جداسازی و شناسایی گالاکتو مانان پروتئین از *Aspergillus fumigatus* AF-293

نریمان شاه حسینی*[۱]، علیرضا خبیری[۲]، فریده باقری[۳]، مهدی آسمار[۴]، ناصر قائمی[۵]

۱، ۴ و۵- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲ و ۳- انستیتو پاستور ایران، بخش قارچ شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

(*عهده دار مکاتبات - Nariman.Shahhosseini@yahoo.com)

چکیده

خانواده *Aspergillus* جزء قارچ‌های فرصت طلب می‌باشند که سبب سندرم‌های تهاجمی و آلرژیک می شوند. بیش از ۲۰۰ گونه *Aspergillus* شناسایی شده است، که ۱۸ گونه آن برای انسان بیماری‌زا می‌باشند. گالاکتومانان یکی از مولکول‌های مهم در قارچ بیماری‌زا و فرصت طلب *Aspergillus fumigatus* محسوب می‌شود. گالاکتومانان در بدن میزبان نیز توسط قارچ تولید شده و به عنوان یک ساختار آنتی ژنی برای *A. fumigatus* مطرح می‌باشد. هدف اصلی از انجام این مطالعه شناسایی گالاکتو مانان بود، از این‌رو *A. fumigatus* سویه AF-293 در محیط کشت سابوراد مایع در ۳ حالت مختلف از نظر شرایط دمایی کشت داده شد. پس از خالص سازی گالاکتومانان، نمونه‌ها توسط ژل SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس گالاکتومانان پروتئین با تکنیک نقره رنگ آمیزی شده و توسط تکنیک الکترو بلاتینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های سرم از ۱۵ بیمار مشکوک به عفونت آسپرژیلوسی در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. سرم‌ها به منظور حضور آنتی بادی بر علیه گالاکتومانان پروتئین *A. fumigatus* توسط تکنیک ELISA غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان دادند که گالاکتو مانا پروتئین در بخش ۶۰ کیلو دالتون حضور دارد. از سوی دیگرنتایج حاصل از ELISA غیر مستقیم نیز نشان داد که گالاکتومانان پروتئین می‌تواند به صورت آنتی ژنی با سرم بیماران واکنش دهد.

کلمات کلیدی: آسپرژیلوزیس، گالاکتومانان پروتئین، جداسازی.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

قارچ‌ها را می‌توان در سراسر دنیا یافت. قارچ‌ها در محیط‌های خاکی و یا به عنوان پارازیت و یا همیار در حیوانات و گیاهان مشاهده می‌شوند. *Aspergillus* ها طور وسیعی در محیط پراکنده بوده و در خاک، بر روی گیاهان و مواد آلی در حال فساد یافت می‌شوند. این قارچ‌ها در هوا، آب، غذا و گرد و غبار وجود دارند. بیماری‌های انسانی توسط *Aspergillus* ها در نتیجه کلونیزه شدن آن‌ها در سیستم تنفسی ایجاد می‌شود مانند پنومونی با حساسیت بالا، تورم مایع مخاطی بینی، سینوزیت و آسم (۹و۱۶). به طور معمول بیماری آسپرژیلوزیس در افرادی که دچار اختلال در سیستم ایمنی می‌باشند مانند بیماران HIV و لوسمی یا بیمارانی که برای مدت طولانی تحت مراقبت‌های شدید در بیمارستان بستری شده‌اند و یا بیمارانی که پس از عمل پیوند عضو سیستم ایمنی آن‌ها سرکوب شده است ظاهر می‌شود. از ویژگی‌های بیولوژیک *Aspergillus* می‌توان به اسپور کوچک آن، رشد در دمای بالای بدن انسان، مقاومت به مرگ اکسیداتیو و توانایی آن در تولید متابولیسم‌های کوچک و آنزیم‌های پروتئولیتیک و یا حتی آنزیم‌هایی که دارای فعالیت سرکوبگر برای سیستم ایمنی می‌باشند اشاره نمود (۱و۴).

در اشخاص طبیعی این کپک‌ها قادرند عفونت موضعی در ریه، سینوس‌ها و سایر نقاط بدن ایجاد کنند، همچنین امکان دارد بیماری غیرعفونی و آلرژیک در افراد آتوپیک و غیرآتوپیک ایجاد نمایند. خانوادهٔ *Aspergillus* انواع گوناگونی از آنزیم‌های خارج سلولی مانند متالوپروتئازها، فسفولیپازها، و متابولیت‌های اولیه مثل مانیتول، گالاکتو مانان و متابولیت‌های ثانویه مثل گلیوتوکسین را تولید می‌کنند که تمامی این آنزیم‌ها و متابولیت‌ها می‌تواند به عنوان نشانگری برای تشخیص آسپرژیلوزیس تهاجمی به کار رود (۵و۱۰). گالاکتو مانان یک ترکیب پلی ساکاریدی می‌باشد که دراکثر *Aspergillus* و *Penicillium* وجود دارد و به علت خاصیت آنتی‌ژنی گالاکتو مانان، در علم قارچ شناسی پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲و۳). علاوه بر آن، تحقیقات متعددی نشان داده است که گالاکتو مانان در مایعات بیولوژیکی بیماران مبتلا به عفونت آسپرژیلوزیس تهاجمی از قبیل سرم، ادرار، برونکوآلوئولار لاواژ (BAL)، مایع پری تونیال، مایع پری کاردیال و مایع مغزی- نخاعی قابل شناسایی است نیز *A. fumigatus* در فاز فعال رشد می‌تواند گالاکتومانان را به داخل محیط رشد خود ترشح می‌کند (۱۲، ۱۳و۱۴). از این رو اهمیت گالاکتومانان به عنوان یک فاکتور تشخیص برای بیماری آسپرژیلوزیس ما را بر آن داشت که به شناسایی و جداسازی آن اقدام نماییم.

مواد و روش‌ها

گونه‌ی قارچ و شرایط کشت قارچ

ابتدا قارچ *A. fumigatus*، سویه AF-۲۹۳ از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی عفونی ایران (PTCC) تهیه شده و سپس به درون محیط کشت سابوراد مالتوز مایع تلقیح شد. محیط کشت مایع به ترتیب داخل انکوباتور شیکر (مدلJSSI-100T) قرار داده شد (rpm = ۱۵۰):

یک محیط کشت در دمای ۲۵°C و ۲ محیط کشت دیگر در دمای ۳۷°C کشت داده شدند، محیط کشت اول را برای مدت ۱ روز و دیگری برای ۷۲

Archive of SID

www.SID.ir

ساعت (۳ روز) داخل انکوباتور کشت داده شد. سپس محیط‌ها خارج شدند و محیط کشت با استفاده از کاغذ واتمن ۴۰ فیلتر شد تا سوپ از میسلیوم‌ها جدا شود. سوپ‌های فیلتر شده داخل لوله آزمایش ریخته شد و به منظور جلوگیری از رشد قارچ به آن آزید سدیم اضافه شد.

تخلیص گالاکتو مانان پروتئین از سوپ کشت ۲۵°C و کشت ۳۷°C

سوپ کشت ۲۵°C و کشت ۳۷°C (۱ روزه و ۳ روزه) را که به حجم ۴ برابر اتانول، به منظور رسوب دهی گالاکتو مانان پروتئین، اضافه شده بود را پس از ۲۴ ساعت از یخچال خارج کرده و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس گالاکتو مانان پروتئین ته نشین شده و مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله‌ی بعدی رسوب حاصله را ۳ بار با الکل شستشو داده به این ترتیب که در هر بار شستشو لوله را داخل سانتریفیوژ قرار داده به مدت ۲۰ دقیقه در rpm = ۴۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد و پس از هر با شستشو مایع رویی را دور ریخته و رسوب مجدداً شستشو داده شد. در پایان ۱۲ نمونه مطابق جدول شماره ۱ خواهیم داشت.

آنالیز گالاکتومانان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE

ابتدا ۵۰ میکرو لیتر از هر نمونه با ۱۰ میکرو لیتر بافر نمونه ترکیب شده و ترکیب برای مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس نمونه‌ها درون چاهک‌های ژل SDS-PAGE ریخته شدند. پس از زمان ۱/۳۰ دقیقه نمونه‌ها به پایان ژل رسیده و ژل‌ها جهت رنگ‌آمیزی و بلاتینگ آماده-سازی شدند.

جدول ۱: تقسیم‌بندی نمونه‌ها بر اساس دمای کشت قارچ و شرایط نگهداری

شرایط / نمونه	دمای کشت قارچ (سلسیوس)	دمای نگهداری (سلسیوس)
سوپ کشت	۲۵	۳۷
سوپ کشت	۲۵	-۲۰
رسوب اتانولی	۲۵	۳۷
رسوب اتانولی	۲۵	-۲۰
سوپ کشت	۳۷ (۱ روزه)	۳۷
سوپ کشت	۳۷ (۱ روزه)	-۲۰
رسوب اتانولی	۳۷ (۱ روزه)	۳۷
رسوب اتانولی	۳۷ (۱ روزه)	-۲۰
سوپ کشت	۳۷ (۳ روزه)	۳۷
سوپ کشت	۳۷ (۳ روزه)	-۲۰
رسوب اتانولی	۳۷ (۳ روزه)	۳۷
رسوب اتانولی	۳۷ (۳ روزه)	-۲۰

رنگ آمیزی نیترات نقره

برای مدت زمان ۱ ساعت یا یک شب تا صبح ژل را در محلول تثبیت قرار داده و سپس با اتانول ۵۰٪، ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه شستشو داده شدند. در مرحله بعد ژل در محلول Pretreatment برای مدت ۱ دقیقه قرار گرفت و سپس ژل با آب مقطر ۳ مرتبه هر بار ۲۰ دقیقه شستشو شد. ژل در محلول نیترات نقره قرار داده شد و برای مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرا داده شد. سپس ژل را خارج کرده و ۴ مرتبه هر بار ۲۰ دقیقه ژل با آب مقطر شستشو داده شد. پس از شستشو ژل در محلول ظهور قرار داده و روی شیکر قرار داده تا باندها

Archive of SID

www.SID.ir

ظاهر گردد. پس از ظهور باندها ژل در داخل محلول توقف قرار داده شد.

تکنیک الکترو بلاتینگ

به منظور انتقال باندها ابتدا تعدادی کاغذ واتمن را به بافر انتقال آغشته کرده و در دستگاه قرار داده شد. سپس کاغذ نیترو سلولز نیز به بافر انتقال آغشته شده و روی کاغذها قرار داده شدند. با استفاده از یک پیپت شیشه‌ای به طور غلتکی تمام حباب‌های هوای بین کاغذ نبترو سلولز و کاغذ صافی را خارج کرده و سپس ژل روی آن قرار داده شد. مجدداً تعدادی کاغذ را به بافر انتقال آغشته کرده و روی ژل قرار داده شدند. جریان برق روی ۱۲ ولت برای مدت زمان ۳-۲/۵ ساعت تنظیم شد. پس از اتمام زمان، کاغذ در محلول ۱٪ BSA قرار داده شد تا سایت‌های غیر اختصاصی بلاک شود. سپس کاغذ در محلول ۰/۱ مولار پری آیودیت به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. کاغذ به خوبی با آب شستشو داده شد. در مرحله بعد بر روی کاغذ آنزیم پر اکسیداز ریخته و ۳۰ دقیقه بر روی تکان دهنده قرار داده شد. سپس کاغذ با محلول PBS-Tween 20 شستشو داده شد. محلول DAB (سوبسترایی که به آنزیم متصل می‌شود) را روی کاغذ ریخته تا باندها ظاهر شوند.

بررسی آنتی نیسیته گالاکتومانان پروتئین

۱۰۰ میکرو لیتر از آنتی ژن استخراج شده با نسبت ۱:۲۰۰۰ در محلول PBS رقیق قرار داده شد. آنتی ژن را به داخل پلیت‌ها ریخته و یک شب تا صبح اجازه داده شد تا آنتی ژن به سطح پایین پلیت‌ها coat شود. سپس در روز بعد ۱۰۰ میکرو لیتر از sample dilution داخل هر پلیت ریخته شد. ۱۰ میکرو لیتر از سرم بیماران مشکوک به آسم آلرژیک که از بیمارستان مسیح دانشوری تهیه شده بود را داخل هر پلیت ریخته، به جزء خانه اول که به عنوان شاهد خالی گذاشته شد. ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس با محلول شستشو ۴ بار به خوبی پلیت‌ها شسته شدند. در این مرحله ۱۰۰ میکرو لیتر conjugate را که ۱:۵۰۰۰ رقیق نموده‌ایم را به پلیت‌ها اضافه کرده و در تاریکی برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده. سپس با محلول شستشو ۴ بار به خوبی پلیت‌ها شسته شدند. در مرحله بعد به هر خانه ۱۰۰ میکرو لیتر TMB اضافه نموده و خانه‌ها به رنگ آبی تغییر رنگ می‌دهند. به منظور توقف واکنش ۱۰۰ میکرو لیتر HCL 1N به هر خانه اضافه نموده و خانه‌ها زرد می شوند. دانسیته نوری پلیت‌ها در طول موج nm ۴۵۰ قرائت شدند.

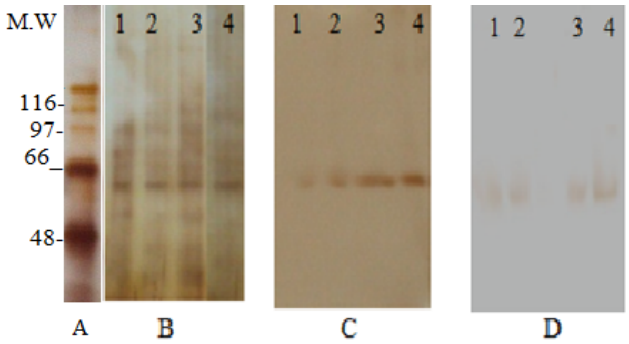
نتایج

شناسایی گالاکتو مانان پروتئین

گالاکتو مانان پروتئین‌ها جزء متابولیت‌های اولیه می‌باشند که در محیط کشت *A. fumigatus* آزاد می‌شوند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گالاکتو مانان پروتئین یک گلیکو پروتئین می‌باشد و دارای وزن مولکولی ۵۵-۶۰ کیلو دالتون می‌باشد. ارزیابی سوپ کشت و رسوب اتانولی برای هر ۳ شرایط کشت ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۱ روزه و ۳ روزه) که با تکنیک رنگ آمیزی نقره بر روی ژل SDS-PAGE ارزیابی شده است نشان دادند که گالاکتو مانا پروتئین در بخش ۶۰ کیلو دالتون حضور دارد.

Archive of SID

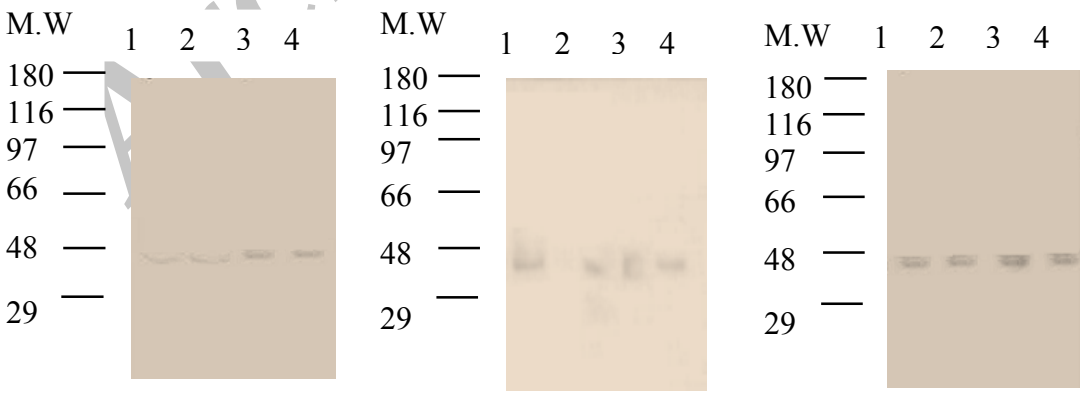
www.SID.ir



شکل ۱: رنگ آمیزی نقره بر روی ژل الکتروفورز. وزن مولکولی (ستون A). تصویر B گالاکتو مانان پروتئین ترشحی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی انکوباسیون ۳ روزه، تصویر C گالاکتو مانان پروتئین ترشحی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی انکوباسیون ۱ روزه، تصویر D گالاکتو مانان پروتئین ترشحی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس طی انکوباسیون ۱ روزه. ستونهای ۱و۲ به ترتیب : سوپ کشت ذخیره شده در دمای ۳۷ و -۲۰ درجه سانتی گراد و ستونهای ۳و۴ به ترتیب گالاکتومانان پروتئین جداسازی شده از رسوب اتانولی ذخیره شده در دمای ۳۷ و -۲۰ درجه سانتی گراد است.

الکترو بلاتینگ

با توجه به خاصیت اکسیدکنندگی Periodate، در این مطالعه توانستیم بخش کربوهیدراتی گالاکتو مانو پروتئین را توسط Periodate بر روی کاغذ نیترو سلولز به آلدهید تبدیل کرده و سپس گروه آلدهیدی در گالاکتو مانو پروتئین به بخش آمینی آنزیم پر اکسیداز متصل می‌شود و در پایان DAB به این مجموعه متصل شده و با ایجاد رنگ سبب آشکار شدن مجموعه می-گردد. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است مولکول گالاکتو مانو پروتئین پس از اکسیداسیون بخش ساکاریدی در بخش ۶۰ کیلو دالتون قرار گرفته است.



شکل ۲: باندهای منتقل شده به کاغذ نیترو سلولز. تصویر سمت چپ گالاکتو مانان پروتئین ترشحی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی انکوباسیون ۳ روزه، تصویر وسط گالاکتو مانان پروتئین ترشحی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی انکوباسیون ۱ روزه، تصویر سمت راست گالاکتو مانان پروتئین ترشحی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس طی انکوباسیون ۱ روزه. ستون‌های ۱و۲ به ترتیب: سوپ کشت ذخیره شده در دمای ۳۷ و -۲۰ درجه سانتی گراد و ستون‌های ۳و۴ به ترتیب گالاکتومانان پروتئین جداسازی شده از رسوب اتانولی ذخیره شده در دمای ۳۷ و -۲۰ درجه سانتی گراد است.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج حاصل از ELISA

به منظور انجام تست از ۱۵ بیمار مشکوک به آسم آلرژیک در بیمارستان مسیح دانشوری خون‌گیری به عمل آمده و پس از تهیه سرم از نمونه خون بیماران، نمونه‌ها توسط آزمون الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. پلیت‌ها را داخل دستگاه ELISA reader قرار داده و در طول موج ۴۵۰ nm، دانسیته نوری هر پلیت خوانده شده که نتایج به شرح جدول ۲ قرائت می‌شوند.

نتایج حاصل از ELISA غیر مستقیم نشان داد که گالاکتو مانان پروتئین می‌تواند به صورت آنتی ژنی با سرم بیماران واکنش دهد. سرم بیماران داخل پلیت A1 شاهد بوده و با توجه به محاسبه cut-off به میزان ۰/۵ ng/ml که در مطالعه دیگری در راستای همین تحقیق صورت پذیرفت می توان اینگونه نتیجه گیری کرد: پلیت‌های D1,E1,G1,A2,C2,E2,F2,H2 مثبت گزارش می‌شوند که بیان‌گر مواجه بیمار در گذشته با اسپور *A. fumigatus* و حضور IgG در سرم شخص می‌باشد و سرم ۷ بیمار نیز منفی گزارش می‌گردد.

جدول ۲: میزان OD قرائت شده برای پلیت‌ها در طول موج ۴۵۰ nm

	۱	۲
A	۰/۰۶۵	۰/۵۱۲
B	۰/۸۲۳	۰/۳۶۷
C	۰/۱۸۰	۰/۶۶۳
D	۰/۵۱۲	۰/۴۳۵
E	۰/۵۵۳	۰/۵۷۹
F	۰/۰۹۶	۰/۹۴۶
G	۰/۵۶۰	۰/۴۸۲
H	۰/۴۸۷	۰/۷۱۷

بحث

جزئیات در رابطه با ترشح گالاکتو مانان به طور کامل مشخص نشده است و نکات قابل توجهی هنوز به صورت نامشخص باقی مانده است. فاز رشد، سیستم ایمنی میزبان و پاتولوژی، همگی ممکن است در ترشح گالاکتو مانان نقش داشته باشند. در این مطالعه ما به بررسی نقش شرایط مختلف دمایی بر ترشح گالاکتومانان در محیط کشت پرداختیم. طی انجام این مطالعه ۲ دما جهت کشت *A. fumigatus* مورد بررسی قرار گرفت. دمای ۳۷ ^{o}C به دو دلیل انتخاب گردید: اولاً، توانایی رشد در دمای ۳۷ ^{o}C یک وجه تفاوت *A. fumigatus* از دیگر قارچ‌های غیر بیماری‌زا می‌باشد زیرا دیگر قارچ‌های غیر بیماری‌زا نمی‌توانند همچون *A. fumigatus* در ۳۷^{o}C رشد نمایند. ثانیاً، یکی از ویژگی‌های بیولوژیکی *A. fumigatus* تحمل پذیری آن در دمای بالا می‌باشد که این امر اجازه رشد در دمای بدن انسان را به *A. fumigatus* می‌دهد. دمای دیگری که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، دمای ۲۵ ^{o}C بود که به عنوان دمای رشد استاندارد انتخاب گردید تا در پایان به ما اجازه مقایسه آنتی ژن ترشح شده در محیط کشت در ۲ شرایط دمایی مختلف را بدهد. نتایج حاصل از SDS-PAGE توسط الکترو بلاتینگ مورد تائید قرار گرفت و در هر دو مورد ترشح گالاکتو مانان در هر دو شرایط کشت از نظر دمایی ثابت گرید.

فاکتور دیگری که در این مطالعه مورد توجه قرار داده شد، مدت زمان انکو باسیون قارچ در محیط کشت سابورانت مایع بود. نتایج به دست آمده از این مطالعه ثابت کرد که دمای انکو باسیون *A. fumigatus* در ترشح آنتی ژن گالاکتو مانان پروتئین در دمای ۲۵

Archive of SID

www.SID.ir

درجه سلسیوس اثر خاصی ندارد اما در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بهترین ترشح گالاکتو مانان پروتئین در روز اول انکوباسیون رخ می‌دهد و در صورت انکوباسیون محیط کشت به مدت ۳ روز متابولیت‌های دیگری علاوه بر گالاکتو مانان پروتئین نیز به داخل محیط کشت ترشح می‌گردد.

الگوهای آنتی ژنی یکسان در هر دو دمای ۳۷°C، ۲۵ نشان دادند که گوناگونی در شرایط استخراج گالاکتو مانان پروتئین و دمای رشد (۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس) ارتباط معنی داری با ترشح آنتی ژنی نشان نمی‌دهد اما عوامل دیگری همچون مدت زمان انکو باسیون که در این مطالعه بررسی شد و ترکیبات محیط کشت که توسط J-P.Latge بررسی شد، می‌توانند در ترشح گالاکتو مانان پروتئین نقش داشته باشند. الگوهای آنتی ژنی حاصل از کشت *A. fumigatus* در محیط‌های مختلف همچون Czapek-Dox و Sabouraud نشان می‌دهند که ترکیبات محیط نقشی اساسی در ترشح آنتی‌ژن در محیط دارند (۱۱).

دیگر شرایطی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، بررسی مقاومت گرمایی آنتی‌ژن (از نمونه‌های رسوب اتانولی و محیط کشت فیلتر شده) در دمای ۳۷°C بود. بر اساس اطلاعات به دست آمده از SDS-PAGE و الکتروبلاتینگ می‌توان نتیجه گرفت که گالاگتو مانان پروتئین انکو باسیون شده در ۳۷°C به مدت ۳۰ روز به منظور دناچوره کردن قسمت پروتئینی از آنتی‌ژن گالاکتو مانان پروتئین و ۲۰- سلسیوس به عنوان دمای ذخیره سازی آنتی ژن، پس از الکتروفورز دارای وزن مولکولی یکسان بر روی ژل می‌باشند. از این اطلاعات می‌توان به این نتیجه رسید که گالاکتو مانان می‌تواند ساختار شیمیایی خود را در دمای ۳۷°C حفظ نماید و دناچوره نشود اما آنتی ژنیسیته گالاکتو مانان پروتئین پس از مدت طولانی انکو با سیون در دمای ۳۷°C تحت بررسی می‌باشد.

با مقایسه این مطالعه با مطالعه صورت گرفته توسط گروه تحقیقاتی W.Morelle و J-P.Latge از انستیتو پاستو فرانسه (۱۱)، متوجه شدیم که تاکنون مقالات مختلفی استفاده از تکنیک رنگ آمیزی Coomassie blue را جهت شناسایی گالاکتو مانان پروتئین بر روی ژل گزارش داده اند، اما هیچکدام از مطالعات پیشین از روش رنگ آمیزی نقره جهت شناسایی گالاکتو مانان پروتئین استفاده نکرده‌اند. از آن جایی که حساسیت تکنیک رنگ آمیزی تقره، ۵۰ برابر رنگ آمیزی Coomassie blue می‌باشد (تکنیک Coomassie blue می‌تواند باندهای ۵۰ ng را بر روی ژل شناسایی کند در حالی که رنگ آمیزی نقره می‌تواند باندهای ۱ ng را نیز شناسایی نماید) (۶-۷) و از سوی دیگر چون میزان گالاکتو مانان پروتئین استخراج شده در این مطالعه در حد چند نانوگرم بود، تصمیم گرفتیم که در این مطالعه برای اولین بار از تکنیک رنگ آمیزی نقره برای ظهور باندهای گالاکتو مانان پروتئین استفاده شود. بر خلاف مدت زمان معمول برای ظهور باندهای پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE که ۱۰ تا ۱۵ دقیقه می‌باشد، مدت زمان ۱ ساعت و حتی گاهی ۱/۳۰ ساعت جهت ظهور باندهای گالاکتومانان پروتئین بر روی ژل توسط تکنیک رنگ‌آمیزی نقره لازم است (۸و۱۵). در این جا ۲ فرضیه برای این تاخیر بیان می‌کنیم: اول آن که، بخش پلی ساکاریدی گالاکتو مانان پروتئین ممکن است مانند سدی در مقابل یون نقره عمل نماید و سبب تاخیر در رسیدن یون نقره به بخش پروتئینی گالاکتو مانان پروتئین شود. فرضیه دوم در

Archive of SID

www.SID.ir

رابطه با مقدار گالاکتو مانان پروتئین در ژل می‌باشد. از آن جایی که مقدار گالاکتو مانان پروتئین استخراج شده در این مطالعه در اندازه چند نانوگرم بود، این امر ممکن است سبب تاخیر در رنگ آمیزی شده باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمام عزیزانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند به ویژه همکاران در انستیتو پاستور ایران سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. Banerjee, B., Kurup, V. P., Greenberger, P. A., Hoffman, D. R., Nair, D. S., Fink, J. N., 1997. Purification of a major allergen, Asp f_2 binding to Ig*E* in allergic bronchopulmonary aspergillosis, from culture filtrate of *Aspergillus fumigatus*. J Allergy Clin Immunol. 99: 821–827.
2. Barreto-Bergter, E., Gorin, P. A. J., Travassos, L. R., 1981. Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*. Carbohydr. Res. 95:205-218.
3. Bennett, J. E., Bhattacharjee, A. K., Glaudemans, C. P. J., 1985. Galacto-furanosyl groups are immunodominant in *Aspergillus fumigatus* galactomannan. Mol. Immunol. 22:251-254.
4. Crameri, R., Blaser, K., 1996. Cloning *Aspergillus fumigatus* allergens by the pJuFo filamentous phage display system. Int Arch Allergy Immunol. 110: 41–45.
5. Francis, P., Lee, J. W., Hoffman, A., et al., 1994. Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: the potential role of bronchoalveolar D-mannitol and serum galactomannan as markers of infection. *J Infect Dis*. 169: 356–68.
6. Golgi, C., 1873. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana (Lombardia)*. 33: 244–246.
7. Hempelmann, E., Schulze, M., Götze, O., 1984. Free SH-groups are important for the polychromatic staining of proteins with silver nitrat. *Neuhof V (ed) Electrophoresis '84 , Verlag Chemie Weinheim.* 328–330.
8. Kerenyi, L., Gallyas, F., 1973. Über Probleme der quantitiven Auswertung der mit physikalischer Entwicklung versilberten Agarelektrophoretogramme. *Clin. Chim. Acta* 47: 425–436.
9. Kurup, V. P., Banerjee, B., 2000. Fungal allergens and peptide epitopes. Peptides. 21: 589–599.
10. Latge, J. P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 12: 310–50.
11. Latge, J. P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J. P., 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun, 62:5424–33.
12. Reiss, E., Lehmann, P. F., 1979. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. Infect. Immun. 25:357-365.
13. Sakaguchi, O., Yokota, K., Suzuki, M., 1969. Immunochemical and biochemical studies of fungi. XIII. On the galactomannans isolated from mycelia and culture filtrates of several filamentous fungi. Jpn. J. Microbiol. 13:1-7.
14. Salt, S. D., Gander, J. E., 1988. Peptidophosphogalactomannans from *Penicillium charlesii*: Effects of culture pH and phosphate limitation. Exp. Mycol. 12:243-257.
15. Switzer, R. C., Merril, C. R., Shifrin, S., 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 98 (1): 231–237.
16. Terr, A. I., 2004. Are indoor molds causing a new disease. J Allergy Clin Immunol. 113: 221-226.

Archive of SID

www.SID.ir