

## مقایسه مقادیر پروتئین‌های سطحی کاندیدا با استفاده از رنگ آمیزی نقره، کوماسی بلو و مخلوط هر دو رنگ و مشاهده باندهای مربوطه با استفاده از روش SDS-PAGE

دکتر سید امیر یزدان پرست<sup>۱</sup>، سیده شهرزاد مهدوی نظارتی<sup>۲</sup>،  
فربا حشمتی<sup>۳</sup>، سمیرا جهانگیری<sup>۴</sup>، زهره زارعی<sup>۴</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** گونه‌های کاندیدا بعنوان شایعترین عوامل بیماری‌های عفونی و قارچی فرصت طلب مطرح هستند. کاندیدا آلبیکنس بعنوان نوعی قارچ پلی مورف مطرح است. کاندیدا دابلینینسیس بعلت تشابه بسیار با قارچ کاندیدا آلبیکنس حائز اهمیت است. پروتئین‌های دیواره نیز می‌توانند در ساختار دیواره وجود داشته باشند. این پروتئینها بعلت نقش در چسبندگی و اتصال به سلولهای میزبان و بیماری زایی مورد تاکید مطالعات بوده است. لذا شناخت این پروتئینها در قارچ‌های پاتوژن و استخراج و جدا سازی و تعیین اجزای آنها ضروری به نظر می‌رسد.

**روش بررسی:** هدف از این طرح بررسی مقادیر پروتئین‌های سطحی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس با استفاده از سه رنگ آمیزی و مشاهده باند احتمالی آنها با روش سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) به منظور شناخت بیشتر این قارچهای بیماریزا می‌باشد. همچنین با استفاده از بافرکربنات آمونیوم که شامل بتامرکاپتواتانول است پروتئینهای سطحی کاندیدا استخراج می‌شوند و پس از استخراج انجام دیالیز نیز ضروری است.

**یافته‌ها:** با رنگ آمیزی کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی ۴۲ و ۶۶۲ و ۲۰۰ kDa و در رنگ آمیزی با نقره پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۱/۵ و ۲۸/۵ و ۳۷ kDa و با استفاده از رنگ آمیزی توام کوماسی بلو و نقره پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۷ و ۳۵ و ۴۰ و ۴۵ و ۵۲ و ۸۰ و ۹۷ kDa تشخیص داده شد.

**نتیجه‌گیری:** با رنگ آمیزی کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی بالا و در رنگ آمیزی با نقره پروتئینهایی با وزن مولکولی پایین و با مخلوط هر دو رنگ بیشتر باندهای پروتئین مشاهده شدند.

**واژه‌های کلیدی:** کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا دابلینینسیس، استخراج پروتئین، SDS-PAGE

\* نویسنده مسئول :

دکتر سید امیر یزدان پرست ؛  
دانشکده پیرپرستی دانشکده علوم  
پزشکی تهران

Email :  
Syazdanparast@tums.ac.ir

- دریافت مقاله : مهر ۱۳۹۰ - پذیرش مقاله : دی ۱۳۹۰

### مقدمه

کاندیدا دابلینینسیس اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط سولیوان (Sullivan) شرح داده شد. به طور عمده از حفره دهانی افراد مبتلا به ویروس HIV جدا می‌شود و از نظر خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی شبیه کاندیدا آلبیکنس می‌باشد (۱-۲).

کاندیدا آلبیکنس یک قارچ فرصت طلب است که به صورت چند شکلی می‌باشد و شایعترین عامل کاندیدایازیس است.

<sup>۱</sup> دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیرپرستی دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

<sup>۳</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیرپرستی دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۴</sup> کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشکده پیرپرستی دانشگاه علوم پزشکی تهران

گلوکز و لوله‌های حاوی گالاکتوز سانتریفیوژ انجام گرفت. مشابه همین عمل در مورد کانیدیدا دابلینسیس صورت گرفت (۵).

استخراج پروتئین: استخراج پروتئین به روش بتامرکاپتواتانول بدین صورت که محیط کشت در دور ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد سپس رسوب دو نوبت با آب مقطر استریل شستشو داده شد و سلولهای شسته شده را در محلول کربنات آمونیوم ۱/۸۹ گرم بر لیتر و بتامرکاپتواتانول ۱٪ معلق گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بعد از سانتریفیوژ مایع رویی (سوپرناتانت) به دقت جمع آوری شد و عصاره استخراج شده (با فیلتر ۰/۲) در برابر بافر تریس-HCL به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد دیالیز شد (۶). سنجش میزان غلظت پروتئین در هر نمونه با بکارگیری آزمون بردفورد انجام شد (۷).

SDS-PAGE: بررسی باندهای پروتئینی با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد و با تعیین وزن مولکولی تغییرات مربوط به هریک از کانیدیداها مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت (۸). این روش در ابتدا توسط لاملی در سال ۱۹۷۰ و سپس توسط کازانوا در سال ۱۹۸۹ انجام شد (۶و۸). SDS-PAGE در ژلوز separating به میزان ۱۲/۵ درصد W/V و در ژلوز stacking به میزان ۴ درصد W/V با ولتاژ ثابت ۶۵۷ انجام گرفت. برای الکتروفورز هر کانیدیدا، سه ژل آماده سازی شد و در هر ستون ژل ۲۰mg از پروتئینهای سطحی استخراج شد.

رنگ آمیزی: بعد از الکتروفورز، هرکدام از سه سری ژل قارچ به طور جداگانه تحت رنگ آمیزی با نقره با استفاده از روش Chaffin و همکاران (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) و با کوماسی بلو ۰/۱ درصد (CBB;Sigma)R-250 برطبق روش Lee و همکاران با مخلوطی از رنگ نقره

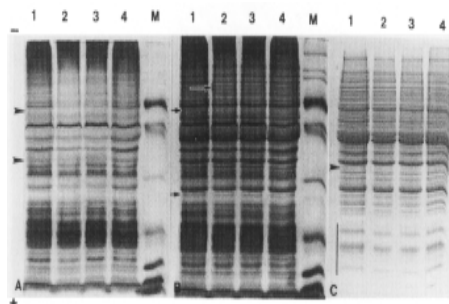
پروتئینهای دیواره سلولی به دلیل نقش چسبندگی شان حائز اهمیت هستند. این پروتئینها نقش در نگهداری ساختار و چسبندگی غیرمستقیم دارند. از پروتئینهای سطحی در دیواره قارچها می‌توان Vitronectin binding proteins و fibronectin binding proteins و همچنین Laminin binding proteins و Entactin binding proteins و نیز Protein-presumed protein را اشاره کرد. پروتئین شوک حرارتی از پروتئینهای مهم در قارچها است که قادرند با اتصال و نگهداری از دیگر پروتئینهای مهم حیات سلولها را نجات دهند (۳-۴). هدف از این کار تحقیقاتی، شناخت این پروتئینها در قارچهای پاتوژن و استخراج، جداسازی و تعیین اجزای آنهاست.

## روش بررسی

جامعه و نمونه پژوهش، گونه‌های کانیدیدا آلیکنس و کانیدیدا دابلینسیس بودند که باتوجه به اینکه از گونه‌های استاندارد استفاده شد، نیازی به انجام نمونه گیری نبوده است و حجم نمونه در این تحقیق، گونه کانیدیدا آلیکنس سویه CBS 562 و کانیدیدا آلیکنس سویه PTCC 6027 و کانیدیدا دابلینسیس سویه CBS 7987 بوده است.

کشت ارگانیسیم: ابتدا سلولهای مخمیری سویه CBS 562 و سویه PTCC 6027 در محیط پایه نیتروژن (YNB) به همراه سه اسید امینه تریپتوفان و متیونین و هیستیدین کشت داده شد. سپس این دو سویه یکبار در (YNB) به همراه گالاکتوز ۰/۳ مولار برده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار با دور 150rpm قرار داده شد و بار دیگر آنها در محیط YNB به همراه ۰/۱ مولار گلوکز و ۰/۳ مولار گالاکتوز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از یک شبانه روز در لوله‌های فالکن حاوی گالاکتوز +

562 پروتئین با وزن مولکولی پایین ۳۷ kDa (شکل A-۱) و همچنین در کانیدیدا دابلیونسیس سویه 7987 پروتئین با وزن مولکولی ۲۱/۵ kDa (شکل A-۳) ستون ۴ و ۵ و ۶ و ۷ (۸) مشاهده شدند. در رنگ آمیزی با مخلوطی از نقره و کوماسی برلیانت بلودرکانیدیدا آلیکنس سویه 6027 پروتئینهای با وزن مولکولی ۸۰ و ۴۵ و ۲۷ kDa (شکل B-۱) در کانیدیدا آلیکنس سویه 562 پروتئینهای با وزن مولکولی ۳۵ و ۴۰ و ۵۲ kDa (شکل B-۲) و در کانیدیدا دابلیونسیس سویه 7987 پروتئینهای با وزن مولکولی ۳۵ و ۴۵ و ۹۷ kDa (شکل A-۳) ستون ۱ و ۲ (۳) مشاهده شدند. به نظر می رسد رنگ آمیزی مضاعف سبب بهبود در ردیابی باندهای پروتئینی شد. پروتئین های اسیدی نسبت به سایر پروتئینها سریعتر رنگ شدند که تنها به فراوانی این پروتئینها مربوط نمی باشد بلکه ممکن است به ساختمان پروتئین مرتبط باشد. پروتئینهای با وزن مولکولی بین ۳۰-۲۰۶ kDa بویژه پروتئینهای اسیدی با رنگ آمیزی نقره شناسایی نمی شوند. همچنین پروتئینهای بسیاری با رنگ آمیزی کوماسی به تنهایی ردیابی نمی شوند. اما ترکیب دو رنگ آمیزی سبب افزایش باندهای پروتئین در ژلها گشت. سه ژل با کوماسی بلو و نقره و با مخلوطی از هر دو رنگ (نقره و کوماسی بلو) رنگ آمیزی شدند. مقایسه پروتکل رنگ آمیزی نشان داد که تشخیص باندهای موجود در هر نمونه بر اساس وزن مولکولی آنها می باشد.



شکل ۱: کانیدیدا آلیکنس سویه 6027 PTCC

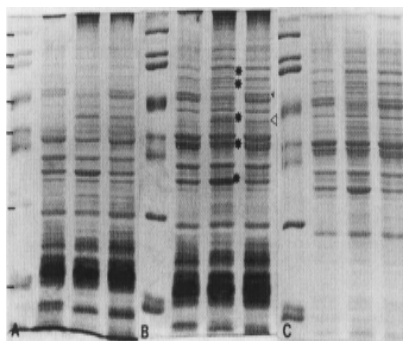
به همراه کوماسی بلو با استفاده از مشاهدات Joseba Chaffin, رنگ آمیزی شدند و سپس در محلول رنگ بر حاوی ۴۰٪ متانول و ۷٪ اسید استیک به مدت یک شبانه روز قرار گرفتند (۹ و ۵-۴). پس از آن مراحل انتقال الکتروفورزی پروتئینها به کاغذ نیتروسولوزی انجام شد. سپس کاغذ با ۳٪ شیرخشک در TBS به مدت ۲ ساعت مسدود شد و در ۲۰٪ TBS+0.05% Tween در ۲۰٪ IgG-2a با آنتی بادی مونوکلونال موش کلاس IgG-2a انکوبه شد. از پروتئین شوک حرارتی (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada) ۷۰ در رقت ۱:۵۰۰ به عنوان شاهد استفاده شد. همچنین از کونزوگه پراکسیداز با Boehringer Anti-IgG (Mannheim, Biochemicals, Indianapolis, IN) به عنوان دومین آنتی بادی در رقت ۱:۱۰۰۰ استفاده شد (۸). از مارکر Bio-Rad استفاده شد (جهت تعیین موقعیت مارکر های بیوتینه شده در غشا). این مارکر از بالا به پایین برحسب kDa به ترتیب شامل: میوزین با وزن مولکولی (۲۰۰) و بتاگالاکتوزیداز (۱۱۶) و فسفوریلاز b (۹۷/۴) و آلبومین سرم گاوی (۶۶/۲) و آلبومین (۴۵) و کربونیک انهدراز (۳۱) و مهار کننده تریپسین (۲۱/۵) است.

## یافته ها

در رنگ آمیزی با کوماسی برلیانت بلو در کانیدیدا آلیکنس سویه 6027 PTCC پروتئینی با وزن مولکولی بالا حدود ۶۶/۲ kDa (شکل C-۱) در کانیدیدا آلیکنس سویه 562 CBS پروتئینی با وزن مولکولی بالا حدود ۴۲ kDa (شکل C-۲) در کانیدیدا دابلیونسیس سویه 7987 CBS پروتئینی با وزن مولکولی بالا kDa ۲۰۰ (شکل B-۳) در رنگ آمیزی نقره در کانیدیدا آلیکنس سویه 6027 پروتئین با وزن مولکولی پایین ۲۸/۵ kDa (شکل A-۱) در کانیدیدا آلیکنس سویه

بخش A: ژل رنگ آمیزی شده با نقره  
بخش B: ژل رنگ آمیزی شده با مخلوطی از هر دو رنگ  
بخش C: ژل رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو

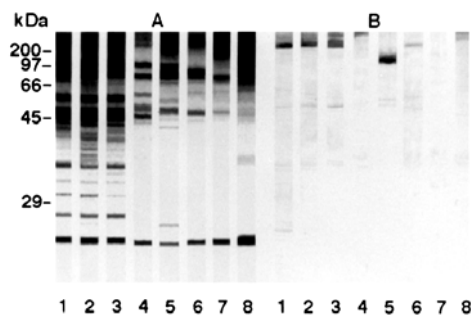
پیکانهای بالایی موجود در بخش A و C نشان دهنده رنگ آمیزی ضعیف باندها با استفاده از رنگ آمیزی تکی است. پیکان بالایی در بخش B بیانگر رنگ آمیزی قوی باندها با مخلوط دو رنگ (نقره و کوماسی برلیانت بلو) است.



شکل ۲: کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 562

بخش A: رنگ آمیزی با نقره  
بخش B: مخلوطی از دو رنگ (نقره و کوماسی بلو)  
بخش C: رنگ آمیزی با کوماسی بلو

ستاره‌های موجود در شکل ۲ بیانگر ردیابی باندهای پروتئین است.  
ستون دوم در بخش B باندهای قوی تر با وزن مولکولی (۳۵ و ۴۰ و ۵۲) مشخص‌اند.



شکل ۳: کاندیدا دابیلینسیس سویه CBS 7987

بخش A: ستون ۱ و ۲ و ۳ رنگ آمیزی شده با مخلوطی از هر دو رنگ. ستون ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ رنگ آمیزی با نقره  
بخش B: همه ستون‌ها رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو

## بحث

نشان داد. نتایج تحقیقات Lee و همکاران (۱۹۷۵) با استفاده از این رنگ آمیزی، پروتئین با وزن مولکولی ۴۲ و ۴۳ kDa را در کاندیدا آلبیکنس سویه A3153 شناسایی کردند (۹). وجود پروتئین ۴۲ kDa در

نتایج حاصل از این پژوهش در طی استفاده از رنگ آمیزی کوماسی بلو برای نشان دادن مقادیر و نوع پروتئین‌های موجود در قارچ کاندیدا، وجود پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۴۲،۲/۶۶،۲۰۰/۴۲،۲ kDa را

پروتئین ۲۷ و ۹۷ kDa در تحقیق Joseba, chaffin شناسایی نشدند که به نظر می‌رسد مربوط به اختلاف استرین باشد. همچنین روش رنگ آمیزی نقره و کوماسی برلیانت بلو تعداد پروتئینهای ردیابی شده را افزایش می‌دهد. این افزایش به نظر می‌رسد از دو منبع گرفته شده است. پاک سازی رنگ از پروتئینهای بازی و اسیدی در ژل مشابه ردیابی شد. ثانيا در رنگ آمیزی تکی نقاط رنگ کمتری گرفتند. ترکیب رنگ آمیزی نقره و کوماسی برلیانت بلو از پروتئینهای دیواره سلولی دو مزیت دارد: ردیابی پروتئینهایی که با رنگ آمیزی تکی مشاهده نشدند و افزایش ردیابی پروتئینهایی که با رنگ آمیزی تکی دیده نشدند و افزایش ردیابی پروتئینهایی که به طور ضعیف رنگ آمیزی شدند، می‌توان نتیجه گرفت که رنگ آمیزی اصلاح شده در شناسایی بهتر پروتئینهای قارچی کمک می‌کند (۱۲-۱۱).

با بررسی‌های بیشتر بر روی پروتئینهای موجود و استفاده از سرم افراد مبتلا به کاندیدیازیس یا در کلنی‌های کاندیدا می‌توان به مکانیسم دقیق بیماریزایی و شاید راهکارهایی برای تولید واکسن ضد قارچی دست یافت (۱۴-۱۳).

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از مساعدت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر را دارند. همچنین از همکاران محترم در مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه و نیز از آقای دکتر حمید بدلی به خاطر اهدای سوش قارچی کاندیدا دابلینسیس از دانشگاه آمستردام سپاسگزاری می‌نمایند.

سویه‌های مورد استفاده این تحقیق و تحقیق Lee هم خوانی دارد، اما دو پروتئین ۶۶/۲ و ۲۰۰ در سویه PTCC 6027 و CBS 562 مشاهده شد که در تحقیق Lee گزارش نشده و این تفاوت به نظر می‌رسد که مربوط به تفاوت استرین‌ها باشد و بررسی با تهیه نمونه بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. Casanova و همکاران (۱۹۹۱) با استفاده از کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی ۸۰ تا ۱۴۰ kDa را در کاندیدا آلبیکنس سویه ATCC 26555 مشاهده نمودند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱۰).

همچنین نتایج به دست آمده از این تحقیق طی استفاده از رنگ آمیزی نقره وجود پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۱/۵ و ۲۸/۵ و ۳۷ kDa را نشان داد. نتایج Chaffin و همکاران (۱۹۹۸) با این رنگ آمیزی پروتئینهایی با وزن ۲۱/۵ تا ۲۵ kDa را کاندیدا آلبیکنس سویه ATCC 44807 و کاندیدا آلبیکنس سویه NCPF 3153 نشان دادند (۵).

وجود پروتئین ۲۱/۵ kDa در سویه‌های مورد استفاده این تحقیق و تحقیق Chaffin هم سویی دارد، اما دو پروتئین ۲۸/۵ و ۳۷ kDa در سویه PTCC 6027 و CBS 562 شناسایی شدند که در تحقیق Chaffin مشاهده نشد.

این تفاوت نیز ممکن است مرتبط به اختلاف سویه‌های قارچی باشد. از سوی دیگر با استفاده از رنگ آمیزی مضاعف (مخلوطی از رنگ آمیزی نقره و کوماسی بلو) پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۷ و ۳۵ و ۴۰ و ۴۵ و ۵۲ و ۸۰ و ۹۷ kDa در کاندیدا آلبیکنس و دابلینسیس مشاهده شد و این نتایج با نتایج تحقیقات Chaffin و همکاران (۱۹۹۸) که از این رنگ آمیزی استفاده نمودند همخوانی دارد، زیرا آنها نیز پروتئینهایی با وزن مولکولی ۳۵ و ۴۰ و ۴۵ و ۵۲ و ۸۰ kDa را در کاندیدا آلبیکنس نشان دادند (۵). اما دو

1. Yazdanparast SA. Medical Mycology. Tehran: Jahad Daneshgahi; 2007: 206-7[Book in Persian].
2. Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991; 324(10): 654-62.
3. Moseley PL. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Applied Physiology* 1997; 83(5): 1413-7.
4. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 1994; 38(1): 1-17.
5. Chaffin WL, Lopez Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Mol Biol Rev* 1998; 62(3): 130-80.
6. Casanova M, Chaffin WL. Cell wall Glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J Gen Microbiol* 1991; 137(5): 1045-51.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(2): 248-54.
8. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(3): 680-5.
9. Lee KL, Buckley HR, Camobell CC. An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelia and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1975; 13(2): 148-53.
10. Casanova M, Chaffin WL. Phosphate-containing proteins and glycoproteins of the cell wall of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1991; 59(3): 808-13.
11. De Moreno MR, Smith JF, Smith RV. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Anal Biochem* 1985; 151(2): 466-70.
12. Dzandu JK, Deh ME, Barraatt DL, Wise GE. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins, and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(6): 1733-7.
13. Cybulsk Zefiryn, krzeminska elzbieta, Majewski Przemyslaw. Enzyme Production and Biotypes of vaginal *Candida albicans*. *Pelish Journal of Microbiology* 2005; 54(3): 227-31.
14. Davis leigh E, Shields christen E, Merz William G. Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbial* .2005; 43(5): 2465-66.