مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۵ شماره٤ آذر و دی ۱۳۹۰، ۱۵-۱۰

مقایسه مقادیر پروتئین‌های سطحی کاندیدا با استفاده از رنگ آمیزی نقره، کوماسی بلو و مخلوط هر دو رنگ و مشاهده باندهای مربوطه با استفاده از روش SDS-PAGE

دکتر سید امیر یزدان پرست[۱]، سیده شهرزاد مهدوی نظارتی[۲]، فریبا حشمتی[۳]، سمیرا جهانگیری[٤]، زهره زارعی[٤]

چکیده

زمینه و هدف: گونه‌های کاندیدا بعنوان شایعترین عوامل بیماریهای عفونی و قارچی فرصت طلب مطرح هستند. کاندیدا آلبیکنس بعنوان نوعی قارچ پلی مورف مطرح است. کاندیدا دابلینینسیس بعلت تشابه بسیار با قارچ کاندیدا آلبیکنس حائز اهمیت است. پروتئین‌های دیواره نیز می‌توانند در ساختار دیواره وجود داشته باشند. این پروتئینها بعلت نقش در چسبندگی و اتصال به سلولهای میزبان و بیماری زایی مورد تاکید مطالعات بوده است. لذا شناخت این پروتئینها در قارچ‌های پاتوژن و استخراج و جدا سازی و تعیین اجزای آنها ضروری به نظر می‌رسد.

روش بررسی: هدف از این طرح بررسی مقادیر پروتئین‌های سطحی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس با استفاده از سه رنگ آمیزی و مشاهده باند احتمالی آنها با روش سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید(SDS-PAGE) به منظور شناخت بیشتر این قارچهای بیماریزا می‌باشد. همچنین با استفاده از بافرکربنات آمونیوم که شامل بتامرکاپتواتانول است پروتئینهای سطحی کاندیدا استخراج می‌شوند و پس از استخراج انجام دیالیز نیز ضروری است.

یافته‌ها: با رنگ آمیزی کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی٤٢ و ٦٦/٢ و٢٠٠ kDa و در رنگ آمیزی با نقره پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۱/۵ و ۲۸/۵ و۳۷ kDa و با استفاده از رنگ آمیزی توام کوماسی بلو و نقره پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۷ و ۳۵ و٤٠ و ٤٥ و٥٢ و ۸۰ و ۹۷ kDa تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: با رنگ آمیزی کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی بالا و در رنگ آمیزی با نقره پروتئینهایی با وزن مولکولی پایین و با مخلوط هر دو رنگ بیشتر باندهای پروتئین مشاهده شدند.

واژه‌های کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا دابلینینسیس، استخراج پروتئین، SDS-PAGE

* نویسنده مسئول :
دکتر سید امیر یزدان پرست ؛
دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email :
Syazdanparast@tums.ac.ir

- دریافت مقاله : مهر ۱۳۹۰ - پذیرش مقاله : دی ۱۳۹۰

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس یک قارچ فرصت طلب است که به صورت چند شکلی می‌باشد و شایعترین عامل کاندیدیازیس است. کاندیدا دابلینینسیس اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط سولیوان(Sullivan) شرح داده شد. بـه طور عمده از حفره دهانی افراد مبتلا به ویروسHIV جدا می‌شود و از نظر خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی شبیه کاندیدا آلبیکنس می‌باشد(۲-۱).

[۱] دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
[۳] کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
[٤] کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

پروتئینهای دیواره سلولی به دلیل نقش چسبندگی‌شان حائز اهمیت هستند. این پروتئینها نقش در نگهداری ساختار و چسبندگی غیرمستقیم دارند. از پروتئینهای سطحی در دیواره قارچها می‌توان Vitronectin binding proteins و fibronectin binding proteins و همچنین Laminin binding proteins و Entactin binding proteins و نیز Protein-presumed protein را اشاره کرد. پروتئین شوک حرارتی از پروتئینهای مهم در قارچها است که قادرند با اتصال و نگهداری از دیگر پروتئینهای مهم حیات سلولها را نجات دهند(٤-٣). هدف از این کار تحقیقاتی، شناخت این پروتئین‌ها در قارچ‌های پاتوژن و استخراج، جداسازی و تعیین اجزای آنهاست.

روش بررسی

جامعه و نمونه پژوهش، گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس بودند که باتوجه به اینکه از گونه‌های استاندارد استفاده شد، نیازی به انجام نمونه گیری نبوده است و حجم نمونه در این تحقیق، گونه کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 562 و کاندیدا آلبیکنس سویه PTCC 6027 و کاندیدا دابلینسیس سویه CBS 7987 بوده است.

کشت ارگانیسم: ابتدا سلولهای مخمری سویه CBS 562 و سویه PTCC 6027 در محیط پایه نیتروژن(YNB) به همراه سه اسید امینه تریپتوفان و متیونین و هیستیدین کشت داده شد. سپس این دو سویه یکبار در(YNB) به همراه گالاکتوز ۰/۳ مولار برده شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار بادور 150rpm قرار داده شد و بار دیگر آنها در محیط YNB به همراه ۰/۱ مولار گلوکز و ۰/۳ مولار گالاکتوز به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۳- ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از یک شبانه روز در لوله‌های فالکن حاوی گالاکتوز + گلوکز و لوله‌های حاوی گالاکتوز سانتریفوژ انجام گرفت. مشابه همین عمل در مورد کاندیدا دابلینسیس صورت گرفت(۵).

استخراج پروتئین: استخراج پروتئین به روش بتامرکاپتواتانول بدین صورت که محیط کشت در دور ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد سپس رسوب دو نوبت با آب مقطر استریل شستشو داده شد و سلولهای شسته شده را در محلول کربنات آمونیوم ۱/۸۹ گرم بر لیتر و بتامرکاپتو اتانول ۱٪ معلق گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بعد از سانتریفوژ مایع رویی(سوپرناتانت) به دقت جمع آوری شد و عصاره استخراج شده(با فیلتر۰/۲) در برابر بافر تریس-HCL به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد دیالیز شد(٦). سنجش میزان غلظت پروتئین در هر نمونه با بکارگیری آزمون بردفورد انجام شد(۷).

SDS-PAGE: بررسی باندهای پروتئینی با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد و با تعیین وزن مولکولی تغییرات مربوط به هریک از کاندیداها مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت(۸). این روش در ابتدا توسط لاملی در سال۱۹۷۰ و سپس توسط کازانوا در سال ۱۹۸۹ انجام شد(۸و٦). SDS-PAGE در ژلوز separating به میزان ۱۲/۵ درصد W/V و در ژلوز stacking به میزان ٤ درصد W/V با ولتاژ ثابت ٦٥v انجام گرفت. برای الکتروفورز هر کاندیدا، سه ژل آماده سازی شد و در هر ستون ژل ۲۰mg از پروتئینهای سطحی استخراج شد.

رنگ آمیزی: بعد از الکتروفورز، هرکدام از سه سری ژل قارچ به طور جداگانه تحت رنگ آمیزی با نقره با استفاده از روش Chaffin و همکاران(Bio-Rad Labratories,Hercules ,CA) و با کوماسی بلو ۰/۱ درصد R-250(CBB;Sigma) برطبق روش Lee و همکاران با مخلوطی از رنگ نقره

Archive of SID

www.SID.ir

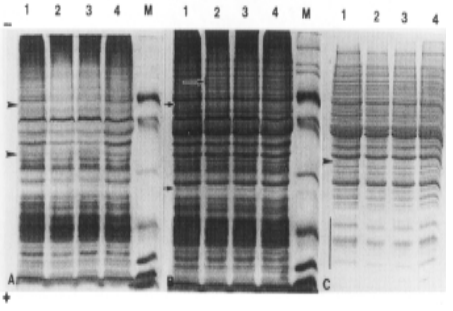
به همراه کوماسی بلو با استفاده از مشاهدات Joseba Chaffin, رنگ آمیزی شدند و سپس در محلول رنگ بر حاوی ٤٠ ٪ متانول و ٧٪ اسید استیک به مدت یک شبانه روز قرار گرفتند(٩و٥-٤).

پس از آن مراحل انتقال الکتروفورزی پروتئینها به کاغذ نیتروسلولزی انجام شد. سپس کاغذ با ٣٪ شیرخشک در TBS به مدت ٢ ساعت مسدود شد و در TBS+0.05 %Tween-20 شستشو داده شد. کاغذ با آنتی بادی مونوکلونال موش کلاس IgG-2a انکوبه شد. از پروتئین شوک حرارتی ٧٠(Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada) در رقت ١:٥٠٠ به عنوان شاهد استفاده شد. همچنین از کونژوگه پراکسیداز با Anti-IgG Boehringer (Mannheim, Biochemicals, Indianapolis,IN) به عنوان دومین آنتی بادی در رقت١:١٠٠٠ استفاده شد(٨). از مارکر Bio-Rad استفاده شد(جهت تعیین موقعیت مارکر های بیوتینه شده در غشا).

این مارکر از بالا به پایین برحسب kDa به ترتیب شامل: میوزین با وزن مولکولی(٢٠٠) و بتاگالاکتوزیداز(١١٦) و فسفوریلازb(٩٧/٤) و آلبومین سرم گاوی(٦٦/٢) اوالبومین(٤٥) و کربونیک انهیدراز(٣١) و مهار کننده تریپسین(٢١/٥) است.

یافته‌ها

در رنگ آمیزی با کوماسی برلیانت بلو در کاندیدا آلبیکنس سویه PTCC 6027 پروتئینی با وزن مولکولی بالا حدود٦٦/٢ kDa(شکلC-١)، در کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 562 پروتئینی با وزن مولکولی بالا حدود٤٢ kDa(شکلC-٢) در کاندیدا دابلینسیس سویه CBS 7987 پروتئینی با وزن مولکولی بالا kDa ٢٠٠(شکلB-٣)، در رنگ آمیزی نقره در کاندیدا آلبیکنس سویه 6027 پروتئین با وزن مولکولی پایین kDa ٢٨/٥(شکلA-١)، در کاندیدا آلبیکنس سویه 562 پروتئین با وزن مولکولی پایین kDa ٣٧(شکلA-٢) و همچنین در کاندیدا دابیلینسیس سویه 7987پروتئین با وزن مولکولی kDa ٢١/٥(شکلA-٣ ستون ٤و٥و٦و٧و٨) مشاهده شدند. در رنگ آمیزی با مخلوطی از نقره و کوماسی برلیانت بلودرکاندیدا آلبیکنس سویه 6027 پروتئینهایی با وزن مولکولی٨٠ و٤٥ و kDa٢٧(شکلB-١)، در کاندیدا آلبیکنس سویه 562 پروتئینهایی با وزن مولکولی ٣٥ و٤٠ و٥٢ kDa(شکلB-٢) و در کاندیدا دابیلینسیس سویه 7987 پروتئینهایی با وزن مولکولی ٣٥ و٤٥ و٩٧ kDa(شکل A-٣ ستون ١و٢و٣) مشاهده شدند. به نظر می‌رسد رنگ آمیزی مضاعف سبب بهبود در ردیابی باندهای پروتئینی شد. پروتئین‌های اسیدی نسبت به سایر پروتئینها سریعتر رنگ شدند که تنها به فراوانی این پروتئین‌ها مربوط نمی‌باشد بلکه ممکن است به ساختمان پروتئین مرتبط باشد. پروتئینهای با وزن مولکولی بین ٣٠-٢٠٦ kDa بویژه پروتئین‌های اسیدی با رنگ آمیزی نقره شناسایی نمی‌شوند. همچنین پروتئینهای بسیاری با رنگ آمیزی کوماسی به تنهایی ردیابی نمی‌شوند. اما ترکیب دو رنگ آمیزی سبب افزایش باندهای پروتئین در ژل‌ها گشت. سه ژل با کوماسی بلو و نقره و با مخلوطی از هر دو رنگ(نقره و کوماسی بلو) رنگ آمیزی شدند. مقایسه پروتوکل رنگ آمیزی نشان داد که تشخیص باندهای موجود در هر نمونه بر اساس وزن مولکولی آنها می‌باشد.



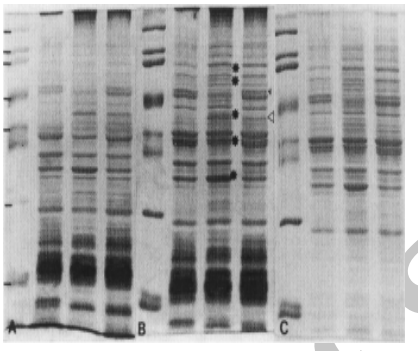
شکل ١: کاندیدا آلبیکنس سویه PTCC 6027

Archive of SID

www.SID.ir

بخش A: ژل رنگ آمیزی شده با نقره بخش B : ژل رنگ آمیزی شده با مخلوطی از هر دو رنگ
بخش C : ژل رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو

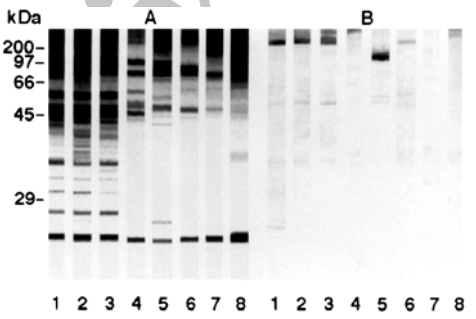
پیکانهای بالایی موجود در بخش A و C نشان دهنده رنگ آمیزی ضعیف باندها با استفاده از رنگ آمیزی تکی است. پیکان بالایی در بخش B بیانگر رنگ آمیزی قوی باندها با مخلوط دورنگ(نقره و کوماسی برلیانت بلو) است.



شکل ۲: کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 562

بخش A : رنگ آمیزی با نقره بخش B : مخلوطی از دو رنگ(نقره و کوماسی بلو) بخشC : رنگ آمیزی با کوماسی بلو

ستاره‌های موجود در شکل ۲ بیانگر ردیابی باندهای پروتئین است. ستون دوم در بخش B باندهای قوی تر با وزن مولکولی(KDa ۳۵ و ۴۰ و۵۲) مشخص‌اند.



شکل ۳: کاندیدا دابیلینسیس سویه CBS 7987

بخش A: ستون ۱و۲و۳ رنگ آمیزی شده با مخلوطی از هر دو رنگ. ستون٤و٥و٦و٧و٨ رنگ آمیزی با نقره
بخش B: همه ستون‌ها رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش در طی استفاده از رنگ آمیزی کوماسی بلو برای نشان دادن مقادیر و نوع پروتئین‌های موجود در قارچ کاندیدا، وجود پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ٦٦،٢٠٠/٤٢،٢ kDa را نشان داد. نتایج تحقیقات Lee و همکاران(۱۹۷۵) با استفاده از این رنگ آمیزی، پروتئین با وزن مولکولی ٤٢ و ٤٣ kDa را در کاندیدا آلبیکنس سویه A3153 شناسایی کردند(۹). وجود پروتئین ٤٢ kDa در

Archive of SID

www.SID.ir

سویه‌های مورد استفاده این تحقیق و تحقیق Lee هم خوانی دارد، اما دو پروتئین ٦٦/٢ و٢٠٠ در سویه PTCC 6027 و CBS 562 مشاهده شد که در تحقیق Lee گزارش نشده و این تفاوت به نظر می‌رسد که مربوط به تفاوت استرین‌ها باشد و بررسی با تهیه نمونه بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. Casanova و همکاران(١٩٩١) با استفاده از کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی ٨٠ تا١٤٠ kDa را در کاندیدا آلبیکنس سویه ATCC 26555 مشاهده نمودند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد(١٠).

همچنین نتایج به دست آمده از این تحقیق طی استفاده از رنگ آمیزی نقره وجود پروتئینهایی با وزن مولکولی ٢١/٥ و ٢٨/٥ و٣٧ kDa را نشان داد. نتایج Chaffin و همکاران(١٩٩٨) با این رنگ آمیزی پروتئینهایی با وزن ٢١/٥ تا ٢٥ kDa را کاندیدا آلبیکنس سویه ATTC 44807 و کاندیدا آلبیکنس سویه NCPF 3153 نشان دادند(٥).

وجود پروتئین kDa٢١/٥ در سویه‌های مورد استفاده این تحقیق و تحقیق Chaffin هم سویی دارد، اما دو پروتئین ٢٨/٥ و٣٧ kDa در سویه PTCC 6027 و CBS 562 شناسایی شدند که در تحقیق Chaffin مشاهده نشد.

این تفاوت نیز ممکن است مرتبط به اختلاف سویه‌های قارچی باشد. از سوی دیگر با استفاده از رنگ آمیزی مضاعف (مخلوطی از رنگ آمیزی نقره و کوماسی بلو) پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ٢٧ و٣٥ و٤٠ و٤٥ و٥٢ و٨٠ و٩٧ kDa در کاندیدا آلبیکنس و دابلینسیس مشاهده شد و این نتایج با نتایج تحقیقاتChaffin و همکاران(١٩٩٨) که از این رنگ آمیزی استفاده نمودند همخوانی دارد، زیرا آنها نیز پروتئینهایی با وزن مولکولی ٣٥ و٤٠ و٤٥ و٥٢ و٨٠ kDa را در کاندیدا آلبیکنس نشان دادند(٥). اما دو پروتئین ٢٧و٩٧ kDa در تحقیق Joseba, chaffin شناسایی نشدند که به نظر می‌رسد مربوط به اختلاف استرین باشد. همچنین روش رنگ آمیزی نقره و کوماسی برلیانت بلو تعداد پروتئینهای ردیابی شده را افزایش می‌دهد. این افزایش به نظر می‌رسد از دو منبع گرفته شده است. پاک سازی رنگ از پروتئین‌های بازی و اسیدی در ژل مشابه ردیابی شد . ثانیا در رنگ آمیزی تکی نقاط رنگ کمتری گرفتند. ترکیب رنگ آمیزی نقره و کوماسی برلیانت بلو از پروتئین‌های دیواره سلولی دو مزیت دارد: ردیابی پروتئین‌هایی که با رنگ آمیزی تکی مشاهده نشدند و افزایش ردیابی پروتئین‌هایی که با رنگ آمیزی تکی دیده نشدند و افزایش ردیابی پروتئین‌هایی که به طور ضعیف رنگ آمیزی شدند، می‌توان نتیجه گرفت که رنگ آمیزی اصلاح شده در شناسایی بهتر پروتئین‌های قارچی کمک می‌کند(١٢-١١).

با بررسی‌های بیشتر بر روی پروتئینهای موجود و استفاده از سرم افراد مبتلا به کاندیدیازیس یا در کلنی‌های کاندیدا می‌توان به مکانیسم دقیق بیماریزایی و شاید راهکارهایی برای تولید واکسن ضد قارچی دست یافت(١٤-١٣).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از مساعدت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر را دارند. همچنین از همکاران محترم در مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی دانشگاه و نیز از آقای دکتر حمید بدلی به خاطر اهدای سوش قارچی کاندیدا دابلینینسیس از دانشگاه آمستردام سپاسگزاری می‌نمایند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1.Yazdanparast SA. Medical Mycology. Tehran: Jahad Daneshgahi; 2007: 206-7[Book in Persian].

2. Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 1991; 324(10): 654-62.

3. Moseley PL. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. J Applied Physiology 1997; 83(5): 1413-7.

4. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. J Mol Evol 1994; 38(1): 1-17.

5.Chaffin WL, Lopez Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of Candida albicans: identification, function, and expression . Mol Biol Rev 1998; 62(3): 130-80.

6. Casanova M, Chaffin WL. Cell wall Glycoproteins of Candida albicans as released by different methods. J Gen Microbiol 1991; 137(5): 1045-51.

7.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72(2): 248-54.

8. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 1970; 227(3): 680-5.

9.Lee KL, Buckley HR, Camobell CC. An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelia and yeast forms of Candida albicans. Sabouraudia 1975; 13(2): 148-53.

10. Casanova M, Chaffin WL. Phosphate-containing proteins and glycoproteins of the cell wall of candida albicans. Infect Immun 1991; 59(3): 808-13.

11. De Moreno MR, Smith JF, Smith RV. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. Anal Biochem 1985; 151(2): 466-70.

12. Dzandu JK, Deh ME, Barraatt DL, Wise GE. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins, and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81(6): 1733-7.

13. Cybulsk Zefiryn, krzeminska elzbieta, Majewski Przemyslaw. Enzyme Production and Biotypes of vaginal Candida albicans. Pelish Journal of Microbiology 2005; 54(3): 227-31.

14. Davis leigh E, Shields christen E, Merz William G. Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production Candida dubliniensis. J Clin Microbial .2005; 43(5): 2465-66.

Archive of SID

www.SID.ir