

# مقایسه مقادیر پروتئین‌های سطحی کاندیدا با استفاده از رنگ آمیزی نقره، کوماسی بلو و مخلوط هر دو رنگ و مشاهده باندهای مربوطه با استفاده از روش SDS-PAGE

دکتر سید امیر یزدان پرست<sup>۱</sup>، سیده شهرزاد مهدوی نظاری<sup>۲</sup>،  
فریبا حشمتی<sup>۳</sup>، سمیرا جهانگیری<sup>۴</sup>، زهره زارعی<sup>۴</sup>

## چکیده

**زمینه و هدف:** گونه‌های کاندیدا بعنوان شایعترین عوامل بیماری‌های عفونی و قارچی فرصت طلب مطرح هستند. کاندیدا آلبیکنس بعنوان نوعی قارچ پلی مورف مطرح است. کاندیدا دابلینینسیس بعلت تشابه بسیار با قارچ کاندیدا آلبیکنس حائز اهمیت است. پروتئین‌های دیواره نیز می‌توانند در ساختار دیواره وجود داشته باشند. این پروتئینها بعلت نقش در چسبندگی و اتصال به سلولهای میزبان و بیماری زایی مورد تأکید مطالعات بوده است. لذا شناخت این پروتئینها در قارچ‌های پاتوژن و استخراج و جدا سازی و تعیین اجزای آنها ضروری به نظر می‌رسد.

**روش بررسی:** هدف از این طرح بررسی مقادیر پروتئین‌های سطحی کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینینسیس با استفاده از سه رنگ آمیزی و مشاهده باند احتمالی آنها با روش سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) به منظور شناخت بیشتر این قارچهای بیماریزا می‌باشد. همچنین با استفاده از بافرکربنات آمونیوم که شامل بتامر کاپتوواتانول است پروتئینهای سطحی کاندیدا استخراج می‌شوند و پس از استخراج انجام دیالیز نیز ضروری است.

**یافته‌ها:** با رنگ آمیزی کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی ۴۲ و ۶۶/۲ و ۲۰۰ kDa و در رنگ آمیزی با نقره پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۱/۵ و ۳۷ و ۲۸/۵ kDa و با استفاده از رنگ آمیزی توام کوماسی بلو و نقره پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۷ و ۳۵ و ۴۰ و ۴۵ و ۵۲ و ۸۰ kDa تشخیص داده شد.

**نتیجه‌گیری:** با رنگ آمیزی کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی بالا و در رنگ آمیزی با نقره پروتئینهایی با وزن مولکولی پایین و با مخلوط هر دو رنگ بیشتر باندهای پروتئین مشاهده شدند.

**واژه‌های کلیدی:** کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا دابلینینسیس، استخراج پروتئین، SDS-PAGE

\* نویسنده مسئول :

دکتر سید امیر یزدان پرست؛  
دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم  
پزشکی تهران

Email :  
Syazdanparast@tums.ac.ir

- دریافت مقاله : مهر ۱۳۹۰ - پذیرش مقاله : دی ۱۳۹۰

## مقدمه

کاندیدا آلبیکنس یک قارچ فرصت طلب است که به صورت چند شکلی می‌باشد و شایعترین عامل کاندیدیازیس است.

کاندیدا دابلینینسیس اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط سولیوان (Sullivan) شرح داده شد. به طور عمده از حفره دهانی افراد مبتلا به ویروس HIV جدا می‌شود و از نظر خصوصیات مرغولوژیکی و فیزیولوژیکی شبیه کاندیدا آلبیکنس می‌باشد (۱-۲).

<sup>۱</sup> دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

<sup>۳</sup> کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۴</sup> کارشناس علوم آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

گلوکز و لوله‌های حاوی گالاکتوز سانتریفوژ انجام گرفت. مشابه همین عمل در مورد کاندیدا دابلینسیس صورت گرفت<sup>(۵)</sup>.

**استخراج پروتئین:** استخراج پروتئین به روش بتامرکاپتواتانول بدین صورت که محیط کشت در دور ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی دور ریخته شد سپس رسوب دو نوبت با آب مقطر استریبل شستشو داده شد و سلولهای شسته شده را در محلول کربنات آمونیوم ۱/۸۹ گرم بر لیتر و بتامرکاپتو اتانول ۰.۱٪ معلق گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بعد از سانتریفوژ مایع رویی(سوپرناتانت) به دقت جمع آوری شد و عصاره استخراج شده(با فیلتر ۰/۲) در برابر بافر تریس-HCL به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد دیالیز شد<sup>(۶)</sup>. سنجش میزان غلظت پروتئین در هر نمونه با بکارگیری آزمون برdfورد انجام شد<sup>(۷)</sup>.

**SDS-PAGE:** بررسی باندهای پروتئینی با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد و با تعیین وزن مولکولی تغییرات مربوط به هریک از کاندیداها مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت<sup>(۸)</sup>. این روش در ابتدا توسط لاملی در سال ۱۹۷۰ و سپس توسط کازانوا در سال ۱۹۸۹ انجام شد<sup>(۶)</sup>. SDS-PAGE در ژلوز separating به میزان ۱۲/۵ درصد W/V و در ژلوز stacking به میزان ۴ درصد W/V با ولتاژ ثابت ۶۵۷ انجام گرفت. برای الکتروفورز هر کاندیدا، سه ژل آماده سازی شد و در هر ستون ژل ۲۰mg از پروتئینهای سطحی استخراج شد.

رنگ آمیزی: بعد از الکتروفورز، هرکدام از سه سری ژل قارچ به طور جداگانه تحت رنگ آمیزی با نقره با استفاده از روش Chaffin و همکاران<sup>(CA)</sup>, Bio-Rad Laboratories, Hercules و با کوماسی بلو ۰/۱ درصد R-250 (CBB;Sigma) برطبق روش Lee و همکاران با مخلوطی از رنگ نقره

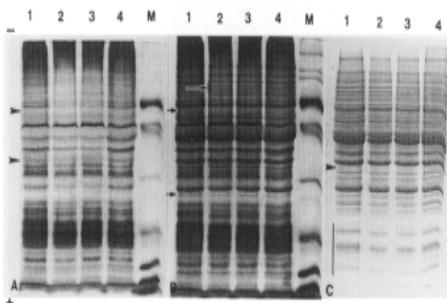
پروتئینهای دیواره سلولی به دلیل نقش چسبندگی شان حائز اهمیت هستند. این پروتئینها نقش در نگهداری ساختار و چسبندگی غیرمستقیم دارند. از پروتئینهای Vitronectin سطحی در دیواره قارچها می‌توان fibronectin binding proteins و Entactin و Laminin binding proteins و همچنین Protein-presumed protein binding proteins را اشاره کرد. پروتئین شوک حرارتی از پروتئینهای مهم در قارچها است که قادرند با اتصال و نگهداری از دیگر پروتئینهای مهم حیات سلولها را نجات دهند<sup>(۴-۳)</sup>. هدف از این کار تحقیقاتی، شناخت این پروتئین‌ها در قارچ‌های پاتوژن و استخراج، جداسازی و تعیین اجزای آنهاست.

## روش بررسی

جامعه و نمونه پژوهش، گونه‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا دابلینسیس بودند که با توجه به اینکه از گونه‌های استاندارد استفاده شد، نیازی به انجام نمونه گیری نبوده است و حجم نمونه در این تحقیق، گونه کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 562 و کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 6027 و کاندیدا دابلینسیس سویه CBS 7987 بوده است.

**کشت ارگانیسم:** ابتدا سلولهای مخمری سویه CBS 562 و سویه PTCC 6027 در محیط پایه نیتروژن(YNB) به همراه سه اسید امینه تریپتوفان و متیونین و هیستیدین کشت داده شد. سپس این دو سویه یکبار در(YNB) به همراه گالاکتوز ۰/۳ مolar بردند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار بادور ۱۵۰rpm قرار داده شد و با دیگر آنها در محیط YNB به همراه ۰/۱ مolar گلوکز و ۰/۳ مolar گالاکتوز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از یک شبانه روز در لوله‌های فالکن حاوی گالاکتوز +

-A ۵۶۲ پروتئین با وزن مولکولی پایین (شکل ۳۷ kDa) و همچنین در کاندیدا دابیلینیسیس سویه ۳-۷۹۸۷ پروتئین با وزن مولکولی ۵/۲۱ kDa (شکل A-۳) مشاهده شدند. در رنگ آمیزی ستون ۸۷ و ۶۵ و ۴۵ ایالیکنس سویه ۰۶۰۲۷ پروتئینهایی با وزن مولکولی ۸۰ و ۴۵ و ۲۷ kDa (شکل B-۱)، در کاندیدا آلبیکنس سویه ۵۶۲ پروتئینهایی با وزن مولکولی ۳۵ و ۴۰ و ۵۲ و ۳۵ kDa (شکل B-۲) و در کاندیدا دابیلینیسیس سویه ۷۹۸۷ پروتئینهایی با وزن مولکولی ۴۵ و ۴۷ و ۹۷ kDa (شکل ۳-A) مشاهده شدند. به نظر می‌رسد ۳-سنون ۳۰ و ۲۱ ایالیکنس سویه ۰۶۰۲۷ پروتئینهایی بجهود در ردبایی باندهای رنگ آمیزی مضاعف سبب شدند که تنها به فراوانی این پروتئینها سریعتر رنگ شدند. پروتئینهای اسیدی نسبت به سایر پروتئینها مربوط نمی‌باشد بلکه ممکن است به ساختمان پروتئین مرتبط باشد. پروتئینهای با وزن مولکولی بین ۳۰-۶۰ kDa بویژه پروتئینهای اسیدی با رنگ آمیزی نقره شناسایی نمی‌شوند. همچنین پروتئینهای بسیاری با رنگ آمیزی کوماسی به تنهایی ردبایی نمی‌شوند. اما ترکیب دو رنگ آمیزی به سبب افزایش باندهای پروتئین در ژل‌ها گشت. سه ژل با کوماسی بلو و نقره و با مخلوطی از هر دو رنگ (نقره و کوماسی بلو) رنگ آمیزی شدند. مقایسه پروتوكل رنگ آمیزی نشان داد که تشخیص باندهای موجود در هر نمونه بر اساس وزن مولکولی آنها ممکن باشد.



## شکل ۱: کاندیدا آلبیکنیس سویه ۶۰۲۷ PTCC

به همراه کوماسی بلو با استفاده از مشاهدات Joseba, Chaffin بر حاوی ۴۰٪ متابول و ۷٪ اسید استیک به مدت یک شبانه روز قرار گرفتند (۹-۵-۴).

پس از آن مراحل انتقال الکتروفورزی پروتئینها به کاغذ نیتروسلولزی انجام شد. سپس کاغذ با ۷/۳% شیرخشک در TBS به مدت ۲ ساعت مسدود شد و در TBS+۰.۰۵% Tween-20 شستشو داده شد. کاغذ با آنتی بادی مونوکلونال موش کلاس IgG-2a از انکوبه شد. از پروتئین شوک حرارتی (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada) ۷۰ در رقت ۱:۵۰۰ به عنوان شاهد استفاده شد. همچنین از کونژوگه پراکسیداز با Boehringer Anti-IgG (Mannheim, Biochemicals, Indianapolis, IN) به عنوان دومین آنتی بادی در رقت ۱:۱۰۰۰ استفاده شد(۸). از مارکر Bio-Rad استفاده شد(جهت تعیین موقعیت مارکر های پیوتبینه شده در غشای).

این مارکر از بالا به پایین بر حسب kDa به ترتیب شامل: میوزین با وزن مولکولی (۲۰۰) و بتا-گالاكتوزیداز (۱۱۶) و فسفوریلаз (۹۷/۴) و آلبومین سرم گاوی (۶۶/۲) او البومن (۴۵) و کربونیک انھیدراز (۳۱) و مهار کننده تر سیس: (۵/۲۱) است.

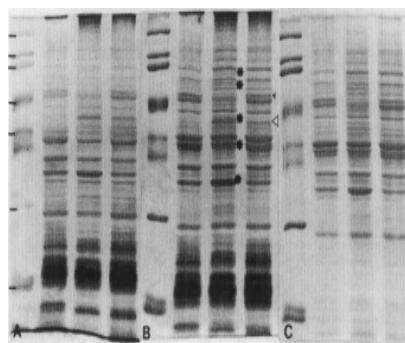
مافتھا

در رنگ آمیزی با کوماسی برلیانت بلو در کاندیدا آلبیکنس سویه PTCC 6027 پروتئینی با وزن مولکولی بالا حدود kDa ۶۶/۲ (شکل C-۱)، در کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 562 پروتئینی با وزن مولکولی بالا حدود kDa ۴۲ (شکل C-۲) در کاندیدا دابیلیسیس سویه CBS 7987 پروتئینی با وزن مولکولی بالا kDa (شکل B-۳)، در رنگ آمیزی نقره در کاندیدا آلبیکنس سویه 6027 پروتئین با وزن مولکولی پایین (شکل A-۱)، در کاندیدا آلبیکنس سویه ۵/۲۸ kDa (شکل A-۲)، در کاندیدا آلبیکنس سویه

بخش A: ژل رنگ آمیزی شده با نقره  
بخش B: ژل رنگ آمیزی شده با مخلوط دورنگ(نقره و کوماسی برلیانت بلو)  
بخش C: ژل رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو

آمیزی قوی باندها با مخلوط دورنگ(نقره و کوماسی برلیانت بلو) است.

پیکانهای بالای موجود در بخش A و C نشان دهنده رنگ آمیزی ضعیف باندها با استفاده از رنگ آمیزی تکی است. پیکان بالایی در بخش B بیانگر رنگ

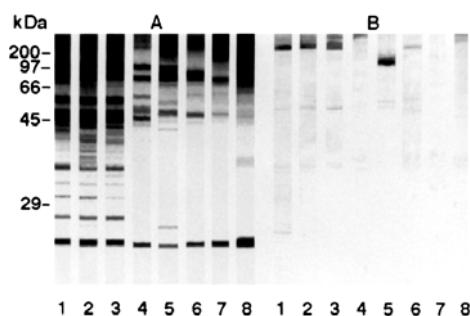


**شکل ۲: کاندیدا آلبیکنس سویه CBS 562**

بخش A: رنگ آمیزی با نقره      بخش B: مخلوطی از دو رنگ(نقره و کوماسی بلو)      بخش C: رنگ آمیزی با کوماسی بلو

ستون دوم در بخش B باندهای قوی تر با وزن مولکولی (KDa) ۳۵ و ۴۰ و ۵۲ مشخص است.

ستاره های موجود در شکل ۲ بیانگر ردیابی باندهای پروتئین است.



**شکل ۳: کاندیدا داپیلینسیس سویه CBS 7987**

بخش A: ستون ۱ و ۲ و ۳ رنگ آمیزی شده با مخلوطی از هر دو رنگ. ستون ۴ و ۵ و ۶ و ۷ و ۸ رنگ آمیزی با نقره

بخش B: همه ستون ها رنگ آمیزی شده با کوماسی برلیانت بلو

## بحث

نشان داد. نتایج تحقیقات Lee و همکاران (۱۹۷۵) با استفاده از این رنگ آمیزی، پروتئین با وزن مولکولی ۴۲ و ۴۳ kDa را در کاندیدا آلبیکنس سویه A3153 شناسایی کردند (۹). وجود پروتئین ۴۲ در

نتایج حاصل از این پژوهش در طی استفاده از رنگ آمیزی کوماسی بلو برای نشان دادن مقادیر و نوع پروتئین های موجود در قارچ کاندیدا، وجود پروتئین هایی با وزن مولکولی ۶۶، ۲۰۰/۴۲، ۲ kDa را

پروتئین ۹۷ و ۲۷ kDa در تحقیق Joseba, chaffin شناسایی نشدند که به نظر می‌رسد مربوط به اختلاف استرین باشد. همچنین روش رنگ آمیزی نقره و کوماسی برلیانت بلو تعداد پروتئینهای ریدیابی شده را افزایش می‌دهد. این افزایش به نظر می‌رسد از دو منبع گرفته شده است. پاک سازی رنگ از پروتئین‌های بازی و اسیدی در ژل مشابه ریدیابی شد. ثانیاً در رنگ آمیزی تکی نقاط رنگ کمتری گرفتند. ترکیب رنگ آمیزی نقره و کوماسی برلیانت بلو از پروتئین‌های دیواره سلولی دو مزیت دارد: ریدیابی پروتئین‌هایی که با رنگ آمیزی تکی مشاهده نشدند و افزایش ریدیابی پروتئین‌هایی که با رنگ آمیزی تکی دیده نشدند و افزایش ریدیابی پروتئین‌هایی که به طور ضعیف رنگ آمیزی شدند، می‌توان نتیجه گرفت که رنگ آمیزی اصلاح شده در شناسایی بهتر پروتئین‌های قارچی کمک می‌کند(۱۱-۱۲).

با بررسی‌های بیشتر بر روی پروتئینهای موجود و استفاده از سرم افراد مبتلا به کاندیدیازیس یا در کلنی‌های کاندیدا می‌توان به مکانیسم دقیق بیماری‌زنی و شاید راهکارهایی برای تولید واکسن ضد قارچی دست یافت(۱۳-۱۴).

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندها مقاله از مساعدت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت انجام این پژوهه تحقیقاتی کمال تشکر را دارند. همچنین از همکاران محترم در مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه و نیز از آقای دکتر حمید بدیلی به خاطر اهدای سوش قارچی کاندیدا دابلینیسیس از دانشگاه آمستردام سپاسگزاری می‌نمایند.

سویه‌های مورد استفاده این تحقیق و تحقیق Lee هم خوانی دارد، اما دو پروتئین ۶۶/۲ و ۲۰۰ در سویه CBS 562 و PTCC 6027 مشاهده شد که در تحقیق Lee گزارش نشده و این تفاوت به نظر می‌رسد که مربوط به تفاوت استرین‌ها باشد و بررسی با تهیه نمونه بیشتر ضروری به نظر می‌رسد. Casanova و همکاران(۱۹۹۱) با استفاده از کوماسی بلو پروتئینهایی با وزن مولکولی ۸۰ kDa تا ۱۴۰ ATCC 26555 مشاهده نمودند که با آلبیکنس سویه ۲۱/۵ تا ۲۵ kDa نتایج این تحقیق مطابقت دارد(۱۰).

همچنین نتایج به دست آمده از این تحقیق طی استفاده از رنگ آمیزی نقره وجود پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۸/۵ و ۳۷ kDa را نشان داد. نتایج Chaffin و همکاران(۱۹۹۸) با این رنگ آمیزی پروتئینهایی با وزن ۲۱/۵ تا ۲۵ kDa را کاندیدا آلبیکنس سویه ۴۴۸۰۷ و کاندیدا ATCC 3153 نشان دادند(۵).

وجود پروتئین ۲۱/۵ kDa در سویه‌های مورد استفاده این تحقیق و تحقیق Chaffin هم سویی دارد، اما دو پروتئین ۲۸/۵ و ۳۷ kDa در سویه CBS 562 و PTCC 6027 مشاهده نشده شدند که در تحقیق Chaffin شناسایی شدند.

این تفاوت نیز ممکن است مرتبط به اختلاف سویه‌های قارچی باشد. از سوی دیگر با استفاده از رنگ آمیزی مضاعف (مخلوطی از رنگ آمیزی نقره و کوماسی بلو) پروتئینهایی با وزن مولکولی ۲۷ و ۳۵ و ۴۰ و ۴۵ و ۵۲ و ۸۰ و ۹۷ kDa در کاندیدا آلبیکنس و دابلینیسیس مشاهده شد و این نتایج با نتایج Chaffin و همکاران(۱۹۹۸) که از این رنگ آمیزی استفاده نمودند همخوانی دارد، زیرا آنها نیز پروتئینهایی با وزن مولکولی ۳۵ و ۴۰ و ۴۵ و ۵۲ و ۸۰ kDa را در کاندیدا آلبیکنس نشان دادند(۵). اما دو

## منابع

1. Yazdanparast SA. Medical Mycology. Tehran: Jahad Daneshgahi; 2007: 206-7[Book in Persian].
2. Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991; 324(10): 654-62.
3. Moseley PL. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Applied Physiology* 1997; 83(5): 1413-7.
4. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J Mol Evol* 1994; 38(1): 1-17.
5. Chaffin WL, Lopez Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression . *Mol Biol Rev* 1998; 62(3): 130-80.
6. Casanova M, Chaffin WL. Cell wall Glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J Gen Microbiol* 1991; 137(5): 1045-51.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72(2): 248-54.
8. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(3): 680-5.
9. Lee KL, Buckley HR, Camobell CC. An amino acid liquid synthetic medium for development of mycelia and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1975; 13(2): 148-53.
10. Casanova M, Chaffin WL. Phosphate-containing proteins and glycoproteins of the cell wall of *candida albicans*. *Infect Immun* 1991; 59(3): 808-13.
11. De Moreno MR, Smith JF, Smith RV. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Anal Biochem* 1985; 151(2): 466-70.
12. Dzandu JK, Deh ME, Barraatt DL, Wise GE. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins, and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(6): 1733-7.
13. Cybulsk Zefiryn, krzeminska elzbieta, Majewski Przemyslaw. Enzyme Production and Biotypes of vaginal *Candida albicans*. *Pelish Journal of Microbiology* 2005; 54(3): 227-31.
14. Davis leigh E, Shields christen E, Merz William G. Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbial* 2005; 43(5): 2465-6.

# Examining Cell Wall Proteins In *Candida Albicans* And *Candida Dubliniensis* By Using Sodium Dodecyl Sulphate Gel Electrophoresis & Modified Staining Method

**Yazdanparast Seyed Amir<sup>1</sup>(PHD) - Mahdavi Nezarati Seyedeh Shahrzad<sup>2</sup>(MSc.)**  
**Heshmati Fariba<sup>3</sup>(MSc.) - Jahangiri Samira<sup>4</sup>(BSc.) - Zarei Zohreh<sup>4</sup>(BSc.)**

<sup>1</sup>Associate Professor in Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Master of Science in Microbiology, Medical Microbiology Department, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Master of Science in Microbiology, Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Bachelor of Science in Medical Laboratory, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

## Abstract

Received : Oct 2011  
Accepted : Jan 2012

**Background and Aim:** *Candida* species are among the most common causes of opportunistic fungal diseases. Among *Candida* species, *Candida albicans* is responsible for most infections. Having many strains, *C.albicans* is highly polymorph. *C. dubliniensis* is very similar to *albicans* species both morphologically and physiologically. For an infection to occur, cell wall proteins play an important role as they enable yeasts to adhere to host cells and begin pathogenesis. Therefore, we decided to extract these proteins and examine them through molecular methods of protein analysis. Finally we came up with the idea of a modified staining in our analysis.

**Materials and Methods:** Initially cell wall proteins of two *C. albicans* strains (CBS 562 & PTCC6027) and one *C. dubliniensis* strain (CBS 7987) were extracted by using a solution of beta-mercaptoethanol and ammonium carbonate. After dialysis, SDS gel electrophoresis was performed on the protein extract. Bands were then visualized by using three different staining methods among which one method was modified by us.

**Results:** By using Coomassie Brilliant Blue staining method, proteins with molecular weight of 42, 66.2 and 200 kDa were detected. By using Silver staining method, proteins with molecular weight of 21.5, 28.5 and 37 kDa were detected. However, using combined staining methods visualized more bands resulting improved detection.

**Conclusion:** To answer many questions about fungal diseases, fungi cell wall proteins are necessary to be examined. A simple method to enhance such molecular studies is the use of a modified staining method that combines both Coomassie Brilliant Blue and Silver staining.

**Key words:** *Candida Albicans*, *C.Dubliniensis*, Protein Extraction, SDS- PAGE