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

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 انبوه قارچ استفاده شد. میسلیوم های قارچی پس از ۹۶ ساعت از سطح محیط کشت فیلتر شده سپس با بافر شکننده خرد شده و با دور ۱۵۰۰۰۰g سانتریفوژ 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 الکتروفورز 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 الکتروفورز 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 ± ۰/۱mg/ml در محیط های YED و AMM بود. عصاره های محلول در آب حاصل از محیط CDA و S 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 تاثیر سویه 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 سویه 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، (۱۳۸۳)، 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 غیرآلرژیک 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 مسئول zavaran@yahoo.com

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]

[1]*Department of Mycology, Faculty of Medical Science, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran.* [2]*Department of Immunology, Faculty of Medical Science, University of Tarbiat Modarres University, Tehran, - Iran.* [3]*Department of mycology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran.* [4]*Faculty 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: Iterventional.

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 suppernatant, was used to purify the antigen. The amount of proteins water - Soluble were measurered by Brodford method. Then electrophorised and the sample was specificaully stained with ferocyanid. 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). Electrphoresis 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 tempreature 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, Tempreatrue, Media composition.

Corresponding author email:zavaran@yahoo.com

۳ـ *آسپرژیلوس نایجر* مرتبط می گردد. آسپرژیلوس طیف وسیعی از گرفتاریهای اندامهای مختلف از جمله ریه، پوست، کلیه، استخوان، مغز و سیستم گوارش را می تواند ایجاد کند که حادترین شکل آن (آسپرژیلوز مهاجم) در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی رخ می دهد که با احتمال ۷۰ـ۵۰ درصد منجر به فوت آنان می گردد (۱۲). دیواره سلولی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در برگیرنده بیشترین آنتی ژنهای ترشحی در طی رشد در محیط های Invitro و Invivo می باشد که توانایی اتصال به ایمنوگلوبین های IgGوIgE 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 *آسپرژیلوس فومیگاتوس* شناسایی شده است که از مهمترین آنها می توان از آنتی ژن کاتالاز، گالاکتومانان،ASPFI و ASPFII و پروتئین های ۳۷KDa و ۶۰KDa و ۴۰KDa نام برد (۷،۹،۱۰،۱۱،۱۷). آنتی ژنهای ASPFI وASPFII در تشخیص فرم آسپرژیلوز برونکوپولمونری کاربرد دارند. در حالیکه بالاترین توان تشخیص بیماریهای آسپرژیلوزی بویژه آسپرژیلوز مهاجم و آسپرژیلوما (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 میسلیال *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، حاوی دوتیپ کاتالاز S وF 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 آسپرژیلوز مؤثر باشد.

مواد و روش کار

۱ـ **قارچها**: ایزوله های بیماریزای انسانی و حیوانی از کلکسیون قارچی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید.

۲ـ **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 2×10^{6} کونیدی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به درون ارلن های حاوی ۵۰۰ ml محیط کشت چهار گانه ذیل تلقیح گردید (۱۵).

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

ب ـ محیط YED حاوی(KH_2Po_4 ٪۰/۱۵، $MgSo_4$٪۰/۳۲، glucose٪۰/۱) به همراه مقادیر بسیار کمی($FeSo_4$, $ZnSo_4$، KCL٪۰/۰۵۲، $NaNo_3$٪۰/۶

ج ـ محیط S حاوی سابروبراث

د ـ محیط CDA حاوی چابکس برات به انضمام اسیدآمینه های آسپارتیک و سیستئین 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.

Na_2HPo_4 به میزان ۱/۳ گرم

KH_2Po_4 به میزان ۳ گرم

NaCL به میزان ۰/۵ گرم

NH_2CL به میزان ۱گرم

$MgSo_4$ به میزان ۰/۲۴ گرم

$CaCL_2$ به میزان ۰/۰۱ گرم

سپس به هر محیط کشت ۱۰۰ واحد پنی سیلین و۲۰۰ mg 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.

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

$$\text{مقدار گلوکز} = \frac{\text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری استاندارد}} \times 100\ \text{mg/ml}$$ غلظت گلوکز در محلول استاندارد

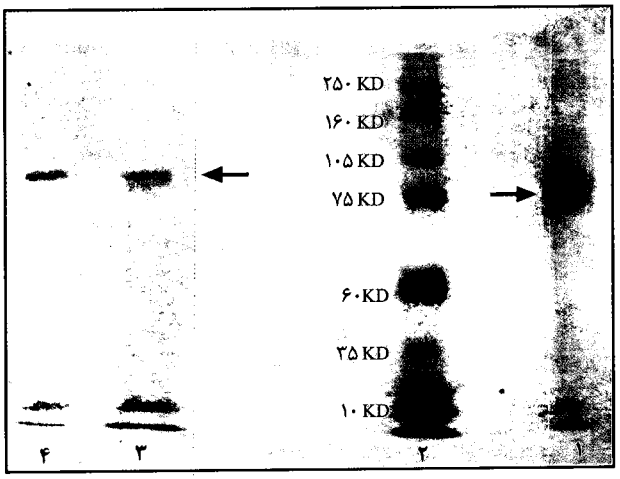
۴ـ **تعیین وزن خشک**: ابتدا میسلیوم را درون یک پتری دیش در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده، سپس هر نیم ساعت یکبار آن را وزن کرده تا در دو توزین متوالی اعداد یکسان به دست آید. در این زمان می توان وزن خشک میسلیوم را تعیین کرد.

۵ـ **تهیه عصاره محلول در آب**: سطح کلنی های قارچی به منظور حذف کونیدی، سه بار با آب مقطر شستشو داده شده، سپس برداشت میسلیوم ها با انجام فیلتراسیون و با استفاده از کاغذ واتمن و آب دو بار تقطیر صورت گرفت. میسلیوم ها در فریزر ۷۰ـ درجه سانتیگراد نگهداری شده سپس با بافر شکننده حاوی EDTA و DTT وPMSF و آپروتنین و پپستاتین 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 میسلیوم ها در این سوسپانسیون با استفاده از میکروسکوپ نوری کنترل شد. سوسپانسیون حاصل توسط اولتراسانتریفوژ با دور ۱۵۰/۰۰۰ 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.

۶ـ **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 ۳۰ـ درجه سانتیگراد، در طی ۶ ساعت رسوب داده شد (۱۵).

۷ـ **الکتروفورز PAGE**: عصاره های محلول در آب حاصل از چهار محیط کشت قارچ، با ژل آکریل آمید دارای شیب غلظت ۱۵ـ۵ درصد به روش متداول الکتروفورز در سیستم ناپیوسته Laemmli و با استفاده از دستگاه



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.

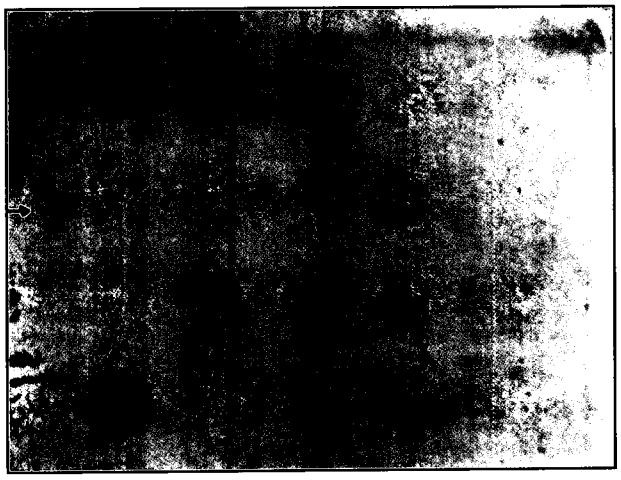
گرادیان ساز مورد آزمایش قرار گرفت. سپس رنگ آمیزی با کوماسی بلو ۰/۵ درصد و رنگ زدایی با اسید استیک و متانول و آب مقطر به نسبت (۵۸-۵-۱۰) صورت گرفت.

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 g ۲۰/۰۰۰ 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 وبه مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. با استفاده از کاغذ واتمن ژل جدا و با آب مقطر شستشو داده شد تا اسیدیته زیر فیلتر به کمتر از ۸ برسد. ژل، حباب گیری شده، داخل ستون به ابعاد ۲۲۰ سانتیمتر قرار گرفت. از بافرفسفات 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 بافرتریس با شیب غلظت نمکی ۳۵- ۰ 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 ۲۰×۲ سانتیمتر ریخته شد ونمونه (خروجی ستون DEAE) بر روی ژل قرار گرفت. از سیستم بافری استات ۱۰ میلی مول با



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

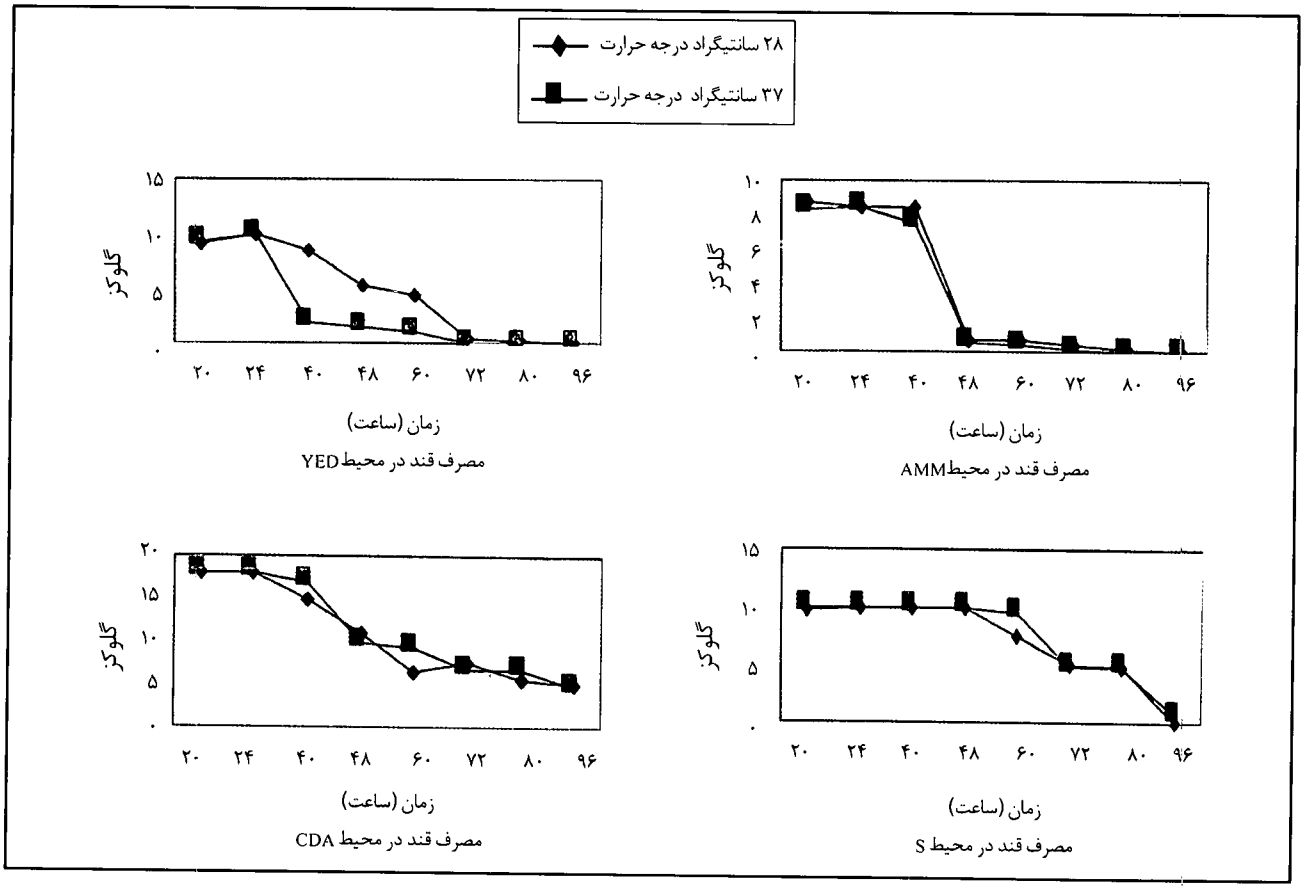
شیب غلظت نمکی ۳۵۰-۰ NaCL جهت تخلیص استفاده گردید.

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 ۲۵۰،۱۶۰،۱۰۵،۷۵،۶۰،۳۵،۱۰ 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 ۰/۰۱ 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 ۰/۰۱ 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 کلرورفریک 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 AMM,YED,S و CDA، میسلیوم های برداشت شده خرد و سانتریفوژ شدند . آنگاه میزان پروتئین عصاره خام بر اساس روش برادفورد به مقدار ۰/۱ ± ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر و در محیط S و CDA و به میزان ۰/۱ ± ۱/۱ 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 ۳۵۰-۰ میلی مول NACL ستفاده شد که در طی ۳ ساعت خروجیهای ستون جمع آوری شده و جذب نوری آنها خوانده شد. خروجی ستون در



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

غلظت ۲۳۰-۲۰۰ میلی مول NACL دارای باند پروتئینی در محدوده ۹۰ کیلو دالتون بود. این خروجیهای ستون آنیوتیک پروتئینی در حد ۱/۳ ± ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر داشتند در حالی که لوله های فاقد کاتالاز، پروتئینی در حد ۰/۲ ± ۰/۱ 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 محدود غلظت نمک ۲۳۰-۲۲۰ میلی مول NACL بافر استات مشاهده شد پس از انجام الکتروفورز SDS - PAGE با ژل ۱۰- ۷/۵ درصد آکریل آمید از این سری از خروجیهای ستون، باند ۹۰ کیلودالتونی مشاهده شد که در تصویر ۱ با یکدیگر مقایسه شدند.

بحث

بیشترین موارد آسپرژیلوز در انسان اتفاق می افتد، امروزه دومین بیماری کشنده قارچی آسپرژیلوز 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 میسلیوم) 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 وبا 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 ۳۷و ۴۰و 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 میسلیومی 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.

جدول ۱- میزان وزن خشک بر حسب میلیگرم از میسلیوم های رشد یافته در دو دمای ۳۷-۲۸ 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

قارچها نیز مانند سایر ارگانیسم 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 منبع 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 که می توان مراحل مختلف رشد را تخمین زد. به طور مثال در بسیاری از قارچها زمانی که مراحل اولیه رشد را می گذارنند، 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 منبع 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 وYED نسبت به محیط های سابروبراث و چاپکس در زمان کوتاهتری مشاهده شد (نمودار ۱). محیط سابروبراث 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 *آسپرژیلوس فومیگاتوس* می باشد. از میسلیوم های فاز فعال رشد جهت عصاره گیری و جستجوی آنزیم کاتالاز استفاده شد. میزان وزن خشک برای هر محیط در دو دمای ۳۷و 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 تاثیری 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.

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 کیلوالتونی 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 (۱،۱۱،۱۴).

محیط YED نیز با مقادیر بسیار کم کربن و روی موجب می شود سنتز آنتی ژنهای مختلف آسپرژیلوس بویژه آنتی ژن آلرژن AspfII محدود گردد. از میسلیوم های رشد یافته در این محیط نیز باند قوی کاتالاز مشاهده نشد.

میسلیوم های قارچی رشد یافته در محیط سابرو 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 *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در دمای ۳۷ درجه سانتگیراد 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 *آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوزی بویژه در آسپرژیلوز مهاجم و آسپرژیلوما (۹۰/۳ 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, Newjersy, USA. PP: 39-47
2. Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamiltion, A. Debeaupuis, J., Diaquin, M., Leal, F. and latge, J.P. (1997): Coloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. Infect and Immun. Nov:4718-1724.

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 dectection 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 virulecnce. 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 allogenic stemcell transplant recipients. Blood, Dec, 100: 4358-4366.
11. Latge. J.P., Debeaupuis, J., Sarfati, J. and Paris, S. (1993): Cell wall antigens in *Aspetrgillus 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., Ovegero, 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 epidiemology 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 staning, method of diferentianing between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamid electrophoresis gels. Anal. Biochem. 157: 89-92.