

بیان، خالص‌سازی و بررسی فعالیت آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحي SAP_2 کاندیدا آلیکنس در سیستم مخمری پیکیا پاستوریس

الهه محمودی^۱، حمیدرضا کلهر^۲، محمدحسین یادگاری^{۳*}، مجید صادقی‌زاده^۴، زهیرمحمد حسن^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- استاد، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۹/۰۳

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۱۰

چکیده

هدف: آنزیم آسپارتیل پروتئیناز ترشحي (SAP_2) کاندیدا آلیکنس نقش محوری در اتصال، تهاجم و بیماری‌زایی این مخمر فرصت‌طلب دارد. هدف از این مطالعه کلون نمودن، بیان و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم SAP_2 است. همچنین در این تحقیق برای اولین بار، از سیستم یوکاریوتی پیکیا پاستوریس برای بیان پروتئین نو ترکیب SAP_2 استفاده شد.

مواد و روش‌ها: ژن Sap_2 کاندیدا آلیکنس با انتهای چسبان *EcoRI* و *SacII* توسط PCR تکثیر و درون ناقل T/A سب‌کلون شد. با استفاده از آغازگرهای عمومی توالی این ژن تعیین شد و سپس درون ناقل بیانی pGAPZαA قرار گرفت. سازه نو ترکیب به درون مخمر پیکیا پاستوریس انتقال داده شد. ژن Sap_2 طی پدیده نو ترکیبی همولوگ درون ژنوم مخمری پیکیا پاستوریس داخل شد. پروتئین بیان شده به کمک روش وسترن بلاتینگ و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه پروتئین SAP_2 تأیید شد. در نهایت پروتئین به‌دست آمده با کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تخلیص و فعال بودن آنزیم تأیید شد.

نتایج: در این تحقیق تکثیر ژن Sap_2 کاندیدا آلیکنس و وارد نمودن آن درون ژنوم مخمر بیانی پیکیا پاستوریس با روش نو ترکیبی همولوگ انجام شد. علاوه بر این، کلونی از مخمر را به‌دست آمد که پروتئین نو ترکیب SAP_2 را به محیط ترشح می‌کرد. بالاترین بیان پس از طی زمان ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: القای ژن Sap_2 در مخمر پیکیا پاستوریس منجر به افزایش قدرت بیان انبوه این ژن نسبت به سیستم بیانی باکتریایی می‌شود. همچنین نیاز به تغییرات بعد از ترجمه و فعال نمودن آنزیم، به علت استفاده از سیستم بیانی یوکاریوتی، از بین می‌رود. برطبق یافته‌های تحقیق حاضر، آسپارتیل اسید پروتئیناز تخلیص شده در این تحقیق خود فعال بوده و قادر به تجزیه BSA به‌عنوان یک سوبسترا است. این پروتئین نو ترکیب در pH اسیدی بیشترین فعالیت را دارد.

کلیدواژگان: کاندیدا آلیکنس، کلونینگ Sap_2 ، پیکیا پاستوریس

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ‌شناسی پزشکی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

۱- مقدمه

کاندیدا آلبیکنس (*Candida albican*) یکی از مهم‌ترین مخمرهای بیماری‌زای انسان است. این مخمر فرصت‌طلب دو شکلی (Dimorphism) (هیف، مخمر) اغلب به صورت فلور طبیعی در سطوح مخاطی وجود دارد اما می‌تواند به یک عامل تهدیدکننده زندگی در افرادی با پاسخ ایمنی کاهش‌یافته ناشی از سرطان، درمان طی پیوند اعضا، افراد HIV⁺ (Human Immunodeficiency Virus) و افرادی با بیماری‌های زمینه‌ای تبدیل شده و ایجاد کاندیدایزیس سیستمیک (Systemic Candidiasis) نماید [۱]. چندین فاکتور مستعدکننده مانند قدرت چسبندگی، دو شکلی، تغییرات شکل ظاهری (Phenotype switching)، سرکوب سیستم ایمنی و تولید فسفولیپازها و آسپارتیل پروتئینازها (Aspartic Proteinases)، برای بیماری‌زایی کاندیدا مطرح شده است [۲]. از بین فاکتورهای مؤثر در بیماری‌زایی این مخمر، وجود آنزیم‌های آسپارتیل پروتئینازهای ترشخی (Secreted Aspartic Proteinase: SAP) به‌عنوان فاکتور بیماری‌زایی بالقوه، مطرح است. وجود SAPها و تهاجم گونه‌های کاندیدا با آزمون‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی و ایمنوشیمی ثابت شده است [۳].

شش ژن نسبتاً همسان *Sap*₁₋₆ برای ترشح پروتئیناز در کاندیدا آلبیکنس وجود دارد. کاندیدا آلبیکنس در حالت مخمری در ابتدا یک مجموعه از ژن‌ها شامل *Sap*₁₋₃ را بیان می‌کند که بیشتر در عفونت‌های مخاطی بیان می‌شوند. در عوض در شکل هیف ابتدایی، دیگر اعضای این ژن‌ها شامل *Sap*₄₋₆ بیان می‌شوند که مؤثر در ایجاد عفونت‌های سیستمیک هستند. نقش آنزیم SAP₁ در ایجاد حفره در سطوح مخاطی بدن و توانایی آنزیم‌های SAP₁₋₃ در چسبندگی به سلول‌های پوششی ثابت شده است و SAP_{5,6,9} در تولید بیوفلم (Biofilm) مؤثر است [۴، ۵]. سویه‌های کاندیدا آلبیکنس با ژن‌های حذف شده *Sap*₁ و *Sap*₃ صدمات بافتی کمتری در ساختار اپیتلیوم انسان (Reconstituted Human Epithelium: RHE) دارد. همچنین

این سویه‌های جهش‌یافته، چسبندگی کمتر به سلول‌های پوششی دهانی و بیماری‌زایی کمتر در مدل واژینیت موش نشان دادند. سویه‌های این مخمر که ژن *Sap*₂ آن‌ها حذف شده بود، تقریباً هیچ نشانه‌ای از بیماری‌زایی در مدل واژینیت تجربی در موش نداشت. به‌علاوه تجزیه بافت‌های موش آلوده شده، نشان داد که حذف ژن *Sap*₂ در مخمر کاندیدا آلبیکنس توانایی چسبندگی مخمر به سطوح سلولی و ایجاد کلونیزاسیون (Colonization) را به شدت کاهش داده است [۶]. در آزمون ایمنوفلورسنت (Immunofluorescent) با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، وجود پروتئین‌های SAP به‌عنوان آنتی‌ژن در سطح دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس طی نفوذ به بافت در کاندیدایزیس سیستمیک و عدم توانایی ماکروفاژها در فاگوسیتوز سلول‌های کاندیدا ثابت شده است [۷].

تحقیق روی SAP₇ نشان داده که این SAP تنها طی عفونت داخل رگی کاندیدایزیس تولید می‌شود و نقشی در عفونت واژنی در موش‌های مورد مطالعه ندارد. گروه‌های آزمایش مانند جهش‌یافته‌های فاقد *Sap*₇ (*Sap*_{7Δ}) هیچ نقشی در ایجاد عفونت مخاطی نداشت [۸].

کاندیدا آلبیکنس ۸ کروموزوم دیپلوئید دارد که از بزرگ‌ترین به کوچک‌ترین کروموزوم به‌صورت ۱ تا ۷ شماره‌گذاری می‌شود و همچنین دارای یک کروموزوم با اندازه بسیار متغیر است که از سایرین بزرگ‌تر بوده و با R نشان داده می‌شود. این کروموزوم دارای دو قسمت اتصال اضافی متغیر است که برای RNA ریبوزومی (rRNA) کد می‌شود. بررسی ترادف ژن *Sap* وجود خانواده این ژن‌ها را روی کروموزوم R کاندیدا آلبیکنس نشان می‌دهد [۹]. در گونه بسیار شایع کاندیدا آلبیکنس وجود ۱۰ ژن *Sap* از *Sap*₁₋₁₀ گزارش شده است. ترادف‌های آمینواسیدی SAPهای کاندیدا آلبیکنس نشان داده که درصد شباهت بین SAP₁، SAP₂ و SAP₃ در حدود ۶۸ درصد و بین مابقی اعضا ۲۵ درصد است [۱۰]. بیان ژن‌های *Sap* طی چرخه زندگی کاندیدا آلبیکنس بسته به شکل یا فنوتایپ آن متفاوت بوده و به‌صورت افتراقی تنظیم و بیان

PAS (Providian Acid Shift) نشان داده شد که سوش غیرواژینوپاتیک N کمتر از سوش‌های بیماری‌زای بالقوه H12 و ATCC10261 و سوش نسبی P به سلول‌های پوششی واژن متصل می‌شود. همچنین قدرت تحریک تولید سلکتین E (یکی از اعضای خانواده مولکول‌های چسبان در روند التهاب) در آن‌ها بالاتر است. نتایج این تحقیق یک رابطه آشکار بین توانایی سوش‌های عفونت‌زا با ترشح SAP را ثابت کرد [۱۴]. یکی از اختصاصات اصلی آنزیم‌های SAP کاندیدا آلیکنس که باعث تمایز آن از اسپاروتیل پروتئینازهای سلول‌های پستانداران می‌شود، داشتن ترادف‌های ترجیحی (Residue preference) در دو جایگاه اختصاصی P₁ و P₁' است که وجود این دو ناحیه باعث تشخیص محل برش در سوبسترا و اختصاصی شدن آن می‌شود. برای مثال با توجه به این‌که SAP₁، SAP₂، SAP₃ و SAP₆ باندهای پپتیدی بین آمینواسیدهای آب‌گریز بزرگ‌تر را می‌شکند، اما دو ناحیه P₁ و P₁' اختصاصی هر آنزیم است به طوری که SAP_{1,2,6} فنیل آلانین و SAP₃ لوسین را در محل P₁ ترجیح می‌دهد. بر پایه این گزارش‌ها احتمالاً نقش اصلی این پروتئینازها در کاندیدا آلیکنس فراهم آوردن تغذیه برای سلول است [۱۵]. آنزیم اسپاروتیل پروتئیناز اسیدی SAP₂ یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی مخمر بیماری‌زای کاندیدا آلیکنس است. استخراج و خالص‌سازی این آنزیم از محیط کشت کاندیدا در مقادیر پایین و به صورت خالص، به منظور مطالعه عملکرد و فعالیت آنزیم، امکان‌پذیر نیست. علاوه بر این، تحقیق روی سویه‌های کاندیدا آلیکنس بیماری‌زا در ایران در مبحث آنزیم‌های SAP و تولید ناقل‌های نوترکیب از این آنزیم‌ها انجام نشده است؛ به همین دلیل محققان حاضر بر آن شدند تا با بیان مهم‌ترین آنزیم خانواده SAP‌ها از نظر بیماری‌زایی (آنزیم SAP₂) در یک ناقل مناسب و تخلیص پروتئین نوترکیب به یک منبع دائمی تولید آنزیم فوق دست یابند تا در مطالعات بعدی بتوان از آن برای تهیه واکسن، کیت‌های تشخیصی، تولید دارو علیه این مخمر و سایر مطالعات در ایران، استفاده نمود. همچنین در این مطالعه برای اولین بار از سیستم

می‌شود [۱۱]. برای مثال تولید بیشتر آنزیم SAP₄ طی شکل بیماری‌زایی هیف بیان می‌شود؛ در حالی‌که SAP₂ در حضور BSA (Bovine Serum Albumin) به‌عنوان منبع نیتروژن و از کلونی‌های سفید به‌دست می‌آید. آنالیز نورترن بلا‌تینگ (Northern blotting) از خانواده SAP‌های کاندیدا نشان داد که SAP₁ و SAP₃ طی تغییرات شکل ظاهری کلون‌های مات (Opaque) به سفید در سویه WHO-1 تولید می‌شود در حالی‌که SAP₂ طی جوانه زدن و تشکیل هیف در این مخمر و در محیط حاوی پروتئین به‌عنوان منبع نیتروژن تولید می‌شود [۱۲]. این پدیده می‌تواند نشان‌دهنده این مسئله باشد که کاندیدا آلیکنس نیازمند پروتئینازهای خاص در هر مرحله از رشد و ایجاد بیماری بوده و همچنین هر آنزیم ویژگی‌های خاص خود را دارد که با بقیه متفاوت است [۱۳]. در یک مطالعه ۴ سوش از کاندیدا آلیکنس سوش‌های H12 و ATCC10261 با قدرت بیماری‌زایی بالا و دو سوش مقاوم به کلوتریمازول (Clotrimazole) N و P به‌منظور بررسی توانایی ایجاد عفونت واژنی در مدل موش بزرگ آزمایشگاهی (رت) بررسی شد. نتایج نشان داد توانایی اتصال کاندیدا به پوشش واژن و ایجاد کاندیدیازیس واژنی در واژینیت رت به بیان دو ژن اسپاروتیل پروتئیناز Sap₁ و Sap₂ مربوط است. آنالیز ساترن بلا‌تینگ (Southern blotting) به روش نقطه‌ای (Dot blot) و نورترن بلا‌ت (Northern blotting) از دورگه‌سازی RNA (Hybridization) استخراج شده از مایع واژنی موش‌های آلوده شده از هر سوش با پروب‌های (Probes) اختصاصی نشان داد که در سوش‌های با قدرت بیماری‌زایی بالا، هر دو ژن طی هفته اول عفونت بیان می‌شود. در مقابل هیچ ژنی طی عفونی کردن رت‌ها به‌وسیله سویه‌های غیربیماری‌زای N بیان نشد. سوش نسبتاً بیماری‌زای P هر دو ژن Sap₁ و Sap₂ را بیان می‌کرد؛ اما سطح mRNA هر دو ژن پایین بود. همچنین سطح mRNA ژن Sap₁ زودتر از سطح mRNA ژن Sap₂ کاهش می‌یابد. در مورد چسبندگی و اتصال در هیستوپاتولوژی بافت‌های عفونی شده با رنگ‌آمیزی بافتی

یوکاریوتی پیکیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) به منظور کلون و بیان آنزیم SAP_2 استفاده شد.

تهیه شد. آنتی-بادی مونوکلونال SAP_2 (Monoclonal) برای انجام وسترن بلائینگ از شرکت Takara ژاپن تهیه شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- پلاسمیدها و مواد واکنش

همه پلاسمیدها بعد از انتقال (Transfer) به روش استاندارد، تکثیر و خالص شدند [۱۶]. برای رشد مخمر پیکیا نوترکیب از محیط کشت (Yeast extract-Peptone- YPD) (Dextrose)، حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ژئوسین (Zeocin) (خریداری شده از Invitrogen) استفاده شد. DNA ژنومی کاندیدا آلیکنس با روش فنل- کلروفرم [۱۷] استخراج شد. آنزیم‌های آندونوکلاز *EcoR1* و *SacII* (تهیه شده از شرکت Takara) هریک با غلظت ۱۵ واحد در میکرولیتر، *BspHI* (Fermentas) ۲۵ واحد در میکرولیتر و DNA لیگاز T_4 (Fermentas) با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر

۲-۲- تکثیر PCR از ژن Sap_2

ژنوم کاندیدا آلیکنس به‌عنوان الگو برای تکثیر ژن Sap_2 استفاده شد. با استفاده از آغازگرهایی (Primers) که حاوی ترادف‌های برش‌گر *EcoR1* و *SacII* است، کپی‌برداری از ژن Sap_2 کاندیدا آلیکنس با طول ۱۲۰۰ جفت‌باز انجام شد (جدول ۱). در طراحی آغازگرها برای اطمینان از عدم وجود توالی‌های تکراری یا مکمل نرم‌افزار Gene Runner استفاده شد. آغازگرها توسط شرکت Bioneer با درجه خلوص HPSF (High Purified Salt Free) به‌صورت لیوفیلیزه (Lyophilized) ساخته شدند. شماره دستیابی ژن مورد مطالعه (National Center Biotechnology Information) NCBI در ID3647354 است.

جدول ۱ توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن Sap_2

جایگاه محدودکننده	دما	توالی	_____
<i>EcoR1</i>	۵۵	5'-CACGAATTCCTCAACAACAACCAAAA-3'	جلویی
<i>SacII</i>	۵۴	5'-CATCCGCGGAGGTCAAGGTCAAGGCAGAAATACA-3'	برگشتی

داده شد. غلظت DNA الگو ۱ میکروگرم و غلظت Mg^{2+} ۳ میکرومولار بود.

نواحی خط کشیده شده جایگاه شناسایی آنزیم *EcoR1* در آغازگر جلویی (Forward) و *SacII* در آغازگر برگشتی (Reverse) است.

۲-۳- کلون Sap_2 درون پلاسمید T/A

به دلیل بروز مشکلات متعدد در فرایند کلونینگ به روش نوترکیبی همولوگ، تصمیم گرفته شد که کلونینگ ابتدا در ناقل T/A انجام شود. به این منظور قطعات ژنی ابتدا به کمک PCR و با زمان ۲۰ دقیقه در مرحله طویل‌سازی نهایی تکثیر شد. محصول PCR در غلظت ۱۰/۸ نانوگرم در میکرولیتر پس از تخلیص به‌وسیله DNA لیگاز T_4 (Fermentas)، لیتوانی به

برنامه PCR به‌صورت زیر استفاده شد: واسرشت‌سازی اولیه (Initial Denaturation) به‌مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه، واسرشت‌سازی ثانویه به‌مدت ۳۰ ثانیه هرکدام در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال (Annealing) آغازگر، ۴۵ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای طویل‌سازی (Extension) ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲ دقیقه و طویل‌سازی نهایی برای ۱۰ دقیقه انجام شد. تعداد ۳۳ چرخه به دستگاه

باکتری‌های ترانسفورم شده قادر به رشد در محیط LB حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ژنوسین بود. پس از استخراج از درون باکتری به‌منظور ترانسفورم در مخمر پیکیا پاستوریس، Sap₂+pGAPZαA با آنزیم اختصاصی *BspH1* (Fermentas) (۲۵ واحد در هر میکرولیتر) خطی شد. این آنزیم ناقل فوق را در محل پروموتور آن که برای انجام نوترکیبی همولوگ ضروری است، برش می‌دهد. برای حساس‌سازی مخمر پیکیا پاستوریس، سویه مخمری درون محیط YPD به‌مدت یک شبانه روز کشت داده شد و سپس وکتور نوترکیب به روش Litium acetate/ssDNA/PEG به داخل مخمر حساس شده انتقال داده شد [۱۸]. مخمرهای ترانسفورم شده روی پلیت‌های YPD حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۲۰ گرم پپتون (Peptone) و ۲۰ گرم گلوکز در یک لیتر از محیط به همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ژنوسین در ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ روز کشت داده شد و کلونی‌ها تشکیل شد.

۲-۵- تأیید انجام نوترکیبی همولوگ

برای تأیید ادغام ژن Sap₂ به درون ژنوم پیکیا پاستوریس، DNA کروموزمی پیکیا پاستوریس به روش DNA fast استخراج [۱۶] و با استفاده از آغازگرهای AOX1 و pGAP که مکمل با مناطق همولوگ با ژنوم پیکیا می‌باشد، PCR انجام و باند ۱۸۰۰ جفت‌بازی مورد انتظار به‌دست آمد. کلون‌هایی از مخمر با ترانسفورم ناموفق که ژن Sap₂ موفق به ادغام درون آن‌ها نشده بود، باند ۶۰۰ جفت‌بازی داشتند.

5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3' pGAP: جلویی

5'-GCAAATGGCATTCTGCATCC-3' AOX1: برگشتی

ترادف pGAP (پروموتور گالاکتوز) هم روی ناقل pGAPZαA و هم روی ژنوم مخمر پیکیا پاستوریس موجود است و محل انجام نوترکیبی همولوگ بین ناقل نوترکیب pGAPZαA به‌همراه ژن وارد شده Sap₂ است. ترادف AOX1 روی ناقل قرار دارد. بین دو ناحیه ذکر شده محل

ناقل کلونینگ pTZ57R/T (Fermentas)، لیتوانی متصل و پلاسمید T/A-Sap₂ بود. پلاسمید حاصل درون باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط LB آگار (Luria Bertani agar) حاوی آمپی‌سیلین (Ampicillin) رشد کرد. ناقل نوترکیب پس از استخراج، تعیین توالی (Sequencing) شد. توالی صحیح ژن Sap₂ توسط تعیین ترادف هر دو رشته (Double-strand sequencing) و با آغازگرهای عمومی (Universal) تأیید شد. هضم آنزیمی با همان آنزیم‌های Colony-PCR، *SacII* و *EcoR1* و تعیین توالی همگی تأیید بر اثبات ژن Sap₂ بود.

۲-۴- تراریختی (Transgenic) درون مخمر

پیکیا پاستوریس

ناقل استفاده شده در این تحقیق pGAPZαA (Invitrogen) است. این ناقل دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ژنوسین است. این ناقل دارای دم پلی‌هیستیدین و اپی‌توپ C-myc بوده که به‌ترتیب برای تخلیص و تأیید وجود پروتئین ترشحی نوترکیب استفاده می‌شود. به‌منظور ساب‌کلونینگ قطعه ژنی مورد نظر از ناقل T/A به داخل ناقل بیانی pGAPZαA و با توجه به وجود کدون آغاز در آغازگر فرادست، دو آنزیم برشی محدودالثر در دو طرف منطقه ورود ژن در ناقل T/A انتخاب شد. بدین منظور سازه نوترکیب T/A-Sap₂ و نیز ناقل بیانی pGAPZαA به کمک آنزیم‌های محدودالثر *EcoR1* و *SacII* (Takara) (۱۵ واحد در هر میکرولیتر) بریده شد. سپس واکنش الحاق با نسبت ۵ به ۱ از غلظت ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر از pGAPZαA و محصول PCR برابر ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T₄ (Fermentas) در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از آن محصول واکنش اتصال به سلول‌های باکتریایی مستعد اشرشیاکلی سویه XL1-Blue وارد شد. ناقل نوترکیب Sap₂+pGAPZαA درون باکتری تکثیر شد.

عصاره مخمر، ۲۰ گرم پپتون و ۲۰ گرم گلوکز در یک لیتر به مدت ۴ شبانه روز در ۳۰ درجه سانتی گراد تحت شرایط هوازی کشت داده شد. بعد از رسوب مخمرها، ۵۰ میلی لیتر محیط کشت به وسیله فیلترهای آمیکون (Amicon filter) با سطح حداقل (Cut off) 10000 mw (Molecular weight) به ۱۰ میلی لیتر تغلیظ شد. به وسیله NaOH ۶ مولار pH محیط کشت از $pH=3$ به $pH=7$ رسانده شد. بعد از دیالیز برای ۱۲ ساعت با بافر سدیم سیترات ۱۰ میلی مولار و $pH=8/6$ ماده تغلیظ شده به ستون (Agarose Nickel His- Ni-NTA) (select) منتقل شد. در ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (Ni-NTA) (Qiagen، آلمان) پروتئین های حاوی His-tag با تمایل بالا به آن متصل می شود. ستون در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در حالت به هم زدن به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شد تا اتصال پروتئین مورد نظر با یون های نیکل صورت گیرد. در این فرایند باند پروتئینی مورد نظر، به وسیله ایمیدازول (Imidazole) (با غلظت ۲۵۰-۴۰۰ میلی مولار) از ستون خارج شد. در پایان فرایند تخلیص محصول به کمک SDS-PAGE ۱۲ درصد و وسترن بلاتینگ تأیید و مقدار محصول به دست آمده با روش برادفورد (Bradford) سنجیده شد.

۲-۸- بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم SAP₂

آنزیم SAP₂ یک پروتئیناز بوده و دارای سوبستراهای متعددی از قبیل کازئین (Casein) و BSA است. در این تحقیق برای بررسی فعال بودن آنزیم تولیدی از سوبسترای BSA استفاده شد. محلول ۲۷۰ میکرولیتر از BSA ۱ درصد (وزنی/حجمی: W/V) در بافر KCl ۵۰ میلی مولار با $pH=5/3$ تهیه و به آن ۲۲۵ میکرولیتر (۳۰ میکروگرم) از محلول حاوی آنزیم تخلیص شده اضافه شد. نمونه کنترل منفی، سوبسترای BSA بدون آنزیم فوق است. بعد از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد، برای ۱ ساعت فعالیت آنزیمی با افزودن ۷۰۰ میکرولیتر TCA (Trichloro Acetic acid) ۱۰ درصد (وزنی/حجمی) متوقف و پروتئین های هضم نشده با سانتریفوژ

ورود ژن SAP₂ است. آغازگرهای طراحی شده فوق درست در ناحیه قبل و بعد از ژن الحاقی روی ژنوم مخمر قرار داشته و بنابراین در صورت انجام صحیح نوترکیبی همولوگ، محصول PCR باید شامل ترادف ژن وارد شده درون مخمر (SAP₂) و ترادف های مربوط به دو ناحیه AOX1 و pGAP باشد. واکنش PCR به تعداد ۳۰ چرخه در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکروگرم از DNA ژنومی مخمر و غلظت Mg^{2+} ۱/۷۵ میکرومولار انجام شد.

۲-۶- تأیید بیان پروتئین نوترکیب

بیان در مخمر پیکیا پاستوریس به وسیله SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) و وسترن بلاتینگ (Western Blotting) تأیید شد. ۶۰ میکرولیتر از محلول رویی محیط کشت حاوی اسید پروتئیناز کاندیدا آلبیکنس به وسیله SDS-PAGE جدا و پروتئین ها از روی ژل به غشای نیتروسولوزی ۰/۴۵ میکرومتر با استفاده از سیستم SDS-PAGE Minitrans blot (Sigma) منتقل شد. سپس غشاها با محلول شستشو [بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی کلرید سدیم، کلرید پتاسیم و فسفات دی سدیک به همراه توئین ۲۰ (Tween 20)] شسته و درون محلول بلوکه کننده (بافر PBS به همراه سرم آلبومین گاوی) برای ۱ ساعت انکوبه شد. غشاها بریده و با آنتی بادی مونوکلونال Anti-Sap₂p موش برای یک ساعت در درجه حرارت اتاق و برای یک شب در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از شستشو با Anti-IgG کوئزوگه شده با پراکسیداز انکوبه شد. بعد از آن با H₂O₂ و دی آمینو بنزن (Diaminobenzidine: DAB) انکوبه شد تا باندها مشاهده شود.

۲-۷- تخلیص پروتئین SAP₂ نوترکیب با

ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل

یک کلون از مخمر نوترکیب پیکیا پاستوریس ترشح کننده آنزیم SAP₂ در ۵۰ میلی لیتر محیط YPD حاوی ۱۰ گرم

۲-۳- نتایج کلونینگ و ساب کلونینگ

کلونینگ ابتدا در ناقل T/A انجام شد. محصول درج ژن در ناقل T/A را، به داخل باکتری اشرشیاکلی سویه blue XL1 ترانسفورم شد که در تمام کلونی‌هایی که توسط Colony-PCR کنترل شد، قطعه مورد نظر وجود داشت. برای تأیید بیشتر از یکی از کلونی‌ها، پلاسمید استخراج شد. پلاسمید نوترکیب با دو آنزیم *EcoR1* و *SacII* که برای کلونینگ استفاده شده بود، هضم شد. خروج قطعه با طول حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز نشان‌دهنده کلون شدن قطعه در ناقل است. سپس محصول هضم با *EcoR1* و *SacII* بعد از تخلیص از ژل به داخل pGAPZαA که با *EcoR1* و *SacII* هضم شده بود، کلون شد. تعیین توالی، سازه نوترکیب را تأیید کرد.

پس از ترانسفورم ناقل درون مخمر، تنها کلونی‌های مخمیری مقاوم به زئوسین روی محیط YPD رشد نمود. استخراج DNA ژنومی مخمر و انجام PCR با آغازگرهای AOX1 از روی DNA ژنومی پس از فرارگیری درون پلاسمید درون آن نشان‌دهنده بانده ۱۸۰۰ جفت‌بازی حاصل از نوترکیبی همولوگ است. کلونی‌هایی از مخمر با ترانسفورم ناموفق که ژن *Sap2* داخل آن نشده، بانده ۶۰۰ جفت‌بازی داشتند (شکل ۲).



شکل ۲ PCR از روی DNA ژنومی مخمر با استفاده از آغازگرهای AOX1؛ DNA (M) نشانگر اندازه ۱۰۰-۱۰۰۰۰ جفت‌بازی (۵ میکروگرم در میکرولیتر)، بانده ۶۰۰ جفت‌بازی مربوط به کنترل منفی (ژنوم مخمر بدون ژن داخل شده)، بانده ۱۸۰۰ جفت‌بازی مربوط به ژنوم مخمر همراه با ترانسفورم موفق (ژن داخل شده)، مشاهده بانده ۱۸۰۰ جفت‌بازی تأیید ترانسفورم ژن *Sap2* درون ژنوم مخمر پیکبا پاستوریس است (۱۲۰۰ جفت‌باز مربوط به ژن *Sap2* و ۶۰۰ جفت‌باز مربوط به نواحی همولوگ روی ژنوم مخمر)

در ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه رسوب داده شد. آنزیم *Sap2* باعث تجزیه پروتئین BSA می‌شود. پروتئولیز با کمک افزایش جذب محلول رویی (Supernatant) در OD (Optical Density) ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد (Unit) فعالیت آنزیم *Sap2* به این صورت تعریف می‌شود: مقداری از آنزیم که نیاز است تا OD نمونه را ۰/۱ برای ۱ ساعت افزایش دهد [۱۹].

۳- نتایج

۱-۳- نتایج PCR

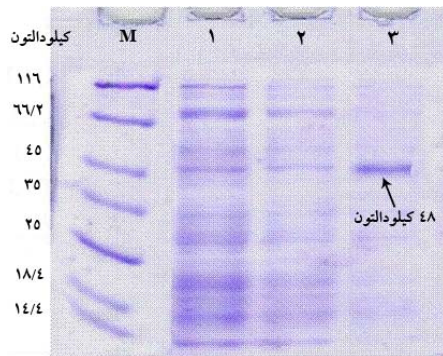
محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و بانده اختصاصی حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز مشاهده شد (شکل ۱). قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با توالی ژن در NCBI هم‌خوانی دارد. محصول PCR مربوط به سویه ایزوله شده پس از تکثیر و مشاهده روی ژل آگارز، با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل، تخلیص شده و برای تعیین توالی به شرکت microgen کره جنوبی ارسال شد.



شکل ۱ محصول PCR ژن *Sap2* بر روی ژل آگارز ۱ درصد؛ DNA (M) نشانگر اندازه ۱۰۰-۱۰۰۰۰ جفت‌بازی (۵ میکروگرم در میکرولیتر)، بانده مربوط به ژن *Sap2* با اندازه ۱۲۰۰ جفت‌باز

نتیجه تعیین توالی دو طرفه ژن کلون شده، هیچ‌گونه جهشی را در جایگاه فعالیت (Active site) و اتصال (Binding site) و بقیه قسمت‌های ژن نشان نداد.

فیلترهای آمیکون به ۱۰ میلی لیتر تغلیظ یافت و در نهایت پروتئین نوترکیب SAP₂ توسط ستون تخلیص جدا شد. تعیین مقدار پروتئین، با آزمون برادفورد توسط اسپکتروفتومتر در OD ۲۸۰ نانومتر نشان داد که غلظت پروتئین به دست آمده برابر با ۷۵±۰/۱ میلی گرم در یک لیتر است (شکل ۴).



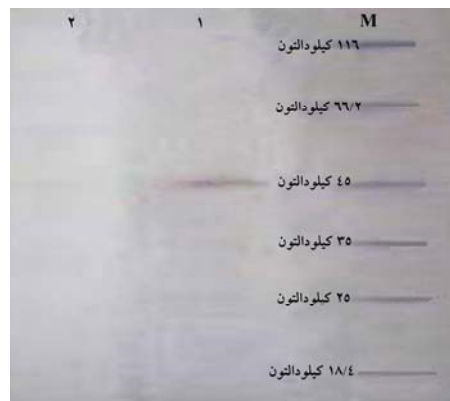
شکل ۴ تخلیص پروتئین Sap₂ روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد، رنگ آمیزی شده با کوماسی بریلیانت بلو؛ (M) نشانگر پروتئینی ۱۴/۴، ۱۸/۴، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۶۶/۲ و ۱۱۶ کیلو دالتون، (۱) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۵۰ میلی مولار، (۲) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۱۰۰ میلی مولار، (۳) خروجی ستون تخلیص با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار

۳-۵- اندازه گیری فعالیت آنزیم SAP₂ نوترکیب

برای اطمینان از فعال بودن آنزیم و مشخص کردن این که آنزیم تخلیص شده ساختار خود را طی تخلیص از دست نداده است، فعالیت آنزیم در لوله آزمایش اندازه گیری شد. مقدار تجزیه شدن سوبسترای BSA توسط SAP₂ با اسپکتروفتومتر در OD ۲۸۰ نانومتر بررسی شد. در لوله آزمایش که حاوی سوبسترا و آنزیم SAP₂ است، این آنزیم باعث تجزیه پروتئین های BSA شد و پپتیدهای کوچک حاصل شد. در لوله کنترل، تنها سوبسترای BSA بوده و آنزیم وجود ندارد. بنابراین با افزودن TCA به نمونه ها، سوبسترا و آنزیم رسوب و تنها پپتیدهای کوچک حاصل از پروتئولیز با اسپکتروفتومتر قابل بررسی هستند. بر مبنای آن که یک واحد فعالیت آنزیم SAP مقداری از آنزیم که نیاز است تا OD نمونه را به میزان

۳-۳- بیان ژن Sap₂

برای تأیید محصول پروتئینی SAP₂ از روش وسترن بلاتینگ توسط آنتی بادی مونوکلونال بر ضد SAP₂ استفاده شد. در این آزمایش چون برای ظهور باندها از آنتی بادی مونوکلونال ضد SAP (Takara) متصل شده به یک آنزیم استفاده شد، میان کنش اختصاصی آنتی بادی، حضور پروتئین مورد نظر را تأیید کرد (شکل ۳).



شکل ۳ وسترن بلاتینگ با آنتی بادی مونوکلونال علیه Sap₂ (M) نشانگر پروتئینی ۱۴/۴، ۱۸/۴، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۶۶/۲ و ۱۱۶ کیلو دالتون (Fermentase#RD 0431). (۱) عصاره محیطی پیکیا پاستوریس حاوی سازه که باند ۴۸ کیلو دالتون دارد. (۲) عصاره محیطی پیکیا بدون سازه (کنترل منفی)

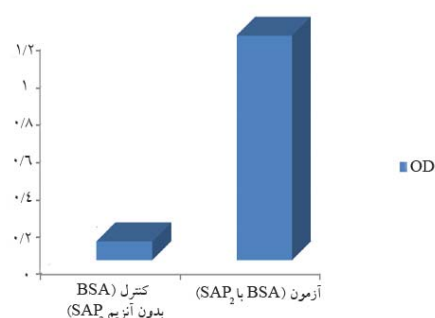
۳-۴- تخلیص پروتئین SAP₂

پس از اطمینان از وارد شدن پلاسمید داخل ژنوم مخمر و مشاهده باند پروتئینی روی SDS-PAGE، کلونی که حاوی ژن Sap₂ در ژنوم آن بود رشد داده شد و پروتئین SAP₂ تخلیص شد. به انتهای کربوکسیل پروتئین SAP₂، ۶ اسید آمینه هیستیدین اضافه شده که برای تخلیص به روش IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) (با استفاده از ستون Ni-NTA) استفاده شد. مقدار ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت YPD با یک کلون از مخمر نوترکیب پیکیای ترشح کننده آنزیم SAP₂ به مدت ۴ شبانه روز کشت داده شد. بعد از رسوب مخمرها، ۵۰ میلی لیتر محیط کشت توسط

کاندیدای آلیکنس نیازمند آنزیم‌های SAP در ایجاد کانیدیازیس است. وجود این آنزیم‌ها با مراحل مختلف نفوذ به بافت میزبان و در نتیجه بیماری‌زایی ثابت شده است. بنابراین این آنزیم‌ها می‌توانند هدف خوبی برای توسعه دارو علیه این مخمر باشند [۲۰]. در این مطالعه برای اولین بار کلونینگ، بیان و تخلیص ژن کدکننده SAP₂ کانیدای آلیکنس در سیستم یوکاریوتی پیکیا پاستوریس انجام گرفت. این بررسی به‌منظور فراهم آوردن زمینه مطالعات آنزیمی، مهندسی پروتئین و ایمونولوژیکی از مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی کانیدای آلیکنس (SAP₂) انجام شد. با وجود مزیت‌های زیاد سیستم بیانی اشرشیاکلی، اما به دلیل عدم توانایی در انجام اصلاحات پس از نسخه‌برداری نظیر حذف ایترون‌ها و تغییرات پس از ترجمه این سیستم برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی مثل پروتئین SAP₂ مناسب نیست. از طرفی بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول پستانداران نیز بسیار پرهزینه بوده و نیازمند تجهیزات کشت سلولی است.

بیان نمودن در مخمر متیلوتروف (Methylotroph) پیکیا پاستوریس علاوه بر دارا بودن مزایای سیستم باکتریایی مانند داشتن محیط کشت ارزان و فاقد سرم، سهولت در افزایش مقیاس تولید و القای کنترل شده، مزایای سیستم‌های یوکاریوتی شامل سطح بیان بالا، اصلاحات پس از نسخه‌برداری و ترجمه را نیز دارا است که این سیستم را برای تولید بهینه پروتئین‌های یوکاریوتی منحصر به فرد می‌سازد [۲۱]. در تحقیق حاضر برای اولین بار از ناقل مخمیری (pGAPZαA) شاتال ناقل طراحی شده برای مخمر پیکیا پاستوریس) برای تولید SAP₂ استفاده شده است. این ناقل حاوی ناحیه کدکننده علامت ترشچی آلفا برای خارج‌سازی پروتئین بیان شده در مخمر است. استفاده از این علامت ترشچی [آلفا فاکتور مشتق شده از ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)] درون ناقل مخمیری pGAPZαA، پروتئین نوترکیب را قادر می‌سازد تا در مسیری از ترشح هدایت شود که در آن تشکیل باندهای دی‌سولفیدی و گلیکوزیلاسیون می‌تواند قبل از ترشح پروتئین نوترکیب به

۰/۱ افزایش دهد، مقدار فعالیت آنزیم نوترکیب حاصل، ۳ واحد به ازای ۱ میکرولیتر (۰/۰۷۵ میکروگرم) آنزیم است (نمودار ۱). نتایج نشان داد که آنزیم در مقایسه با گروه کنترل فعالیت بالایی دارد. قابل ذکر است که فعالیت آنزیم خالص ۱۱ برابر نمونه کنترل منفی است که این نشان‌دهنده فعالیت بالای آنزیم تخلیص شده از سیستم یوکاریوتی است.



نمودار ۱ بررسی فعالیت پروتئولیتیکی SAP₂ با منحنی Excel؛ ستون ۱) نمونه کنترل منفی حاوی سوستر بدون آنزیم است. ستون ۲) محلول حاوی ۲۲۵ میکروگرم آنزیم تخلیص شده که باعث پروتئولیز BSA می‌شود. مقدار فعالیت آنزیم نوترکیب حاصل، ۳ واحد به ازای ۱ ماکرولیتر (۷۵ میکروگرم) آنزیم است.

۴- بحث

بیماری‌زای فرصت‌طلب کانیدای آلیکنس آنزیم SAP تولید می‌کند که این مخمر را قادر به استفاده از پروتئین‌های محیط به‌عنوان منبعی از نیتروژن می‌نماید و باعث رشد مخمر و بیماری‌زایی آن می‌شود [۱۲]. سوبستراهای زیست‌شناسی آنزیم‌های SAP فراوان بوده و شامل سرم آلبومین انسان (BSA)، کراتین، کلاژن، لاکتوفیرین (Lactoferrin) و ایمنوگلوبولین‌های ترشچی (IgA) که در حالت طبیعی به پروتئین‌های باکتری مقاوم است) است. این آنزیم‌ها توسط قارچ برای تجزیه بافت‌های خارجی، جلوگیری از سیستم دفاعی میزبان و برای به‌دست آوردن آمینواسیدهایی که برای متابولیسم مخمر نیاز است به‌کار می‌روند. در تحقیقات قبلی ثابت شده که

داخل محیط کشت صورت پذیرد. این ناقل همچنین دارای نواحی همولوگ با ژنوم مخمر بوده که آن را قادر به انجام نوترکیبی همولوگ می‌نماید. ناقل مخمری pGAPZαA ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک زئوسین و نشانگر (Marker) مخمری هیستیدین را نیز دارد که به آن اجازه رشد در محیط مخمری بدون هیستیدین را می‌دهد [۲۲]. در آزمایش‌های کلون کردن با هدف بیان ژن نوترکیب، به علت آن‌که بازده ترانسفورماسیون محصول الحاق به سویه بیانی، پایین است (به‌ویژه در حالتی که پروتئین نوترکیب بیان شده، دارای اثر سمی بر سلول باشد) توصیه می‌شود که محصول الحاق ابتدا به سویه‌ای که پلاسمید بیانی نوترکیب در آن نمی‌تواند بیان شود، انتقال داده شود [۲۳]. در این تحقیق نیز، به دلیل بروز مشکلات متعدد در فرایند کلونینگ به روش نوترکیبی همولوگ، تصمیم گرفته شد که کلونینگ ابتدا در ناقل T/A به‌منظور کسب غلظت بالایی از پلاسمید نوترکیب و افزایش احتمال کسب آن در تراریخت سویه بیانی پیکیا پاستوریس، انجام شود. تکثیر ژن *Sap2* به‌منظور استفاده در فرایند T/A کلونینگ، با استفاده از آنزیم *Taq* پلیمرز انجام شد. این کار با هدف اضافه شدن نوکلئوتید آدنین به انتهای ۳' محصولات PCR الزامی بود. آنزیم *Taq* پلیمرز با اتکا بر خصوصیت دئوکسی نوکلئوتیدی ترانسفرازی خود و به‌صورت مستقل مبادرت به این کار می‌کند و استفاده از *Pfu* پلیمرز که فاقد این خصوصیت بود امکان‌پذیر نبود.

تعیین توالی ژن *Sap2* به‌صورت دو طرفه، به‌طور کامل انجام گرفت. دو توالی به‌دست آمده به‌طور مجازی در نرم‌افزار GenRuner ترجمه و مقایسه شدند. نتیجه تعیین توالی دو طرفه ژن کلون شده، هیچ‌گونه جهشی را در جایگاه فعالیت و اتصال و بقیه قسمت‌های ژن نشان نداد.

در مرحله تخلیص استفاده از ستون نیکل - سفارز (Nickel sepharose)، علاوه بر نقش کلیدی در خالص‌سازی پروتئین هدف، امکان حذف پروتئین‌های موجود در محلول رویی سلولی را نیز فراهم آورد. عامل جداکننده پروتئین‌های نوترکیب از رزین، رقابت مولکول‌های ایمیدازول با جایگاه

پلی‌هیستیدینی ادغام شده با پروتئین نوترکیب در اتصال به رزین‌های ستون است. در نهایت غلظت بالای ایمیدازول در بافر رقیق‌سازی، جدا شدن پروتئین نوترکیب را باعث می‌شود. ژل الکتروفورز از پروتئین خالص شده باند مورد انتظار در حدود ۴۸ دالتون را نشان داد. قوی بودن این باند تنها می‌تواند حکایت از اتصال محکم آن‌ها در مرحله تزریق نمونه به ستون داشته باشد و این امر مستلزم حضور برجسب پلی‌هیستیدینی (6XHis) است. برجسب هیستیدینی به‌منظور سهولت در تخلیص پروتئین است. این برجسب امکان تخلیص پروتئین اتصالی (Fusion protein) را به‌وسیله ستون IMAC فراهم می‌آورد [۲۴]. براساس نوع پروتئین، برجسب هیستیدینی به انتهای آمینی یا کربوکسیلی متصل می‌شود. قرار دادن برجسب در یک انتها ممکن است باعث پوشیده شدن آن در اثر تاخوردن پروتئین شود. در چنین مواردی برجسب را به انتهای دیگر پروتئین متصل می‌کنند. براساس مطالعات قبلی، متصل کردن برجسب هیستیدینی به انتهای کربوکسیل پروتئین *SAP2* در باکتری اشرشیاکلی تخلیص آن به روش واسرشته را امکان‌پذیر می‌کند [۲۵]. نکته قابل ذکر آن است که استفاده از ستون IMAC منجر به خلوص ۱۰۰ درصد پروتئین نمی‌شود؛ زیرا سلول پروتئین‌های غنی از هیستیدین دارد که به‌طور غیراختصاصی به ستون متصل می‌شوند. این مسئله در سیستم‌های یوکاریوتی شدیدتر است؛ چرا که یوکاریوت‌ها پروتئین‌های غنی از هیستیدین بیشتری دارند. به همین علت در سلول‌های یوکاریوتی برای کاستن از پروتئین‌های غیراختصاصی، شرایط اتصال به ستون و شستشو با افزایش غلظت NaCl تا ۲ مولار و افزودن دترجنت‌ها (Detergents) مانند توئین ۲۰ سخت‌تر می‌شود [۲۶]. در مطالعه حاضر نیز تخلیص پروتئین اتصالی *SAP2* با مشکل پروتئین‌های غیراختصاصی مواجه بود که با تغییر شرایط تخلیص تا حدی از این مشکل کاسته شد. پروتئین متصل شده به ستون IMAC از طریق کاهش pH یا افزایش غلظت ایمیدازول خارج می‌شود. از آنجایی که تأثیر تغییرات pH روی ساختار پروتئین *SAP2*

بتوان از آن برای تهیه واکسن، کیت‌های تشخیصی و سایر مطالعات بهره برد. همچنین در سال‌های اخیر، به‌علت استفاده زیاد از داروهای ضد قارچی در کشور، مقاومت دارویی به‌خصوص در مورد داروهای آزولی (Azol) بسیار نگران‌کننده، شده است. در این راستا تحقیق حاضر می‌تواند به‌عنوان منبعی برای به‌دست آوردن داروی اختصاصی و هدف‌علیه‌عامل بیماری‌زای SAP₂ باشد. مطالعات انجام شده نیز بیانگر آن است که در مخمر بیماری‌زای کاندیدا آلبیکنس خانواده پروتئینی SAP در حد بالایی حفظ شده است و می‌تواند به‌عنوان کاندیداهای مهمی برای ساخت واکسن مطرح شوند [۲۸]. به‌علاوه در مطالعات آینده می‌توان با داشتن چنین سیستم بیانی بالا از تولید پروتئین حاضر، در جهت شناخت خواص ایمنولوژیکی، فیزیولوژیکی، داشتن نقش در پاتوژنیسیته، فرایندهای سلولی و بررسی خاصیت چسبندگی به عوامل سرمی نظیر لاکتوفرین، فیبرینوژن، کلاژن و ... بهره برد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه تربیت مدرس، حمایت‌کننده این پروژه، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

مشخص نبود، از روش دوم که مبنی بر افزایش غلظت ایمیدازول بود، استفاده شد.

نمونه خارج شده از ستون در واکنش با آنتی‌بادی مونوکلونال علیه SAP₂، باند قوی در وسترن بلاتینگ نشان داد. این پروتئاز نوترکیب قادر به هضم پروتئین BSA در شرایط لوله آزمایش بود. همچنین میزان پروتئین SAP تولید شده در سیستم بیانی پیکیا در این تحقیق حدود هشت برابر بیشتر در مقایسه با سیستم بیانی اشرشیاکلی [۲۷] تولید را نشان داد.

با توجه به نکات ذکر شده، استفاده از مخمر پیکیا پاستوریس یک سیستم بیان مناسب برای نشان دادن نقش پروتئین SAP₂ در ایجاد بیماری در صورت وجود نداشتن دیگر عوامل مستعد کننده است. در بررسی حاضر یک سیستم بیانی تولید دایم پروتئین فعال SAP₂ در مقادیر بالا به‌دست آمد که برای مطالعه بیماری‌زایی در مدل‌های حیوانی مناسب است. این آنزیم تولید شده در پیکیا پاستوریس خود فعال بوده و قادر به هیدرولیز BSA است که مثالی از انواع پروتئین‌های میزبان به‌عنوان منبع نیتروژن است. انتظار می‌رود با افزایش هر چه بیشتر مطالعه در زمینه بررسی اثر پروتئین SAP₂ بر بیماری‌زایی کاندیدا آلبیکنس، اطلاعات هر چه مفیدتری در زمینه درک چهره واقعی فعالیت این عامل بیماری‌زا به‌دست آید تا در آینده

۶- منابع

- [1] Anassie EJ, MacGinnid MR, Pfaller MA. Candida virulence factors. In: Anassie EJ, MacGinnid MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. Churchill Livingstone Elsevier UK, New York, 2003; p: 203-24.
- [2] De Melo AC, Dornelas-Ribeiro M, De Souza EP, Macrae A, Fracalanza SE, Vermelho AB. Peptidase profiles from non-albicans Candida spp. isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease. FEMS Yeast Res 2007; 7(6):1004-12.
- [3] Smolenski G, Sullivan PA, Cutfield SM, Cutfield JF. Analysis of secreted aspartic proteinases from Candida albicans: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes. Microbiol 1997; 143(Pt 2): 349-56.
- [4] Dabas N, Morschhäuser J. A transcription factor regulatory cascade controls secreted

- aspartic protease expression in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 2008; 69(3): 586-602.
- [5] Kalkanci A, Bozdayi G, Biri A, Kustimur S. Distribution of secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with SAP specific primers in *Candida albicans* isolates. *Folia Microbiol (Praha)* 2005; 50(5): 409-13.
- [6] Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M, Hube B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiol* 2008; 154(Pt 11): 3266-80.
- [7] Ray TL, Payne CD. Scanning electron microscopy of epidermal adherence and cavitation in murine candidiasis: a role for *Candida acid* proteinase. *Infect Immun* 1988; 56(8): 1942-9.
- [8] Taylor BN, Hannemann H, Sehnal M, Biesemeier A, Schweizer A, Röllinghoff M, Schröppel K. Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. *Infect Immun* 2005; 73(10): 7061-3.
- [9] Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol* 2004; 13(2): 357-68.
- [10] Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 3): 249-58.
- [11] Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 395-401.
- [12] White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol* 1995; 177(18): 5215-21.
- [13] Morrow B, Srikantha T, Soll DR. Transcription of the gene for a pepsinogen, PEP1, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 2006; 26(7): 2997-3005.
- [14] De Bernardis F, Cassone A, Sturtevant J, Calderone R. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. *Infect Immun* 1995; 63(5): 1887-92.
- [15] Borelli C, Ruge E, Schaller M, Monod M, Korting HC, Huber R, Maskos K. The crystal structure of the secreted aspartic proteinase 3 from *Candida albicans* and its complex with pepstatin A. *Proteins* 2007; 68(3): 738-48.
- [16] Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning*. 3rd ed, CSHL Press, New York, 2001; 1145-7.
- [17] Simpson R, Adams P, Golemis E. *Basic Methods in Protein Purification and Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008; 400-5.
- [18] Cereghino GP, Cregg JM. *Applications of yeast in biotechnology: protein production and*

- genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10(5): 422-7.
- [19] Dubois N, Colina AR, Aumont F, Belhumeur P, de Repentigny L. Overexpression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase 2 and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* do not augment virulence in mice. *Microbiol* 1998; 144(Pt 8): 2299-310.
- [20] Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45:187-218.
- [21] Romans A, Scorer A, Clare J. Foreign gene expression in yeast. a review. *Yeast* 1992; 8: 423-88.
- [22] Invitrogen. *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. <http://www.invitrogen.com/site> 2008; Cat. V200 20 and V205 20, 11th edition.
- [23] Saeedinia A, Shamsara M, Bahrami A, Zeinoddini M, Naseeri-Khalili M, Mohammadi R, Malek Sabet N, Sami Hosseinali. Heterologous Expression of Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *Pichia pastoris*. *Biotechnol* 2008; 7(3): 569-573.
- [24] Lee S, Choi J, Kwon S. Cloning, expression, and characterization of a family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic Crenarchaeon *sulfophobococcus zilligii*. *Enzyme and Microb Technol* 2006; 38: 821-83.
- [25] Jochen D, Udo R. high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. *Molecular diagnosis infect diseases*. 2nd Ed., Humana Press, Clifton, Newjersey, 2004; p: 179-90.
- [26] Kurtzman D. Method for producing proteins in transformed *Pichia*. <http://www.Patentstrom.us/patents/6258559;us> patent issued July 10 2001.
- [27] Staib P, Lermann U, Blass-Warmuth J, Degel B, Würzner R, Monod M, Schirmeister T, Morschhäuser J. Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in *Candida albicans* allows isoenzyme-specific inhibitor screening. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(1): 146-56.
- [28] Vilanova M, Teixeira L, Caramalho I, Torrado E, Marques A, Madureira P, Ribeiro A, Ferreira P, Gama M, Demengeot J. Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. *Immunol* 2004; 111(3): 334-42.