مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۵۷ تا ۶۳

Original Article

شناسائی مولکولی ژن تولیدکننده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی در قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون‌وروکوزوم

دکترکامیار متواضع[۱]،دکتر مسعود امامی[۲]، دکترفتح‌اله فلاحیان[۳]،دکتر محمدرضا خرمی‌زاده[۴]، دکترساسان رضائی[۵]

[۱] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی
[۲] استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی
[۳] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی
[۴] دانشیار، بخش بیولوژی مولکولی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] دانشیار، بخش بیولوژی مولکولی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *ترایکوفایتون وروکوزوم (T.verrucosum) یکی از قارچهای درماتوفیت است که پوست و ضمائم آن در انسان و حیوانات به ویژه دام را مورد تهاجم قرار می‌دهد. در مطالعه حاضر سعی شده است تا پروتئین‌های کاپرونی منسوب به پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی در این قارچ تشخیص داده شده و بیان ژن مولد آن تحت شرایط استرس گرمایی بررسی شود.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، پرایمرهایی به اندازه ۲۰ یا ۲۱ نوکلئوتید با استفاده از نواحی بسیار ثابت ژن‌های مشابه دیگر طراحی گردیدند. این پرایمرها در PCR های متعددی با استفاده از DNA ژنومی و نیز cDNA قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون وروکوزوم به کار گرفته شده و قطعات PCR حاصله، تعیین توالی گردیدند.*

یافته‌ها: *در این بررسی ۲۲۱۷ نوکلئوتید از این ژن جدید، توالی‌یابی شد که ORF آن به طول ۱۹۶۲bp بوده، حاوی دو اینترون می‌باشد و پروتئینی با ۶۵۴ آمینواسید را رمز می‌نماید. پروتئین حاصله غنی از گلیسین، آلانین و گلوتامیک اسید بود در حالی که میزان تریپتوفان و سیستئین آن ناچیز است. مقایسه توالی‌های به دست آمده در بانک اطلاعات ژنی چه درمورد ژن جدید و چه در مورد آمینواسید منتج از آن، همولوژی معنی‌داری را با دیگر پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی نشان داده است. مطالعات بیشتر نشان داد بیان این ژن تحت تأثیر استرس‌های حرارتی افزایش می‌یابد.*

نتیجه‌گیری: *ژن سنتزکننده پروتئین شوک حرارتی۷۰ کیلودالتونی که از قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون وروکوزوم به دست آمده است، از نظر توالی نوکلئوتیدی شباهت زیادی با سایر ژن‌های این خانواده در دیگر ارگانیسم‌ها دارد. این پروتئین به طور محسوسی میکروارگانیسم را در برابر استرس‌های گرمائی محافظت می‌کند.*

واژگان کلیدی: *درماتوفیت، ترایکوفایتون وروکوزوم، کاپرون، پروتئین شوک حرارتی.*

مقدمه

قرارگیری سلول‌ها در معرض تنش‌های محیطی همچون شوک حرارتی، فلزات سنگین (۱) و اشعه ماوراء بنفش (۲) باعث فعال شدن ژن‌های شوک حرارتی و سنتز پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock protein:HSP) می‌شود (۳،۴). تاکنون HSPهای مختلفی از نظر اندازه و عملکرد شناخته شده‌اند (۵). پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی، یکی از پروتئین‌های بسیار ثابت از نظر توالی آمینو اسیدی هستند (۶)، همچنین این پروتئین‌ها در نقش کاپرون‌های مولکولی، باعث متابولیسم پروتئین‌ها و جابه‌جائی آنها چه در شرایط تنش و چه در شرایط عادی می‌گردند (۱۱-۷). HSPها،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، میدان قدس، ابتدای خیابان دربند، واحد تهران شمال دانشگاه آزاد اسلامی، دکتر کامیار متواضع (**email**: motavaze49@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۵/۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-28]

جابه‌جایی پروتئین‌های سیتوپلاسمی را بـه درون میتوکنـدری تسهیل می‌نمایند (۱۲،۱۳). این پروتئین‌ها، موجودات زنـده را در برابر استرس‌های محیطی نیز محافظت می‌کنند (۳،۸،۱۴). عملکـرد HSPهـا، چـه در شـرایط اسـترس و چـه در شـرایط معمول، وابسته به ATP می‌باشد (۱۵). خانواده پـروتئین‌هـای شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتونی در مخمرها به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۶) با این وجود درمورد قارچهـای رشته‌ای خصوصاً آنهائی کـه بـا عفونتهـای انـسانی در ارتبـاط هستند اطلاعات بسیار کمی در دسترس است.

درماتوفیت‌هـا، گروهـی از قارچهـای رشـته‌ای کـراتین‌دوسـت هستند که پوست و ضـمائم آن در انـسان و حیوانـات را مـورد حملـه قـرار مـی‌دهنـد (۱۷). طیـف وسـیعی از عفونتهـای درماتوفیتی در انسان توسط T. verrucosum ایجـاد مـی‌شـود (۱۹-۱۷). این قارچ یکی از عوامل ایجاد کننده انـواع مختلـف کچلی است (۲۰). هدف از این بررسی، شناسایی مولکـولی ژن سنتزکننده پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتونی و بررسـی بیـان ژن مـذکور تحـت تـأثیر اسـترس‌هـای گرمـائی در ایـن درماتوفیت بوده است.

مواد و روشها

تهیه نمونه قارچی: برای انجام این مطالعه بنیـادی، از بیمـاران مشکوک مبتلا بـه عفونـت قـارچی‌جلـدی مراجعـه‌کننـده بـه آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت و انـستیتو تحقیقـات بهداشـتی دانـشگاه علـوم پزشـکی تهـران در سـال ۱۳۸۲، نمونه‌برداری صورت گرفت که بعد از بررسیهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی وجود قارچ T. verrucosum تأیید گردید.

جداسازی DNA: DNA بـا وزن مولکـولی بـالا بـا کمـک روش تغییر یافته Choi، از قارچ T. verrucosum به دسـت آمـد. بـه طور خلاصه، توده میسلیومی فریز شده، با کمک نیتروژن مایع در داخل یک هاون چینی بـه صـورت پـودر کـاملاً یکنواخـت درآمد. پـودر حاصـله در داخـل بـافر اسـتخراج کننـده DNA ریخته شد. این بافر شامل Tris- HCl ۵۰ میلی‌مـولار، EDTA ۵۰ میلی‌مولار، SDS ۳٪، بتا مرکاپتواتـانول ۱٪ و پروتئینـاز K می‌باشد. سوسپانسیون حاصل در دمای ۶۵°C به مدت۱ ساعت قرار داده شد و توده سلولی با سـانتریفوژ ۲۵۰۰ دور در مـدت ۱۵ دقیقه جدا شد. پـس از افـزودن RNase-H، سوسپانـسیون حاصله به مـدت نـیم سـاعت در دمـای ۳۷°C قـرار داده شـد. سپس عمل استخراج ابتدا با کمک فنل- کلروفـرم- ایزوآمیـل الکل (۲۵:۲۴:۱) و سپس با کمک کلروفرم- ایـزو آمیـل الکـل (۲۴:۱) دنبال شد. بـا افـزودن حجـم مـساوی از ایزوپروپـانول، DNA رسوب داده شد و در اتانول نگهداری گردید.

جداسازی RNA: استخراج RNA، هم برای نمونه‌هـای شـاهد و هم سه نمونه از سلول‌های قارچی که به ترتیب به مـدت ۱، ۲ و ۴ ساعت در حرارت ۴۰° C قرار داده شده بودند، انجام گرفت. به این منظور برای هر یک از گروهها، ۴۰ پلیت حاوی محـیط سـابورو دکـستروز آگـار مـایع بـه همـراه سـیکلوهگزامید و کلرامفنیکل جهت برداشت میـسلیوم و اسـتخراج RNA مـورد استفاده قرار گرفت. پودر میسلیومی به دسـت آمـده بـا کمـک نیتـروژن مـایع، در داخـل محلـول گوانیـدین ایزوتیوسـیانات (GITC) سرد و به مدت ۱۵ دقیقه به صورت هموژنیزه درآمـد و به دنبـال آن نمونـه در سـانتریفوژ ۲۵۰۰ دور بـه مـدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. عمل استخراج با سدیم استات ۲مولار، فنـل اسیدی و کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) همراه بـا سـانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۷ دقیقه دنبال شد. بعد از افزودن حجـم مساوی از ایزوپروپانول و قرارگیری نمونه‌ها در حـرارت ۲۰°C- به مدت ۱ ساعت، سـانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور بـه مـدت ۵ دقیقـه انجام گرفت. سپس GITC و ایزوپروپانول به نمونـه‌هـا افـزوده شده و مخلوط حاصل در ۲۰°C- به مدت ۱ساعت قرار گرفـت. نمونه‌های نهائی در سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ دور به مـدت ۵ دقیقـه قرار گرفته و رسوب RNA حاصـله، بـا کمـک اتـانول ۷۰٪ بـه آرامی شستشو داده شد.

انجـام PCR: PCR بـا اسـتفاده از DNA ژنـومی و بـا کمـک پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی سنتتیک صورت گرفت. بـه طـور خلاصه مجموعه‌ای از هر یک از پرایمرها به محلول حاوی بـافر PCR به صورت ×۱۰ همـراه بـا MgCl2 ، مخلـوط dNTP ۱۰ میلی‌مولار، آنـزیم Taq و DNA ژنـومی اضـافه گردیـد. برنامـه PCR به کار رفته جهت تکثیر بخش اول ژن مورد نظر به ایـن صورت بوده است: ۹۴°C به مدت یک دقیقـه، ۵۰°C بـه مـدت یک دقیقـه و ۷۲°C بـه مـدت یـک دقیقـه (مجموعـاً۳۵ دور) همچنانکه درمورد بخش میانی و انتهـایی ژن، برنامـه بـه ایـن شکل تنظیم شد:C ۹۴° به مـدت ۱ دقیقـه، ۵۳°C بـه مـدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۷۵ ثانیه (مجموعـاً ۳۵ دور). در پایـان محصولات PCR به دست آمده بـا کمـک الکتروفـورز روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی گردیدند.

انجام RT-PCR: عمل RT-PCR با کمـک cDNA انجـام شـد. برای این منظور ابتدا دو مخلوط جداگانه تهیه شد. یکی از این محلول‌ها حـاوی Random Hexamer، هـر یـک از پرایمرهـا و RNA بود که ابتدا به مدت ۳ دقیقه در۷۰°C و سپس ۱ دقیقه در۴°C قرار داده شدند. در حالی کـه مخلـوط دوم حـاوی بـافر

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-28]

PCR بـه صـورت ×۵ بـا MgCl2 همـراه بـا دی‌تیوتریتـول، بازدارنده RNase، آنزیم RT و مخلوط dNTP بوده است.

از محصول نهایی حاصل از ادغام این دو مخلـوط بـرای تولیـد cDNA مطابق برنامه زیر استفاده گردید:

۳۸°C به مدت ۵۵ دقیقه،۹۵°C بـه مـدت ۳ دقیقـه و۲۰°C بـه مدت ۱ دقیقه.

cDNA حاصله با کمک برنامه‌های ذکر شـده در بخـش PCR، تکثیر شده و محـصولات PCR بـا کمـک الکتروفـورز روی ژل آگاروز ۱٪ بررسی گردیدند.

توالی یابی قطعات PCR: بعد از خالص‌سازی قطعـات PCR بـه دست آمده با کمک کیت Qiagen، تعیین توالی قطعات مربوط به DNA ژنومی و cDNA توسط کمپـانی MWG آلمـان و بـا کمک پرایمرهای ۲۰ و ۲۱ نوکلئوتیـدی طراحـی شـده انجـام گردید.توالی یابی هر بخش از ژن حداقل سه بـار بـرای هـر دو رشته انجام شد. توالی نوکلئوتیدی بـه دسـت آمـده بـا تـوالی ژن‌های مشابه در بانک جهانی ژن مقایسه گردیدند.

انجام Northern Blotting: مولکول‌های RNA جداشـده در ژل الکتروفورز، ابتدا بر روی غشا نیتروسلولزی انتقال یافتند. بعد از عمـل حـرارت‌دهـی در۸۰°C بـه مـدت ۲ سـاعت، از غـشا نیتروسلولزی لکـه‌گـذاری شـده، بـرای عمـل هیبریدیزاسـیون اسـتفاده گردیـد. بـا اسـتفاده از فـسفر رادیواکتیـو، عمـل هیبریدیزاسیون در حرارت ۶۵°C به مـدت ۱۲ سـاعت تکمیـل گردید و بعد از شستشوهای متنـاوب بـا SDS و SSC (سـالین سدیم سیترات) اتورادیوگرافی انجام شد.

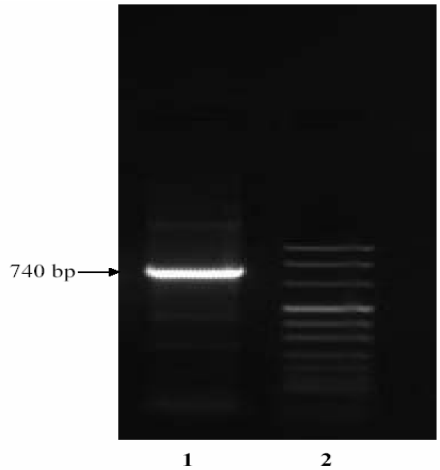
یافته‌ها

بعد از تکثیر سه قطعه از ژن مورد نظر با کمک PCR، پروتئین شوک حرارتی۷۰ کیلودالتونی دیگری در قـارچT.verrucosum شناسایی گردید. قطعـه ابتـدایی ایـن ژن، ۷۴۰bp طـول دارد (شکل۱) در حالی که بخشهای میانی و انتهایی آن بـه ترتیـب ۱۱۰۹bp و ۹۶۵bp طول داشتند (شکل۲).

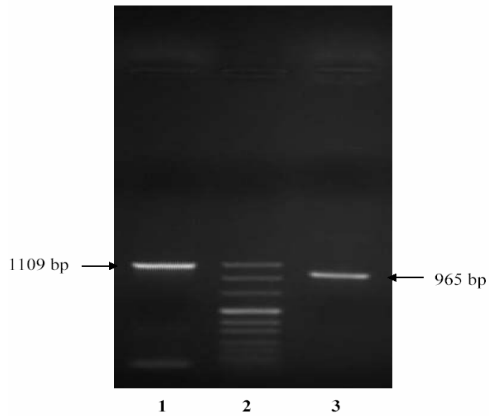
این ژن جدید، دارای ۲ اینترون می‌باشد کـه بـر پایـه مقایـسه قطعات PCR بین DNA ژنومی و cDNA بـه دسـت آمـده‌انـد (شکل۳).

توالی کامل نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این ژن نیز در شـکل۴ آورده شده است. این ژن، حاوی یک ORF بـه طـول ۱۹۶۲bp است که ۶۵۴ آمینواسید را رمز نموده است. مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به دست آمده در بانک جهـانی ژن، شباهت معنی‌داری را با سایر HSPهای ۷۰ کیلودالتونی نـشان می‌دهد. توالی آمینواسـیدی پـروتئین حاصـله حـدود ۹۸٪ بـا T.rubrum، ۸۶٪ با D.melanogaster و ۷۵٪ با انسان شـباهت نشان می‌دهد. ترکیب شیمیایی پروتئین حاصله نشان می‌دهـد که این پروتئین غنی از گلیسین (۸/۸۶٪)، آلانـین (۹/۷۸٪) و گلوتامیک اسید (۸/۲۵٪) بوده در حالی که میزان تریپتوفـان و سیستئین آن ناچیز است (به ترتیب ۰/۱۵٪ و ۰/۶۱٪).

تجزیـه و تحلیلهـای نـشانه‌گـذاری بعـد از Northern blotting برروی هرچهار نمونه RNA مورد بررسی و مقایسه نمونـه‌هـای شـاهد و حـرارت دیـده نـشان مـی‌دهـد بیـان ژن HSP ۷۰ کیلودالتونی با افـزایش مـدت زمـان شـوک حرارتـی بـه طـور محسوسی افزایش پیدا می‌کند (شکل۴).

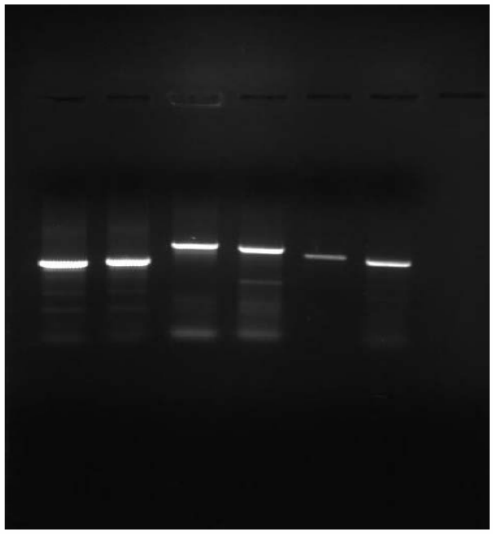


شکل ۱- محصول PCR به دست آمده از قطعه ابتدائی ژن TvHSP70 (ردیف۱). طول باندهای سـایزمارکر (ردیـف۲) عبارتند از: ۱۱۱۴، ۹۰۰، ۶۹۲، ۵۰۱، ۴۸۹ ، ۴۰۴، ۳۲۰، ۲۴۲ و ۱۹۰pb (از بالا به پائین).

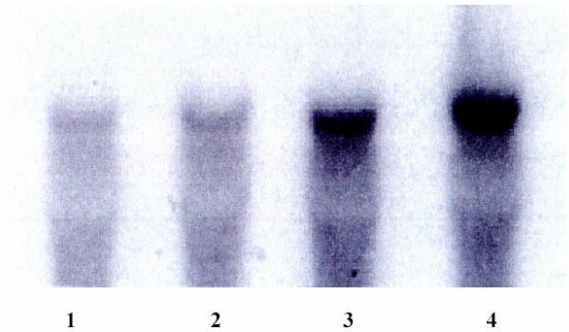


شکل۲- محـصول PCR بـه دسـت آمـده از قطعـه میـانی (ردیف۱) و انتهائی (ردیف۳) ژن TvHSP70. اندازه بانـدهای سایزمارکر (ردیف۲) عبارتند از: ۱۱۱۴، ۹۰۰، ۶۹۲، ۵۰۱، ۴۸۹، ۴۰۴، ۳۲۰، ۲۴۲ و ۱۹۰bp (از بالا به پائین).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-28]



شکل۳- شناسائی اینترون در ژن TvHSP70. محصول PCR مربوط به DNA ژنومی از قطعه ابتدائی ژن (ردیف۱)؛ محصول PCR مربوط به cDNA از قطعه ابتدائی ژن (ردیف۲)؛ محصول PCR مربوط به DNA ژنومی از قطعه میانی ژن (ردیف۳)؛ محصول PCR مربوط به cDNA از قطعه میانی ژن (ردیف۴)؛ محصول PCR مربوط به DNA ژنومی از قطعه انتهائی ژن (ردیف۵)؛ محصول PCR مربوط به cDNA از قطعه انتهائی ژن (ردیف۶). اختلاف اندازه قطعات PCR حاصله بین ردیف‌های ۳ و ۴ و نیز ردیف‌های ۵ و ۶ نشان دهنده وجود دو اینترون می‌باشد.



شکل ۴- افزایش بیان ژن TvHSP70 در نتیجه انجام Northern blotting. ردیف۱: RNA شاهد؛ ردیف۲: RNA مربوط به نمونه حرارت دیده در دمای ۴۰°C به مدت ۱ ساعت؛ ردیف۳: RNA مربوط به نمونه حرارت دیده در دمای ۴۰°C به مدت ۲ ساعت؛ ردیف۴: RNA مربوط به نمونه حرارت دیده در دمای ۴۰°C به مدت ۴ ساعت.

بحث

در مطالعه حاضر، شناسایی و تشخیص مولکولی ژن کدکننده یک پروتئین ۷۰ کیلودالتونی از قارچ T. verrucosum گزارش شده است که از این پس به عنوان TvHSP70 لقب گرفته است. به طور کلی، تحقیقات مولکولی بسیاری بر روی جنس‌های ترایکوفایتون و میکروسپوروم در بین درماتوفیت‌ها انجام شده است. T. verrucosum یکی از پاتوژن‌های حیوان دوست است که باعث کچلی ریش و سبیل، کچلی بدن و کچلی ناخن در انسان می‌شود و یکی از مهمترین عوامل درماتوفیتوزیس مشترک در انسان و حیوانات خصوصاً دام است (۲۰). به دلیل اهمیت دخالت این قارچ در عفونتهای انسان و حیوانات، سعی بر آن شد تا یکی از جنبه‌های مولکولی این قارچ که احتمالاً در بیماری‌زایی آن موثر می‌باشد، بررسی شود. هرچند اطلاعات مولکولی درباره این قارچ بسیار اندک است، اما گزارشهایی درباره تنوع DNA میتوکندریایی T.verrucosum در دسترس است (۲۱،۲۲) و پرایمرهای اختصاصی نیز در برخی تحقیقات ژنتیکی مشخص طراحی و استفاده شده است (۲۵-۲۳). در ضمن این قارچ از طریق توالی‌یابی ناحیه ITS2 مربوط به rDNA مورد شناسایی مولکولی قرار گرفته است (۲۶). گونه‌های ترایکوفایتون با کمک PCR Lightcycler (۲۷)، Repetitive-Sequence-PCR-based DNA fingerprinting (۲۸) و تجزیه و تحلیل‌های RAPD (۲۵) مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

پروتئین‌های شوک حرارتی موجودات زنده را در برابر تنش‌های محیطی نظیر شوک‌های حرارتی، املاح فلزات سنگین و اشعه ماوراء بنفش مقاوم می‌سازند، علیرغم نقشی که به عنوان کاپرون‌های مولکولی در تنظیم تاخوردگی پروتئین‌های تازه ساخته شده و نیز جابه‌جائی آن‌ها به درون اندامک‌های سلولی دارند (۳-۸،۱). HSPها در پاسخهای مختلف ایمنی نیز موثرند (۳۲-۲۹). این پروتئین‌ها در موجودات مختلفی همچون کرم‌ها، مگس سرکه و انسان مطالعه شده‌اند.

در بررسی حاضر، چهارگروه کشت قارچی مورد پژوهش قرار گرفتند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که در دمای ۳۰°C قرار گرفته بودند و سه گروه دیگر در دمای ۴۰°C به مدت ۱، ۲ و ۴ ساعت؛ به عبارت دیگر این سه گروه با شوک حرارتی ۱۰ درجه‌ای مواجه گردیدند.

در این تحقیق سه جفت پرایمر مختلف برای تکثیر بخشهای ابتدایی، میانی و انتهایی این ژن طراحی و استفاده گردیدند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-28]

```
   1   catttgcactgcagaaatcacaacatccaaa                                                  31
  32   atg gct ccc gca gtt ggt atc gat ttg ggt acc acg tac tcc tgc gtg ggt atc ttc cgt   91
   1    M   A   P   A   V   G   I   D   L   G   T   T   Y   S   C   V   G   I   F   R    20
  92   gat gac cgc att gaa atc atc gcc aac gat cag gga aac cgc acc act ccc tcc ttc gtt  151
  21    D   D   R   I   E   I   I   A   N   D   Q   G   N   R   T   T   P   S   F   V    40
 152   gcc ttc aca gac acc gag cgt ctc att gga gat gcc gca aag aac cag gtc gcc atg aac  211
  41    A   F   T   D   T   E   R   L   I   G   D   A   A   K   N   Q   V   A   M   N    60
 212   cct atc aac acc gtc ttc gat gct aag cgt ctc att gga cgc aag ttc aac gac gcc gag  271
  61    P   I   N   T   V   F   D   A   K   R   L   I   G   R   K   F   N   D   A   E    80
 272   gtc cag gcc gac atg aag cac ttc ccc ttc aag gtt gtc gag aag agc ggc aag ccc atc  331
  81    V   Q   A   D   M   K   H   F   P   F   K   V   V   E   K   S   G   K   P   I   100
 332   gtc cag gtc gag ttc aag ggc gag gag aag cag ttc acc cct gag gaa atc tcc tcc atg  391
 101    V   Q   V   E   F   K   G   E   E   K   Q   F   T   P   E   E   I   S   S   M   120
 392   gtc ctc acc aag atg cgt gag acc gcc gag gcc tat ctc ggt ggc acc gtc aac aac gct  451
 121    V   L   T   K   M   R   E   T   A   E   A   Y   L   G   G   T   V   N   N   A   140
 452   gtc atc act gtc cct gcc tac ttc aac gac tcc cag cgt caa gct act aag gac gcc ggt  511
 141    V   I   T   V   P   A   Y   F   N   D   S   Q   R   Q   A   T   K   D   A   G   160
 512   ctc att gcc ggt ctc aac gtc ctc cgt atc atc aac gag ccc act gct gct gct att gcc  571
 161    L   I   A   G   L   N   V   L   R   I   I   N   E   P   T   A   A   A   I   A   180
 572   tac ggt ctc gac aag aag gcc gaa tgt gag cgc aac gtt ctc atc ttc gat ctc ggt ggt  631
 181    Y   G   L   D   K   K   A   E   C   E   R   N   V   L   I   F   D   L   G   G   200
 632   ggt acc ttc gat gtc tcc ctc ctg acc atc gaa gag ggt atc ttc gaa gtc aag tcc act  691
 201    G   T   F   D   V   S   L   L   T   I   E   E   G   I   F   E   V   K   S   T   220
 692   gcc ggt gac act cac ttg ggt ggt gag gac ttt gac aac cgt ctc gtc aac cac ttc gtc  751
 221    A   G   D   T   H   L   G   G   E   D   F   D   N   R   L   V   N   H   F   V   240
 752   aac gaa ttc aag cgc aag aac aag aag                                              778
 241    N   E   F   K   R   K   N   K   K                                               249

 779   GTATGGGCATATTAAATTCTCCCCTTTCTCCAATTGAAATAAAATTAAAAGTTACTAACCTTTTTGACAG          848

 849   gat ctc tcc acc aat gct cgt gct ctc cgc cgt ctc cgc act gcc tgc gag cgt gct aag  908
 250    D   L   S   T   N   A   R   A   L   R   R   L   R   T   A   C   E   R   A   K   269
 909   cgt act ctc tct tct gct gcc cag acc tcc act gag att gat tct ctc tat gag ggt gtt  968
 270    R   T   L   S   S   A   A   Q   T   S   I   E   I   D   S   L   Y   E   G   V   289
 969   gac ttc tac acc tcc atc acc cgt gct cgt ttc gag gag ctc tgc cag gac ctc ttc cgc 1028
 290    D   F   Y   T   S   I   T   R   A   R   F   E   E   L   C   Q   D   L   F   R   309
1029   tcc act atg gag cct gtc gag cga gtc ctc cgt gac gcc aag atc gac aag tcc tcc gtc 1088
 310    S   T   M   E   P   V   E   R   V   L   R   D   A   K   I   D   K   S   S   V   329
1089   cac gag att gtc ctc gtc ggt ggt tct act cgt atc ccc aag atc cag aag atg gtc tcc 1148
 330    H   E   I   V   L   V   G   G   S   T   R   I   P   K   I   Q   K   M   V   S   349
1149   gac ttc ttc aac ggc aag gag cca aac aag tcc atc aac ccc gat gaa gcc gtt gcc tac 1208
 350    D   F   F   N   G   K   E   P   N   K   S   I   N   P   D   E   A   V   A   Y   369
1209   ggt gct gcc gtc cag gcc gcc att ctc tcc ggt gac acc tcc tcc aag tcc acc aac gag 1268
 370    G   A   A   V   Q   A   A   I   L   S   G   D   T   S   S   K   S   T   N   E   389
1269   atc ctc ctg ctc gat gtc gct ccc ctc tct ctc ggt atc gag act gct ggc ggt gtc atg 1328
 390    I   L   L   L   D   V   A   P   L   S   L   G   I   E   T   A   G   G   V   M   409
1329   act cct ctc atc aag cgc aac acc acc atc cct acc aag aag tct gag act ttc tcc acc 1388
 410    T   P   L   I   K   R   N   T   T   I   P   T   K   K   S   E   T   F   S   T   429
1389   ttc tct gac aac cag cct ggt gtc ttg atc cag gtc ttc gag ggt gag cgt gcc cgc acc 1448
 430    F   S   D   N   Q   P   G   V   L   I   Q   V   F   E   G   E   R   A   R   T   449
1449   aag gac aac aac ttg ctc ggc aag ttc gag ctc act ggt atc cca cct gcc ccc cgt ggt 1508
 450    K   D   N   N   L   L   G   K   F   E   L   T   G   I   P   P   A   P   R   G   469
1509   gtt cct cag atc gaa gtc acc ttc gat gtt gat gcc aac ggt att atg aac gtc tct gct 1568
 470    V   P   Q   I   E   V   T   F   D   V   D   A   N   G   I   M   N   V   S   A   489
1569   ctc gag aag ggc act gga aag acc aac aag att gtc atc acc aac gac aag ggc cgt ctg 1628
 490    L   E   K   G   T   G   K   T   N   K   I   V   I   T   N   D   K   G   R   L   509
1629   tcc aag gag gag atc gag cgt atg ctt gct gag gcc gag aag tac aag gcc gag gac gag 1688
 510    S   K   E   E   I   E   R   M   L   A   E   A   E   K   Y   K   A   E   D   E   529
1689   gct gag act gcc cgt atc ggt gct aag aac ggt ctc gag tcc tat gct tac tcc ctc aag 1748
 530    A   E   T   A   R   I   G   A   K   N   G   L   E   S   Y   A   Y   S   L   K   549
1749   aac acc ttg agc gac tcc aag gtc gac gag aag ctc gac gct gcc gac aag gag aaa ctc 1808
 550    N   T   L   S   D   S   K   V   D   E   K   L   D   A   A   D   K   E   K   L   569
1809   aag tcc gag atc gac aag gtt gtt gct tgg ctc gat gac aac cag acc gcc acc aag gag 1868
 570    K   S   E   I   D   K   V   V   A   W   L   D   D   N   Q   T   A   T   K   E   589
1869   gaa tat gag tcc cag cag aag gag ctt gaa gg                                      1900
 590    E   Y   E   S   Q   Q   K   E   L   E   G                                       600

1901   GTATGTATATCCATTCTCGCAACACCTCCATTGAAAAGAAACATTATGCTAACATCTTTCCTTACAG             1967

1968 t gtt gcc aac ccc atc atg atg aag ttc tac ggt gct ggc ggt gag ggt ggt gct cca ggt 2028
 601    V   A   N   P   I   M   M   K   F   Y   G   A   G   G   E   G   G   A   P   G   620
2029   ggc ttc cca ggt gct ggt gct ggc ggc cct ggc ggt ttc ccc ggt gcc ggt gct ggt ggc 2088
 621    G   F   P   G   A   G   A   G   G   P   G   G   F   P   G   A   G   A   G   G   640
2089   gct gct gcc cac gac gac ggc cca acc gtc gag gaa gtc gac taa                     2133
 641    A   A   A   H   D   D   G   P   T   V   E   E   V   D                           654
2134   atgtctcgctcacatcagcgaaaagagacatcctccttccaacattaaaaaaaaaaaataccaataattcctgccaaaa 2212
2213   aaaaa                                                                           2217
```

شکل۵- توالی‌های کامل نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن TvHSP70. نوکلئوتیدهای ۸۴۸-۷۷۹ و نیز ۱۹۶۷- ۱۹۰۱، توالی‌های اینترونی هستند. کدون آغازین (atg) و پایانی (taa) روی شکل مشخص می‌باشند

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-28]

ژن کامل HSP70 در قارچ ترایکوفایتون وروکوزوم، دارای ۲۲۱۷ نوکلئوتید است که یک ORF به اندازه ۱۹۶۲bp داشته و پروتئینی با ۶۵۴ آمینواسید را سنتز می‌نماید. مقایسه توالی نوکلئوتیدی DNA ژنومی و cDNA درمورد ژن TvHSP70 نشان دهنده وجود ۲ اینترون در این ژن بوده که شباهت بسیار زیادی با ژن HSP70 مشابه کشف شده در قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون روبروم دارد (۳۳). اخیراً ژن HSP70 مشابهی در قارچ ریزوپوس نیگریکانس بررسی شده که حاوی ۴ اینترون است (۳۴). تجزیه و تحلیل توالی آمینواسیدی ژن TvHSP70، شباهت معنی‌داری با دیگر ژن‌های HSP70 جداشده دارد به طوری که ۹۸٪ با ترایکوفایتون روبروم، ۸۷٪ با نوروسپورا کراسا، ۸۶٪ با مگس سرکه، ۷۸٪ با سنورابدیتیس الگانس ، ۷۵٪ با انسان و ۷۳٪ با کاندیدا آلبیکنز همولوژی نشان می‌دهد. مطالعات بیشتر نشان داد بیان ژن HSP70 در نتیجه افزایش حرارت، بالا می‌رود و این افزایش برحسب زمان شوک حرارتی به طور تصاعدی انجام می‌شود.

به طور کلی، بیان ژن‌های HSP70 در نتیجه استرس‌های محیطی تغییر می‌کنند. در این مطالعه مشخص شد که بیان ژن HSP70 در نتیجه افزایش مدت زمان شوک حرارتی افزایش یافته است که این نتیجه نیز با مطالعات مشابه قبلی (۳۴،۳۳) مطابقت دارد.

می‌توان نتیجه گرفت که HSP70 در قارچ درماتوفیت T.verrucosum علاوه بر کاپرون بودن، نقش مهمی را در مقاوم‌کردن میکروارگانیسم نسبت به استرس‌های محیطی دارد.

با بررسیهای بیشتر بر روی ساختار این ژن و مطالعه عوامل موثر بر آن، می‌توان به راهکارهایی برای تولید داروهای جدید ضد قارچی دست یافت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات بی‌شائبه همکاران محترم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و همچنین پرسنل آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. Annu Rev Genet 1988;22:631-7.
2. Trautinger F, Kindas-Mugge I, Barlan B, Neuner P, Knobler RM. 72kDa heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. J Invest Dermatol 1995;105:160-2.
3. Leppa S, Sistonen L. Heat shock response; Pathophysiological implication. Ann Med 1997; 29:73-8.
4. Steen BR, Lian T, Zuyderduyn S, MacDonald WK, Marra M, Jones SJ, et al. Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus Cryptococcus neoformans. Genome Research 2002;12(9):1386-1400.
5. Moseley PL. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. J Appl Physiol 1997;83:1413-17
6. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. J Mol Evol 1994;38:1-17.
7. Bukau B, Horwich AL. The HSP70 and HSP60 Chaperone machines. Cell 1998;92:351-366.
8. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 1996;381:571-79.
9. Hendrick JP, Hartl FU. Molecullar chaperone functions of HSPs. Annu Rev Biochem 1993; 62:349-84.
10. Mayer MP, Bukau B. HSP70 chaperone system: diversity of cellular functions and mechanisms of action. Biol Chem 1998;379:261-68
11. Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. Essay Biochem 1997;32:17-29.
12. Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. 70 kDa heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsome. Nature 1988;332:805-10.
13. Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. Nature 1988;332:800-5.
14. Ohtsuka K, Kawashima D, Gu Y, Saito K. Inducers and co-inducers of molecular chaperones. Int J Hyperthermia 2005;21(8):703-11.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-28]

15. Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature 1988;333:330-4.

16. Craven RA, Tyson JR, Stirling CJ. A novel subfamily of HSP70s in the endoplasmic reticulum. Trends Cell Biology 1997;7:277-282.

17. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995;8:240-59

18. Dahl MV, Grando SG. Chronic dermatophytosis. Adv Dermatol 1994;9:97-111.

19. Odom R. Pathophysiology of dermatophyte infection. J Am Acad Dermatol 1993;28:S2-S7.

20. Rippon J, editor. Medical mycology. 3rd edition. WB Saunders, New York. 1988.

21. Kawasaki M, Inoue T, Ohsawa T, Ishioka S, Mochizuki T, Ishizaki H. Two Arthroderma benhamiae isolates showing mitochondrial DNA type of Trichophyton verrucosum. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 2002;43(2):103-6.

22. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera Trichophyton using mitochondrial DNA analysis. Mycopathologia 1992;117(3):127-32.

23. Blanz P, Buzina W, Ginter G, Graser Y. Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes. Mycoses 2000;Suppl 1:11-16.

24. Bock M, Maiwald M, Kappe R, Nickel P, Naher H. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophytes DNA with a fungus-specific primer system. Mycoses 1994;37(3-4):79-84.

25. Hajduch M, Drabek J, Raclavsky V, Kotala V, Michalek T, Zelenkova I. Diversity among wild type and vaccination strains of Trichophyton verrucosum investigated using random amplified polymorphic DNA analysis. Folia Biol (praha) 1999;45(4): 151-6.

26. Woldeamanuel Y, Leekassa R, Chryssanthou E, Mengistu Y, Petrini B. Clinico-mycological profile of dermatophytosis in a reference center for leprosy and dermatological diseases in Addis Ababa. Mycopathologia 2006;161(3):167-72.

27. Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by lightcycler PCR. J Med Microbiol 2004;53:1207-14.

28. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the DiversiLab system for identification of commonly encountered dermatophytes. J Clin Microbiol 2005;43(5):2141-7.

29. Bahr GM, Rook GA, al-Saffar M, Van Embden J, Stanford JL, Behbehani K. Antibody levels to Mycobacteria in relation to HLA type: evidence for non-HLA-linked high levels of antibody to the 65 kDa heat shock protein of M.bovis in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 1988; 74:211-15.

30. Gomes FJ. An 80 kDa antigen from Histoplasma capsulatum that has homology with HSP70 induces cell-mediated immune response in mice. Infect Immun 1992;60:2565-71.

31. Mizzen L. Immune response to stress proteins (application to infectious disease and cancer). Biotherapy 1998;10:173-89.

32. Tsoulfa G, Rook GA, Van-Embden JD, Young DB, Mehlert A, Isenberg DA, et al. Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1989;48:118-23.

33. Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek C, Brna C, Tschachler E. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen Trichophyton rubrum. Gene 2000;241(1):27-33.

34. Cernila B, Cresnar B, Breskvar K. Molecular characterization of a ribosome-associated hsp70 homologous gene from Rhizopus nigricans. Biochim Biophys Acta 2003;1629(1-3):109-13.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-06-28]