The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sc.
No. 16 , Winter, 2001
Archive of SID
مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی قزوین
شماره ۱۶ - زمستان ۱۳۷۹

مطالعه الگوی الکتروفورتیکی عصاره پروتئین‌های سوماتیک فوزاریوم سولانی

دکتر محمدرضا آقامیریان * ، دکتر فریده زینی **

Analysis of electrophoretic patterns of extracted somatic proteins from fusarium solani

M. Aghamirian F. Zaini

Abstract

Background: *Electrophoretic patterns of extracted somatic proteins from fungi can be useful in identification of different species and strains, and also help to find the sources of infection.*

Objective: *To determine the electrophoretic patterns of extracted somatic proteins from fusarium solani.*

Methods: *Fusarium solani strains UAMH 7419 and UAMH 3317 , isolated from a patient and air respectively, were used to prepare the somatic extract of young mycelia. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method was used to determine the number and characteristics of protein bands.*

Findings: *The somatic proteins extracted from F. solani UAMH 3317 and UAMH 7419 resulted in 16 and 21 protein bands respectively, with molecular weights of 14 to 100 KD.*

Conclusion: *The patient isolated strain of F. solani showed more bands in SDS-PAGE than the air isolated strain.*

Keywords: *Fusarium Solani, Electrophoretic Patterns of Protein*

چکیده

زمینه : *الگوی الکتروفورتیکی عصاره پروتئین‌های سوماتیک قارچ‌ها در تشخیص گونه و سویه‌های آنها مفید است و می‌تواند در تشخیص ارگانیسم‌ها و منبع عفونت کمک شایانی نماید.*

هدف: *این مطالعه به منظور تعیین الگوی الکتروفورتیکی عصاره پروتئین‌های سوماتیک فوزاریوم سولانی صورت گرفت.*

مواد و روش‌ها: *در این مطالعه سویه‌های UAMH ۷۴۱۹ و UAMH۳۳۱۷ فوزاریوم سولانی که اولی از بیمار و دومی از هوا جدا شده بودند جهت استخراج عصاره‌های سوماتیک میسلیوم‌های جوان استفاده شدند. روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور SDS(SDS-PAGE) برای تعیین تعداد و مشخصات پروتئین‌های موجود در عصاره‌ها به کار گرفته شد.*

یافته‌ها: *۱۶ باند پروتئینی از عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه UAMH ۳۳۱۷ و ۲۱ باند پروتئینی بین ۱۴ تا ۱۰۰ کیلودالتون از سویه فوزاریوم سولانی UAMH ۷۴۱۹ شناسایی گردید.*

نتیجه‌گیری: *سویه جدا شده از بیمار در مقایسه با سویه محیطی از لحاظ طیف پروتئینی گسترده‌تر بود.*

کلید واژه‌ها: *فوزاریوم سولانی - الگوی الکتروفورتیکی پروتئینی*

* مربی و عضو هئیت علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

www.SID.ir

www.SID.ir

مقدمه:

فوزاریوم سولانی یک قارچ رشته‌ای ساپروفیت واجد دیواره عرضی (Septate) با رشته شفاف (hyaline) است که در شرایط مستعدکننده نظیر نوتروپنی ، ایدز، پیوند مغز استخوان، سرطان ، سوختگی ، تروما و دیابت می‌تواند بیماری‌هایی نظیر آندوکاردیت، آندوفتالمیت، عفونت منتشره، پریتونیت وکراتیت ایجاد نماید. [۷ و ۱۶ و ۱۸] عفونت ناشی از این قارچ به بسیاری از داروهای معمول مقاوم است.[۱۰] راه ورود گونه‌های فوزاریوم از طریق دستگاه تنفس و پوست و جایگاه اصلی عفونت به ترتیب پوست، خون و ریه است. قارچ پس از ورود و استقرار از طریق خون در بدن منتشر می‌شود و اعضایی چون ریه ، قلب ، کبد، طحال وکلیه را درگیر می‌کند. [۷ و ۱۱] گونه‌های گزارش شده از عفونت‌های انسانی شامل فوزاریوم سولانی ، فوزاریوم اکسی‌سپوروم و فوزاریوم مونیلیفورم هستند.[۲] فوزاریوم سولانی معمول‌ترین عامل فوزاریوزیس است که قادر به ایجاد آسم و آلرژی در انسان می‌باشد.[۱۳ و ۱۴] از طرفی فوزاریوم‌ها به دلیل تولید سم در مواد غذایی انسان و دام و اثرات سوء آن مورد توجه هستند.[۱]

مطالعه الگوی پروتئینی عصاره سوماتیک قارچ‌ها در شناسایی جنس ،گونه و سویهٔ گونه‌های مربوطه مفید است. در حال حاضر یکی از روش‌های معمول برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی، الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل آمید است که نتایج آن علاوه بر تعیین هویت قارچ‌ها می‌تواند در مطالعات اپیدمیولوژیک نیز مورد استفاده قرار گیرد.[۹]

بررسی مطالعات نشان داد که ورما پروتئین‌های سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه ۳۵۹۶ متعلق به انستیتو تحقیقات کشاورزی دهلی و همچنین مندیل پروتئین‌های سوماتیک سویه‌ای فوزاریوم سولانی جدا شده از خاک مورد استفاده برای کشت گوجه فرنگی را در بحرین به روش SDS-PAGE مطالعه نموده‌اند.[۹ و ۱۷] ولی با توجه به این که مطالعه‌ای بر روی پروتئین‌های ایزوله‌های بالینی صورت نگرفته بود و این در حالی است که پروتئین‌های قارچ‌ها در پاتوژنز بیماری نقش مهمی دارند، لذا در این بررسی الگوی پروتئینی عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه بالینی ۷۴۱۹ UAMH و سویه محیطی ۳۳۱۷ UAMH با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

دو سویه فوزاریوم سولانی ۷۴۱۹ UAMH و ۳۳۱۷ UAMH از کانادا تهیه شد. سویه ۷۴۱۹ از بیمار و سویه ۳۳۱۷ از هوا جدا شده بود . این دو سویه بر روی محیط جامد سابورودکستروز آگار محتوی کلرامفنیکل تجدید کشت و سپس به محیط سابوروی مایع منتقل شدند. ارلن مایرهای محتوی کشت مایع به مدت ۱۴ روز در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و هر روز چند بار تکان داده شدند تا از رشد ارگانیسم به صورت ورقه میسلیال (Sheet) در سطح محیط مایع جلوگیری شود. پس از حصول اطمینان از خالص بودن نمونه‌ها به روش میکروسکپی و حذف نمونه‌های آلوده،

www.SID.ir

میسلیوم‌های قارچی به روش فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرون ازمایع جدا شدند. توده‌های میسلیومی دو بار با آب مقطر استریل شستشو و سپس در ظروف استریل جمع‌آوری شدند و پس از توزین در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. ۴گرم توده میسلیومی در ۱۰ میلی‌لیتر فسفات بافر نمکی با pH برابر ۷/۴ حاوی مهارکننده‌های پروتئازی زیر:

/ ۱ میلی مول اتیلن دی آمین تتراستیک اسید سدیم (EDTA)، ۱ میکروگرم در میلی لیتر بستاتین، ۱۰ میکرمول بنزآمیدین هیدروکلراید (BH)، ۱ میلی مول ان- اتیل مالی‌مید (NEM)، ۱ میلی مول فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF)، ۰/۱ میلی مول توسیل آمینو ۲ متیل کلرومتیل کتون (TPCK)، ۰/۱ میلی مول پپستاتین A/

مخلوط و با دستگاه هموژنیزور (Edmund Buhler) با دور RPM ۲۰۰۰ برای ۱۰ بار و هر بار برای ۳۰ ثانیه خرد شد. این میسلیوم‌های خرد شده با هموژنیزور (B. Broun) به کمک گلوله‌های شیشه‌ای با دور RPM ۴۰۰۰ برای ۱۴ بار و هر بار برای ۳۰ ثانیه خرد شدند.[۳] محلول شیری به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در g ×۲۲۰۰ و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در g ×۲۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و مایع رویی از رسوب جدا گردید (Beckan Avanti J-25).[۷] این عصاره سوماتیک به مدت ۲۴ ساعت در برابر آب مقطر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز (Sigma, cut off 12000)[۳] و سپس لیوفیلیزه گردید (Freeze-Dryer FD-1 EYELA) و در دمای ۴۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شد.[۸] عمل سنجش پروتئین در محلول حاوی یک میلی‌گرم پودر عصاره سوماتیک در یک میلی‌لیتر آب مقطر به روش برادفورد انجام شد.[۴] عصاره آماده شده طبق پیشنهاد لاملی (Laemmli) به روش SDS-PAGE با استفاده از سیستم ناپیوسته بر روی ژل مسطح عمودی پلی‌آکریل آمید جداکننده ۱۰ و ۸ درصد و متراکم کننده ۵ درصد (Sigma) و تانک الکتروفورز و Power supply ساخت شرکت پایاپژوهش مشهد آنالیز گردید.[۳] نمونه‌ها قبل از تزریق به درون چاله‌های ژل با بافر نمونه (۰/۱۲۵ مول تریس ـ Hcl محتوی ۲ درصد SDS، ۲ درصد مرکاپتواتانول، ۱۰ درصد گلیسرول، ۲ درصد بروموفنل بلو) رقیق و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه جوشانده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در RPM ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید و مقدار ۲۰تا ۴۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به چاله‌های ژل تزریق شد. بافر ژل متراکم‌کننده محتوی ۰/۱۲۵ مول تریس ـ Hcl با pH برابر ۶/۸ و بافر ژل جداکننده محتوی ۰/۳۷۵ مول تریس ـ Hcl با pH برابر ۸/۸ و بافر تانک محتوی ۰/۰۲۵ تریس ـ Hcl در ۰/۱۹۲ مول گلیسین با pH برابر ۸/۳ بود.[۱۹] مقدار ولتاژ برای ژل متراکم‌کننده ۱۰۰ و برای ژل جداکننده ۱۲۵ بود و الکتروفورز به مدت ۴ ساعت انجام شد. سپس ژل با رنگ کوماسی بلو (۰/۵ درصد کوماسی بلو R-250) در محلولی مرکب از متانول، آب، اسید استیک گلاسیال به نسبت ۵،۴و۱ رنگ آمیزی و توسط رنگ‌بر محتوی متانول و اسید استیک گلاسیال و آب به نسبت ۱،۱و۸ رنگ‌بری گردید.[۳و۱۵] وزن‌های مولکولی تقریبی پروتئین‌های عصاره سوماتیک نمونه‌ها با مقایسه با منحنی استاندارد شامل پروتئین‌های زیر محاسبه شد:

www.SID.ir

Archive of SID

Bovine serum Albumin (۶۷۰۰۰D) Phosphorylase b (۹۴۰۰۰D) , Carbonic Anhyrase (۳۰۰۰۰D) , Ovalbumin (۴۳۰۰۰D) , @-lactalbumine (۱۴۴۰۰D) , Soy Bean trypsin inhibitor (۲۰۱۰۰D).

عمل اسکن نمودن پروتئین‌های عصاره سوماتیک نمونه‌ها با فیلتر ۵۹۰ نانومتر انجام گرفت (Helena, Process-24)[۳].

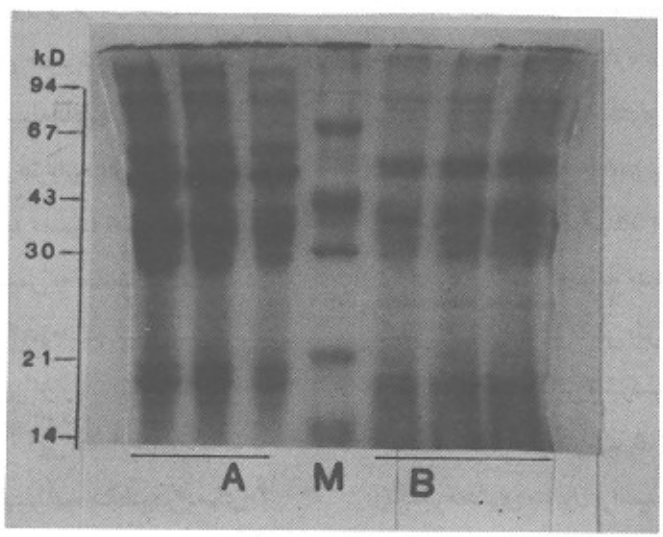
یافته‌ها:

در الکتروفورز پروتئین‌های سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه UAMH ۷۴۱۹ ، پس از محاسبه RF و مقایسه با منحنی استاندارد، ۲۱ باند پروتئینی با وزن‌های مولکولی زیر بر حسب کیلودالتون به دست آمد: ۱۰۰، ۹۵، ۹۲، ۸۶، ۷۸، ۷۲، ۷۰، ۶۶، ۶۱، ۵۶، ۵۴، ۵۰، ۴۸، ۴۳، ۴۰، ۳۶، ۲۷، ۲۲، ۱۸، ۱۶ و ۱۴ (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

درالکتروفورز پروتئین‌های فوزاریوم سولانی سویه UAMH ۳۳۱۷ ، ۱۶ باند پروتئینی با وزن‌های مولکولی زیر بر حسب کیلودالتون به دست آمد:

۹۵، ۸۶، ۷۸، ۷۲، ۷۰، ۶۶، ۶۱، ۵۶، ۵۲، ۴۳، ۳۶، ۳۲، ۲۷، ۲۲، ۱۸ و ۱۴ (شکل‌های شماره ۱ و ۳).

در بین دو سویه فوزاریوم سولانی باندهای پروتئینی ۹۵، ۸۶، ۷۸، ۷۲، ۷۰، ۶۶، ۶۱، ۵۶، ۴۳، ۳۶، ۲۷، ۲۲، ۱۸ و ۱۴ کیلو دالتون مشترک و پروتئین‌های جدا شده در هر دو سویه بین ۱۴ تا ۱۰۰ کیلو دالتون بود. سویه UAMH ۷۴۱۹ جدا شده از بیمار دارای باندهای پروتئین بیشتری نسبت به سویه ۳۳۱۷ UAMH جدا شده از هوا بود.

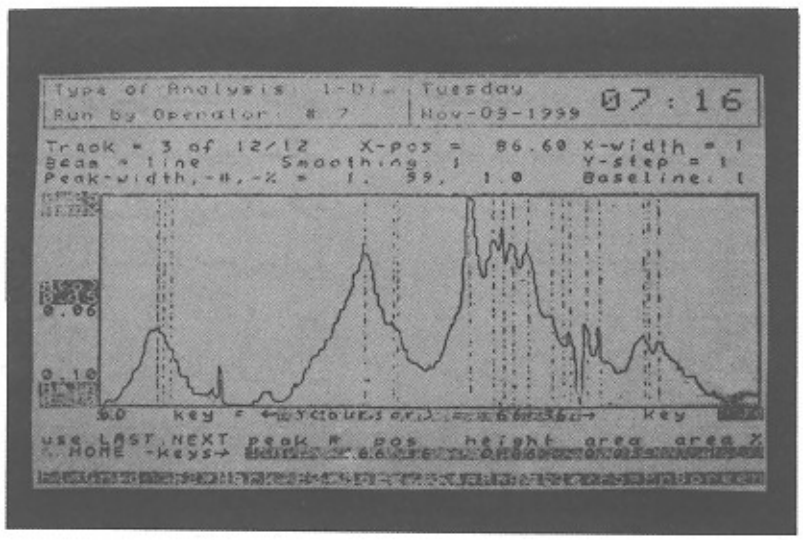


شکل ۱ :

الگوی الکتروفورتیکی عصاره‌های پروتئین‌های سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه UAMH ۷۴۱۹ ، نمونه‌های (A) با غلظت‌های مختلف به ترتیب از سمت چپ به راست ۳۵، ۳۰ و ۲۵ میکروگرم و سویه UAMH ۳۳۱۷ (B) با غلظت‌های مختلف به ترتیب از سمت راست به چپ ۳۵، ۳۰ و ۲۵ میکروگرم ، همراه با مارکر وزن ملکولی (M) بر روی ژل ۱۰ درصد به روش SDS-PAGE

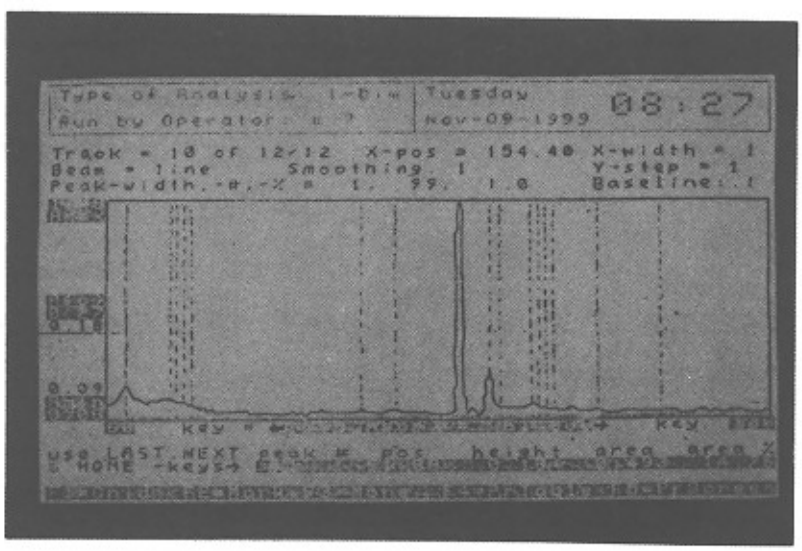
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲ :

دانسیتومتری باندهای پروتئینی فوزاریوم سولانی سویه ۷۴۱۹ *UAMH*



شکل ۳ :

دانسیومتری باندهای پروتئینی فوزاریم سولانی سویه ۳۳۱۷ *UAMH*

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری:

گونه فوزاریوم یکی از مهم‌ترین آئروآلرژن‌ها و عامل مهم ایجاد کننده فوزاریوزیس است. [۲] در این پژوهش برای تهیه عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی از کشت متحرک در محیط سابوروی مایع و برای خرد کردن از روش مکانیکی با دستگاه هموژنیزور و گلوله‌های شیشه‌ای استفاده شد. زیرا عدم کارایی روش‌هایی چون شوک اسمزی یا سیکل‌های مکرر انجماد و ذوب درتهیه عصاره سوماتیک قارچ‌ها به علت سختی زیاد و آسیب ناپذیر بودن دیواره آنها ثابت شده است. پس از خرد کردن سلول، بقایای دیواره سلول و ارگانل‌های داخل سلولی به کمک سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد جداسازی شد تا پروتئین‌های درون سلولی آزاد شده تحت تأثیر گرمای محیط دناتوره نشوند. [۴]

در این بررسی از روش SDS-PAGE برای جداسازی زیرواحدهای پروتئینی و تخمین وزن مولکولی آنها استفاده گردید. اُهنو نیز وزن مولکولی آمیلاز ۱ و ۲ خارج سلولی را ازگونه‌ای قارچ فوزاریوم، با این روش تعیین نمود. [۱۲] هیرن نیز از روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ برای نشان دادن اختلاف‌های آنتی‌ژنیک سویه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس استفاده کرد. [۵]

در این مطالعه سویه UAMH ۷۴۱۹ که از بیمار جدا شده بود دارای ۲۱ باند پروتئینی و سویه UAMH۳۳۱۷ که از هوا به دست آمده بود دارای ۱۶ باند پروتئینی بود. احتمالاً همین تفاوت‌های پروتئینی است که باعث پاتوژنیسیتی بیشتر و ایجاد بیماری می‌شود. در مطالعه بر روی سویه‌های محیطی و کلینیکی یک گونه آسپرژیلوس‌نیز اختلافات چشمگیری در تعداد و نوع پروتئین‌ها مشاهده شد. [۶] ورما در مطالعه پروتئین‌های سوماتیک فوزاریوم سولانی سویه ۳۵۹۶که از انستیتو تحقیقات کشاورزی دهلی تهیه کرده بود موفق به شناسایی ۱۸ باند پروتئینی شد. [۱۷] مندیل نیز در مطالعه پروتئین‌های سوماتیک سویه‌ای از فوزاریوم سولانی به دست آمده از خاک بحرین به همان روش ۱۸ باند پروتئینی را از ۲۱ تا ۱۰۰کیلودالتون شناسایی نمود. [۹]

اطلاعات موجود نشان می‌دهد که از روش SDS-PAGE می‌توان برای تفکیک سویه‌های فوزاریوم و معلوم نمودن اختلافات ژنوتیپی آنها استفاده کرد. زیرا تفاوت الگوی الکتروفورتیکی پروتئین‌ها دلالت بر تفاوت‌های ژنومی آنها دارد. با توجه به جدا شدن پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۱۰۰، ۹۲، ۵۴، ۵۰، ۴۸، ۴۰ و ۱۶ در سویه بالینی ۷۴۱۹ UAMH ، لازم است تحقیقاتی بر روی نحوه آنتی‌ژنیسیتی آنها انجام شود.

مراجع:

۱ ـ زینی فریده، مهبد امیرسیدعلی، امامی مسعود. قارچ شناسی پزشکی جامع. چاپ اول ، انتشارات دانشگاه تهران، زمستان ۱۳۷۷ : ۵۳۲

2. Bennett E J, Chung KJ K. Medical Mycology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992: 745-7

3. Bollag D M, Edelstein S J. Protein Methods. 3th ed, Wiley liss, 1992: 30-42

4. Copeland R A. Methods for protein analysis.

www.SID.ir

Archive of SID

CHAPMAN & HALL, 1994: 32-45

5. Hearn V M, Wilson E V. Immunochemical studies of Aspergillus fumigatus mycelial antigens by polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting techniques. J Gen Microbiol 1990; 136: 1525-35

6. Howard D. Pathogenic for Human and animal. New York, Marcel Dekker, 1983, Part B: 9-11

7. Kibbler GC, Mackenzie D W R, Odds FC. Principles and practice of clinical mycology. John wiley & Sons, 1996: 98-99

8. Longbottom JL, Austwick P K C. Handbook of Experimental Immunology. Volume 1 Edited by weir D M, 1992: 121-33

9. Mandeel A, Gamal Y, Mohammed A. Analysis of SDS-dissociated proteins of pathogenic and nonpathogenic fusarium species. Mycopathologia 1996: 127: 159-66

10. Minor R, Pfaller MA, Glingrich RD. Disseminated Fusarium infections in patients following bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1989; Nov; 4(6): 653-8

11. Murphy W J, Friedman H. Fungal infections and Immune Responses. Plaenum Tress 1993; PP: 418-9

12. Ohono N. Purification and properties of amylases extracellulary produced by an imperfect fungus. Biosci Biotechnol Biochem 1992 Mar; 56(3): 456-71

13. Rabodonirina M, Piens MA, Monier MF. Fusarium infection in immunocompromised patients; case reports and literature review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994 Feb; 13(2): 152-61

14. Tarlo SM, Fradkin A. Skin testing with extracts of fungal species drived from the homes of allergy clinic patients in Toronto Canada. Clin Allergy 1988 Jan; 18(1): 45-52

15. Towner KJ, Cockayne A. Molecular Methods for microbial identification and typing. 2nd ed, Chapman & Hall, 1995: 131-42

16. Valenstein P, Schell WA. Primary intranasal fusarium infection potential for confusion with rhinocerebral zygomycosis. Arch Pathol lab Med 1986 Aug; 110(8): 751-4

17. Verma J. Fusarium solani, Immunochemical characterization of Allergens. Int Arch Allergy Immunol 1994; 104: 175-183

18. Viscoli C, Castagnola E, Moroni C, Garaventa A.Infection with Fusarium species in two children with neuroblastoma. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990 Oct; 9(10): 773-6

19. Zaini F, Moore M K, Hatbi D et al. The antigenic composition and protein profiles of eumycetoma agents. Mycoses 1991; 35: 19-28

www.SID.ir