انباری ۵٪ stacking gel بر اساس روش laemmli الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز برای مشخص کردن باندهای پروتئینی، ژلها بوسیله ۵٪ coomassie blue R-250 به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید و سپس طی ۲ مرحله بوسیله محلولهای متانل ـ اسید استیک و آب با غلظتهای (۴،۱،۵) و (۰/۵ و ۳/۵ و ۶) مراحل رنگبری انجام گرفت.

1- N-ethyl-maleimide
2- Benzamidine hydrochloride
3- Phenyl-methyl - sulphonyl fluoride
4- Tosylamino-z-phenylethyl chloromethyl ketone

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

اسکنینگ نمونه‌ها توسط دستگاه دانسیتومتر با طول موج ۵۹۰ نانومتر و طول اسکن ۱۰ سانتیمتر انجام شده و وزن مولکولی باندها با استفاده از منحنی استاندارد مارکر وزن ملوکولی و اندازه‌گیری میزان حرکت Rf هر یک از باندها محاسبه گردید.

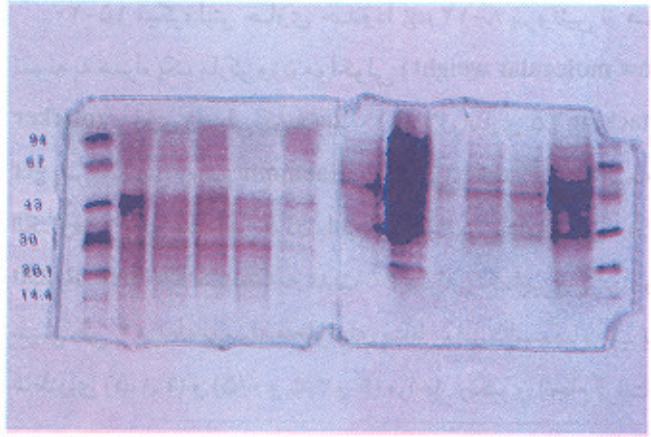
یافته‌ها

در این مطالعه برای تهیهٔ عصارهٔ سوماتیک از روش Sand(۵،۴) استفاده شد و به منظور مهار فعالیت آنزیمهای پروتئولیتیک نیز ترکیبی از مهارکننده‌های پروتئاز Protease inhibitores به بافر اضافه گردید. مقدار پروتئین لازم برای روش SDS-PAGE مقدار ۰/۸ mg در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

در آنالیز پروتئینهای داخل سلولی ایزوله‌های اپیدرموفیتون فلوکوزوم بوسیله ژل ۱۰٪ اکریلامید بیش از ۳۱ باند پروتئینی با وزنهای مولکولی بین 12-98KD شناسایی گردید که فراوانی باندها بین ایزوله‌های مختلف متفاوت بود (شکل ۱). با استفاده از منحنی وزن مولکولی استاندارد و دانسیتومتری باندهای بدست آمده، الگوی پروتئینی اپیدرموفیتون فلوکوزوم دارای فراکسیونهایی به شرح زیر بوده است :

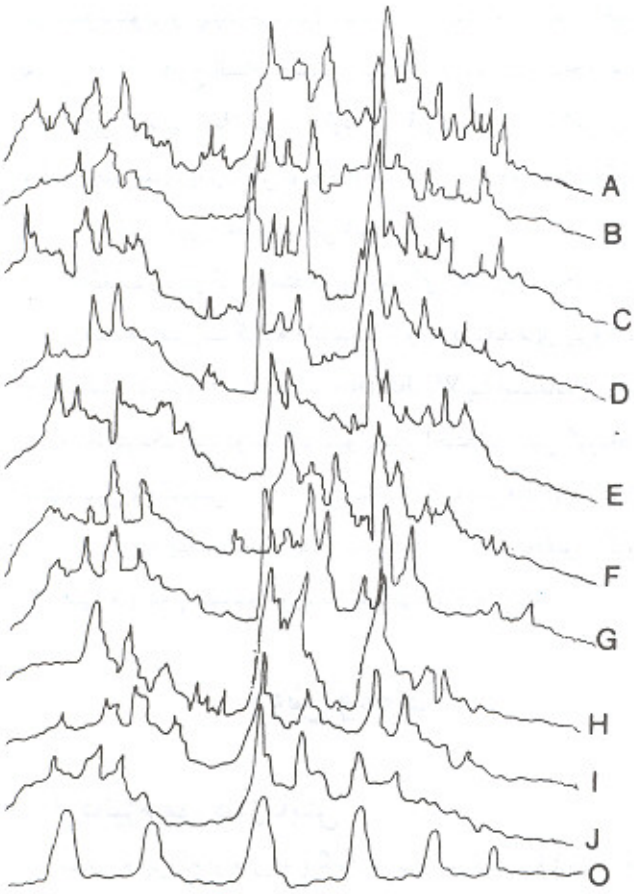
12.5, 13.5, 14.4, 16, 18.4, 19.7, 20.1, 23.5, 26, 27, 29, 30, 32.5, 34, 35.5, 37,39.5, 40.5, 43, 47.5, 50, 63, 68, 75, 79, 82.5,74.5,90,94,96,97-5 KD

شکل ۱ـ الکتروفورز پروتئینهای داخل سلولی اپیدرموفیتون فلوکوزوم به روش SDS-PAGE بر روی ژل ۱۰٪ اکریلامید ـ لاین اول و آخر مارکر وزن مولکولی باشد



از این میان باندهای پروتئین با وزنهای ۷۹ کیلودالتون از بقیه قوی‌تر و در همه مشترک بوده و می‌تواند بصورت اختصاصی در تشخیص جنس اپیدرموفیتون از سایر درماتوفیتها مورد استفاده قرار گیرد.

شکل ۲ـ دانسیتومتری باندهای پروتئینی ایزوله‌های اپیدرموفیتون فلوکوزوم واریئهٔ پیگمانتهٔ بر روی ژل ۱۰٪ اکریلامید (A-J)، مارکر وزن مولکولی (O)



بحث

امروزه از روش SDS-PAGE برای طبقه‌بندی و مطالعات اپیدمیولوژیک درماتوفیتها استفاده می‌شود(۶) Noble و Jones با جدا کردن ایزوآنزیمهای بعضی از درماتوفیتها به کمک این روش علی‌رغم نبودن اختلاف مورفولوژیکی بین آنها موفق به شناسایی ایزوآنزیمهای اختصاص گونه‌ها شدند(۷).

در گذشته به علت مشکلات موجود در تهیه غلظت مناسبی از آنتی‌ژنهای پروتئینی محلول، مطالعات کافی در زمینهٔ آنالیز آنتی‌ژنی درماتوفیتها به روشی SDS-PAGE انجام نشده بود ولی امروزه از روشهای متعددی برای خرد کردن دیوارهٔ میسلیومهای قارچی جهت تهیه غلظت مناسبی از آنتی‌ژنها استفاده می‌شود(۸) دیواره سلولی قارچها بخصوص قارچهای رشته‌ای بسیار مقاومتر از باکتریهاست، به همین دلیل با استفاده از روشهای معمولی نظیر ذوب و انجماد Freeze & Thowing، فشار اسموتیک و امواج صوتی براحتی تخریب نمی‌شوند و بایستی توسط وسایل و تکنیکهای متفاوتی نظیر همگن کننده (Homogenizer)، گلوله‌های شیشه‌ای (Glass Beads)، دستگاه Braun Mill و شن و یا ترکیبی از این روشها خرد گردند. در مواقعی که این وسایل در اختیار نباشد می‌توان از شن که روشی ساده و کم‌هزینه است استفاده کرد(۵،۴).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]

در روش SDS-PAGE برای بدست آوردن باندهای قوی و واضح، بسته به نوع ارگانیزم، مقدار ۸-۵ میکروگرم پروتئین لازم است(۴،۵،۸،۹) در این بررسی نیز جهت تهیه عصاره سیتوپلاسمی با توجه به امکانات موجود از روش Sand استفاده گردید. ما در این روش با طولانی‌تر کردن زمان خرد کردن قارچ در حضور مهارکننده‌های آنزیمی و دمای ۴ درجه سانتیگراد توانستیم به مقدار پروتئینی بالاتر از حد مورد نیاز جهت SDS-PAGE دست یابیم.

در مطالعاتی که با استفاده از تکنیکهای الکتروفورتیک بر روی درماتوفیتها صورت گرفته همگی نشاندهندهٔ اختصاصی بودن باندهای پروتئینی بدست آمده در گونه‌های خاص بوده است(۷).

گزارشاتی که از دانسیتومتری و آنالیز کامپیوتری باندهای پروتئینی بدست آمده از سلولهای میکروارگانیزمها موجود بوده نشاندهندهٔ مفید بودن روش SDS-PAGE جهت تشخیص اختلافات بین ایزوله‌ها و مطالعات تاکسونومی در باکتریها و بعضی قارچها می‌باشد(۲،۱۰).

در دانسیتومتری نمونه‌ها تعداد زیادی باند پروتئینی شناسایی گردید که تقریباً در همه ایزوله‌ها مشترک بوده است. وجود اختلاف ناچیز بین ایزوله‌ها شاید مربوط به نحوهٔ تهیه عصاره‌های آنتی‌ژنی، غلظت و یا رنگبری نمونه‌ها باشد، در هر حال وجود برخی از باندهای پروتئینی که در همه مشترک و از بقیه قویتر بوده را می‌توان در تشخیص جنس اپیدرموفیتون از سایر جنسهای درماتوفیتها مورد استفاده قرار داد.

منابع

1- Rippon J W. Medical mycology, the pathogenic Fungi and the Pathogenic actinomyceted 3th edition. WB Saunders Company, Philadelphia (1988) P : 169-275.

2- Ibrahim GQ, Bievre C, Romain F and leoffe S. Comparative electrophoresis isoelectrofocusing and numerical taxonomy of some isolates of Fonsecaea Pedrosoi and allied fungi J. Med. Vet. Mycol (1985) 23: P: 253-264.

3- Jefries CD Agello RE Analytical isoelectro focusing of Secreted dermatophyte proteins applied to taxonomic differentation of Microsporum and Trichophyton Species. Sabouraudia (1984) 22. P: 369-379.

4- Collins and Lyne. Microbiological methods. Butter Worths and Co-Publishers London-Boston (1979) : P: 179-193.

5- Grissin DH. Fungal physiology. Willy-Liss Publisheres (1994) P: 63-102.

6- Tucker WDL and Noble W.C. Poluacrglamide gel electrophoresis patterns of some Microsporum species. Mycoses (1991) 34 P: 303-307.

7- Tucker WDL and Noble W.C. The value of electrophoretic protein patterns for study of microsporum cains J Med Vet Mycol (1990) 28, P; 117-123.

8- Garg A.P and Muller J. Preparation of antigens from Trichophyton Mentagrophytes using a new semi-solid culture medium and their characterization by SDS-PAGE and immunological techniques. Mycoses (1992) 35, 349-355.

9- Zaini F, Madani M, Elmi-Akhounie E. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of some iranian Microsporum and Trichophayton species. Acta-Medica Iranica (1998) (1) P: 9-13.

10- Jackman P.H.H and Pelcynska S. Characterization of Coryneba cterium group JK by whole cell protein patterns. J Gen Microbiol (1986) 132. P: 1911-1915.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-23]