

ارزیابی تأثیر دما و ترکیبات محیط کشت بر تولید آنتی ژن کاتالاز در قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس

شهلا رودبار محمدی^۱ دکتر احمد زواران حسینی^{۲*} دکتر علیرضا خسروی^۳ دکتر جعفر اصلانی^۴

دریافت مقاله: ۲۱ بهمن ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۴ آبان ماه ۱۳۸۲

Effects of strain, temperature and media composition on the production of catalase antigen in *Aspergillus fumigatus*

Roudbarmohammadi, SH.,¹ Zavaran Hosseini, A.,² Khosravi, A.R.,³ Aslani, J.⁴

¹Department of Mycology, Faculty of Medical Science, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran. ²Department of Immunology, Faculty of Medical Science, University of Tarbiat Modarres University, Tehran, - Iran. ³Department of mycology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran. ⁴Faculty of Medicine, Baghiatollah (a.s) University of Medical Sciences, Tehran-Iran.

Objective: To evaluate The effect of some physicochemical factors such as strain, temperature and media composition on the production of catalase Antigen.

Design: Irterventional.

Procedure: Four media (AMM, YED, S and CDA) which were different in kind, and amount of glucose and other ionic and aminoacid components were used at 28°C and 37°C. Also Two pathogenic human and animal isolates were used for mass Production of fungi, the mycelia were being filtered after 96 hours, were disrupted using lysing buffer, and then centrifuged at 150000g, The water soluble supernatant, was used to purify the antigen. The amount of proteins water - Soluble were measured by Brodford method. Then electrophorised and the sample was specifically stained with ferrocyanid. The water - sdubles were loaded on the anionic and cathionic columns, respectively. The amounts of their proteins were measured followed by reading their O.Ds eluents of cathionic calumn were electrophorised and their electrophoretic patterns were compared.

Results: Results showed that the amount of the proteins in two S and CDA was 1/3±0/1mg/ml and in the other two YED and AMM it was 1/1±0/1mg/ml. After chromatography, still the protein amount of the first two water - soluble's (S and CDA) were more than that of the second two water - soluble's (YED and AMM). Electrophoresis of the eluents showed that the eluents of S and CDA had stronger bands than the eluents of YED and AMM. It is concluded that strain and temperature has no effects on the protein amounts of water - solubles as well as eluents. While The media composition had positive effect on their protein amounts.

Clinical implications: This study also showed that in contrast to the media composition, strain and temperature has no effects on the electrophoretic Pattern of The water - solubles and eluents. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59,1: 73-78, 2004.*

Key words: *Aspergillus fumigatus*, Catalase, Purification, Tempreatru, Media composition.

Corresponding author email: zavaran@yahoo.com

هدف: بررسی چند عامل بر میزان تولید آنتی ژن کاتالاز از قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس.

طرح: مداخله ای.

روش: از چهار محیط کشت که به لحاظ نوع و مقدار قند و سایر ترکیبات تشکیل دهنده محیط با یکدیگر متفاوت بودند در دو دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده گردید. همچنین از دو ایزوله بیماریزای انسانی و حیوانی جهت کشت آنبوه قارچ استفاده شد. میسلیموم های قارچی پس از ۹۶ ساعت از سطح محیط کشت فیلتر شده سپس با بافر شکننده خرد شده و با دوز ۱۵۰۰۰۰ g سانتریفوز گردیدند. مایع رویی حاصل به عنوان عصاره محلول در آب محسوب می شود که از آن جهت تخلیص آنتی ژنی استفاده گردید. میزان پروتئین عصاره های محلول در آب توسط روش برادفورد سنجش شد سپس الکتروفوروز و رنگ آمیزی اختصاصی با فروسیانید پتاسیم انجام گرفت. عصاره های محلول در آب بر روی ستون مبادله یونی آنیونیک و کاتیونیک قرار گرفتند. جذب نوری خروجیهای ستون و همچنین مقدار پروتئین آنها سنجش شد. خروجیهای ستون کاتیونیک مورد الکتروفوروز SDS-PAGE قرار گرفته و الگوی الکتروفورزی آنها با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج: عصاره های محلول در آب حاصل از محیط های چهارگانه دارای ۱/۳ ± ۰/۱ mg/ml پروتئین در محیط های S و CDA و مقدار پروتئین ۱/۱ ± ۰/۱ mg/ml در محیط های YED و AMM بود. عصاره های محلول در آب حاصل از محیط S و CDA پس از قرار گرفتن بر روی ستون تعویض یونی باندهای قویتری نسبت به سایر خروجیهای ستون از دیگر محیط های کشت داشتند. مقدار پروتئین عصاره محلول در آب و همچنین مقدار پروتئین خروجیهای ستون تعویض یونی تحت تأثیر سوبه قارچی و دما نبوده در حالیکه ترکیب محیط کشت بر مقدار پروتئین و تراکم باند مؤثر بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد. دما و سوبه تأثیری در الگوی الکتروفورزی و مقدار پروتئین عصاره های محلول در آب نداشت در حالیکه ترکیب محیط کشت در مقدار پروتئین و تولید آنتی ژن مؤثر است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

(۱۳۸۲)، دوره ۵۹، شماره ۱، ۷۸-۷۳.

واژه های کلیدی: آسپرژیلوس فومیگاتوس، تخلیص، کاتالاز، دما، محیط کشت.

در طی ده سال اخیر قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس شایعترین پاتوژن منتقله از راه هوا بوده است. پاتوژن فرصت طلب منحصر به فردی که امروزه به عنوان یک قارچ مهاجم، عامل طیف وسیعی از بیماریهای پیچیده آلرژیک و غیر آلرژیک انسانی و حیوانی می باشد. بیش از ۹۵ درصد عفونتهای آسپرژیلوزی به حضور سه گونه: ۱- آسپرژیلوس فومیگاتوس، ۲- آسپرژیلوس فلاووس،

(۱) گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه آموزشی ایمنی شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.

(۳) گروه آموزشی قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۴) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... اعظم تهران، تهران - ایران.

(* نویسنده مسؤول zavaran@yahoo.com)



د- محیط CDA حاوی چابکس برات به انضمام اسید آمینه های اسپارتیک و سیستین به میزان ۰/۰۵ درصد کیتوزان به مقدار ده گرم که قبلاً در ۲۰۰ mL اسید استیک ۱ درصد حل شده، و نیز مقادیری از موارد ذیل به محیط کشت CDA اضافه شد.

Na₂HPO₄ به میزان ۱/۳ گرم

KH₂PO₄ به میزان ۳ گرم

NaCl به میزان ۰/۵ گرم

NH₂CL به میزان ۱ گرم

MgSO₄ به میزان ۰/۲۴ گرم

CaCl₂ به میزان ۰/۰۱ گرم

سپس به هر محیط کشت ۱۰۰ واحد پنی سیلین و ۲۰۰ میلی گرم آدنین و ۱۰ میلی گرم P-aminobenzoic در هر لیتر اضافه شد. آنگاه ارلن ها در دمای ۲۸ و ۳۸ درجه سانتیگراد و در حال شیک با ۲۸۰ rpm قرار گرفتند و هر ده الی چهارده ساعت از لحاظ pH محیط، مقدار گلوکز موجود در محیط کشت و وزن خشک مورد بررسی قرار گرفتند.

۳- روش گلوکز-اکسیداز: (کیت پارس آزمون GOD-PAD)

غلظت گلوکز در محلول استاندارد ۱۰۰ mg/ml × $\frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد}}$ = مقدار گلوکز

۴- تعیین وزن خشک: ابتدا میسلیم را درون یک پتری دیش در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده، سپس هر نیم ساعت یکبار آن را وزن کرده تا در دو توزین متوالی اعداد یکسان به دست آید. در این زمان می توان وزن خشک میسلیم را تعیین کرد.

۵- تهیه عصاره محلول در آب: سطح کلنی های قارچی به منظور حذف کونیدی، سه بار با آب مقطر شستشو داده شده، سپس برداشت میسلیم ها با انجام فیلتراسیون و با استفاده از کاغذ واتمن و آب دو بار تقطیر صورت گرفت. میسلیم ها در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده سپس با بافر شکننده حاوی EDTA و DTT و PMSF و آپروتینین و پیپستاتین A مخلوط شده و از طریق مکانیکی با استفاده از پرل شیشه ای ۱۰۰ میکرونی و ازت مایع در دمای ۴ درجه سانتیگراد خرد شدند.

خرد شدن کامل میسلیم ها در این سوسپانسیون با استفاده از میکروسکوپ نوری کنترل شد. سوسپانسیون حاصل توسط اولتراسانتریفوژ با دور ۱۵۰۰۰ g به مدت یکساعت مورد سانتریفوژ قرار گرفت. مایع رویی به دست آمده از سانتریفوژ، به عنوان عصاره محلول در آب محسوب می گردد که از آن جهت تخلیص آنتی ژن بهره برداری می شود.

۶- سنجش مقدار پروتئین: سنجش میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد صورت گرفت و عصاره هایی با مقادیر کمتر از یک میلیگرم پروتئین در هر میلی لیتر، از طریق رسوب با هفت حجم از استون سرد در شرایط ۳۰- درجه سانتیگراد، در طی ۶ ساعت رسوب داده شد (۱۵).

۷- الکتروفورز PAGE: عصاره های محلول در آب حاصل از چهار محیط کشت قارچ، با ژل آکریل آمید دارای شیب غلظت ۵-۱۵ درصد به روش متداول الکتروفورز در سیستم ناپیوسته Laemmli و با استفاده از دستگاه

۳- اسپرژیلوس نایجر مرتبط می گردد. اسپرژیلوس طیف وسیعی از گرفتاریهای اندامهای مختلف از جمله ریه، پوست، کلیه، استخوان، مغز و سیستم گوارش را می تواند ایجاد کند که حادثترین شکل آن (اسپرژیلوز مهاجم) در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی رخ می دهد که با احتمال ۵۰-۷۰ درصد منجر به فوت آنان می گردد (۱۲). دیواره سلولی اسپرژیلوس فومیگاتوس در برگیرنده بیشترین آنتی ژنهای ترشخی در طی رشد در محیط های Invivo و Invitro می باشد که توانایی اتصال به ایمنوگلوبین های IgE و IgG سرم بیماران را دارد. بخش سیتوزولیک، فیلتره محیط کشت نیز حاوی پروتئین ها و گلیکوپروتئین هایی می باشند که خاصیت آنتی ژنیک دارند (۳،۵،۱۰،۱۶). حدود ۱۰۰ پروتئین و گلیکوپروتئین از اسپرژیلوس فومیگاتوس شناسایی شده است که از مهمترین آنها می توان از آنتی ژن کاتالاز، گلاکتومانان، ASPFI و ASPFII و پروتئین های ۳۷kDa و ۶۰kDa و ۴۰kDa نام برد (۷،۹،۱۰،۱۱،۱۷). آنتی ژنهای ASPFI و ASPFII در تشخیص فرم اسپرژیلوز برونکوپولمونری کاربرد دارند. در حالیکه بالاترین توان تشخیص بیماریهای اسپرژیلوزی بویژه اسپرژیلوز مهاجم و اسپرژیلوما (۹۰/۳ درصد) از طریق آنتی ژن ۹۰ کیلودالتونی کاتالاز بوده است (۲،۴). آنتی ژن کاتالاز بر روی دیواره سلولی، بخش غشایی و مایع رویی محیط کشت قابل دستیابی است (۵،۶،۸،۹،۱۲).

عصاره محلول در آب حاصل از فاز رشد میسلالی اسپرژیلوس فومیگاتوس، حاوی دو تیپ کاتالاز S و F بر اساس حرکت الکتروفورتیکی آنها در الکتروفورز می باشد. آنتی ژن ۹۰ کیلو دالتونی متعلق به گروه S بوده و میزان آنتی بادی نسبت به این نوع کاتالاز در سرم افراد بیمار به مراتب بیش از آنتی بادی نسبت به نوع F می باشد (۲،۳،۸،۱۴،۱۵،۱۸). هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر دما و ترکیبات محیط کشت بر میزان آنتی ژنهای بخش محلول در آب بویژه آنزیم کاتالاز می باشد. تشخیص این آنتی ژن ۹۰ کیلو دالتونی می تواند به عنوان یک آنتی ژن شاخص در پاسخ ایمنی در تشخیص اسپرژیلوز مؤثر باشد.

مواد و روش کار

- ۱- قارچها: ایزوله های بیماریزای انسانی و حیوانی از کلکسیون قارچی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید.
- ۲- تولید انبوه: جهت تولید انبوه قارچ، از چهار محیط کشت با ترکیبات متفاوت استفاده گردید ابتدا مطابق روش Hearn و همکاران در سال ۱۹۹۵ میزان ۲×۱۰^۶ کونیدی اسپرژیلوس فومیگاتوس به درون ارلن های حاوی ۵۰۰ ml محیط کشت چهار گانه ذیل تلقیح گردید (۱۵).

الف - محیط AMM حاوی (۱% D-glucose و ۱% yeast extract)

ب- محیط YED حاوی (۱/۱۵% KH₂PO₄، ۳۲% MgSO₄، ۰/۱% glucose)

به همراه مقادیر بسیار کمی (FeSO₄، ZnSO₄، KCL، ۰/۰۵۲% .)

۱/۶% NaNO₃

ج- محیط S حاوی ساپروبراث





تصویر ۲- ژل رنگ آمیزی شده با فری سیانید پتاسیم که صرفاً چاهک کاتالاز به رنگ زرد مشخص می گردد.

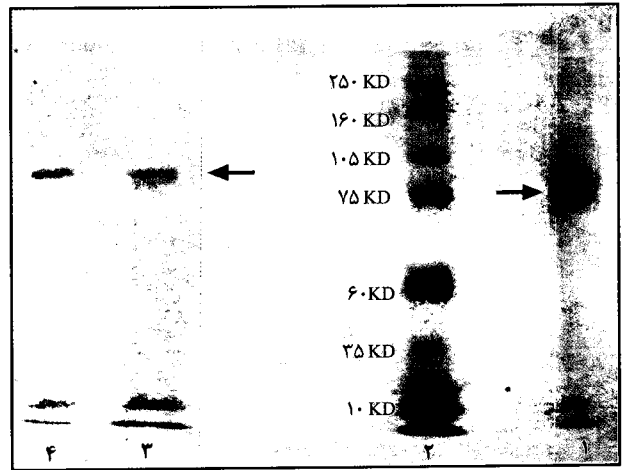
شیب غلظت نمکی ۰.۳۵- NaCl جهت تخلیص استفاده گردید.

۱۱- الکتروفورز خروجیهای ستون: خروجیهای ستون تعویض یونی کاتیونیک با ژل ۷/۵ و ۱۰ درصد به صورت SDS-PAGE الکتروفورز شدند. از پروتئین های استاندارد به وزنهای مولکولی ۱۰، ۳۵، ۶۰، ۷۵، ۱۰۵، ۱۶۰، ۲۵۰ کیلودالتون استفاده شد (تصویر ۱).

۱۲- رنگ آمیزی اختصاصی آنزیم کاتالاز با استفاده از فری سیانید پتاسیم: به منظور رنگ آمیزی اختصاصی ابتدا نمونه خروجی ستون تعویض یونی کاتیونیک بر روی ژل ۱۲ درصد به صورت PAGE الکتروفورز شد. سپس ژل قبل از رنگ آمیزی درون ظرف حاوی ۰/۱ میلی لیتر H_2O_2 سی درصد و ۱۰۰ میلی لیتر PBS به همراه ۵۰ میلی گرم DAB قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰ دقیقه DAB آسپیره شده، ژل با آب مقطر شستشو داده شد و برای رنگ آمیزی با فروسیانید آماده گشت. ابتدا ژل در مخلوطی از ۰/۱ میلی لیتر H_2O_2 سی درصد و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. آنگاه ژل در فضای تاریکی قرار گرفته و محلول رنگی حاوی کلروفریک ۲ درصد و فری سیانید ۲ درصد بر روی ژل ریخته شد. بعد از ۶۰ ثانیه محلول رنگی از سطح ژل آسپیره شده و ژل با آب مقطر شستشو داده شد صرفاً چاهک حاوی کاتالاز به رنگ زرد و نارنجی نمایان می گردد که باید بلافاصله فتوگرافی گردد (تصویر ۲).

نتایج

بعد از رشد انبوه قارچ در چهار محیط مجزای YED, S, AMM و CDA، میسلیموم های برداشت شده خرد و سانتریفوژ شدند. آنگاه میزان پروتئین عصاره خام بر اساس روش برادفورد به مقدار $1/1 \pm 0/1$ میلی گرم در میلی لیتر و در محیط S و CDA و به میزان $1/1 \pm 0/1$ میلی گرم در میلی لیتر در محیط AMM و YED سنجش شد. از این گونه عصاره ها جهت کروماتوگرافی بر روی ستون تعویض یونی آنیونیک با سیستم بافری فسفات با غلظت نمک ۰.۳۵- میلی مول NaCl استفاده شد که در طی ۳ ساعت خروجیهای ستون جمع آوری شده و جذب نوری آنها خوانده شد. خروجی ستون در



تصویر ۱- باند ۹۰ کیلودالتونی کاتالاز در سه محیط CDA، AMM و YED در شکل نشان داده شده است.

(۱ محیط CDA، ۲ پروتئین استاندارد، ۳ محیط AMM و ۴ محیط YED).

گردان ساز مورد آزمایش قرار گرفت. سپس رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۰/۵ درصد و رنگ زدایی با اسید استیک و متانول و آب مقطر به نسبت (۵۸-۱۰-۵) صورت گرفت.

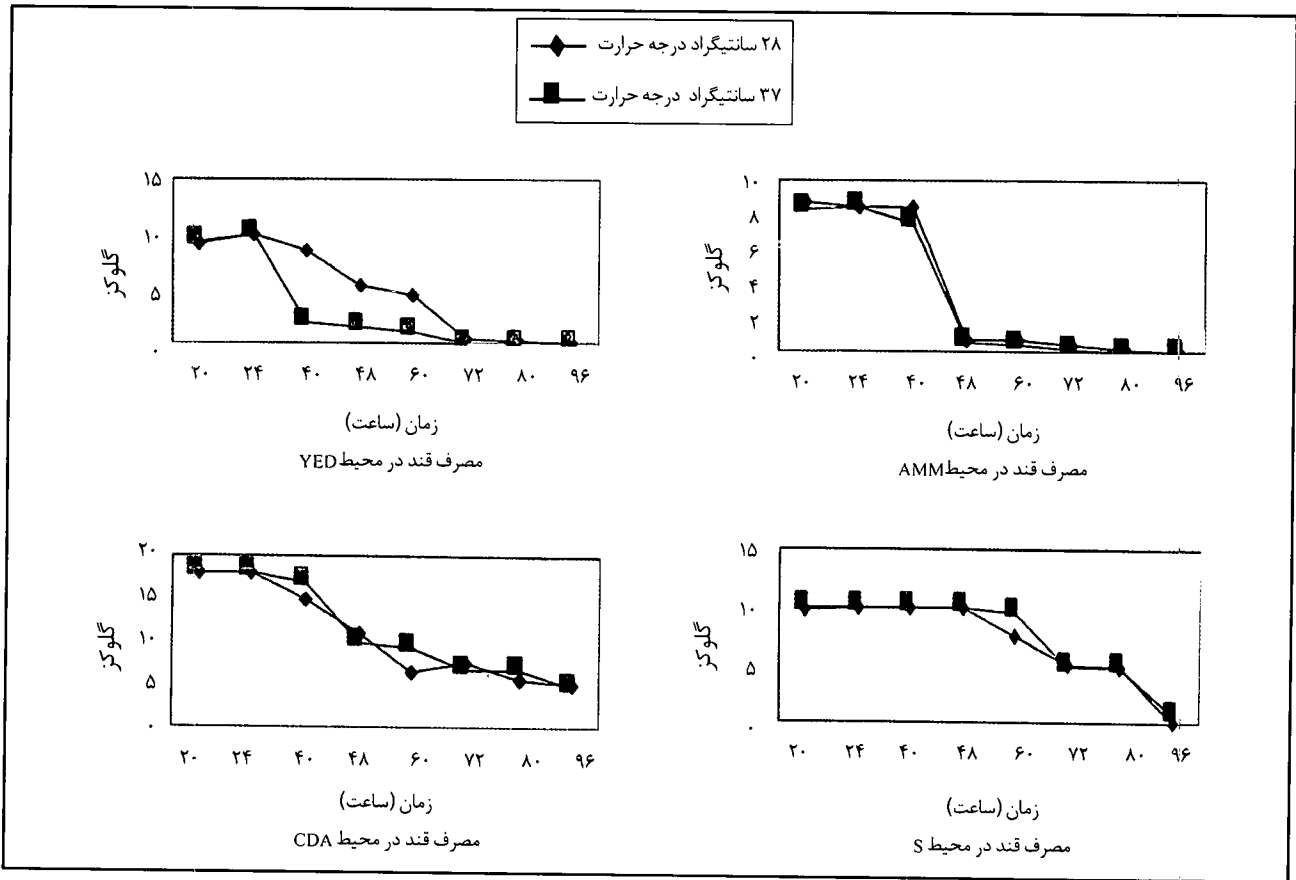
۸- انجام الکتروفورز SDS-PAGE: عصاره های محلول در آب با ژل ۱۰ و ۱۲ درصد مورد SDS-PAGE نیز قرار گرفتند. نمونه ها قبل از انجام الکتروفورز مقابل آب مقطر به مدت ۱۲ ساعت دیالیز شده و با SDS دو درصد جوشیده شده و به مدت نیم ساعت در دور 2000 g سانتریفوژ شدند.

۹- کروماتوگرافی تعویض یونی آنیونیک DEAE-Sephadex A-50: مقدار ۳/۵ گرم پودر DEAE را در ۵۰۰ سی سی آب مقطر دیونیزه شستشو داده، به ته نشین ژل ۲۵۰ mL اسید کلریدریک ۰/۵ مولار اضافه شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. با استفاده از کاغذ واتمن ژل جدا و با آب مقطر شستشو داده شده تا زمانی که اسیدتیه زیر فیلتر به بالای ۴ برسد. ژل در ۲۵۰ میلی لیتر سود ۰/۵ مولار شسته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. با استفاده از کاغذ واتمن ژل جدا و با آب مقطر شستشو داده شد تا اسیدتیه زیر فیلتر به کمتر از ۸ برسد. ژل، حباب گیری شده، داخل ستون به ابعاد ۲۲۰ سانتیمتر قرار گرفت. از بافر فسفات ۰/۱ مولار به عنوان بافر شروع کننده استفاده شد.

عصاره محلول در آب از هر محیط کشت به طور جداگانه بر روی ژل قرار گرفت. از بافر تریس با شیب غلظت نمکی ۰.۳۵- میلی مول NaCl جهت جداسازی استفاده گردید. خروجی ستون در حجم ۳ میلی لیتر در هر لوله جمع آوری شد. جذب نوری هر یک در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد.

۱۰- کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونیک کربوکسی متیل: مقدار ۳ گرم ژل کربوکسی متیل در ۵۰۰ سی سی آب مقطر دیونیزه شستشو شده، به ته نشین ژل ۲۵۰ میلی لیتر سود ۰/۵ مولار اضافه کرده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ژل به مدت ۳۰ دقیقه در اسید کلریدریک ۰/۵ مولار قرار داده شده، آنگاه با آب مقطر شستشو داده شد. ژل داخل ستون به ابعاد 2×20 سانتیمتر ریخته شد و نمونه (خروجی ستون DEAE) بر روی ژل قرار گرفت. از سیستم بافری استات ۱۰ میلی مول با





نمودار ۱- نمودارهای مربوط به مصرف قند در چهار محیط کشت جداگانه.

جهت عصاره گیری، تکنیکهای به کار گرفته شده جهت عصاره گیری و تخلیص آنتی ژنی و همچنین اختلاف در انتخاب روش تعیین آنتی ژن موجب می شود الگوی آنتی ژنی و شناسایی آنها از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر متفاوت باشد (۱۱، ۱۲، ۱۸).

طی چندین تحقیق انجام شده آنزیم کاتالاز با وزن مولکولی ۹۰ کیلو دالتون یکی از بهترین آنتی ژنهای تشخیصی بعد از انجام ایمنوبلات با سرم بیماران و با سرم خرگوشهای فوق ایمن بوده است که با هیچ یک از سرم افراد کنترل واکنش نشان نداده و نسبت به سایر آنتی ژنها اختصاصی تر بوده است. در حالی که آنتی ژنهای دیگر ۳۷ و ۴۰ و ۶۰ کیلو دالتونی با ۶۰-۳۰ درصد سرم افراد کنترل واکنش مثبت کاذب داشته اند (۱۳، ۱۴، ۱۵). آنزیم کاتالاز که در دو تیپ F و S شناخته شده است، در عصاره محلول در آب حاصل از رشد میسلومی قارچ قابل دستیابی است. کاتالاز نوع S برخلاف نوع F به حرارت حساس نبوده و فاقد فعالیت پراکسیدازی است و تولید آن غیر وابسته به سویه به کار رفته می باشد.

کاتالاز ۹۰ کیلودالتونی جزو خانواده کاتالاز نوع S می باشد (۸، ۱۹). این نوع کاتالاز به دنبال رشد قارچ در همه محیط های کشت معمول آزمایشگاه حاصل می شود اما کاتالاز نوع F از محیط تفریقی چاپکس به دست نمی آید.

غلظت ۲۳۰-۲۰۰ میلی مول NACL دارای باند پروتئینی در محدوده ۹۰ کیلو دالتون بود. این خروجیهای ستون آنیوتیک پروتئینی در حد $0.1 \pm 0.1/3$ میلی گرم در میلی لیتر داشتند در حالی که لوله های فاقد کاتالاز، پروتئینی در حد 0.2 ± 0.1 میلی گرم در میلی لیتر داشتند. خروجیهای ستون دارای مقادیر پروتئین بالاتر از ۱ میلی گرم در میلی لیتر بر روی ستون تعویض یونی کاتیونیک قرار گرفتند. جذب نوری بالا در خروجیهای ستون تعویض یونی کاتیونیک در محدوده غلظت نمک ۲۲۰-۲۳۰ میلی مول NACL بافر استات مشاهده شد پس از انجام الکتروفورز SDS-PAGE با ژل ۱۰-۷/۵ درصد آکریل امید از این سری از خروجیهای ستون، باند ۹۰ کیلودالتونی مشاهده شد که در تصویر ۱ با یکدیگر مقایسه شدند.

بحث

بیشترین موارد اسپرژیلوز در انسان اتفاق می افتد، امروزه دومین بیماری کشنده قارچی اسپرژیلوز مهاجم می باشد که در بیماران با سیستم ایمنی تضعیف شده رخ می دهد. اما تاکنون یک آنتی ژن تشخیصی جهت تشخیص سریع و زود هنگام بیماری، استاندارد نشده است. عوامل زیر مانع استاندارد سازی یک آنتی ژن واحد شده است (۶، ۱۲). ترکیب محیط کشت، شرایط نگهداری محیط کشت، زمان نگهداری قارچ در محیط رشد، استفاده از بخشهای مختلف سلولی (داخل سلولی یا خارج سلولی، استفاده از کونیدی یا میسلوم)



جدول ۱- میزان وزن خشک بر حسب میلیگرم از میسلیموم های رشد یافته در دو دمای ۲۸-۳۷ درجه سانتیگراد در چهار نوع محیط کشت.

وزن خشک (میلی گرم)		درجه حرارت بر حسب سانتیگراد در محیط AMM		درجه حرارت بر حسب سانتیگراد در محیط YED		درجه حرارت بر حسب سانتیگراد در محیط S		درجه حرارت بر حسب سانتیگراد در محیط CDA	
زمان (ساعت)		۲۸	۳۷	۲۸	۳۷	۲۸	۳۷	۲۸	۳۷
۲۰		۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
۲۴		۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۷	۰/۹
۴۰		۰/۷	۱/۲	۲/۵	۲/۷	۳	۵/۵	۶	۶/۸
۴۸		۱/۲	۱/۳	۲/۹	۲/۸	۵/۴	۶/۱	۷/۲	۷/۹
۶۰		۱/۵	۳/۸	۲/۹	۳/۵	۵/۵	۶	۷	۷/۳
۷۲		۳/۵	۳/۹	۳	۳/۸	۵/۵	۶/۱	۷/۱	۷/۱
۸۰		۳/۵	۳/۸	۳/۳	۳/۶	۵/۵	۶/۱	۷/۱	۷/۱
۹۶		۳/۵	۳/۸	۳/۵	۳/۵	۵/۴	۶/۱	۷/۱	۷/۱

محیط AMM به علت فقر منبع قندی و سایر مکمل های فلزی و اسید آمینه ای محیط مناسبی جهت تحریک سنتز انواع آنتی ژنها نیست. لذا انتظار حضور باند قوی ۹۰ کیلو دالتونی در این محیط نبود، گرچه نشان دادن باند ۹۰ کیلو دالتونی کاتالاز در کل با انجام الکتروفورز به سختی صورت می گیرد (۱۲) و استفاده از شیب غلظت ژل جدا کننده و رنگ آمیزی اختصاصی در این خصوص کمک کننده است (۱۴، ۱۱، ۱۱).

محیط YED نیز با مقادیر بسیار کم کربن و روی موجب می شود سنتز آنتی ژنهای مختلف آسپریژیلوس بویژه آنتی ژن آلرژن AspIII محدود گردد. از میسلیموم های رشد یافته در این محیط نیز باند قوی کاتالاز مشاهده نشد. میسلیموم های قارچی رشد یافته در محیط ساپرو و به خصوص در محیط کشت CDA با داشتن ۳-۲ درصد گلوکز دارای مقادیر مناسب آنتی ژن ۹۰ کیلو دالتونی بوده و با رشد چند روزه آسپریژیلوس فومیگاتوس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در چنین محیطی می توان به بیشترین آنتی ژنهای داخل سلولی و خارج سلولی دست یافت.

این آنزیم اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط Lopez و همکاران از قارچ آسپریژیلوس فومیگاتوس تخلیص گردید و در سال ۱۹۹۷ ژن آن توسط Calera و همکاران شناسایی و کلون گردید و با استفاده از موتانت عاری از ژن کاتالاز، تأثیر این فاکتور در ویرولانس قارچ ارزیابی گردید. امروزه این آنزیم به دلیل دارا بودن بالاترین توان تشخیصی در بیماریهای آسپریژیلوزی بویژه در آسپریژیلوز مهاجم و آسپریژیلوما (۳/۹۰ درصد) به عنوان یک آنتی ژن شناساگر مطرح می باشد. مطالعه حاضر نشان می دهد نوع استرین قارچی و دمای انکوباسیون تأثیری بر الگوی رشد و میزان تولید آنزیم کاتالاز نداشت.

References

1. Bridge, P. (1996): Protein purification protocols. Edited by Doonan 3rd ed. Humana Press, Newjersey, USA. PP: 39-47
2. Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A. Debeaupuis, J., Diaquin, M., Leal, F. and latge, J.P. (1997): Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. Infect and Immun. Nov:4718-1724.

قارچها نیز مانند سایر ارگانسیم ها، ضمن طی مسیر رشد از فازهای مختلف رشد فعال، کاهش رشد و اتولیز می گذرند. جهت تعیین این مراحل می توان هم به واسطه مصرف قند محیط کشت و هم از طریق برخی آنزیم های که در محیط کشت وارد می شوند مراحل مذکور را تخمین زد. تعیین آنزیمهای خارج سلولی β -گلوکزیداز، β -گالاکتوزیداز و دی استیل-کیتوبیوزیداز می تواند معرف مراحل مختلف رشد باشد و با استفاده از سوبستراهای U.m β -D-galactoside β -D-glucoside, U-methylumbeli feryl می توان مراحل مختلف رشد را تخمین زد. به طور مثال در بسیاری از قارچها زمانی که مراحل اولیه رشد را می گذارند، دارای آنزیم β -گلوکزیداز در مایع روئی پس از سانتریفوژ هستند. زمانی که گلوکز صرف رشد فعال قارچ می شود، حضور آنزیم β -گالاکتوزیداز قابل تعیین است و در مراحل اتولیز آنزیم دی استیل-کیتوبیوزیداز قابل اندازه گیری است.

با استفاده از میزان مصرف قند محیط کشت نیز می توان به مراحل مختلف رشد پی برد. لذا در این مطالعه با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده از میزان قند مصرف شده، مدت فاز رشد فعال در محیط AMM و YED نسبت به محیط های ساپروبراث و چاپکس در زمان کوتاهتری مشاهده شد (نمودار ۱). محیط ساپروبراث و چاپکس دارای ۳-۲ درصد گلوکز و نیز حاوی مکمل های اسید آمینه ای و فلزی می باشند. بهترین محیط کشت، محیطی است که دارای مکمل های اسید آمینه ای نزدیک به ترکیبات محیط اطراف بافت ریه باشد (۱۲).

محیط چاپکس بهترین محیط تحریک کننده بیوسنتز آنتی ژنهای مختلف آسپریژیلوس فومیگاتوس می باشد. از میسلیموم های فاز فعال رشد جهت عصاره گیری و جستجوی آنزیم کاتالاز استفاده شد. میزان وزن خشک برای هر محیط در دو دمای ۳۷ و ۲۸ درجه سانتیگراد سنجش شد (جدول ۱). دما تأثیری بر مقدار وزن خشک نداشت. زمان رسیدن به حداکثر وزن خشک در محیط AMM و YED نسبت به محیط های کشت S و CDA طولانیتر بود. علی رغم استفاده از دو دما جهت نگهداری قارچ در چهار محیط ذکر شده، حرارت تأثیری بر میزان پروتئین عصاره های محلول در آب، و خروجیهای ستون و تراکم باند ۹۰ کیلو دالتونی آنزیم کاتالاز نداشت. لذا در تولید انبوه قارچ می توان از تأثیر این فاکتور بر تولید آنتی ژن مورد نظر صرف نظر کرد.



3. Cenci, E., Mencacci, A., Bacci, A., Bistoni, F., Kurup, P. and Romani, L. (2000): T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol.* 165: 381-8.
4. Chumpitazi, B. (2000): *Aspergillus fumigatus* antigen detection in sera from patients at risk for invasive aspergillosis. *J. Clin. Jan.* 438-443.
5. Ellis, M. (2002): Invasive fungal infection evolving challenges for diagnosis and therapeutics. *Molecul. Innunol, May*: 947-957.
6. Hamilton, J. Holdom, M. (1999): Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med. Mycol*, 37: 375-389.
7. Hearn, V. (1992): Antigenicity of *Aspergillus* species. *J. Med. Vet. Mycol*, 30:11-25.
8. Hearn, V. Wilson, E. and Mackenzie, D.W.R. (1992): Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity. *J. Med. Microbiol.* 36: 61-67.
9. Hebart, H., Bollinger, C., Fisch, P., Sarfati, J. and Latge, J.P. (2002): Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood*. Dec, 100: 4571-4578.
10. Kieren, A., Marr, R., Carter, M., Boeckh, P. and Lawrence, C. (2002): Invasive aspergillosis in allogeneic stemcell transplant recipients. *Blood*, Dec, 100: 4358-4366.
11. Latge, J.P., Debeaupuis, J., Sarfati, J. and Paris, S. (1993): Cell wall antigens in *Aspergillus fumigatus*. *Arch. Med. Res.* 24: 269-274.
12. Latge, J. P. (1999): *Aspergillus* and aspergillosis. *Clin. Microb. Rev.* 12. 2: 310-350
13. Loudon, K. (1994): Invasive aspergillosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 217-224.
14. Lopez- Medrano, R., Ovejero, M.C., Calera, J.A., Puente, P. and Leal, F. (1995): *Aspergillus fumigatus* antigens. *Microbiol*, 141:2699-2704.
15. Lopez-Medrano, R., Ovejero, M.C., Calera, J.A. and Leal, F. (1995): An immunodominant 90-KDa *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase, *Infect. Immunol*, Dec: 4774-4780.
16. Manuel. R. and Kibbler, C. (1998): The epidemiology and prevention of invasive aspergillosis. *J. Hosp. Infect*, 39:95-109.
17. Purkayastha, S., Madan, T., Shah, A., Krishnamurthy, H.G. and Usha sarma, P. (2000): Multifunctional antigens of *Aspergillus fumigatus* and specific antibodies. *Appl. Biochem. Biotech*, 83: 271-287.
18. Sarfati, J., Boucias, D. G. and Latge, J.P. (1995): Antigens of *Aspergillus fumigatus* produced invivo. *J. Med. Vet. Mycol.* 33:9-14.
19. Takasuka, T., Sayers, N., Anderson, M., Benbow, E. and Dennim, P. (1999): *Aspergillus fumigatus* catalases. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 23: 125-133.
20. Wayne, L.G. and Diaz, C. (1988): A double staining, method of diferentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamid electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 157: 89-92.

