مطالعه وسترن بلاتینگ آنتی ژنهای پروتئینی سوماتیک فوزاریوم سولانی

محمد رضا آقامیریان*[۱] ، فریدهٔ 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 ژنیکی سوماتیک میسلیومهای 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 UAMH۷۴۱۹ فوزاریوم سولانی ۱۶ باند آنتی ژنیک و سویه UAMH۳۳۱۷ 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

مقدمه

فوزاریوم یکی از شایعترین قـارچهایی است که می تواند 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 می تواند 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 می شود(۲). راه ورود گونه های فوزاریوم دستگاه تنفس و پوست می باشد. 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 می کند(۳). فوزاریوم زندگی بیماران لوسمیک و یا دچار آنمی آپلاستیک را تهدید می کند(۴). ورما آلرژنهای فوزاریوم سولانی سویه ۳۵۹۶ متعلق به انسیتوی تحقیقات کشاورزی دهلی هندوستان(۱). وانی تاناکوم آنتی ژنهای پروتئینی پنی سیلیوم مارنفئی را در خلال رشد و کپکی با روش ژل الکتروفورز و وسترن بلاتینگ مشخص نمود(۵). هدایتی و همکاران با روش ایمو نو بلاتینگ ثابت نمودند ژنهای ۲۵ و ۵۲ کیلو دالتونی کاندیداآلبیکنس با آنتی بادی IgG سرم های بدست آمده از بیماران مبتلا به واژینیت مزمن کاندیدایی در ۱۰۰ درصد موارد واکنش مثبت نشان می دهد(۶). لذا این مطالعه به منظور شناسایی آنتی ژنهای سوماتیک سویه بالینی UAMH ۷۴۱۹ و سویه محیطی ۳۳۱۷ UAMH فوزاریوم سولانی با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل پلی اکریل آمیـــد در حضـــور SDS (SDS-PAGE) و وسترن بلاتینگ انجام شد تا بتوان در آینده نقش آنتی ژنیکی پروتئینهای جدا شده را مورد مطالعه بیشتری قرار داد.

مواد و روش ها

دو سویه فوزاریوم سولانی UAMH ۷۴۱۹ و UAMH۳۳۱۷ از کانادا تهیه شد، سویه UAMH ۷۴۱۹ از بیمار و سویه UAMH ۳۳۱۷ 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 میسلیال (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 میسلیومی در ظروفی استریل جمع آوری شدند و در دمای ۴۰° c- نگهداری گردیدند، ۴ گرم از توده میسلیومی در ۱۰ میلی لیتر از فسفات بافر نمکی با ۷/۴= pH حاوی مهـار کننده های پروتئازی مخلوط شده و با دستگاه هموژنیزور (Edmund Buhler) با دور rpm ۲۰۰۰ خرد شده، میسلیومهای 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 g ×۲۲۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه و در g ×۲۵۰۰۰ 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 وبه خرگوش تزریق شدند(۱۰). قبل از ایمن سازی خرگوش از سرم خرگوش ها با روش Counter Immuno electrophoresis (CIE) در مقابل عصارهٔ سوماتیک سویه های فوزاریوم سولانی آزمایش بعمل آمد، دو هفته بعد از آخرین تزریق از سرم pooled خرگوشها به روش CIE و عصارهٔ پروتئینهای سوماتیک آزمایش بعمل آمد، جهت ایمنوبلاتینگ، انتقال پروتئینهای الکتروفورز شده در ژ ل ۱۰٪ SDS-PAGE به غشا نیتروسلولوز در تانک انتقال (وسترن بلاتینگ) با

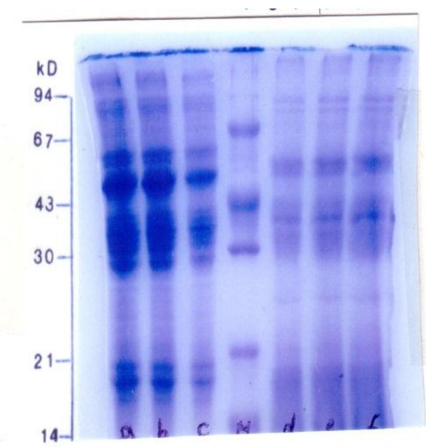
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

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

جهت سنجش پاتوژنیسیتی سویه محیطی۳۳۱۷ UAMH و سویه بالینی UAMH ۷۴۱۹ 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 پژوهش

سرم خرگوش های شاهد که با تست CIE برضد عصاره های سوماتیک سویه فوزاریوم کنترل شدند 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 تیتر ۱/۶۴ مثبت بود و با تست الیزا سرم خرگوشها تا تیتر ۱/۶۴۰ که آزمایش ادامه یافت مثبت بود، با روش SDS- PAGE مشخص شد که فوزاریوم سولانی سویه ۷۴۱۹ UAMH 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.



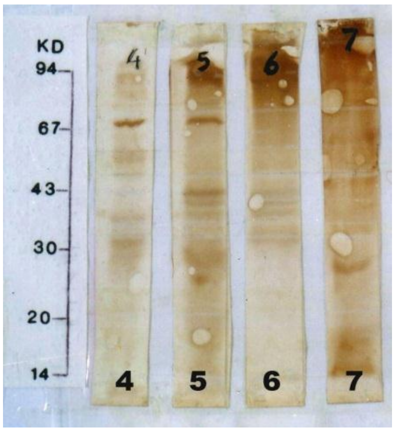
---- A--- M --- B ----

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

با استفاده از سرم خرگوش هیپرایمیون بصورت Pooled تعداد ۱۶ باند پروتئینی آنتی ژنیک به روش ایمنوبلاتینگ برای سویه بالینی UAMH ۷۴۱۹ 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 UAMH فوزاریوم سولانی بصورت(KD)۱۴-۱۸-۲۲-۲۷-۳۶-۴۳-۵۲-۵۶-۶۱-۶۶-۹۵-بدست آمد(شکل۲).

در این بررسی باندهای پروتئینی(KD)۴۰-۴۸-۵۰-۵۴-۹۲-۱۰۰منحصراً توسط سویه بالینی ۷۴۱۹ UAMH مشاهده گردید، همچنین باند پروتئینی ۵۲ کیلو دالتون فقط در سویه محیطی UAMH۳۳۱۷ دیده شد وبقیه باندهای پروتئینی (KD)۱۴-۱۸-۲۲-۲۷-۳۶-۴۳-۵۶-۶۱-۶۶-۹۵ در هر دو سویه مشترک دیده شدند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]



شکل۲. پروتئینهای آنتی ژنیک قابل مشاهده با سرم خرگوش در روش ایمنوبلاتینگ با رنگ آمیزی دی آمینو بنزیدین. شماره ۵و۶ سویه UAMH۷۴۱۹. شماره ۴ و۷سویه UAMH۳۳۱۷

بحث و نتیجه گیری

از روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ 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 پاتوژنیسیتی 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 بلاتینگ برای نشان دادن اختلافهای آنتی ژنیک سویه های آسپرژیلوس فومیگاتوس استفاده کرد(۱۳). زریم سک با استفاده از روش وسترن بلاتینگ آنتی ژنهای تریکوفیتون منتاگروفیتس را در خرگوشی دارای کچلی ورم مشخص ساخت (۱۵). ورما در مطالعه با روش ایمنوبلاتینگ بر فوزاریوم سولانی سویه ۳۵۹۶ انستیتوی تحقیقات کشاورزی دهلی بین IgG سرم Pooled انسانهای آلرژیک و عصاره میسلیومی قارچ مزبور ۱۵ باند آنتی ژنیک بدست آورد(۱). هایاشی آنتی ژن مهم ۵۵ کیلو دالتونی میسلیال فوزاریوم اکسی سپوروم را با روش وسترن بلاتینگ شناسایی کرد(۱۶). پی تارچ با روش وسترن بلاتینگ آنتی ژن های کاندیدا آلبیکنس را در سرم بیماران با بدخیمی خونی و دارای کاندیدیازیس سیستمیک شناسایی کرد(۱۷). هو با تست وسترن بلاتینگ تفاوت های مهم اپی توپ های سه استرین کاندیدا آلبیکنس را شناسایی نمود(۱۸). این اختلالات پروتئینی ایجاد شده درتخمک خوک های دریافت کننده ی سم زی رالنون مترشحه از فوزاریوم را با روش وسترن بلاتینگ بررسی کرد(۱۹). در تحقیق حاضر، ما نیز با استفاده از روش ایمنوبلاتینگ بین سرم Pooled خرگوشهای ایمن شده و عصاره میسلیومی سویه بالینی UAMH ۷۴۱۹ ۱۶ باند آنتی ژنیک و بین IgG سرم Pooled خرگوشهای ایمن شده و عصاره میسلیومی سویه محیطی UAMH ۳۳۱۷ ۱۱ باند آنتی ژنیک بدست آوردیم، به این ترتیب تعداد باندهای آنتی ژنیکی شناسایی شده توسط خرگوش در سویه ای که از بیمار جدا شده است بیشتر بود احتمالا 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 ایمنوپاتوژنز بیماری قارچی بوده و به همین دلیل شناخت بهترآنها لازم است ، مطالعه الگوی آنتی ژنیکی عامل بیماری میتواند در کنترل بیماری موثر باشد و این موضوع میتواند با وسترن بلاتینگ صورت گیرد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]

References

1-RMA J. Fusarium solani: immunuchemical 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 affectiong 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 marneffei. *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 آلبیکنس 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 Pratice 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 extracellulary 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 candidasis 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.*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-18]