

مطالعه وسترن بلاتینگ آنتی ژنهای پروتئینی سوماتیک فوزاریوم سولانی

محمد رضا آقامیریان^{۱*} ، فریده زینی^۲

(۱) استادیار بخش انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی قزوین

(۲) استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱/۱

چکیده

مقدمه: الگوی وسترن بلاتینگ آنتی ژنهای پروتئینی عصاره های سوماتیک قارچها در تشخیص گونه و سویه های آنها مفید بوده و می تواند کمک با ارزشی در تشخیص عامل عفونت باشد.

این مطالعه به منظور تعیین الگوی آنتی ژنهای پروتئینی عصاره سوماتیک فوزاریوم سولانی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه سویه UAMH ۷۴۱۹ و UAMH ۳۳۱۷ فوزاریوم سولانی که اولی از بیمار و دومی از هوا جدا شده بود جهت بررسی الگوی آنتی ژنیک سوماتیک میسلیمهای جوان استفاده گردید، روش الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) و وسترن بلاتینگ برای تعیین تعداد و مشخصات آنتی ژنهای پروتئینی موجود در عصاره ها بکار گرفته شد.

یافته های پژوهش: در آنالیز وسترن بلاتینگ عصاره سوماتیک سویه UAMH ۷۴۱۹ فوزاریوم سولانی ۱۶ باند آنتی ژنیک و سویه UAMH ۳۳۱۷ فوزاریوم سولانی ۱۱ باند آنتی ژنیک با وزن ملکولی ۱۴ تا ۱۰۰ کیلو دالتون شناسایی گردید.

بحث و نتیجه گیری: سویه UAMH ۷۴۱۹ فوزاریوم سولانی که از بیمار جدا شده بود در مقایسه با سویه محیطی UAMH ۳۳۱۷ فوزاریوم سولانی باندهای آنتی ژنیک بیشتری ظاهر ساخت.

واژه های کلیدی: فوزاریوم سولانی ، وسترن بلاتینگ، آنتی ژن

* نویسنده مسئول: دکتر محمد رضا آقامیریان استادیار بخش انگل شناسی و قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی قزوین

Email: aghamirian2001@yahoo.com

مقدمه

فوزاریوم یکی از شایعترین قارچ‌هایی است که می‌تواند سبب واکنش های آلرژیک تنفسی در انسان شود (۱). این قارچ در شرایط مستعد چون نوتروپنی و ایدز، پیوند مغز استخوان، سرطان، سوختگی، تروما، دیابت می‌تواند بیماری‌هایی نظیر آندوکاردیت، آندوفتالمیت، عفونت منتشره، پریتونیت و کراتیت ایجاد نماید، فوزاریوزیس یک بیماری قارچی مهم است که نسبت به درمان مقاوم بوده و اغلب تو سط فوزاریوم سولانی ایجاد می‌شود (۲). راه ورود گونه های فوزاریوم دستگاه تنفس و پوست می‌باشد. جایگاه اصلی عفونت به ترتیب پوست و خون و ریه است. قارچ پس از ورود و استقرار از طریق خون در بدن منتشر شده اعضایی چون ریه، قلب، کبد، طحال و کلیه را درگیر می‌کند (۳). فوزاریوم زندگی بیماران لوسمیک و یا دچار آنمی آپلاستیک را تهدید می‌کند (۴). ورما آلرژنهای فوزاریوم سولانی سویه ۳۵۹۶ متعلق به انسیتوی تحقیقات کشاورزی دهلی هندوستان (۱). وانی تاناکوم آنتی ژنهای پروتئینی پنی سیلیوم مارنفتی را در خلال رشد و کپکی با روش ژل الکتروفورز و وسترن بلائینگ مشخص نمود (۵). هدایتی و همکاران با روش ایمو نو بلائینگ ثابت نمودند ژنهای ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتونی کاندیدآلبیکنس با آنتی بادی IgG سرم های بدست آمده از بیماران مبتلا به واژینیت مزمن کاندیدی در ۱۰۰ درصد موارد واکنش مثبت نشان می‌دهد (۶). لذا این مطالعه به منظور شناسایی آنتی ژنهای سوماتیک سویه بالینی ۷۴۱۹ UAMH و سویه محیطی ۳۳۱۷ UAMH فوزاریوم سولانی با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) و وسترن بلائینگ انجام شد تا بتوان در آینده نقش آنتی ژنیک پروتئینهای جدا شده را مورد مطالعه بیشتری قرار داد.

مواد و روش ها

دو سویه فوزاریوم سولانی ۷۴۱۹ UAMH و ۳۳۱۷ UAMH از کانادا تهیه شد، سویه ۷۴۱۹ UAMH از بیمار و سویه ۳۳۱۷ UAMH از هوا جدا شده بود، این دو سویه به محیط سابوروی مایع منتقل شدند. ارلن

مایرهای محتوی کشت مایع به مدت ۱۴ روز در حرارت ۳۰°C نگهداری و هر روز چند بار تکان داده شدند تا از رشد ارگانیسم بصورت ورقه میسیلیال (Sheet) در سطح محیط مایع جلوگیری شود، کشت حاصله بعد از گذشت ۱۴ روز، پس از حصول اطمینان از خالص بودن نمونه ها به روش میکروسکپی، به روش فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرون از مایع جدا گردیدند، توده های میسیلومی در ظروفی استریل جمع آوری شدند و در دمای ۴۰°C - نگهداری گردیدند، ۴ گرم از توده میسیلومی در ۱۰ میلی لیتر از فسفات بافر نمکی با pH=۷/۴ حاوی مهار کننده های پروتئازی مخلوط شده و با دستگاه هموژنیزور (Edmund Buhler) با دور ۲۰۰۰ rpm خرد شده، میسیلومهای خرد شده در هموژنیزور نوبت اول و برای بار دوم با هموژنیزور (B.Broun) به کمک گلوله های شیشه ای با دور ۴۰۰۰rpm خرد شدند (۷). محلول شیری بدست آمده طی دو مرحله در ۲۲۰۰×g بمدت ۱۵ دقیقه و در ۲۵۰۰×g بمدت ۴۵ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ شد (Beckan Avantij-25) و مایع روئی از رسوب جدا گردید (۸). آنگاه مایع حاصل (عصاره سوماتیک) بمدت ۲۴ ساعت در برابر آب مقطر در ۴°C دیالیز شد (sigma , cut off 12000) سپس مایع دیالیز شده لیوفیلیزه گردید (Freeze Dryer FD-1 (EYELA) و در ۴۰°C - نگهداری شد (۹). عمل سنجش پروتئین عصاره سوماتیک به روش برادفورد انجام گرفت، و عصاره سوماتیک بدست آمده در حضور SDS-PAGE ژل ۱۰ درصد تعیین وزن مولکولی شد، برای آنکه دانسته شود آنچه که تهیه شده قدرت تولید آنتی بادی را دارد از چهار خرگوش سفید آزمایشگاهی استفاده شد، و عصاره سوماتیک با ادجوانت کامل و ناقص مخلوط و به خرگوش تزریق شدند (۱۰). قبل از ایمن سازی خرگوش از سرم خرگوش ها با روش Counter Immuno electrophoresis (CIE) مقابل عصاره سوماتیک سویه های فوزاریوم سولانی آزمایش بعمل آمد، دو هفته بعد از آخرین تزریق از سرم pooled خرگوشها به روش CIE و عصاره پروتئینهای سوماتیک آزمایش بعمل آمد، جهت ایمونوبلائینگ، انتقال پروتئینهای الکتروفورز شده در ژل ۱۰٪ SDS-PAGE به غشا نیتروسولولوز در تانک انتقال (وسترن بلائینگ) با

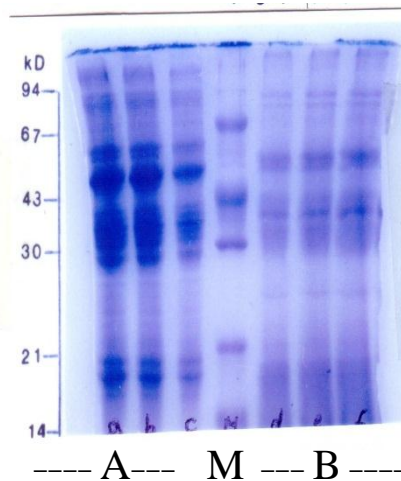
تمامی منفی و فاقد آنتی بادی بودند، بعد از ایمن سازی به کمک عصاره پروتئینهای سوماتیک همراه با ادجوانت، سرم خرگوش ها با تست CIE تا تیتراژ ۱/۶۴ مثبت بود و با تست الیزا سرم خرگوشها تا تیتراژ ۱/۶۴۰ که آزمایش ادامه یافت مثبت بود، با روش SDS-PAGE مشخص شد که فوزاریوم سولانی سویه UAMH ۷۴۱۹ که از انسان جدا شده، ۲۱ باند پروتئینی و فوزاریوم سولانی سویه UAMH ۳۳۱۷ که از هوا جدا شده دارای ۱۶ باند پروتئینی و پروتئینهای جدا شده در هر سویه بین ۱۴ تا ۱۰۰ کیلو دالتون بود، در اینجا سویه بالینی نسبت به سویه محیطی دارای باند پروتئینی بیشتری بود.

شدت جریان ۵۰ میلی آمپر بصورت overnight انجام شد (۱۱).

جهت سنجش پاتوژنیسیته سویه محیطی ۳۳۱۷ UAMH و سویه بالینی ۷۴۱۹ UAMH به ایجاد عفونت تجربی در حیوان آزمایشگاهی اقدام شد، نتیجه برای سویه محیطی منفی بود در حالیکه سویه بالینی موفق شد از ۵ موش سوری تزریق شده سه موش را دچار عفونت و مرگ نماید (۱۲).

یافته های پژوهشی

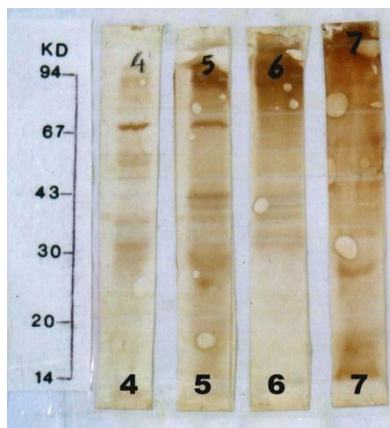
سرم خرگوش های شاهد که با تست CIE برضد عصاره های سوماتیک سویه فوزاریوم کنترل شدند



شکل ۱. الگوی الکتروفوریزیکی عصاره های پروتئین های سوماتیک فوزاریوم سولانی، نمونه های (A) سویه UAMH 7419 با غلظت های مختلف. نمونه های (B) سویه UAMH 3317 با غلظت های مختلف. همراه با مارکر ملکولی (M) بر روی ژل ۱۰ درصد به روش SDS-PAGE.

UAMH فوزاریوم سولانی بصورت (KD) ۱۴-۱۸-۲۲-۲۷-۳۶-۴۳-۵۲-۵۶-۶۱-۶۶-۹۵-بدست آمد (شکل ۲). در این بررسی باندهای پروتئینی (KD) ۴۰-۴۸-۵۰-۵۴-۹۲-۱۰۰ منحصراً توسط سویه بالینی ۷۴۱۹ UAMH مشاهده گردید، همچنین باند پروتئینی ۵۲ کیلو دالتون فقط در سویه محیطی ۳۳۱۷ UAMH دیده شد وبقیه باندهای پروتئینی (KD) ۱۴-۱۸-۲۲-۲۷-۳۶-۴۳-۵۶-۶۱-۶۶-۹۵ در هر دو سویه مشترک دیده شدند.

با استفاده از سرم خرگوش هیپرایمیون بصورت Pooled تعداد ۱۶ باند پروتئینی آنتی ژنیک به روش ایمنوبلاتینگ برای سویه بالینی ۷۴۱۹ UAMH بصورت (KD) ۱۴-۱۸-۲۲-۲۷-۳۶-۴۰-۴۳-۴۸-۵۰-۵۴-۵۶-۶۱-۶۶-۹۲-۹۵-۱۰۰ بدست آمد (شکل ۳) و با استفاده از سرم خرگوشی هیپرایمیون بصورت Pooled تعداد ۱۱ باند پروتئینی آنتی ژنیک به روش ایمنوبلاتینگ برای سویه محیطی ۳۳۱۷



شکل ۲. پروتئینهای آنتی ژنیک قابل مشاهده با سرم خرگوش در روش ایمونوبلائینگ با رنگ آمیزی دی آمینو بنزیدین. شماره ۶ و ۷ سویه UAMH۷۴۱۹. شماره ۴ و ۵ سویه UAMH۳۳۱۷

بحث و نتیجه گیری

از روش SDS-PAGE و وسترن بلائینگ می توان برای تفکیک و اختلافات ژنوتیپی سویه های بالینی و محیطی میکرو ارگانیسم ها استفاده کرد. در مطالعه حاضر از سویه بالینی UAMH ۷۴۱۹ باند آنتی ژنیک بیشتری در مقایسه با سویه محیطی ۳۳۱۷ UAMH بدست آمد، این تفاوت مهم بوده و می تواند دلیلی برای داشتن قدرت پاتوژنیسیته بیشتر توسط سویه بالینی باشد (۲). در این بررسی از روش SDS-PAGE برای جداسازی زیر واحدهای پروتئینی استفاده شد، اوهنو نیز آمیلاز ۱ و ۲ خارج سلولی را از گونه های فوزاریوم با این روش تعیین وزن مولکولی نمود (۱۴). هرن از روش SDS-PAGE و وسترن بلائینگ برای نشان دادن اختلافهای آنتی ژنیک سویه های اسپرژیلوس فومیگاتوس استفاده کرد (۱۳). رژیم سک با استفاده از روش وسترن بلائینگ آنتی ژنهای تریکوفیتون متناگروفیتس را در خرگوشی دارای کچلی ورم مشخص ساخت (۱۵). ورم در مطالعه با روش ایمونوبلائینگ بر فوزاریوم سلوانی سویه ۳۵۹۶ انستیتوی تحقیقات کشاورزی دهلی بین IgG سرم Pooled انسانهای آلرژیک و عصاره میسلیمی قارچ مزبور ۱۵ باند آنتی ژنیک بدست آورد (۱). هایاشی آنتی ژن مهم ۵۵ کیلو دالتونی میسلیال فوزاریوم اکسی سپوروم را با روش وسترن بلائینگ شناسایی کرد (۱۶). پی تارچ با روش وسترن بلائینگ آنتی ژن های کاندیدا آلبیکنس را

در سرم بیماران با بدخیمی خونی و دارای کاندیدیا زیس سیستمیک شناسایی کرد (۱۷). هو با تست وسترن بلائینگ تفاوت های مهم اپی توپ های سه استرین کاندیدا آلبیکنس را شناسایی نمود (۱۸). این اختلافات پروتئینی ایجاد شده در تخمک خوک های دریافت کننده ی سم زی رالنون مترشحه از فوزاریوم را با روش وسترن بلائینگ بررسی کرد (۱۹). در تحقیق حاضر، ما نیز با استفاده از روش ایمونوبلائینگ بین سرم Pooled خرگوشهای ایمن شده و عصاره میسلیمی سویه بالینی UAMH ۷۴۱۹ باند آنتی ژنیک و بین IgG سرم Pooled خرگوشهای ایمن شده و عصاره میسلیمی سویه محیطی UAMH ۳۳۱۷ باند آنتی ژنیک بدست آوردیم، به این ترتیب تعداد باندهای آنتی ژنیک شناسایی شده توسط خرگوش در سویه ای که از بیمار جدا شده است بیشتر بود احتمالاً همین تفاوتهای پروتئینی است که به سویه بالینی اجازه ایجاد بیماری می دهد. در حالی که سویه محیطی چنین قدرتی را ندارد و در عمل نیز تزریق سویه بالینی UAMH ۷۴۱۹ همراه با تزریق سیکلوفسفامید موفق به کشتن موش سوری شد در حالیکه همین آزمایش با سویه محیطی UAMH ۳۳۱۷ منفی بود. آنتی ژنها مسئول ایمونوپاتوژنر بیماری قارچی بوده و به همین دلیل شناخت بهتر آنها لازم است، مطالعه الگوی آنتی ژنیک عامل بیماری میتواند در کنترل بیماری موثر باشد و این موضوع میتواند با وسترن بلائینگ صورت گیرد.

References

- 1-RMA J. Fusarium solani: immunochemical characterization of Allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994; 104: 175-83.
- 2-Nnett EJ, Chung KJK Medical Mycology, Lea & Febiger, Philadelphia, 1992.
- 3-Ippon JW. Medical Mycology, The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomyces. Philadelphia W.B. Saunders. 3 rd edition. 1988.
- 4-Orres BL, Mederios BS, Neto JZ. Disseminated Fusarium sp. Infection affecting the drain of a child after bone marrow transplanation. *Bone-Marrow Transplant.* 1996; 18(5): 1013-5.
- 5-Vanittanako MN, Mekapratee PM. Western immunoblot analysis of protein antigens of penicillium marneffeii. *Journal of Medical Veterinary Mycology.* 1997; 35, 123-31.
- ۶- هدایتی ، م ، ت و همکاران، بررسی سرم بیماران مبتلا به واژینیت حاد و مزمن از نظر IgE، IgG اختصاصی نسبت به کاندید آلبیکس با روش ایمونوبلاتینگ . مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران. سال ۱۳۸۳: ۱۷-۲۴.
- 7-Bollag DM, Edelstein SJ. Protein Methods. 3rd ed. New York Wiley Liss, 1992.
- 8-Kibbler GC, Mackenzie DWR. ODDS FC. Principles and Praticce of clinical mycology London, John & Sons. 1996.
- 9-Longbotton JL, Austwick PKC. Handbook of Experimental Immunology V. 1. London Edited by Weir D.M. 1992.
- 10-Copeland RA. Methods for protein analysis. New York, CHAPMAN HALL 1994.
- 11-Zaini F, Moore MK, Hatbi D, et al. The antigenic composition and protein profiles of eumycetoma agents. *Mycoses.* 1991; 34: 19-28.
- 12-Polak A. Experimental Models antifungal chemothray. *Mycoses.* 1988; 14, 10-30.
- 13-Hearn VM, Wilson EV. Immunochemical studies of Aspergillus fumigatus mycelial antigens by polyacrylamide gel electrophoresis, and western blotting techniques. *JG Microbiol.* 1990;136:1525-35.
- 14-Ohono N. Purification and properties of amylases extracellularly produced by an imperfect fungus. Biosci. Biotechnol. *Biochem.* 1992, 56. No3: 456-71.
- 15-Zrimsek P, Kos J, Pinter AK. Detection by ELISA of the humoral Immune response in rabbits naturally infected with Trichophyton mentagrophytes. *Vet Microbiol.* 2000;70 (1-2) 77-86.
- 16-Hayashi Y, Arie T, Yoneyama K, Yamaguchi I. Characterization of the antigenic determinant on Fusarium oxysporum recognized by a genus –specific monoclonal antibody. *J Gen Appl Microbiol.* 1998; 44(1): 43-47.
- 17-Pitarch A, Abian J Carrascal M. Proteomics-based identification of novel candida albicans antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics.* 2004; 4(10): 3084-96.
- 18-Hu Y, Farahcs, Ashman RB. Isolates of candida albicans that differ in virulence for mice elicit strain –specific antibody-mediated protective responses. *Microbes Infect.* 2006; 8(3): 612-20.
- 19-Aim H, Brussow KP, Torner H, Vanselow J. Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod Toxicol.* 2006;22(1): 44-50.