تعیین الگوی پروتئینی پنی‌سیلیوم‌های جدا شده از منابع طبیعی ایران

آذر سبکبار[1] دکتر علیرضا خسروی[2]* دکتر حسین کیوانی امینه[3] دکتر محمد موذنی[4] دکتر انوشیروان کاظم‌نژاد[5]

دریافت مقاله: ۱۲ بهمن ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۳۱ مردادماه ۱۳۸۳

هدف: تفکیک‌گونه‌های مختلف پنی‌سیلیوم براساس باندهای پروتئینی.

روش: در این مطالعه جهت مقایسه آنتی‌ژن‌های پروتئینی جدایه‌های پنی‌سیلیوم، از ۴ گونه پنی‌سیلیوم سیترینوم، پنی‌سیلیوم اگزالیکوم، پنی‌سیلیوم نوتاتوم و پنی‌سیلیوم فرکوئنتس جداشده از هوای ایران استفاده گردید (۳۰ جدایه پنی‌سیلیوم). ابتدا این قارچ‌ها برروی محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شده وسپس برروی محیط چاپکس آگار پاساژ داده‌شد و در دمای ۳۰ درجه‌سانتیگراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس برای تهیه عصاره پروتئینی قارچ‌های فوق در محیط سابوروروی مایع کشت داده شده و از روش برادفورد (Braud ford Method) برای اندازه‌گیری میزان پروتئین استفاده شد. با استفاده از روش پلی‌اکریل آمیدژل الکتروفورزیس (SDS-PAGE) با ژل جدا کننده ۱۰ درصد تفکیک پروتئین‌ها صورت گرفت. برای رنگ‌آمیزی ژل، از کوماسی بلو G250 استفاده شد که بعد از ثابت نمودن، رنگ‌آمیزی و رنگ‌زدایی ژل، باندهای مختلفی ظاهر شدند.

نتایج: براین اساس ۳۴ باند پروتئین با اوزان موکوسی ۱۹/۵، ۲۴، ۲۶، ۲۷، ۲۸/۵، ۳۲، ۳۶، ۳۹، ۴۵، ۴۸، ۵۰، ۵۲، ۵۳، ۵۵، ۵۶/۵، ۵۹/۵، ۶۳، ۶۵، ۶۶/۵، ۶۸، ۷۶، ۸۴، ۸۸، ۹۰، ۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۷، ۱۰۷، ۱۱۶، ۱۲۳، ۱۲۸ و ۱۵۸ کیلودالتون مشاهده شد. که باندهای ۱۹/۵-۲۴، ۲۸/۵-۴۵-۵۲، ۵۳-۵۶/۵، ۵۹/۵-۷۶-۸۴ و ۹۷ کیلودالتون باندهایی هستند که در تمام گونه‌ها حضور داشته، یعنی در تمام ۳۰ جدایه تحت مطالعه این باندها دیده شده‌اند.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج به‌دست‌آمده در این رابطه مشخص گردید که تفاوت‌هایی بین‌گونه و داخل‌گونه وجود دارد ولی اختلاف معنی‌داری در الگوی پروتئینی جدایه‌های تحت مطالعه مشاهده نگردید. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۲، ۱۱۵-۱۱۱.

واژه‌های کلیدی: پنی‌سیلیوم، پروتئین، SDS-PAGE.

Protein pattern of penicillium species isolated from natural sources in Iran.

Sabokbar, A.[1], Khosravi, A.R.[2], Keyvani Amineh, H.[3], Moazzeni, M.[4], Kazemnedjad, A.[5]

[1]Graduated from, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran. [2]Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran-Iran. [3]Department of Virology, Facutly of Veterinary Medicine University of Iran, Tehran-Iran. [4]Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran. [5]Department of Epiology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran.

Objective: Farctionation of diffecent penicillium species based on protein bands.

Procedure: In this study penicillium citrinum, penicillium oxalicum, penicillium notatum and penicillium frequentes isolated from air in Iran have been compared for their protein pattern antigens. First, the isolates were cultured on sabouraud dextrose agar medium and then subcultured on czapex agar and were maintained on 30°C for 48-72h. Then they were cultured on sobouraud broth medium for preparing protein extracts, and braudford method was used for measuring the level of protein. The proteins were differentiated using SDS-PAGE with 10% separating gel. Coomassie blue G250 was used for staining.

Results: 34 protein band with molecular weight of: 19.5, 24, 26, 27, 28.5, 32, 36, 39, 45, 48, 50, 52, 53, 55, 56.5, 59.5, 63, 65, 66.5, 68, 76, 84, 88, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 107, 116, 123, 128 and 158 kD were observed.

The bands 19.5, 24, 28.5, 45, 52, 53, 56.5, 59.5, 76, 84 and 97kD were present in all 30 isolates under study.

Clinical implications: The results, indicate that there are inter species and intra species differences but there is no significant difference in protein patterns of the isolates.

J.Fac.Vet.Med.Univ.Tehran. 60,2:111-115,2005.

Key words: Penicillium,Protein,SDS-PAGE.

Corresponding author's email: khosravi@ut.ac.ir

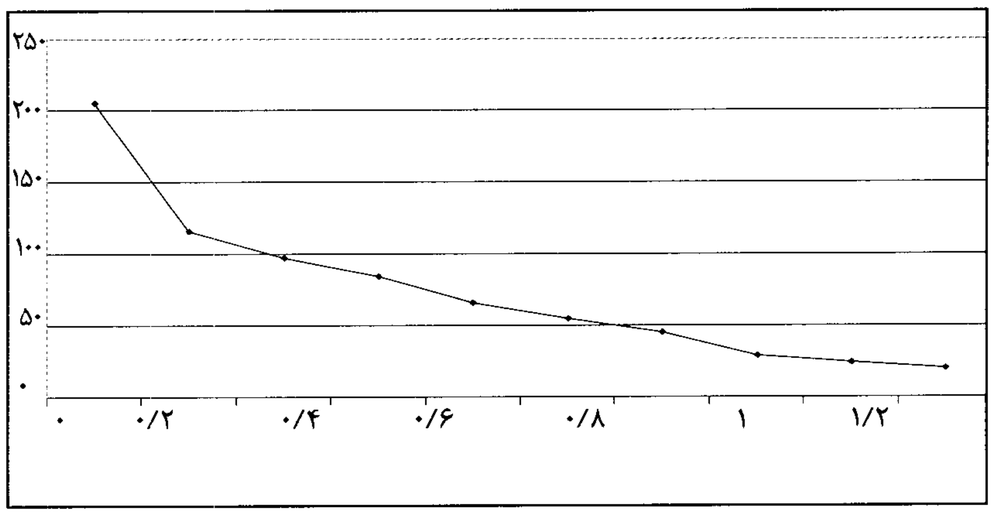
پنی‌سیلیوم قارچی ساپروفیت است که باعث آلودگی مواد غذایی، میوه‌جات، نوشابه‌های غیرالکلی و باعث آلودگی مواد بالینی می‌شود. این قارچ‌ها تنها ایجاد آلودگی مواد غذایی یا دارویی نکرده بلکه توانسته‌اند از برخی از انواع پنی‌سیلیوم‌ها مواد ضدقارچی و ضدمیکروبی به‌دست آورند.

کونیدی‌های این قارچ در هوا پراکنده بوده و انسان و حیوانات از طریق استنشاق با این اسپورها در تماس می‌باشند (۱،۹،۱۱،۱۳). به منظور به‌دست آوردن الگوی پروتئینی برای ۳۰ جدایه پنی‌سیلیوم تحت مطالعه و تفکیک گونه‌های مختلف پنی‌سیلیوم براساس باندهای پروتئینی در این مطالعه از روش SDS-PAGE استفاده گردید.

مواد و روش کار

۱- قارچ‌ها: ۳۰ جدایه پنی‌سیلیوم تایید شده که از هوای مناطق مختلف ایران

۱) دانش آموخته دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران -ایران.
۲) گروه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران -ایران.
۳) گروه ویروس‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه ایران، تهران -ایران.
۴) گروه ایمنی‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران -ایران.
۵) گروه اپیدمیولوژی و آمار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران -ایران.
*) نویسنده مسؤول: *khosravi@ut.ac.ir*



نمودار۱- منحنی استاندارد وزن مولکولی جهت محاسبه وزن مولکولی پروتئین‌های جداسازی شده به روش SDS-PAGE ژل ۱۰ درصد

جدا شده و در کلکسیون بخش قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند جهت انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. جدول ۱ لیست قارچ‌های مزبور را نشان می‌دهد.

۲- تولید انبوه: جدایه‌های نگهداری شده در آب مقطر، در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شدند پس از رشد مناسب قارچ در شرایط کاملاً استریل کلنی‌ها را از محیط کشت جدا نموده و در محیط چاپکس آگار در حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت پاساژ داده شد.

پس از کامل شدن رشد پرگنه‌ها، از لحاظ مشخصات مرفولوژی کلنی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تهیه پروتئین و به منظور انبوه‌سازی از هر نمونه قارچ یک پلیت انتخاب شده و در شرایط کاملاً استریل در ارلن‌های حاوی ۶۰۰ میلی‌لیتر سابوروی مایع کشت داده شده، سپس ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲-۱۰ روز نگهداری شدند.

۳- جداسازی کلنی‌های قارچی: برای جداسازی پرگنه‌ها، ابتدا محیط‌های سابوروی مایع حاوی پرگنه، به طور جداگانه با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردیده و پرگنه‌ها سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند (۱۲).

۴- خردکردن: برای خرد کردن پرگنه‌ها، ابتدا نمونه‌ها فریزدفریز گردیدند و سپس برای شکستن سلول‌های هر یک از ایزوله‌ها، روش سایش مکانیکی بوسیله پرل‌های شیشه‌ای و بافر شکننده شامل (تریس ۶۲/۵ میلی‌مولار، دی‌تیوتریتول ۱ میلی‌مولار، فنل متیل سولفونیل فلوراید ۰/۲ میلیگرم در هر میلی‌لیتر، گلیسرول ۱۵ درصد با pH = ۶/۸) مورد استفاده قرار گرفت.

۵- تهیه عصاره خام و سنجش مقدار پروتئین: بعد از خرد کردن، سوسپانسیون حاوی میسلیوم‌ها و اسپورهای شکسته شده طی سه مرحله در ۴ درجه سانتیگراد با دور ۲۵۰۰۰ گرم به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی به‌دست آمده پس از اندازه‌گیری مقدار پروتئین آن با روش برادفورد در لوله‌های کوچک تقسیم و تا مراحل بعدی کار در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۶،۱۰،۱۲،۱۴،۲۰).

۶- انجام الکتروفورز: SDS-PAGE با استفاده از روش SDS-PAGE با ژل جدا کننده ۱۰ درصد آنالیز پروتئین‌ها صورت گرفت. همراه با نمونه‌ها پروتئین‌های استاندارد (سیگما) نیز الکتروفورز شدند که شامل میوزین (۲۰۵kD)، بتاگالاکتوزیداز (۱۱۶kD)، فسفوریلاز B(۹۷kD)، فروکتوز-۶-فسفات کیناز (۸۴kD)، آلبومین سرم گاوی (۶۶kD)، گلوتامیک دهیدروژناز (۵۵kD)، اوالبومین (۴۵kD)، گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (۳۶kD)، کربونیک آنهیدراز (۲۹kD)، تریپسینوژن (۲۴kD)، تریپسین (۲۰kD) می‌باشند.

جهت آشکار شدن باندهای پروتئینی ژل با رنگ کوسی‌بلو G250 رنگ‌آمیزی گردید (۸،۵،۴،۳).

نتایج

نحوه تفکیک اجزای پروتئینی و اوزان مولکولی اجزای تشکیل دهنده عصاره پنی‌سیلیوم‌های تحت این مطالعه با روش SDS-PAGE مشخص گردید (تصاویر ۱، ۲، ۳ و ۴). براساس نحوه حرکت پروتئین‌های استاندارد در ژل و تعیین RF آنها منحنی استاندارد رسم گردید. (نمودار ۱) و با استفاده از این منحنی وزن‌های مولکولی اجزاء تشکیل دهنده عصاره تخمین زده شد.

براین اساس ۳۴ باند پروتئین با اوزان مولکولی ۱۹/۵، ۲۴، ۲۶، ۲۷، ۲۸/۵، ۳۲،

جدول ۱- لیست ایزوله‌های قارچی به‌کار رفته در الکتروفورز.

ردیف	قارچ
۱	P. citrinum C1
۲	P. citrinum C2
۳	P. citrinum C3
۴	P. citrinum C4
۵	P. oxalicum O1
۶	P. oxalicum O2
۷	P. oxalicum O3
۸	P. oxalicum O4
۹	P. oxalicum O5
۱۰	P. oxalicum O6
۱۱	P. notatum N1
۱۲	P. notatum N2
۱۳	P. notatum N3
۱۴	P. notatum N4
۱۵	P. notatum N5
۱۶	P. notatum N6
۱۷	P. notatum N7
۱۸	P. notatum N8
۱۹	P. frequentes F1
۲۰	P. frequentes F2
۲۱	P. frequentes F3
۲۲	P. frequentes F4
۲۳	P. frequentes F5
۲۴	P. frequentes F6
۲۵	P. frequentes F7
۲۶	P. frequentes F8
۲۷	P. frequentes F9
۲۸	P. frequentes F10
۲۹	P. frequentes F11
۳۰	P. frequentes F12

جدول ۲- باندهای به دست آمده (برحسب کیلودالتون) در جدایه‌های پنی‌سیلیوم‌های تحت مطالعه.

وزن مولکولی / شماره جدایه	۱۹/۵	۲۴	۲۶	۲۷	۲۸/۵	۳۲	۳۶	۳۹	۴۵	۴۸	۵۰	۵۲	۵۳	۵۵	۵۶/۵	۵۹/۵	۶۳	۶۵	۶۶/۵	۶۸	۷۶	۸۴	۸۸	۹۰	۹۲	۹۳	۹۴	۹۵	۹۷	۱۰۷	۱۱۶	۱۲۳	۱۲۸	۱۵۸	جمع کل
۱	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	۲۱
۲	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	۲۲
۳	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	۲۱
۴	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	۲۲
۵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	۲۵
۶	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	۲۳
۷	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	۲۲
۸	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۱
۹	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	۲۳
۱۰	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	۲۴
۱۱	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	۲۳
۱۲	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۲
۱۳	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۱
۱۴	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	۲۳
۱۵	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	۲۴
۱۶	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	۲۳
۱۷	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	۲۲
۱۸	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	۲۵
۱۹	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	۲۳
۲۰	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	۲۵
۲۱	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۵
۲۲	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	۲۶
۲۳	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	۲۲
۲۴	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	۲۳
۲۵	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	۲۴
۲۶	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۴
۲۷	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۲
۲۸	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۱
۲۹	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	۲۱
۳۰	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	۲۳
جمع کل	۳۰	۳۰	۲۳	۱۱	۳۰	۲۴	۱۲	۱۸	۳۰	۱۰	۲۲	۳۰	۳۰	۲۳	۳۰	۳۰	۷	۱۹	۱۵	۱۰	۳۰	۳۰	۲۶	۵	۱۳	۱۲	۱۸	۱۲	۳۰	۲۰	۱۶	۱۷	۱۳	۱۰	
٪	۱۰۰	۱۰۰	۷۶/۶	۳۶/۶	۱۰۰	۸۰	۴۰	۶۰	۱۰۰	۳۳/۳	۷۳/۳	۱۰۰	۱۰۰	۷۶/۶	۱۰۰	۱۰۰	۲۳/۳	۶۳/۳	۵۰	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰	۸۶/۶	۱۶/۶	۴۳/۳	۴۰	۶۰	۴۰	۱۰۰	۶۶/۶	۵۳/۳	۵۶/۶	۴۳/۳	۳۳/۳	

جدول ۳- باندهای به دست آمده (کیلودالتون) برحسب گونه‌های پنی‌سیلیوم‌های تحت مطالعه.

وزن مولکولی / گونه	۱۹/۵	۲۴	۲۶	۲۷	۲۸/۵	۳۲	۳۶	۳۹	۴۵	۴۸	۵۰	۵۲	۵۳	۵۵	۵۶/۵	۵۹/۵	۶۳	۶۵	۶۶/۵	۶۸	۷۶	۸۴	۸۸	۹۰	۹۲	۹۳	۹۴	۹۵	۹۷	۱۰۷	۱۱۶	۱۲۳	۱۲۸	۱۵۸
پنی‌سیلیوم سیترینوم	۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۰	۱۰۰	۷۵	۲۵	۷۵	۱۰۰	۲۵	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۲۵	۷۵	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۲۵	۷۵	۲۵	۷۵	۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۲۵	۷۵	۰
پنی‌سیلیوم اگزالیکوم	۱۰۰	۱۰۰	۸۳/۳	۶۶/۶	۱۰۰	۶۶/۶	۵۰	۵۰	۱۰۰	۱۶/۶	۶۶/۶	۱۰۰	۱۰۰	۶۶/۵	۱۰۰	۱۰۰	۳۳/۶	۵۰	۶۶/۶	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۰	۱۶/۶	۳۳/۳	۶۶/۶	۳۳/۳	۱۰۰	۸۳/۳	۳۳/۳	۸۳/۳	۱۶/۶	۳۳/۳
پنی‌سیلیوم نوتاتوم	۱۰۰	۱۰۰	۸۷/۵	۳۷/۵	۱۰۰	۶۲/۵	۷۵	۲۵	۱۰۰	۸۷/۵	۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۷۵	۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۶۲/۵	۳۷/۵	۱۲/۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۲/۵	۵۰	۳۷/۵	۶۲/۵	۳۷/۵	۱۰۰	۷۵	۵۰	۷۵	۲۵	۵۰
پنی‌سیلیوم فرکونئنتس	۱۰۰	۱۰۰	۸۳/۳	۳۳/۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۶/۶	۸۳/۳	۱۰۰	۷۵	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۷۵	۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۸۳/۳	۴۱/۶	۴۱/۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۸/۳	۵۸/۳	۳۳/۳	۶۶/۶	۳۳/۳	۱۰۰	۴۱/۶	۷۵	۴۱/۶	۵۸/۳	۳۳/۳

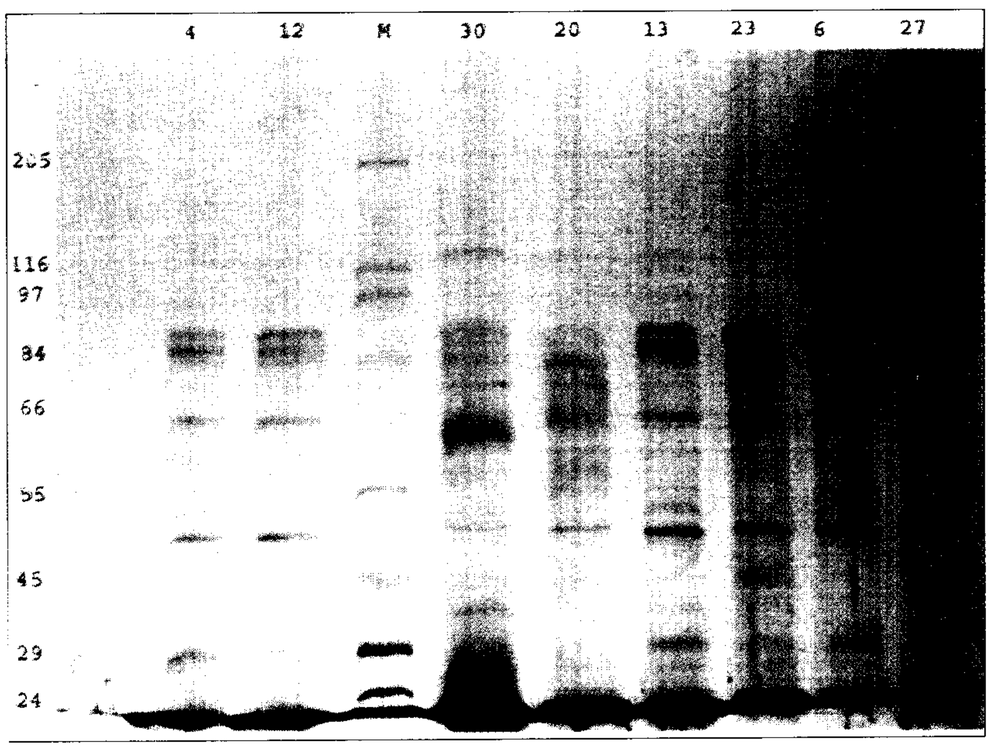
۳۶، ۳۹، ۴۵، ۴۸، ۵۰، ۵۲، ۵۳، ۵۵، ۵۶/۵، ۵۹/۵، ۶۳، ۶۵، ۶۶/۵، ۶۸، ۷۶، ۸۴، ۸۸، ۹۰، ۹۲، ۹۳، ۹۴، ۹۵، ۹۷، ۱۰۷، ۱۱۶، ۱۲۳، ۱۲۸ و ۱۵۸ کیلودالتون مشاهده شد.

جدول ۲ نشان می‌دهد که باندهای ۱۹/۵، ۲۴، ۲۸/۵، ۴۵، ۵۲، ۵۳، ۵۶/۵، ۵۹/۵، ۷۶، ۸۴ و ۹۷ کیلودالتون باندهایی هستند که در تمام گونه‌ها حضور داشته، یعنی در تمامی ۳۰ جدایه تحت مطالعه این باندها دیده شدند. براساس این جدول جدایه ۲۲ واجد حداکثر باندهای پروتئینی (۲۶ باند) بود در حالی‌که جدایه‌های ۱، ۳، ۸، ۱۳، ۲۸ و ۲۹ واجد حداقل باندهای پروتئینی (۲۱ باند) بودند.

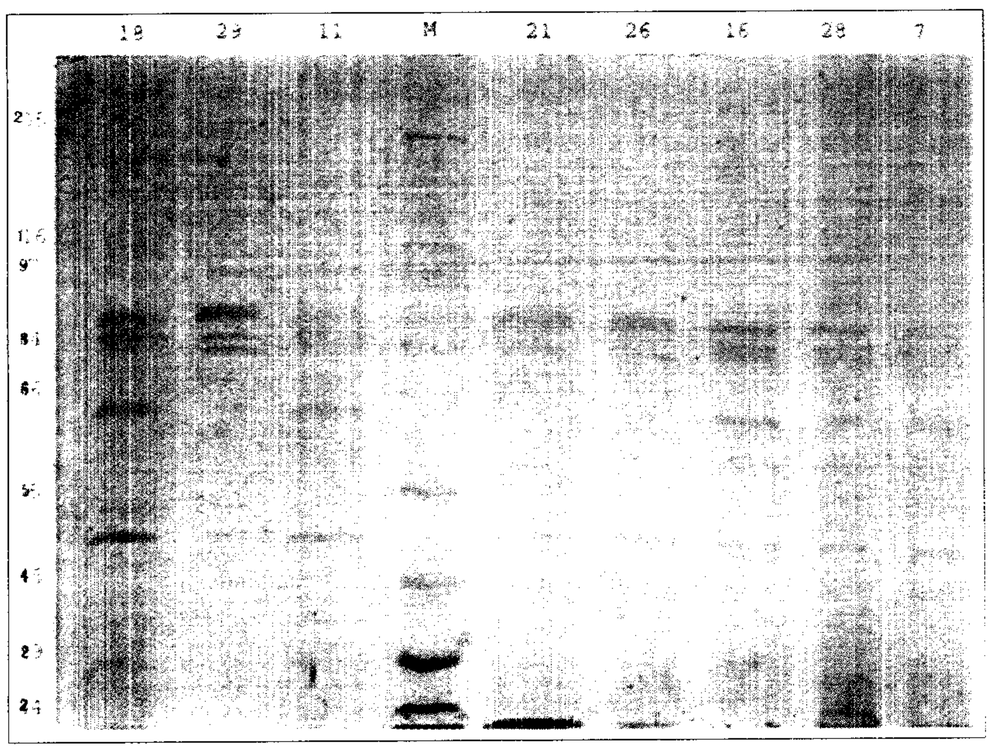
در پنی‌سیلیوم سیترینوم ۲۲ باند اصلی در طیف ۱۲۸-۱۹/۵ کیلودالتون، در پنی‌سیلیوم اگزوالیکوم ۲۵ باند در طیف ۱۲۳-۱۹/۵ کیلودالتون، در پنی‌سیلیوم نوتاتوم ۲۲ باند در طیف ۱۵۸-۱۹/۵ کیلودالتون و در پنی‌سیلیوم فرکوئنتس ۲۳ باند در طیف ۱۲۸-۱۹/۵ کیلودالتون با بالاترین فراوانی نسبی (۵۰٪<) مشاهده گردید (جدول ۳).

باندهای ضعیف در طیف ۱۵۸-۹۴ کیلودالتون مشاهد گردید که در برخی مواقع در تفکیک گونه‌ها حائز اهمیت است. که در پنی‌سیلیوم سیترینوم ۴ باند در رنج ۹، ۹۷، ۱۰۷ و ۱۲۸ کیلودالتون، در پنی‌سیلیوم اگزوالیکوم ۴ باند در رنج ۹۴، ۹۷، ۱۰۷ و ۱۲۳ کیلودالتون، در پنی‌سیلیوم نوتاتوم ۶ باند در رنج ۹۴، ۹۷، ۱۰۷، ۱۱۶، ۱۲۳ و ۱۵۸ کیلودالتون و در پنی‌سیلیوم فرکوئنتس ۴ باند در رنج ۹۴، ۹۷، ۱۱۶ و ۱۲۸ کیلودالتون (بافراوانی نسبی بالای ۵۰ درصد) مشاهده گردید (جدول ۳).

براساس نتایج به‌دست آمده در این رابطه مشخص گردید که تفاوت‌هایی بین گونه و داخل گونه وجود دارد ولی در حل اختلاف معنی‌داری در الگوی



تصویر ۱- الگوی الکتروفورزی عصاره قارچ پنی‌سیلیوم به روش SDS-PAGE(ژل ۱۰ درصد، رنگ‌آمیزی باکوماسی بریلیانت‌بلو).



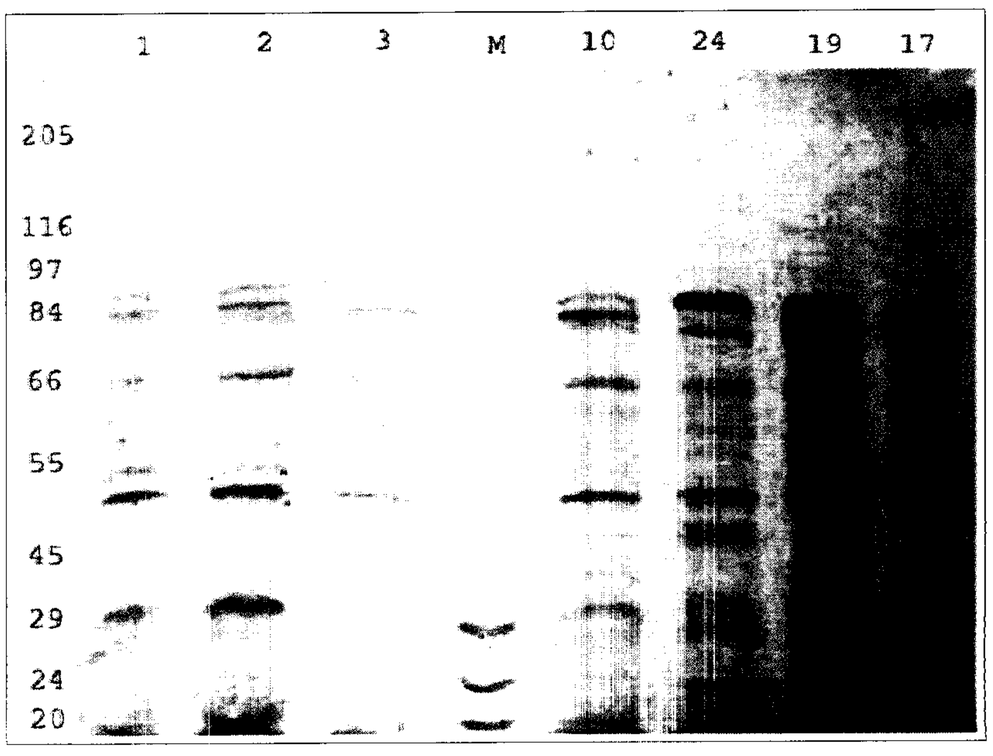
تصویر ۲- الگوی الکتروفورزی عصاره قارچ پنی‌سیلیوم به روش SDS-PAGE(ژل ۱۰ درصد، رنگ‌آمیزی باکوماسی بریلیانت‌بلو).

پروتئنی جدایه‌های مطالعه بین گونه و داخل گونه مشاهده نگردید.

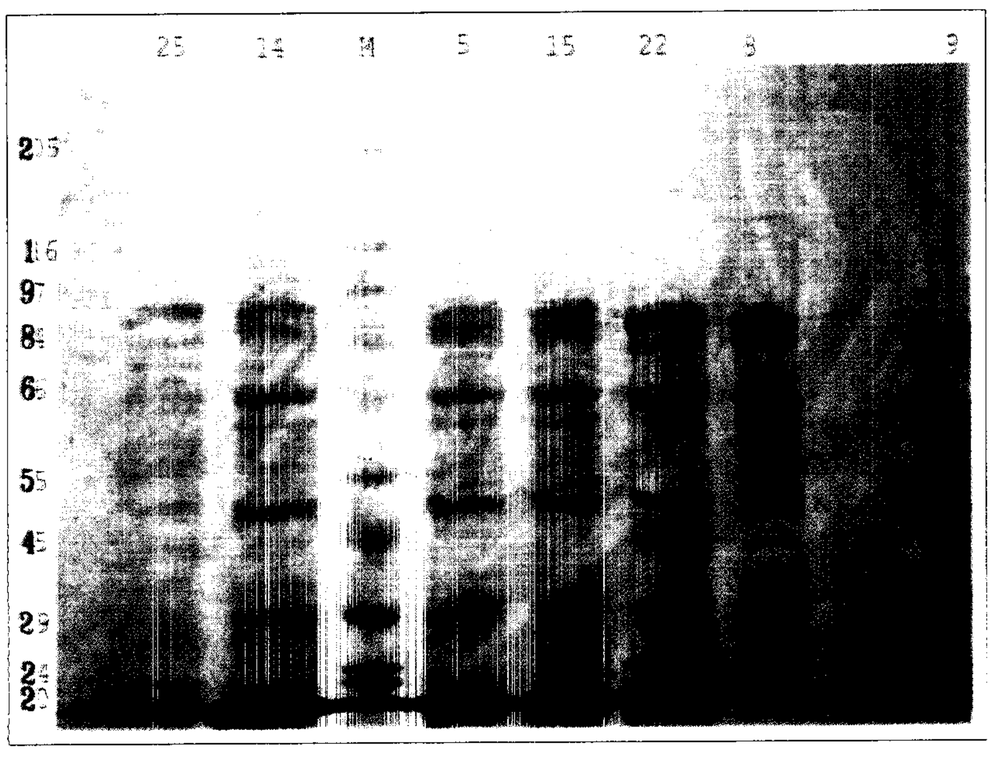
بحث

قارچ‌های ساپروفیتی دارای تنوع گونه‌ای زیادی بوده و در طبیعت برروی هر نوع مواد آلی رشد می‌نمایند. اسپورهای غالب این قارچ‌ها در هوا پراکنده شده و انسان و حیوان از طریق استنشاق با این اسپورها در تماس می‌باشند (۱۳، ۹، ۱). پنی‌سیلیوم نیز دارای گونه‌های بسیار متنوعی در طبیعت می‌باشد. این قارچ‌ها به‌شکل گنده‌روی برروی مواد غذایی در حال فساد و میوه‌جات رشد نموده علاوه بر آسیب رساندن به مواد (با تولید سموم، برخی از آنزیم‌ها) کنیدی آن در هوا منتشر شده و به علت کوچک بودن قطر کویندی غالباً از طریق مجرای تنفس فوقانی انسان و حیوان به آلوئل‌های ریوی رسیده و ممکن است در شرایط خاص ایجاد عفونت نموده و یا موجب واکنش حساسیتی به شکل آسم شود (۱۱، ۷).

برخی از پنی‌سیلیوم‌ها مانند پنی‌سیلیوم سیترینوم برای جیره‌های غذایی دامی یا انسانی تحت شرایط خاصی می‌توانند تولید سموم خطرناکی نمایند. لذا حضور پنی‌سیلیوم‌ها در علوفه دامی باید به‌عنوان یک عامل خطر در جیره مدنظر قرار بگیرد. برای به‌دست آوردن الگوی پروتئینی این قارچ‌ها در مطالعه حاضر از ۴ گونه پنی‌سیلیوم سیترینوم، پنی‌سیلیوم اگزالیکوم، پنی‌سیلیوم نوتاتوم و پنی‌سیلیوم فرکوئنتس جدا شده از هوای ایران استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده از روش SDS-PAGE مشخص گردید که عصاره‌های به‌دست آمده از این قارچ‌ها حداکثر دارای ۳۴ باند پروتئینی می‌باشند. که دامنه باند پروتئینی آنها بین ۱۹/۵ تا ۱۵۸ کیلودالتون می‌باشد. در این بین جدایه ۲۲ دارای حداکثر باند پروتئینی (۲۶ باند) بوده و جدایه‌های ۱، ۳، ۸، ۱۳، ۲۸ و ۲۹ حداقل باند پروتئینی (۲۱ باند) را دارا بودند. براساس نتایج حاصله اختلاف معنی‌داری از نظر حضور یا عدم حضور باندها در بین گونه‌های مختلف مشاهده نگردید. تمام گونه‌های تحت مطالعه با فراوانی متفاوتی واجد این باندها بودند. (به جز پنی‌سیلیوم سیترینوم که فاقد باندهای ۲۷، ۶۳، ۹۰ و ۱۵۸ کیلودالتون بود). بنابراین الگوی پروتئینی هریک از این گونه‌ها اختصاصی آن گونه نبوده و نمی‌تواند به عنوان یک معیار تشخیص قابل قبل مورد نظر قرار گیرد.



تصویر ۳- الگوی الکتروفورزی عصاره قارچ پنی‌سیلیوم به روش SDS-PAGE(ژل ۱۰ درصد، رنگ‌آمیزی باکوماسی بریلیانت‌بلو).



تصویر ۴- الگوی الکتروفورزی عصاره قارچ پنی‌سیلیوم به روش SDS-PAGE(ژل ۱۰ درصد، رنگ‌آمیزی باکوماسی بریلیانت‌بلو).

تشکر وقدردانی

بدین‌وسیله‌ازهمکاری‌سرکارخانم‌ها،مینوسلطانی،مریم‌هاشمیان‌وآقای محمدطاهری‌درانجام‌کارهای‌آزمایشگاهی‌تشکرمی‌شود.

References

1. Bierman, W.C., Van Arsdel Jr P.P. (1999): Allergens and Allergen Immunotherapy, in: Lockey R.F., Bukantz. S.C. (Eds), Marce Dekker, Inc., New York, PP: 1-26.
2. BradFord, M.M.(1989): Arapid and Sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priciple of protein-dyebinding. Analytical Biochem. 72: 248-254.
3. Cooper, C.T. (1997): Electrophoresis. In: thetools biochemistry. John Willy and Sons, New York. PP: 124-232.
4. Ellis, M. (2002): Invasive fungal infection evolving challenges for diagnosis and therapeutics. Molecul. Innunol. May: 947-957.
5. Hames, B.O and Rickwood, D. (1994): One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel electrophoresis of proteins oxford university. PP: 22-49.
6. Koivikko, A.,Ogawa, H. (1988): Allergenic cross-reactivity of yeasts. Allergy. 43: 192-200.
7. Kurup V.P. and Shen H.D. (2000): Respiratory fungal allergy. Microb. Infect. 1101-1110.
8. Laemmli U.K. (1970): Cleavage of stuructural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-5.
9. Latge, J.P., Paris S. (1991): The fungal spore and disease initiation in plants and animals, in: cole G.T., Moch H.C. (Eds), Plenum press, New York, pp: 378-401.
10. lintu P.(1994): Cross-reacting IgE and IgG antibodies to pityrosporum ovale mannan and other yeasts in atopic dermatitis. Allergy. 54(10): 1067-73.
11. Murphy, J.W., Friedman, H. and Bendinelli, M. (1993): Fungal infection and Immune response. New York and London: plenum press, pp: 379-391.
12. Rath, P.M. (2001): Phenotypic and genotypic characterization of reference streins of the genus Aspergillus. Mycoses. 44: 65-72.
13. Vijay, H.M., Thaker A.J., Banergee B., Kurup, V.P. (1999): Allergens and Allergen Immunotherapy, in: locky R.F., Bukantz S.C. (Eds), Marcel Dekker, Inc. New York, pp: 133-154.
14. Vijaya kumar, B., Medoff, G., Kobayashi, G.S. and Leosieling, W. (1985): Cross-reacting human and rabbit antibodies to antigens of histoplasma capsulatum, candida albicans, and saccharomyces cervisiae. Infection and Immunity. 48(3): 806-812.