تعیین الگوی پروتئینی واریته‌های مختلف ترایکوفایتون وروکوزوم

دکتر علیرضا خسروی[1] زینب عابدیان[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دورهٔ ۵۳، شماره ۳ و ۴، ۱۴ - ۱۱، (۱۳۷۷)

در این مطالعه، جهت مقایسه آنتی‌ژن‌های پروتئینی واریته‌های ترایکوفایتون وروکوزوم (Trichophyton verrucosum)، ۵ واریته از این قارچ با منشاء انسانی و حیوانی، انتخاب شدند. ابتدا این قارچ‌ها بر روی محیط‌های اختصاصی کشت داده شده و در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ماه نگهداری شدند. سپس برای تهیه عصاره پروتئینی، قارچ‌های فوق در محیط سابوروی مایع کشت داده شده و از روش برادفورد (Braudford method) برای اندازه‌گیری میزان پروتئین استفاده شد. با استفاده از روش پلی‌آکریل ، با آمیدژل الکتروفورزیس (SDS - PAGE)، با ژل جداکننده ۱۳ درصد و سیستم بافر غیرپیوسته، تفکیک پروتئین‌ها صورت گرفت. برای رنگ‌آمیزی ژل، از کوماسی بلو G_{250} استفاده شد که بعد از ثابت نمودن، رنگ‌آمیزی و رنگ‌زدایی ژل، باندهای مختلفی ظاهر شدند. از مایع رویی نمونه‌ها ۱۴ باند پروتئینی با اوزان مولکولی ۹۲۲۵۰، ۸۱۲۸۰، ۷۴۹۹۰، ۷۲۴۴۰، ۷۰۷۹۰، ۶۳۱۰۰، ۶۰۰۰۰، ۵۶۸۹۰، ۵۱۸۸۰، ۴۸۴۲۰، ۴۴۱۵۰، ۴۱۶۸۰، ۲۹۱۵۰، ۱۲۷۳۰ دالتون مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصله، هیچ‌گونه اختلافی بین ۵ واریته ترایکوفایتون وروکوزوم تحت آزمایش از نظر این پروتئین‌ها وجود نداشت. در محلول کلوئیدی رسوب نمونه‌ها نیز ۱۶ باند پروتئینی مشاهده گردید که دو باند پروتئینی علاوه بر باندهای فوق نیز با وزن مولکولی ۳۸۰۲۰ و ۳۴۶۷۰ دالتون ظاهر گردید. در ۵ واریته، بین مایع رویی و رسوب نمونه‌ها، در وجود دو پروتئین مذکور اختلاف دیده شد. بدین معنی که مایع رویی نمونه‌ها فاقد این دو پروتئین بود.

واژه‌های کلیدی: درماتوفیت، ترایکوفایتون وروکوزوم، پروتئین

درماتوفیت‌ها، قارچ‌هایی هستند که به نواحی کراتینی پوست، ناخن، مو و پشم حیوان و انسان حمله کرده و ایجاد درماتوفیتوزیس می‌کنند. از نظر اکولوژی، درماتوفیت‌ها را به سه گروه انسان‌گرا، حیوان‌گرا و خاک‌گرا تقسیم می‌کنند. حیوانات منبع مهم کچلی برای انسان در شهر و روستا محسوب شده، لذا کنترل درماتوفیتوزیس حیوانی از نظر بهداشت عمومی دارای اهمیت فراوانی است. از جمله درماتوفیت‌های حیوان‌گرا، ترایکوفایتون وروکوزوم بوده که علت اصلی رینگ ورم در گاو است که از نظر اقتصادی موجب خسارات قابل توجهی می‌شود. افرادی که با چنین دام‌های آلوده و محصولات آنها مانند پشم و پوست در تماس هستند، در معرض ابتلا می‌باشند (۱۱،۹،۷).

از آنجایی که می‌توان از آنتی‌ژن‌های پروتئینی قارچ‌ها برای ایمن نمودن حیوانات استفاده نموده و به دنبال آن، عفونت را در جوامع انسانی کنترل نمود، بنابراین شناسایی و جداسازی و تخلیص پروتئین‌های اختصاصی آنها می‌تواند در این راستا تعیین‌کننده باشد. پیچیدگی ساختمان سلولی و تنوع پروتئین‌های سیتوپلاسمی قارچ‌ها، بر ضرورت بیشتر و جامع‌تر تعیین الگوی پروتئینی واریته‌های مختلف ترایکوفایتون وروکوزوم تأکید می‌کند (۱۴،۱۳،۱۲،۸).

مواد و روش کار

ابتدا ۵ واریته ترایکوفایتون وروکوزوم که قبلاً در بخش قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، از انسان و حیوان جدا شده بودند، انتخاب شدند. این واریته‌ها از نظر مشخصات کلی دارای اختلافاتی از قبیل سرعت رشد، ایجاد رنگدانه و همچنین شکل پرگنه بودند. از ابتدا این قارچ‌ها بر روی دو سری محیط‌های برین‌هارت اینفیوژن آگار ، (Brain heart infusion agar)، سابوروی حاوی سیکلوهگزامید و (Sabouraud with cycloheximide)نوترینت آگار کشت (Nutrient agar)، آگار خوندار (Blood agar) محیط کشت درماتوفیتی (Dermatophyte test medium = DTM) داده شده و سپس تعدادی از آنها به گرمخانه ۳۰ درجه سانتیگراد و سری دیگر به ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شدند. پس از کامل شدن رشد پرگنه‌ها، از نظر مورفولوژی، ایجاد رنگدانه، تغییر و رنگ محیط DTM همولیز محیط آگار خوندار و میزان رشد مورد بررسی قرار گرفتند.

برای تهیه پروتئین، از هر نمونه قارچ یک پلیت انتخاب شده و در شرایط کاملاً استریل در ارلن‌های حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر سابوروی مایع کشت داده شده و سپس ارلن‌ها به گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شدند. بعد از ۴۰ روز، از هر کدام از ارلن‌ها لام تهیه شده و از نظر میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند.

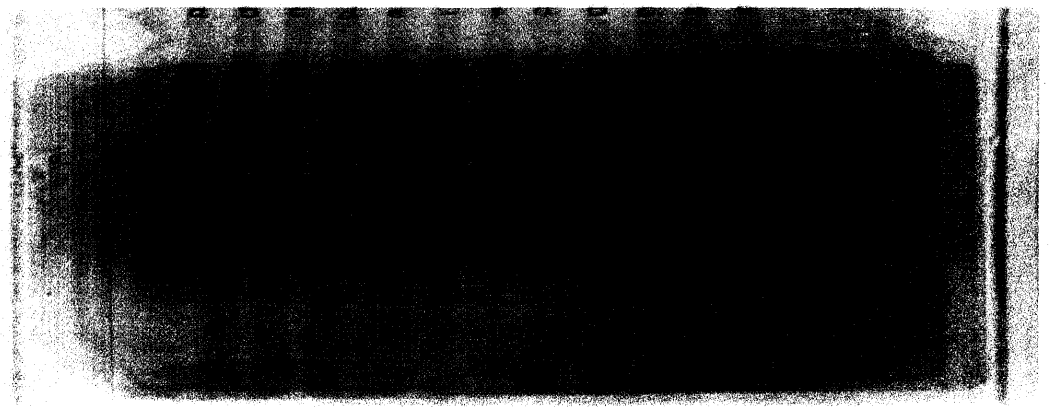
برای جداسازی پرگنه‌ها، ابتدا محیط‌های سابوروی مایع حاوی پرگنه، به‌طور جداگانه باکاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردیده و سپس پرگنه‌ها دو بار با بافر PBS شستشو داده شدند. سپس به ارلن‌های حاوی بافر منتقل گردیدند. برای خرد کردن پرگنه‌ها از دستگاه خردکننده سلول استفاده گردید. نمونه‌ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰g سانتریفوژ شده و سپس به کمک اولتراسانتریفوژ یخچال‌دار، مایع رویی نمونه‌ها، سه بار با دور ۱۵۰۰۰ تا ۲۸۰۰۰g به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ گردید که مایع رویی و محلول کلوئیدی ته‌نشین شده از هم جدا شدند. محلول‌های رویی هر نمونه به‌طور جداگانه در کیسه‌های دیالیز ریخته شد و بر روی کیسه، پلی اتیلن گلیکول خشک ۸۰۰۰ خشک پاشیده و به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از دیالیز، میزان پروتئین به روش برادفورد سنجیده شد. با استفاده از دستگاه لیوفیلیزاتور محلول‌ها خشک گردیده و در ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱ و ۱۵).

با استفاده از روش SDS-PAGE، با ژل جداکننده ۱۳ درصد و سیستم بافر غیرپیوسته، آنالیز پروتئین‌ها صورت گرفت. همراه با نمونه‌ها پروتئین‌های استاندارد (سیگما) نیز الکتروفورز شدند که شامل اووترانسفرین (۷۸۰۰۰da)، آلبومین (۶۶۲۵۰da)، اوالبومین (۴۲۷۰۰da)، کربوآنهیدراز (۳۰۰۰۰da)، میوگلوبین (۱۶۹۴۹da)، سیتوکروم C (۱۲۳۰۰da) می‌باشند. برای بررسی باندهای پروتئینی و تعیین درصد پروتئین‌ها از دستگاه دانسیتومتر هلنا با طول موج ۵۹۰ نانومتر استفاده شد (۶،۴،۲).

نتایج

همان‌گونه که در تصویر ۱ مشاهده می‌شود باندهای پروتئین حاصل از مایع تفکیک SDS-PAGE رویی و محلول کلوئیدی نمونه‌های تحت بررسی، به خوبی گردیده و این باندها رنگ‌آمیزی شده‌اند. منحنی استاندارد رسم شد ، وزن (نمودار ۱) و پس از تعیین گردید. RFمولکولی باندهای پروتئینی آنها، مشخص نتایج گویای آن است که باندهای پروتئینی، مایع رویی نمونه‌ها، مشابه بوده و هیچ‌گونه اختلافی از نظر پروتئین، بین آنها وجود ندارد. همچنین

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه میکروبیولوژی انستیتو پاستور.



تصویر ۱ ـ SDS-PAGE آنتی‌ژن‌های پروتئینی واریته‌های ترایکوفایتون وروکوزوم تحت مطالعه. شماره‌های ۱ ـ ۵ = مایع رویی هر نمونه، ۶ = نمونه استاندارد، ۱ ـ ۵ = محلول کلوئیدی رسوب نمونه‌ها

باندهای پروتئینی حاصل از SDS-PAGE محلول کلوئیدی نمونه‌های مورد بررسی، مشابه بوده و از این نظر اختلافی بین آنها وجود ندارد. اما بین باندهای پروتئینی مایع رویی و محلول کلوئیدی زیرین، در وجود دو باند با اوزان مولکولی ۳۴۶۷۰ و ۳۸۰۲۰ دالتون اختلاف دیده شد. بدین‌معنی که رسوب نمونه‌ها واجد دو باند مذکور می‌باشند در حالیکه مایع رویی آنها فاقد آن دو هستند (جدول ۱).

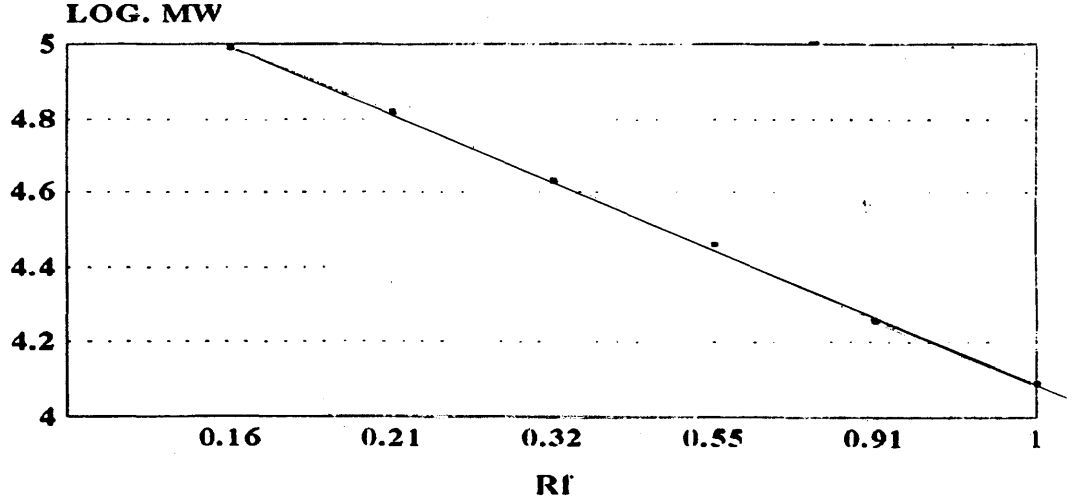
اوزان مولکولی پروتئین‌های به‌دست آمده بین ۹۲۲۵۰ تا ۱۲۷۳۰ دالتون می‌باشد که در مجموع ۱۴ باند در مایع رویی و ۱۶ باند پروتئینی در رسوب نمونه‌ها دیده شد.

بحث

ترایکوفایتون وروکوزوم، یکی از درماتوفیت‌های مهم حیوان‌گرا می‌باشد که علاوه بر ایجاد عفونت در حیوانات، موجب درماتوفیتوزیس حاد در انسان می‌شود. مخزن اصلی این قارچ در وهله اوّل گوساله‌ها و بعد گوسفندان هستند (۱۰). پرگنه‌های این قارچ، از نظر مورفولوژی ایجاد رنگدانه، سرعت رشد و نیازهای تغذیه‌ای در محیط کشت دارای تفاوت‌هایی می‌باشند که بر همین اساس آن را به چند واریته مختلف تقسیم‌بندی نموده‌اند (۱۶).

در مطالعه‌ای که در ایران صورت پذیرفت، مشاهده شد که واریته خاصی مکرراً از گوسفند و بز و واریته دیگر نیز اختصاصاً از گاو جدا می‌شود. همه این واریته‌ها، توانایی ایجاد بیماری به شکل حاد در انسان را دارا هستند، در حالیکه در شرایط طبیعی واریته‌ای که قادر به ایجاد بیماری در گوسفند است فاقد توانایی بیماری‌زایی در گاو می‌باشد. همچنین واریته‌ای که در گاو بیماری ایجاد می‌کند، در گوسفند بیماری به شکل اپیدمی ایجاد نمی‌کند.

این مطالعه بر این مبنا صورت پذیرفت که چون اختلاف در مورفولوژی و بیماری‌زایی این واریته‌ها مشاهده می‌گردد، احتمالاً این اختلاف می‌تواند مربوط به پروتئین‌های خاص واریته‌ها باشد. بر این اساس، واریته‌های ترایکوفایتون وروکوزوم جدا شده از انسان و حیوان که دارای مورفولوژی متفاوتی بودند، انتخاب نموده و پس از انجام مراحل کشت و عصاره‌گیری، از روش SDS-PAGE برای تفکیک اجزاء پروتئینی استفاده شد. پس از انجام آزمایش SDS-PAGE نتایج گویای آن بود که در پنج واریته ترایکوفایتون وروکوزوم تحت مطالعه، چهارده باند پروتئینی مشابه، با اوزان مولکولی به شرح زیر ایجاد شده است: ۹۲۲۵۰، ۸۱۲۸۰، ۷۴۹۹۰، ۷۲۴۴۰، ۷۰۷۹۰، ۶۳۱۰۰، ۶۰۰۰۰، ۵۶۸۹۰، ۵۱۸۸۰، ۴۸۴۲۰، ۴۴۱۵۰، ۴۱۶۸۰، ۲۹۱۵۰، ۱۲۷۳۰، دالتون.



نمودار ۱ ـ منحنی استاندارد

جدول ۱ ـ اوزان مولکولی آنتی‌ژن‌های پروتئینی، در مایع رویی و رسوب نمونه‌های تحت آزمایش

شماره نمونه / وزن مولکولی	۱		۲		۳		۴		۵	
	مایع رویی	رسوب	مایع رویی	رسوب	مایع رویی	رسوب	مایع رویی	رسوب	مایع رویی	رسوب
۹۲۲۵۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۸۱۲۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۷۴۹۹۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۷۲۴۴۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۷۰۷۹۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۶۳۱۰۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۶۰۰۰۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۵۶۸۹۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۵۱۸۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۴۸۴۲۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۴۴۱۵۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۴۱۶۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۳۸۰۲۰	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
۳۴۶۷۰	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+
۲۹۱۵۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۱۲۷۳۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

هیچ اختلافی بین ۵ واریته ترایکوفایتون وروکوزوم تحت آزمایش از نظر وزن مولکولی این پروتئین‌ها مشاهده نشد. در بررسی که Noble و همکاران در سال ۱۹۹۰ در مورد الگوی پروتئینی واریته‌های میکروسپوروم کانیس به روش SDS-PAGE انجام دادند، مشابهت زیادی در همه الگوهای پروتئینی به دست آمده از نمونه‌های کلینیکی وجود داشت و هیچ اختلاف بارزی مشاهده نشد. علاوه بر آن بین فرم‌های تیپیک و غیرتیپیک نیز اختلافی دیده نشد (۱۵). مطالعات انجام یافته بر روی الگوی پروتئینی میکروسپوروم کانیس، نشان‌دهنده اشتراکات آنتی‌ژنی در باندهای پروتئینی باترایکوفایتون وروکوزوم می‌باشد. وجود باندهای پروتئینی ۹۲۲۵۰، ۷۰۷۹۰، ۶۳۱۰۰ دالتون در ترایکوفایتون وروکوزوم و فقدان آن در میکروسپوروم کانیس، احتمالاً آن را از گونه‌های دیگر درماتوفیتی متمایز خواهد ساخت. اسکنینگ نمونه‌ها نشان می‌دهد که سه پروتئین فوق به ترتیب دارای ۲/۳، ۳/۲ و ۷/۷ درصد پروتئین کامل نمونه بوده است. در صورت بررسی بر روی گونه‌های دیگر درماتوفیتی، می‌توان آنتی‌ژن‌های پروتئینی اختصاصی را در ترایکوفایتون وروکوزوم شناسایی و جهت مطالعات بعدی مورد استفاده قرار داد.

Grzywnowicz و همکاران در سال ۱۹۸۹ تحقیقی بر روی مقایسه آنزیم‌های پروتئولیتیک ترایکوفایتون گالینه (T.gallinae) ترایکوفایتون وروکوزوم انجام دادند. آنها متوجه شدند که فعالیت پروتئولیتیک ترایکوفایتون گالینه با آنزیم‌های داخلی سلولی قارچی همراه است در حالی که در مورد ترایکوفایتون وروکوزوم، آنزیم‌ها به‌طور فعالی به داخل محیط کشت به‌عنوان آنزیم‌های خارج سلولی ترشح می‌شوند. بیشترین فعالیت هر دو آنزیم داخل و خارج سلولی در pH خنثی بوده است (۵).

در مطالعه ما، اختلافی بین الگوهای پروتئینی واریته‌های مختلف مشاهده نشد. بر همین اساس نتیجه‌گیری می‌شود که اختلاف مورفولوژی و بیماری‌زایی واریته‌های مختلف ترایکوفایتون وروکوزوم در ارتباط با تفاوت پروتئین‌ها از نظر وزن مولکولی آنها نمی‌باشد. باید مطالعات بیشتری صورت گیرد و هر کدام از اجزاء پروتئینی، تفکیک شده و از نظر قدرت آنتی‌ژنی مورد بررسی قرار گیرد. مطالعات آینده روشن خواهد ساخت که این تفاوت‌ها شاید مربوط به اختلاف در فعالیت آنزیمی آنها باشد. مسئله دیگر، وجود رنگدانه در بعضی از واریته‌ها و فقدان آن در واریته‌های دیگر می‌باشد. تجارب نشان می‌دهد که گونه‌های رنگدانه‌دار نسبت به گونه‌های فاقد رنگدانه حدت بیشتری دارند. مثلاً رنگدانه‌های دیواره سلولی در بیماری‌زایی در گیاه و حیوان نقش دارند. رنگدانه قدرت زیادی به قارچ داده و فقدان آن، نقش کلیدی در افزایش فشار هیدروستاتیک بازی می‌کند. ممکن است تشکیل رنگدانه در بیماری‌زایی پاتوژن‌های انسانی مثل کریپتوکوکوس نئوفورمنس نقش داشته (Cryptococus neoformans) باشد. همانطور و وانژیلا درماتیدیس (Vangiella dermatidis) که واریته‌های هر دو قارچ که فاقد رنگدانه هستند، آثار بیماری‌زایی در موش راکمتر نشان می‌دهند (۳). در این بررسی نیز واریته‌های مختلف تریکوفایتون وروکوزوم از نظر تولید رنگدانه متفاوت بودند. به هر حال این اولین مطالعه در زمینه تفکیک پروتئین‌های ترایکوفایتون وروکوزوم بوده و به‌عنوان الگوی پروتئینی این قارچ معرفی می‌گردد.

References

1. Apodaca, G. and Mckerrow, J.H. (1989). Purification and characterization of a 27,000 Mr Extracellular proteinase from Trichophyton rubrum. Infect and Immun. 3072-3080.
2. Cooper, G.T. (1997). Electrophoresis. In: The tools of biochemistry. PP: 194-232, John Willy and Sons, NewYork.
3. Gow, N.A.R. and Gadd, G.M. (1995). Cell walls and cell membranes. In: The growing Fungus. PP: 41-71, Alden Press, London.
4. Grappel, S.F., Bishop, C.T., Blank, F. (1974). Immunology

of dermatophytes and dermatophytosis. J.Bact. Rev. 222-250.

5 . Grzywnowicz, G., Lobarzewski, J., Wawrzkiewicz, K., Wolski, T. (1989). Comparative characterization of prroteolytic enzymes from T. gallinae and T. verrucosum. J. Med. Vet. Mycol., 27(5), 319-28.

6 . Hames, B.D. and Rickwood, D. (1994). One dimensional Polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel electrophoresis of proteins. PP: 22-49, Oxford university.

7 . Howard, D.H. (1985). Fungi pathogenic for humans and animals, Part B: I, II, 1-27, 17-79, Dekker Press, New York.

8 . Jones, J.E., Reinhardt, J.H., Rinaldi, M.G. (1974). Acquired immunity to dermatophytes. Arch. Dermatol., 109, 840-848.

9 . Korting, H.C., Zienicke, H. (1990).Dermatophytoses as occupational dermatoses in industrialized countries. Mycoses, 33(2), 86-9.

10 . Kwon Chung, K.J., Bennet, J.E. (1993). Dermatophytoses In: Medical mycology, PP: 105-161, Lea and Febiger Press, Pensylvania.

11 . Meriel, G., Jones, Noble, W.C. (1981). An electrophoretic study of enzymes as a tool in the toxinomy of the dermatophtes. J. Gen. Micro, 1101-1107.

12 . Rybnikar, A., Chumela, J., Verzal, V. (1989). The development of Immunity after vaccination of cattle against trichophytosis. Vet. Med. (Praha), 34(2), 97-100.

13 . Rybnikar, A., Chumela, J., Verzal, V. (1991). Immunity in cattle vaccinated against ringworm. J. Mycoses, 34(9-10), 433-436.

14 . Rybnikar, A., Verzal, V., Chumela, J. (1991). The minimal effective dose of vaccine against trichophytosis in heifers. J. Vet. Med. (Praha). 36(10), 593-7.

15 . Tucker, W.D.L. and Noble, W.C. (1990). The value electrophoretic protein patterns for the study of Microsporum canis. J. Med. Vet. Myco., 28, 117-123.

16 . Wawrzkiewicz, K., Ziolkowska, G., Klimont, S. (1986). Micromorphology of T. Verrucosum. Pol. Arch. Weter, 24(4), 67-74.

The electrophoretic Protein Pattern of Trichophyton verrucosum varities.

Khosravi, A.R.[1], **Abedian z**[2].

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine Tehran University, Tehran - Iran,* [2]*Passture Institute, Section of Microbiology.*

In ordre to compare the proteins of Trichophytonverrucosum, five isolates of this fungus, which obtained from human and animals, were chosen. The fungi were cultured on the specicfic media and incubated at 30° and 37° For preparation of protein extracts, the fungi were cultured in sabouraud's liquid medium and Bradford method was used to estimate the amount of protein, as well. protein analysis was carried out by using SDS-PAGE with 13% polyacrylamide resolving gel and a discontinious buffersystem. Gel staining was done by Coomassie Blue G250 and different bands were observed. Protein Patterns were scanned with a Helena densitometer. Fourteen protein bands with diffeerent molecular weights (Dalton), including 92250, 81280, 74990, 72440, 70790, 63100, 60000, 56890, 51880, 48420, 44150, 41680, 29150, 12730, were Detected from the supernatant of samples. In the pellet of samples, 16 protein bands were illustrated which were the same as above and the molecular weights of the two remainders were 38020 and 34670 Da. There were no differences between proteins of supernataant and pellet of five Trichophyton verrucosum isolates. It is concluded that the different varieties of Trichophyton verrucosum, in respect to their proteins patterns, are similar.

Key words: Dermatophyte, Trichophyton verrucosum, Protein