Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۶، شماره ۱، پائیز ۱۳۸۳

کلونینگ و توالی‌یابی بخشی از ژن فسفولیپاز B_2 در آسپرژیلوس فومیگاتوس

عبدالحسن کاظمی[*۱](Ph.D)، جفری رابسون[۲](Ph.D)، دیوید دنینگ[۲](M.D, Ph.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و ایمنی‌شناسی

۲- دانشگاه منچستر، دانشکده علوم حیاتی، گروه PME

چکیده

سابقه و هدف: کپک Mold پاتوژن آسپرژیلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigatus*) به‌عنوان یک میکروارگانیسم عامل انواع عفونت‌های ریوی به‌ویژه در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی و هم‌چنین آلرژن، آلوده کننده مواد غذایی، مولد میکوتوکسین (Mycotoxin) و در نتیجه عامل میکوتوکسیکوز (Mycotoxicosis) مورد توجه می‌باشد. قدرت تولید انواع فسفولیپازها و به‌ویژه فسفولیپاز (Phospholipase B ،PLB) از عوامل کلیدی در ویرولانس این قارچ بوده و کلونینگ و تعیین توالی ژن فسفولیپاز B_2 (PLB_2 ،Phospholipose B_2) جهت بررسی ویژگی‌های ژن سنتزکننده PLB_2 در این میکروارگانیسم و مقایسه خصوصیات ژن و فرآورده آن با ژن مشابه سایر میکروارگانیسم‌ها انجام گردید.

مواد و روش‌ها: DNA ژنومی آ. فومیگاتوس جدا شده از خلط یک بیمار مبتلا به آسپرژیلوزیس ریوی (Pulmonary aspergillosis)، استخراج و تلخیص شد و با استفاده از دژنراتیو PCR (Degenerate PCR)، یک قطعه اولیه از ژن plb_2 به طول ۵۴۲ bp به‌دست آمد. سپس با استفاده از PCR برگشتی (IPCR ،Inverse PCR)، قطعه طویل‌تری به طول ۱۱۷۵ bp به‌دست آمد. توالی نوکلئوتیدی قطعه ژن ثانوی، متعاقب استخراج از ژل، خالص‌سازی، پیوند به وکتور مناسب، ترانسفورماسیون و نهایتاً استخراج از سلول میزبان و تلخیص، تعیین و با تلفیق این توالی با توالی قطعه اولیه، سکوانسی به طول ۱۵۲۹ bp حاصل گردید.

یافته‌ها: آنالیز فرآورده PCR دژنراتیو اولیه و PCR برگشتی (IPCR) با بلاست X (BLASTX)، در سطح اسیدنوکلئیک، حداکثر ۶۲٪ هم‌سانی با توالی نوکلئوتیدی ژن لیزوفسفولیپاز ۱ (LPL_1) آسپرژیلوس اوریزه‌آ (*A. oryza*) و حداقل ۳۹٪ هم‌سانی با توالی نوکلئوتیدی ژن فسفولیپاز B (PLB) کریپتوکوکوس نئوفرمنس *Cryptococcus neoformans* را نشان داد.

نتیجه‌گیری: وجود ژن فسفولیپاز B_2 (PLB_2) در ژنوم آ. فومیگاتوس و مشابهت بسیار زیاد قطعه توالی‌یابی شده با ژن فسفولیپاز سایر میکروارگانیسم‌های دارای قرابت فیلوژنیک و یا فاقد قرابت فیلوژنیک با این قارچ نشان‌دهنده انتقال محافظه‌کارانه آن در مسیر تکاملی از ژنوم دودمانی و هم‌چنین نقش اساسی آن برای بیماری‌زایی میکروارگانیسم می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی حاصله می‌تواند برای کلون نمودن و تعیین توالی ژن کامل plb_2 و تعیین خصوصیات پروتئین (آنزیم) حاصل از ژن و در نهایت طراحی و سنتز واکسن و یا داروی مؤثر بر علیه میکروارگانیسم، مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس فومیگاتوس، ژن فسفولیپاز B_2، کلونینگ، توالی‌یابی

* نویسنده مسئول. تلفن: ۳۳۶۴۶۶۵-۰۴۱۱، نمابر: ۳۳۶۴۶۶۵-۰۴۱۱، E-mail: hassan5628@yahoo.com

www.SID.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۱۰/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۳/۱۷

Archive of SID

مقدمه

کپک‌های جنس آسپرژیلوس و به‌ویژه آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* عامل اتیولوژیک علایم بالینی وسیعی از عفونت‌های سطحی تا عمقی در نواحی آناتومیکی مختلف پیکر انسان و حیوان و به‌ویژه دستگاه تنفسی افراد دارای ضعف سیستم ایمنی بوده و همچنین از نظر آلودگی مواد غذایی، تولید میکوتوکسین‌ها و بروز میکوتوکسیکوز اولیه (Primary mycotoxicosis) و ثانویه (Secondary mycotoxicosis) نقشی منفی در زندگی جامعه بشری و از نظر تجزیه مواد مختلف در طبیعت و برگرداندن مواد ساده اولیه به چرخه گردش عناصر در طبیعت، نقشی مثبت را ایفا می‌نمایند [٧،١٧]. اهمیت کلینیکی آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) با توجه به افزایش موارد بیماری ناشی از این قارچ به‌ویژه به‌صورت حالات بالینی مهاجم ریوی در افراد HIV^+، بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی، مصرف‌کنندگان داروهای بیولوژیک، دریافت‌کنندگان عضو پیوندی و... و همچنین بروز مقاومت دارویی در این قارچ نسبت به داروهای ضدقارچی موجود، به شدت افزایش یافته است [٣،٤،٦]. یکی از عوامل اصلی در بیماری‌زایی این قارچ قدرت تولید و ترشح فسفولیپازهای گروه B می‌باشند [١،٢]، که در ایجاد آسیب‌های بافتی و تخریب غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های یوکاریوتی مورد تهاجم به شدت مؤثر می‌باشند؛ زیرا فسفولیپیدها در ساختمان غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های حیوانی سهم عمده‌ای دارند [١١،٢٦،٢٨] که در این مورد به وجود رگه‌های خون در خلط افراد مبتلا به آسپرژیلوس ریوی مهاجم به علت تخریب بافتی اشاره می‌شود [٥]. ترکیبات و اجزای حاصل از تأثیر فسفولیپازهای گروه B بر روی غشاء سیتوپلاسمی و تخریب غشاء، به‌عنوان ماده غذایی مورد استفاده میکروارگانیسم مهاجم قرار گرفته و همچنین به‌عنوان واسطه‌های شیمیایی و پیامبران ثانوی درون سلولی تعادل فیزیولوژیک سلول و بافت مورد تهاجم را مختل نموده [٨،٢٥] و به‌عنوان نمونه با تولید و فعال نمودن پروتئین‌کیناز C (Protein kinase C)، اینترلوکین‌ها و پروستاگلاندین‌ها و آراشیدونیک اسید، تنظیم متابولیکی سلول را به هم می‌زنند [٩،١٩،٢١،٢٩،٣١]. تحقیقات گسترده‌ای در مورد ایفای نقش مؤثر به‌وسیله فسفولیپازها در ویرولانس میکروارگانیسم‌هایی نظیر کریپتوکوکوس نئوفرمنس (*C. neoformans*)، کاندیدا آلبیکانس (*Candida albicans*) و سایر کاندیداها (Candida SP)، کلستریدیوم پرفرنژنس (*Clostridium perfringens*)، کلستریدیوم نویه (*C. novyi*) و کلستریدیوم سپتیکوم (*C. septicum*)، آنتامبا هیستولیتیکا (*Entamoeba histolitica*)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonase aeruginosa*)، جنس میکوباکتریوم (Mycobacterium SP)، باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) و مالاسزیا فورفور (*Malassezia furfur*) [١٢،١٤،١٥،١٦،١٨،٢٢،٢٣] نیز بر اهمیت این آنزیم‌ها صحه گذاشته و همچنین استفاده از این آنزیم‌ها برای تهیه واکسن و یا شاخص‌های آزمایشگاهی تشخیص عفونت نیز مورد توجه واقع شده است [١٩،١٣،٣٢].

مواد و روش‌ها

DNA ژنومی آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* از کلنی‌های حاصل از کشت خلط یک بیمار مبتلا به آسپرژیلوس ریوی مهاجم با استفاده از روش پایه ریدر و برود (Reader and Brode) [٢٩] با اندکی اصلاح، استخراج گردید. برای این منظور میسلیوم‌های قارچی پس از آسیاب شدن در نیتروژن مایع، به‌مدت ٢٠ دقیقه در حرارت ٦٥° C با حجم مساوی از بافر استخراج DNA، مخلوط شده و سپس با افزودن حجم مساوی از کلروفرم و ایزومیل الکل (نسبت ٢٤:١) به مدت ٣٠ دقیقه در میان یخ قرار داده شد. مخلوط فوق به مدت ٣٠ دقیقه در ١٢٠٠٠ xg و در حرارت ٤° C سانتریفوژ شده، لایه بالایی به لوله استریل جدید منتقل و با استفاده از حجم مساوی ایزوپروپانول و سانتریفوژ به‌مدت ده دقیقه در ٤٠٠٠xg، DNA ژنومی رسوب داده شده و درنهایت با شستشو به‌وسیله اتانول ٧٠٪ و حل نمودن رسوب

www.SID.ir

Archive of SID

DNA در ddH2O و افزودن RNAase A، ماده ژنتیکی حاصله برای مصارف آتی در C ۲۰°- نگه‌داری گردید. به عنوان نمونه شاهد مثبت، DNA ژنومی کاندیدا آلبیکانس C. albicans نیز به روش فوق تهیه و ذخیره گردید. لازم به ذکر است که نمونه بالینی مورد استفاده با شماره ۹۰۲۵۴ در American type culture collection (ATCC) ثبت و ذخیره شده است.

– **دژنراتیو PCR**. با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی محفوظ برای ژن *plb* در ژنوم کاندیدا آلبیکانس (*C. albicans*)، کریپتوکوکوس نئوفورمنس (*C. neoformanse*)، ساکارومایسس سرویسیه (*Saccharomyces cereviciae*) و پنسیلیوم کرایزوژنوم (*Penicillium chrysogenum*)، پرایمرهای DBF و DBP برای تکثیر یك قطعه تخمینی به طول ۵۵۰bp طراحی شد. تکثیر قطعه مورد نظر با تکنیك PCR دژنراتیو از DNA ژنومی در میکروارگانیسم هدف و شاهد در ترموسایکلر با شرایط ۳ دقیقه در C ۹۴° برای یك سیکل، یك دقیقه در ۹۴°C، یك دقیقه در C ۴۸° و ۹۰ ثانیه در C ۷۲° برای ۲۹ سیکل و درنهایت یك دقیقه در C ۹۴°، یك دقیقه در C ۴۸° و هفت دقیقه در C ۷۲° برای یك سیکل با موفقیت انجام گردید و فرآورده PCR در ژل آگارز الکتروفورز تهیه شده با بافر TBE و با استفاده از اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) رنگ‌آمیزی و آنالیز شده و از باند حاصله تصویر تهیه گردید. پرایمرهای مورد استفاده برای PCR دژنراتیو عبارت بودند از:

Forward primer:
5' GAY GGI GGI GAR GAY AAY CAR AA 3'
Reverse primer:
5' AYI GTI CCR TTC CAR CAR TA 3'
(Y=CT, R=AG, I=Inosin)

– **کمیت‌سنجی DNA**. کمیت‌سنجی DNA ژنومی استخراج شده از آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* و شاهد مثبت با استفاده از دو تکنیك [۱- مقایسه غلظت DNA رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورز با غلظت DNA استاندارد (DNA شاخص GIBCO BRL, 1kb)، ۲- غلظت‌سنجی DNA در محلول تهیه شده با استفاده از ۱=۲۶۰ OD در اسپکتروفتومتر] انجام پذیرفت.

– **کلونینگ و تعیین توالی اولیه**. مقدار کافی (۵۰ul) از فرآورده PCR در ژل الکتروفورز تهیه شده با بافر TAE آنالیز شده و بعد از برش باند مورد نظر از روی ژل، باند حاصله از ژل، استخراج و تلخیص گردید (QIA quick gel extraction kit). باند ۵۵۰ bp استخراج شده به وکتور pGEMT-Easy vector پیوند زده شده و سپس به سلول میزبان (E.coli Top 10 F') ترانسفورم گردید. غربال‌گری کلنی‌های آبی ـ سفید در محیط کشت LB حاوی ۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندول-بتا-دی-گالاکتوپیرانوزید (X-gal) و ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاتوپیرانوزید (IPTG) انجام شده و پس از انتخاب ۱۲ کلنی حاوی وکتور ترانسفورم شده، کلنی‌های حاصله در محیط LB (Luria-Burtani) مایع، کشت داده شده و سپس با وکتور حاوی قطعه PCR از مجموعه باکتری‌های تك‌تك محیط‌های LB مایع با انجام لیز سلولی و مراحل بعدی آن جدا گردید. برش قطعه PCR از ناحیه Multi cloning site (MCS) وکتور با استفاده از اندونوکلئاز محدودالاثر *Eco*RI انجام گرفته و پس از تأثیر دو ساعته آنزیم فوق در C ۳۷° بر روی وکتور، فرآورده حاصله در ژل آگاروز حاوی بافر TAE آنالیز گشته و باند مورد نظر با برش از ژل و انجام مراحل مربوط به تلخیص قطعه DNA از ژل، به‌صورت خالص به‌دست آمد. برای انجام مراحل مربوط به تعیین توالی باند هدف، PCR مجدد با استفاده از پلاسمید M13 و پرایمرهای MBR و MBF (Amersham Pharmacia. uk) در ترموسایکلر و با شرایط C ۹۶° به‌مدت چهار دقیقه برای یك سیکل، C ۹۶° به مدت ۳۰ ثانیه، C ۵۰° به مدت ۱۵ ثانیه، C ۶۰° به مدت چهار دقیقه برای ۲۵ سیکل انجام گردید و تعیین توالی نوکلئوتیدها در فرآورده نهایی PCR با استفاده از تکنیك ABI اتوماتیك انجام شد و توالی قطعه‌ای از ژن plb_2

www.SID.ir

Archive of SID

آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* به طول ۵۴۲ bp به‌دست آمد (شکل ۱).

پرایمرهای MBR و MBF مورد استفاده برای پلاسمید M13 عبارت بودند از:

Forward primer:
5' GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA 3'
Reverse Primer:
5' TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC 3'

```
1   gatgggggggg aggataacca gaacatcccg ctcgatcccc ttcttcagcc ccaacgtcac
61  gttgacgtga ttttggctgt cgactcgtca gcggacacga ctaccaggtg gcccaatggg
121acatccctgg tcgccacata cgagcgaaac gtagactcat cacaaaggaa cagtagtctc
181ccctttccgt ctgtgcctga ccaaaacaca ttcgtcaacc tggggttgaa caaccgtccg
241acattctttg gctgcaatag ttcaaacgcg actggcgccc cgcttgtcgt ttatattcca
301aacgccccgt atatataccc gtccaatgtg tccacattcg atctgcaata caatactagt
361gagcgcaacg ccatcattga gaatgggtac gatgtggcaa cactgggaaa tgggacagtg
421gactctaact ggccggcttg tctggcttgc gcgatattga gtcggagttt tgaacgcaca
481aatacgactg tcccaaagac ctgctcgacg tgtttcaaga cgtattgctg gaacggcacc
541gt
```

شکل ۱. توالی قطعه‌ای از ژن plb_2 حاصل از PCR دژنراتیو. کل توالی، ۵۴۲ bp می‌باشد.

– **ساترن بلاتینگ.** به منظور تأیید وجود ژن PLB_2 در آسپرژیلوس فومیکاتوس *A. fumigatus*، بررسی تعداد کپی ژن در ژنوم و هم‌چنین تخمین اندازه مناسب قطعه ژنومی برای کلونینگ و تعیین توالی در مرحله بعدی، DNA ژنومی با سریالی از اندونوکلئازهای محدودالاثر شامل *Apa* I، *Brf* I، *Bji* I، *Kpn* I، *Sal* I، *Xba* I و *Xho* I هضم و ساترن بلاتینگ (لکه‌گذاری ساترن) Southern blotting با استفاده از پروب DNA نشان‌دار شده با دیگوکسی‌جنین Digoxigenin (DIG) انجام و قطعات DNA حاوی تمام یا قسمتی از ژن plb_2 به‌ترتیب به طول‌های تخمینی ۹/۶ kb، ۱۱/۲kb، ۶/۱ kb، ۱۰/۱ kb، ۳ kb، ۵/۷ kb و ۲/۲ kb در شرایط بحرانی شناسایی گردید. با توجه به نتایج ساترن بلاتینگ، فقط وجود یک نسخه از ژن plb_2 در ژنوم آسپرژیلوس فومیکاتوس *A. fumigatus* شناسایی شد.

– **کلونینگ و توالی‌یابی ثانویه.** برای کلونینگ و توالی‌یابی طول بیش‌تری از ژن plb_2، دو تکنیک پایه ذیل مورد استفاده قرار گرفت:

۱– غربالگری گنجینه ژنی دارای اندازه محدود Size limited library screening یا غربالگری کلنی Colony screening

۲– استفاده از PCR برگشتی Inverse PCR (IPCR) که علی‌رغم شناسایی چند کلنی بالقوه مثبت از نظر وجود ژن مورد نظر در کلنی‌ها با تکنیک غربالگری کلنی، با عنایت به پیشرفت مطلوب‌تر مراحل آزمایشگاهی با استفاده از تکنیک IPCR، این تکنیک به منظور جداسازی و تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن plb_2 مورد استفاده قرار گرفت و برای این منظور DNA ژنومی هضم شده با اندونوکلئاز محدودالاثر *Xho* I به طول ۲/۲ kb که دربردارنده طولی نامشخص از ژن plb_2 بود، انتخاب و برای مراحل بعدی جستجوی توالی نوکلئوتیدها مورد استفاده قرار گرفت.

قطعه ۲/۲ kb خطی فوق الذکر ابتدا تحت تأثیر آنزیم DNA لیگاز T4 (T4 DNA Ligase) به یک قطعه DNA حلقوی تبدیل شده و موفقیت این مرحله از آزمایش، ارزیابی گردید. با طراحی پرایمرهای اختصاصی IB2F و IB2R جهت انجام IPCR، تکثیر DNA حلقوی حاوی طول نامشخص از ژن plb_2 در ترموسیکلر با شرایط ۳ دقیقه در ۹۴°C برای یک سیکل، یک دقیقه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۶۵°C و سه دقیقه در ۷۰°C برای ۱۰ سیکل، یک دقیقه در ۹۴°C، یک دقیقه در۶۵°C، سه دقیقه+پنج ثانیه اضافی به ازای انجام هر سیکل در ۷۰°C برای ۲۴ سیکل، یک دقیقه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۶۵°C و هفت دقیقه در ۷۰°C یک

www.SID.ir

Archive of SID

سیکل انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده برای PCR برگشتی (IPCR) عبارت بودند از:

Forward primer:
5' CTG GTA GTC GTG TCC GCT GAC GAG TCG AC 3'
Reverse primer:
5' TGA GAA TGG GTA CGA TGT GGC AAC ACT GGG 3'

توالی نوکلئوتیدها در فرآورده حاصل از IPCR با انجام مجدد موفقیت‌آمیز مراحل مشروحه در قسمت کلونینگ و توالی‌یابی اولیه، شناسایی شد؛ که شامل قطعه‌ای از ژن *plb*$_2$ آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* به طول ۱۱۷۵bp بود.

نتایج

از تلفیق توالی ۱۱۷۵ bp حاصل از IPCR با توالی قطعه ژن حاصل از PCR اولیه (۵۴۲ bp)، سکوانسی به طول ۱۵۲۹bp حاصل شد (شکل ۲)، که در بردارنده قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ژن *plb*$_2$ در آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* می‌باشد. توالی نوکلئوتید ژن *plb*$_2$ آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در سایر میکروارگانیسم ها نشان می دهد. جستجوی بانک‌های اطلاعاتی ژنوم در وب Web با استفاده از نرم افزار کامپیوتری بیوانفورماتیکی BLASTX به آدرس‌های اینترنتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ و http://blast.genome.ad.jp/ همسانی ژن plb$_2$ آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* با ژن لیزوفسفولیپاز یك lpl1 آسپرژیلوس اوریزهآ *A. oryzae* به میزان حداکثر ۶۲٪ و با ژن فسفولیپاز B *plb* کریپتوکوکوس نئوفرمنس *C. neoformans* به میزان حداقل ۳۹٪ و مقادیر مابین این دو را برای سایر میکروارگانیسم‌ها در سطح اسید نوکلئیك نشان می‌دهد (جدول ۱ و شکل ۳)

جدول ۱. درصد تطابق توالی ژن *plb*$_2$ آسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* با توالی ژن‌های *plb* منتشر شده قارچ‌ها

Species	Classification	% Identity with partial afplb2
Aspergillus oryzae LPL1 AX112082.1	Ascomycota	%۶۲
Aspergillus oryzae LPL2 AX112084.1	Ascomycota	%۵۹
Aspergillus niger LPL1 AX112078.1	Ascomycota	%۶۰
Aspergillus niger LPL2 AX112080.1	Ascomycota	%۵۹
Penicillium chrysogenum LPL P39457	Ascomycete	%۶۰
Neurospora crassa LPL AF045574	Ascomycete	%۵۱
Torulaspora delbrueckii LPL Q11121	Ascomycete	%۴۸
Kluyveromyces lactis PLB AB014495	Ascomycete	%۴۶
Saccharomyces cerevisiae PLB1 S533037	Ascomycete	%۴۴
Saccharomyces cerevisiae PLB2 S53035	Ascomycete	%۴۴
Candida albicans PLB1 BAA36162	Ascomycete	%۴۳
Candida albicans PLB2 AAC72296	Ascomycete	%۴۱
Cryptococus neoformans PLB AAF61964.1	Basidiomycete	%۳۹

www.SID.ir

Archive of SID

قطعه توالی‌یابی شده به طول ١٥٢٩ bp، دربردارنده قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ژن plb_2 آ. فومیگاتوس *A. fumigatus* از انتهای 3' ژن plb_2 می‌باشد.

```
1       GATGGGGGGGAGGATAACCAGAACATCCCGCTCGATCCCCTTCTTCAGCCCCAACGTCAC
61      GTTGACGTGATTTTGGCTGTCGACTCGTCAGCGGACACGACTACCAGGTGGCCCAATGGG
121     ACATCCCTGGTCGCCACATACGAGCGAAACGTAGACTCATCACAAAGGAACAGTAGTCTC
181     CCCTTTCCGTCTGTGCCTGACCAAAACACATTCGTCAACCTGGGGTTGAACAACCGTCCG
241     ACATTCTTTGGCTGCAATAGTTCAAACGCGACTGGCGCCCCGCTTGTCGTTTATATTCCA
301     AACGCCCCGTATATATACCCGTCCAATGTGTCCACATTCGATCTGCAATACAATACTAGT
361     GAGCGCAACGCCATCATTGAGAATGGGTACGATGTGGCAACACTGGGAAATGGGACAGTG
421     GACTCTAACTGGCCGGCTTGTCTGGCTTGCGCGATATTGAGTCGGAGTTTTGAACGCACA
481     AATACGACTGTCCCAAAGACCTGCTCGACGTGTTTCAAGACGTACTGTTGGAATGGTACC
541     ATAAATGCAACGACTCCCGGGGATTATTATCCGACGCTGAAGCTGCACTAGGTGCGGAGA
601     TGACAGTAGGACAGTGGACCTGGGGCACAGGAAATCGCAATAGTTTAGTCAATGTTTGAT
661     TGATGAGTTCCGCGTTTTTACTGAAAATGAATGCTGAGAATGGTTATTCTGCGCCAGTAA
721     GTGGACAAAGAGGAATATGTGGTACGTTGACTGTCCCGAATTGTGTGGACTTGATATGAC
781     ACCGTCGGTGATTGATATCTTGGGTCCCTTGGTCTTTGACGGGACGATTGATACTTGGTG
841     AGGGCATTGAAATTCACGCACCTGCTTACTTGCATATGGAAACGAGGGTAACGCTACAGA
901     TTATCATGCGGGTGTAATTGGTTATATAGTTTCACAAATTAAGCTACATATAGCGGTCCC
961     TCTCAGATACAGCTCTGCGGCTATACTCCTTCACCAGCACCTATTTTTCCTTAGATTGTG
1021    TCTTCTCCTTACGCAGGGTCAAATAGTCACCAACAGACCCATCACCGCGGATAAACTCCC
1081    ACTTAACCTCCTTCTCACTCAGCACAGTAAGCTTACTGATACCAAAGTGCGTGGTGTCCA
1141    GCAAAGCAGTGATATTCTGGAGGCCCTGGCCCTTGCCGAACTCACTGTGGCTCTCAATGT
1201    TACCAGCCATTCCGTTGATGATGTGGGTGATGGATTTGCCCGGGTTGGTGCGGTAGGTGT
1261    GATTGTTGACAATCGACGCCGAATCGATGGTGCCGTTGGCGCCGAGGGGATACAGGCGCT
1321    CGTACCAGTGGATGTGACTGCATCAGTTAGTATCTGCGTTCCCGGCGAAGGAAACATGCA
1381    CCATACCCAGAGAGATAAGCATCAACACCGAACTGCAGGAACAATCGCTCGAACGCAGCA
1441    CGGAGGTTCTTCTGGTAGCTCGAGTACGCGGAGCTGTACATGGGCCGGTGGCTCATGACA
1501    AACACCCAGGGGGTCTTCTTGCGGTCGAC
```

شکل ٢. توالی قطعه‌ای از ژن plb_2 بعد از تلفیق قطعه حاصل از PCR دژنراتیو و قطعه حاصل از IPCR انجام شده بر روی فرآورده ناشی از اثر *Xho* I بر DNA ژنومی. توالی فوق از تلفیق دو قطعه با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری CAP به‌دست آمده است. کل توالی ١٥٢٩ bp می‌باشد.

```
A.fumigatus PLB1      1 ------------------------------LEYLGTKFNGGSVPSNESCVRGFDNVGFVM
C.albicans PLB1     260 LNSTVIELTPYEFGSWDP-----SLNEFVDTRYLGTKLDNGRPTG--KCYNGFDNAGFFM
C.albicans PLB2     258 FNSTVFELTPYEVGSWDP-----SLRSFVDTKYIGTRLDDGAPVSK-RCVNGFDNAGFFM
A.oryzae LLPL2      296 SNATVYEFNPWEFGTFDP-----TVYGFVPLEYVGSKFDGGSIPDNETCVRGFDNAGFVM
P.chrysogenum PLB   238 SNSTVYEFN WEFGTFDP- ---TIFGFVPLEYLGSKFE GSLPSNESC RGFDSAGFV
A.niger LLPL1       293 SNSTVYEFNPWEFGSFDP-----SIFGFAPLEYLGSYFENGEVPSSRSCVRGFDNAGFVM
A.niger LLPL2       295 TNATVYEVNPWEFGSFDP-----SVYAFAPLQYLGSRFENGSIFDNGTCVSGFDNAGFIM
A.oryzae LLPL1      280 SNSTVYEFNPWEFGSFDP-----SVYGFAPLEYLGSNFENGELPKGESCVRGFDNAGFVM
N.crassa LPL        270 LNATNYEFNPFETGSWDP-----TVYGFAPTKYLGANFSNGVIPSGGKCVEGLDQAGFVM
C.neoformans PLB    268 ENATVWEFTPYEFGSWAFGSQYKSPGAFTPIEYLGTSVDDGSPNG--TCWKGFDQLSFVM
consensus           301  . ..............     ..... ...*.*.....* ..   .*..*.*...*..

A.fumigatus PLB1     31 GTSSTLFNQFLLQINSTALPDWLKSVFTDILKDIGEN--DEDIAQYAPNPFYHFSNTTNP
C.albicans PLB1     313 GTSSALFNEAVLSITEANIPSFLKDIIDDILVDPILK-SNIDVSAYNPNPFFKSSGSNTA
C.albicans PLB2     312 GTSSSLFNIVLQQLNNMPIPPFLKELISKFTLDPVEK-LNIDIAQYNPNPFHKSNNSDTK
A.oryzae LLPL2      351 GTSSSLFNQFFLQVNSTSLPDFLKTAFSDILAKIGEE--DEDIAVYAPNPFYNWAPVSSP
P.chrysogenum PLB   288 GTSSSLFNQ LLQINTTSL SFIKDVFNG LFDLDKS-- NDIASYDPN FYKYNEHSS
A.niger LLPL1       348 GTSSSLFNQFILKLNTTDIPSTLKTVIASILEELGDR--NDDIAIYSPNPFYGYRNATVS
A.niger LLPL2       350 GSSSTLFNQFLLQINSTSIPTILKDAFTDILEDLGER--NDDIAVYSPNPFSGYRDSSED
A.oryzae LLPL1      335 GTSSSLFNQFILRLNGTDIPNFLKEAIADVLEHLGEN--DEDIAVYAPNPFYKYRNSTAA
N.crassa LPL        325 GTSSTLFNQFLLANISSYDGVARRAHRSRDFCPQGNRRQEDDVSQIIPNPFLDWNNRTNP
C.neoformans PLB    326 GTSATLFNGAFLELNGTDSG-LLTNLITAFLADLGED--QADISRIP-NSFSNYNSGENP
consensus           361 *.*..***.... .... .. ... ..... ..... ..*.. . .*.*. . ...

A.fumigatus PLB1     89 SAAELELDLVDGGEDLQNIPLHPLIQPERHVDVIFAVDSSADTTYSWPNGTALVATYERS
C.albicans PLB1     372 ISQSKNLYLVDGGEDGQNIPISPLLH--RNVSAIFAFDNSNDVLN-WPDGTSLVKTYERQ
C.albicans PLB2     371 IAQSRTLYLADGGEDGQNVPLLPLIH--RKVSAIFAFDQSADKNN-WPDGSALIKTFERQ
A.oryzae LLPL2      409 AAHQQELDMVDGGEDLQNIPLHPLIQPERHVDVIFAVDSSADTTYSWPNGTALVATYERS
P.chrysogenum PLB   340 YAAQKLLD VDGGEDGQNV LHPLIQPER VDVIFAVD SADTDYFWPN TSLVATYFR
A.niger LLPL1       406 YEKTPDLNVVDGGEDKQNLPLHPLIQPARNVDVIFAVDSSASTSDNWPNGSPLVATYERS
A.niger LLPL2       408 YATAKDLDVVDGGEDGENIPLHPLIQPERAVDVIFAIDSSADTDYYWPNGTSLVATYERS
A.oryzae LLPL1      393 YSSTPELDVVDGGEDGQNVPLHPLIQPTHNVDVIFAVDSSADTDHSWPNGSSLIYTYERS
N.crassa LPL        385 NADTLELDLVDGGEDLQNIPLNPLTQPVRAVDVIFAVDSSADVTN-WPNGTALRATYERT
C.neoformans PLB    382 IYNLTYITLVDAGETNQNIPLEPLLVPTRDVDAIVAFDSSYDSDYIWPNGTALRTTYERA
consensus           421  . . .....*.**. .*....**... . **.*.*.*.*.*..  **....*..*.**.
```

www.SID.ir

Archive of SID

```
A.fumigatus PLB1    149 LNSSG-IANGTSFPAIPDQNTFVNKGLNTRPTFFGCNNSNTTGPS------PLIVYLPNY
C.albicans PLB1     429 FSSQ---GNGIAFPYVPDQYTFRNLNLTSKPTFFGCDAKNLTSLTNDIYDVPLVIYLANR
C.albicans PLB2     428 FSSQ---GDGIAFPYVPDQNTFRNTNLTSKPTFFGCDAQNLTSLTENIYDVPVVIYLANR
A.oryzae LLPL2      469 LNSTG-IANGTSFPAIPDQNTFVNNGLNTRPTFFGCNSTNTTGPT------PLVVYLPNY
P.chrysogenum PLB   394 LNSSG-IAN TAFPAVPDQ TFINLGLST PSFFGCDSS QTGPS---- -PLVVYIPN
A.niger LLPL1       466 LNSTG-IGNGTAFPSIPDKSTFINLGLNTRPTFFGCNSSNITGHA------PLVVYLPNY
A.niger LLPL2       468 LEPS--IANGTAFPAVPDQNTFVNLGLNSRPTFFGCDPKNISGTA------PLVIYLPNS
A.oryzae LLPL1      453 LNTTG-IANGTSFPAVPDVNTFLNLGLNKRPTFFGCNSSNTSTPT------PLIVYLPNA
N.crassa LPL        444 FGSI---SNGTLFPSIPDDWTFINLGLNNRPSFFGCDVKNFTLNAN-QKVPPLIVYVPNA
C.neoformans PLB    442 KILAEHENTRVLMPEVPSMNGFVNGGYNSRPTFFGCN----DTTT------PVIIYIPSY
consensus           481 . ..  ..... .. .*....*.*......*.****. .. .. .      *...*...

A.fumigatus PLB1    202 PYTAYSNFSTFQPDYTEQERDSTILNGYDVVTMGNSTRD--GNWSTCVGCAILSRSLERT
C.albicans PLB1     486 PFTYWSNTSTFKLTYDDNERQGMISNGFEIATRSSGSLD--DEWAACVGCAIIRREQERQ
C.albicans PLB2     485 PFTYFSNISTFKLKYSDTERQGMISNGYDVASRLNGKLD--NEWAACVGCAIIRREQERL
A.oryzae LLPL2      522 PYVSYSNWSTFQPSYEISERDDTIRNGYDVVTMGNSTRD--GNWTTCVGCAILSRSFERT
P.chrysogenum PLB   42  PYSYHSNIS FQLSTDDAE DNIILNGYE ATMANSTLD -DNWTACVA AILSRSFER
A.niger LLPL1       519 PYTTLSNKSTFQLKYEILERDEMITNGWNVVTMGNGSRKSYEDWPTCAGCAILSRSFDRT
A.niger LLPL2       520 PYTYDSNFSTFKLTYSDEERDSVITNGWNVVTRGNGTVD--DNFPSCVACAILQALHYRT
A.oryzae LLPL1      506 PYTAESNTSTFQLAYKDQQRDDIILNGYNVVTQGNASAD--ANWPSCVGCAILQRSTERT
N.crassa LPL        500 PYTALSNVSTFDPSYTMSQRNDIIGNGWNSATQGNGTLDS--EWPTCVACAVISRSLDRL
C.neoformans PLB    492 PWSFAANTSTYQLSYENNEANEMLLNGMRSLTLNHSVPT----WPTCFACALTDRSFMYT
consensus           541 *.. ..* *........ ..... **. ... .... .   ....*...*.. .. ...

A.fumigatus PLB1    260 NTNVPEICKQCFQRYCWNGTVNSTTPAGYEPVTILDS--AASGIIPSISTVAMAVVFAAW
C.albicans PLB1     544 GIEQTEQCKRCFENYCWDGTIYKGEPLGENFSDDGLTNSATEYNSNNVAGFNDGGTSILK
C.albicans PLB2     543 GIEQTEQCKKCFENYCWDGTIYKGEPLGDNFSDEGLTTSAAYYNSNNVAGINDGGIALVK
A.oryzae LLPL2      580 NTQVPDACTQCFQKYCWDGTTNSTNPADYEPVTLLEDS-AGSALSPAVITTIVATSAALF
P.chrysogenum PLB   495 GTTLPDICS CFDRYCWNG VNSTRPESY PAFYLADNS ASVSLPTML TVVAAGLAM
A.niger LLPL1       579 NTQVPDMCSQCFDKYCWDGTRNSTTPAAYEPKVLMASAGVRGISMSRLVLGLFPVVVGVW
A.niger LLPL2       578 NTSLPDICTTCFNDYCWNGTTNSTTPGAYEPSVLIATSGAIKSVLDYSVLALAMGVAAFM
A.oryzae LLPL1      564 NTKLPDICNTCFKNYCWDGKTNSTTPAPYEPELLMEASTSGASKDQLNRTAAVIAFAVMF
N.crassa LPL        558 GRQTPAACKTCFERYCWNGTVNSKDTGVYMPEFKIADAHALDSGAVAIGKMVNVWSSVVV
C.neoformans PLB    548 SENRSTTCQECFDTWCWAGDDNTTEPANYEPVINSVPPWLIANNLSIGMADAPGSNESTA
consensus           601 ..... *  **. .**... ..... .. . .      ..    .. ...

A.fumigatus PLB1    318 TIF-------------------------
C.albicans PLB1     604 KA-------------------------
C.albicans PLB2     603 RDDLSN-----------------------
A.oryzae LLPL2      639 TLL-------------------------
P.chrysogenum PLB   549  ILV------ --------- ------
A.niger LLPL1       639 MM-------------------------
A.niger LLPL2       638 L--------------------------
A.oryzae LLPL1      624 FMTI-----------------------
N.crassa LPL        618 GVVAATLLL------------------
C.neoformans PLB    608 GTASSGAAKMGVGMGMVALTAGLGLML
consensus           661
```

شکل ۳. مقایسه هم‌سانی قطعه‌ای از ژن plb_2 آ. فومیگاتوس *A. fumigatus* با plb_1 و plb_2 و lpl منتشر شده سایر قارچ‌ها در سطح اسید آمینه با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری بیوانفورماتیکی به آدرس‌های اینترنتی:

http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html و http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html

بحث و نتیجه‌گیری

تلفیق توالی قطعه ۵۴۲ bp حاصل از PCR اولیه با قطعه ۱۱۷۵ bp حاصل از IPCR با شناسایی و مشخص نمودن توالی نوکلئوتیدهای ویژه آندونوکلئاز محدودالاثر *Xho* I پرایمرهای مربوط به PCR دژنراتیو و IPCR در توالی هر دو قطعه، توجه به جهت 5' →3' توالی‌های هر دو مرحله و درنهایت حذف ردیف‌های تکراری از نوکلئوتیدها مقدور گردید و در نتیجه از جمع جبری ۱۷۱۷ bp نوکلئوتید حاصل از دو مرحله، ۱۵۲۹ bp باقی‌ماند و ۱۸۸ bp حذف شد.

مقایسه هم‌سانی مابین توالی نوکلئوتیدهای بخشی از ژن plb_2 آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) با ژن مشابه در سایر میکروارگانیسم‌ها، نشانه هم‌سانی بسیار بالای توالی اسیدهای نوکلئیک این ژن با ژن *plb* و هم‌چنین ژن لیزوفسفولیپاز در میکروارگانیسم‌هایی است که توالی ژنتیکی این ژن‌ها در آن میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده است. مطابق استانداردهای محافل علمی و بانک‌های اطلاعات ژنومی، هم‌سانی توالی اسیدهای نوکلئیک مابین دو ژن در حد ۲۵٪، مشابهت زیاد High identity و نشانه قرابت فیلوژنیک،

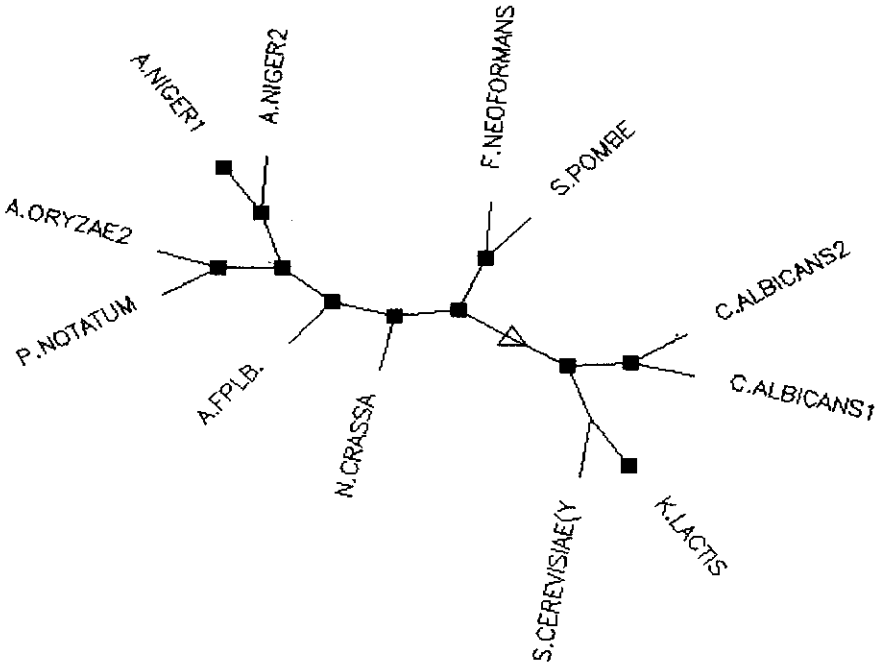
www.SID.ir

Archive of SID

قلمداد می‌شود و بدین جهت هم‌سانی حداکثر ۶۲٪ بخشی از ژن plb_2 آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) با ژن LPL1 آسپرژیلوس اوریزهآ *A. oryzae* نشان‌دهنده قرابت فیلوژنیك بسیار زیاد مابین این دو میکروارگانیسم در میراث ژنومی و انتقال کاملاً محافظه‌کارانه گنجینه ژنی در طول مسیر تکاملی موجودات زنده در بین گونه‌های مختلف جنس آسپرژیلوس Aspergillus SP. می‌باشد؛ هم‌چنان‌که حداقل هم‌سانی ۳۹٪ مابین ژن PLB قارچ مخمری کریپتوکوکوس نئوفرمنس *C. neoformans* نیز از استاندارد تشابه ۲۵٪ بسیار زیادتر بوده و می‌تواند نشان‌دهنده این امر باشد که در مسیر تکاملی سلسله قارچ‌ها، انتقال میراث ژنی به‌نحو بسیار محافظه‌کارانه‌ای در مورد ژن‌های دارای نقش اساسی در ساختار حیاتی و ژنتیکی این میکروارگانیسم‌ها، انجام گرفته است زیرا جنس آسپرژیلوس (Aspergillus SP.) و گونه‌های مختلف آن به شاخه Phylum یا Division اسکومیکوتا (Ascomycota) و رده (Class) اسکومیست‌ها (Ascomycetes)، ولی جنس فیلوبازیدیلا (Phylobasidiella) به Phylum یا Division بازیدیومایکوتا (Basidiomycota) و رده بازیدیومیست‌ها (Basidiomycetes) تعلق دارند که از نظر تکاملی از آسکومیکوتاها (Ascomycota) تکامل یافته‌تر بوده ولی علی‌رغم وجود فاصله تکاملی مابین این دو شاخه از میکروارگانیسم‌های سلسله Kingdom قارچی، هم‌سانی توالی نوکلئوتیدهای ژن‌های plb2 در آن‌ها در حدی بسیار بالاتر از حداقل استاندارد، تشابه زیاد (High identity)، مشاهده می‌شود. هم‌چنین توجه به توازن سیر نزولی درصد هم‌سانی توالی ژن‌های lpl و plb میکروارگانیسم‌های مختلف با ژن plb2 آسپرژیلوس فومیگاتوس (A. fumigatus) در جدول ١ می‌تواند نشان‌دهنده افت میزان هم‌سانی توالی ژن plb_2 آسپرژیلوس فومیگاتوس (A. fumigatus) با میکروارگانیسم‌هایی باشد که قرابت فیلوژنیك آن‌ها با آسپرژیلوس فومیگاتوس (A. fumigatus) به‌تدریج کم‌تر می‌گردد، به‌نحوی‌که LPL قارچ‌های کپکی پنیسیلیوم نوتاتوم (Penicillium notatum)، آ. اوریزهآ (A. oryzea) آ. نیجر (A. niger) و نوروسپورا کراسا (N. crassa) با توجه به تعلق آن‌ها به آسکوسیت‌ها (همانند آسپرژیلوس‌ها) و قرار گرفتن در راسته Order ترایکوکوماسه (Trichocomacase) در مرحله تولیدمثل جنسی (همانند آ. فومیگاتوس) تشابه بیش‌تری را (۵۱٪-۶۲٪) با ژن PLB_2 آسپرژیلوس فومیگاتوس نشان می‌دهد، درحالی‌که PLB قارچ‌های مخمری و شبه‌مخمری مانند ك. نئوفرمنس، ك. آلبیکانس، ش. پومبه، س. سرویسیه و ك. لاکتیس به علت قرار گرفتن این قارچ در مرحله تولیدمثل جنسی در راسته‌ای دیگر، تشابه کم‌تری (۳۹٪-۴۳٪) را با توالی ژن plb_2 آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) نشان می‌دهد و درنهایت انعکاس این هم‌سانی بسیار بالا در تطبیق توالی این ژن‌ها با هم‌دیگر در سطح اسیدآمینه آشکار می‌گردد، که نواحی محفوظ متعدد و طولانی را مابین این ژن‌ها در سطح اسیدآمینه در شکل سه نشان می‌دهد. در این‌جا ذکر این نکته لازم است که لیزوفسفولیپازها LPL و فسفولیپازهای PLB B دارای فعالیت آنزیماتیك مشابهی بوده و در تقسیم‌بندی درونی انواع فسفولیپازها به دو گروه آسیل هیدرولازها (Acyl-hydrolases) و فسفودی‌استرازها (Phosphodiesterases) هر دو آنزیم فوق الذکر در گروه اول قرار می‌گیرند.

www.SID.ir

Archive of SID

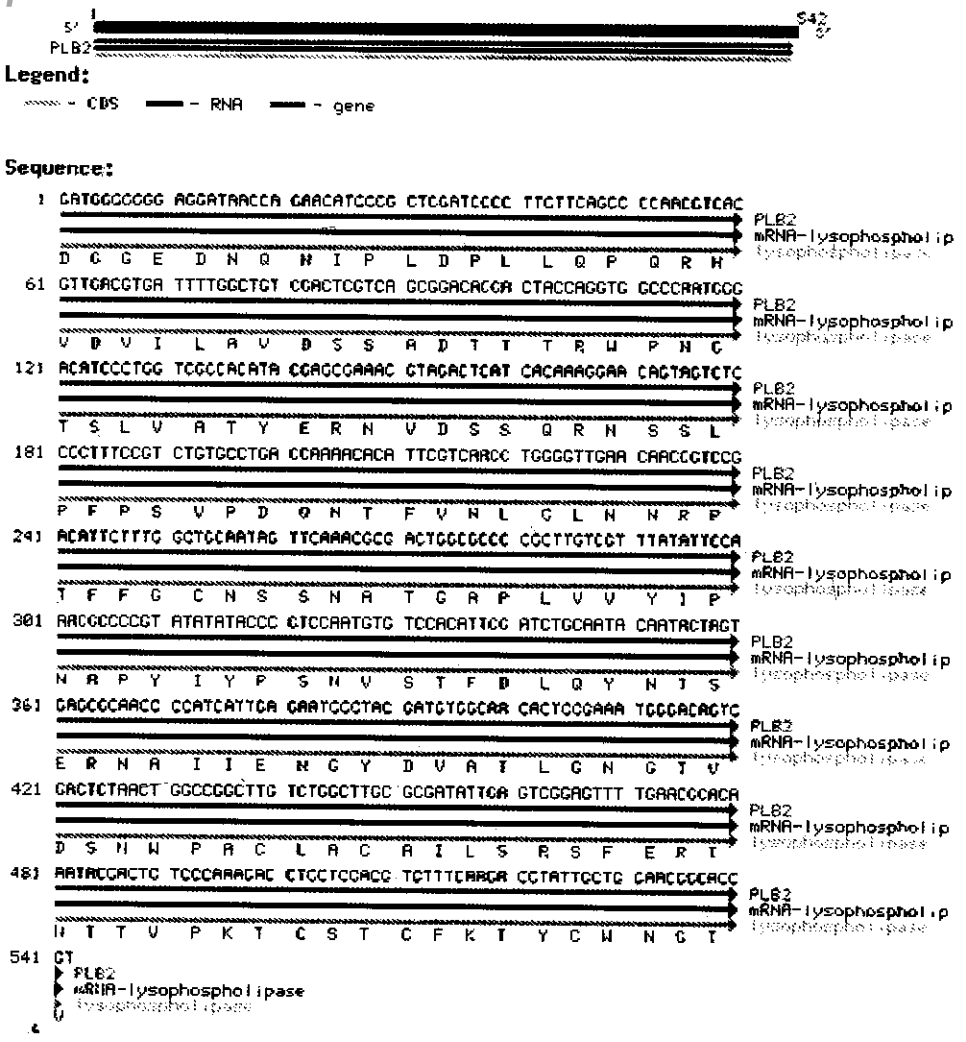


شکل ۴. شجره‌نامه فیلوژنیک قطعه ژن plb_2 شجره‌نامه فیلوژنیک فوق با نرم‌افزار کامپیوتری بیوانفورماتیکی، به آدرس اینترنتی http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html ترسیم شده است. این شجره‌نامه نشان‌دهنده کثرت خوشه آنزیم‌های PLB بوده و قرابت فیلوژنیک بیش‌تر آ. فومیگاتوس با نوروسپورا کراسا (*N. crassa*) را در مقایسه با سایر قارچ‌ها نمایان می‌سازد.

در این بررسی در مراحل نهایی جستجوی طول بیش‌تری از توالی ژن plb_2، دو تکنیک غربال‌گری گنجینه ژنی دارای اندازه محدود (Size limited library screening) یا غربال‌گری کلنی (Colony screening) و PCR برگشتی (IPCR) مورد استفاده قرار گرفتند. تکنیک اول در واقع روش استاندارد و متداول برای جداسازی ژن کامل و یا طول بیش‌تری از توالی ژن در مراحل بعد از PCR اولیه می‌باشد و استفاده از PCR برگشتی (IPCR) به علت حساسیت‌ها و ظرافت‌های لازم، روشی مرسوم محسوب نمی‌شود و به‌ویژه تبدیل قطعات DNA خطی حاصل از هضم DNA ژنومی میکروارگانیسم به قطعات DNA حلقوی در مرحله اول این تکنیک، نقطه‌ای بحرانی برای مراحل بعدی جستجو می‌باشد، که موفقیت مراحل بعدی، بستگی تام به این تبدیل وضعیت DNA از حالت خطی به حلقوی دارد و علاوه بر این، حساسیت بسیار زیاد این تکنیک به غلظت $MgCl_2$ در مخلوط PCR، همراه با مشکلات مربوط به تکثیر قطعه‌ای طویل از DNA، استفاده از این تکنیک به عنوان روش مرسوم را مقدور نمی‌سازد؛ ولی در این پژوهش با حل تمام این مشکلات، درنهایت توفیق تکثیر و تعیین توالی قطعه‌ای به‌طول ۱۱۷۵ bp از ژنوم آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*)، به‌دست آمد که با تلفیق توالی قطعه ۵۴۲ bp حاصل از PCR اولیه با قطعه ۱۱۷۵bp حاصل از IPCR با شناسایی و مشخص نمودن توالی نوکلئوتیدهای ویژه آندونوکلئاز محدودالاثر *Xho* I، پرایمرهای مربوط به PCR دژنراتیو و IPCR در توالی هر دو قطعه، توجه به جهت 5' →3' توالی های هر دو مرحله و درنهایت حذف ردیف‌های تکراری از نوکلئوتیدها از جمع جبری ۱۷۱۷ bp، دو توالی نوکلئوتیدی حاصل از PCR اولیه و IPCR ثانویه، ۱۵۲۹ bp باقی‌مانده و ۱۸۸ bp حذف گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. ثبت توالی نوکلئوتیدی قطعه اولیه ژن *plb*$_2$ آ. فومیگاتوس (*A. fumigatus*) در بانک ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده امریکا (NCBI).

مطالعات مربوط به تعیین توالی ژن‌هایی که فرآوردهای نهایی آن‌ها دارای اهمیت اساسی در ویرولانس میکروارگانیسم‌ها می‌باشند؛ عموماً با هدف تعیین میزان مشارکت محصول حاصل از بیان ژن در بیماری‌زایی میکروارگانیسم، تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد فیزیولوژیك فرآورده ژن برای خود میکروارگانیسم و بافت مورد تهاجم میزبان و همچنین استنباط اطلاعات بنیادی برای ارائه شیوه مصونیت‌بخشی، تهیه واکسن، طراحی دارو و یا تهیه بلوکر برای فرآورده ژن، بهره‌برداری از فرآورده ژن به‌عنوان شاخص آزمایشگاهی تشخیص عفونت و ... انجام می‌گیرد. با توجه به شناسایی اهمیت اساسی فسفولیپازها در ویرولانس میکروارگانیسم‌هایی نظیر کریپتوکوکوس نئوفرمنس (*C. neoformans*) [۱،۲،۲۴]، کاندیدا آلبیکانس (*C. albicans*)، انواع آسپرژیلوس‌ها (Aspergillus SP)، پاراکوکسیدیوئیدس برازیلینسیس (*Paracoccidioido brasiliansis*) [۱۰،۱۱،۱۸،۲۷]، مالاسزیافور فور (*M. furfur*) [۲۳]، انواع کلستریدیوم (Clostridium SP) [۲۹] و آنتامبا هیستولیتیکا (*E. histolitica*) [۹]، پژوهش‌های مقدماتی برای استفاده از این آنزیم‌ها برای طراحی و تهیه دارو [۱۳،۲۰،۲۷،۳۰]، تشخیص آزمایشگاهی عفونت [۱۰،۱۸] و تهیه واکسن [۳۲] انجام گرفته است و کلونینگ ژن کامل *plb* آسپرژیلوس فومیگاتوس (*A. fumigatus*) و سپس شناسایی کامل توالی نوکلئوتیدهای این ژن و درنهایت اشراف بر ساختمان پروتئین حاصل از بیان ژن، گامی اساسی جهت نیل به موارد مذکور خواهد بود.

www.SID.ir

Archive of SID

توالی نوکلئوتیدی قطعه اولیه ژن plb_2 آ. فومیگاتوس با هدف نشر اطلاعات علمی و دسترسی پژوهش‌گران به توالی نوکلئوتیدی مذکور در بانک ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده امریکا (NCBI) به ثبت رسیده است که شکل ۵، تصویر توالی نوکلئوتیدی ثبت شده در سایت اینترنتی بانک ژنی فوق را نشان می‌دهد.

منابع

[1] Chen SCA, Muller M, Zhou JZ, Wright LC, Sorrell TC. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? J Infect Dis, 1997; 175: 414-20.

[2] Chen SCA, Wright LC, Santangelo RT, Muller M, Moran VR, Kuchel PW, et al. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun, 1997; 65(2): 405-11.

[3] Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med, 1991 Mar 7; 324(10): 654-62.

[4] Denning DW. Early diagnosis of invasive aspergillosis. Lancet, 2000 Feb 5; 355(9202): 423-4.

[5] Denning DW. Diagnosis and management of invasive aspergillosis. Curr Clin Top Infect Dis, 1996; 16: 277-99.

[6] Denning DW. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. J Antimicrob Chemother, 1991; 28: 1-16

[7] Denning DW Aflatoxin and human disease. Adverse Drug React Acute Poisoning Rev. 1987 Winter; 6(4): 175-209.

[8] Dennis EA, Rhee SG, Billah MM, Hannun YA. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. FASEB J, 1991 Apr; 5(7): 2068-77.

[9] Eckmann L, Reed SL, Smith JR, Kagnoff MF. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. J Clin Invest, 1995 Sep; 96(3): 1269-79.

[10] Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev, 2000 Jan; 13(1): 122-43.

[11] Ghannoum MA. Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 1998; 39(2): 55-9.

[12] Gilmore MS, Cruz-Rodz AL, Leimeister-Wachter M, Kreft J, Goebel W. A Bacillus cereus cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. J Bacteriol, 1989 Feb; 171(2): 744-53.

[13] Hanel H, Kirsch R, Schmidts HL, Kottmann H. New systematically active antimycotics from the beta-blocker category. Mycoses, 1995 Jul-Aug; 38(7-8): 251-64.

[14] Hermans E, Octave JN, Maloteaux JM. Interaction of the COOH-terminal domain of the neurotensin receptor with a G protein does not control the phospholipase C activation but is involved in the agonist-induced internalization. Mol Pharmacol, 1996 Feb; 49(2): 365-72.

[15] Johansen KA, Ronald EG, Vasil LM. Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. Infect Immun, 1996; 64: 3259–3266.

[16] Kaplanski G, Teysseire N, Farnarier C, Kaplanski S, Lissitzky JC, Durand JM, et al. IL-6 and IL-8 production from cultured human endothelial cells stimulated by infection with *Rickettsia conorii* via a cell-associated IL-1 alpha-dependent pathway. J Clin Invest, 1995 Dec; 96(6): 2839-44.

[17] Latge JP. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. Clin Microbiol Rev, 1999 Apr; 12(2): 310-50.

[18] Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. J Biol Chem, 1998 Oct 2; 273(40): 26078-86.

[19] Meyers DJ, Berk RS. Characterization of phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa as a potent inflammatory agent. Infect Immun, 1990 Mar; 58(3): 659-66.

[20] Odds FC. Antifungal therapy. In: Kibber CC, Mackenzie DWR, Odds FC. Editors. Principle and practice of clinical mycology. 1st ed. England: Johan Wiley and Sons Ltd. 1996. p. 120-25.

[21] Oishi K, Raynor RL, Charp PA, Kuo JF. Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. J Biol Chem, 1988 May 15; 263(14): 6865-71.

[22] Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML. Molecular comparision of a nonheamolytic and a haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeroginosa*. J Bacteriol, 1990; 172: 5915-5923.

[23] Plotkin LI, Mathov I, Squiquera L, Leoni J. Arachidonic acid released from epithelial cells by *Malassezia furfur* phospholipase A(2): a potential pathophysiologic mechanism. Mycologia, 1998; 90(2): 163-169.

[24] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from *filamentous fungi*. Lett Appl Microbiol, 1985; 1:17-20.

[25] Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. FASEB J, 1996 Aug; 10(10): 1147-58.

[26] Songer JG. Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol, 1997 Apr; 5(4): 156-61.

[27] Raines MA, Kolesnick RN, Golde DW. Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. J Biol Chem, 1993 Jul 15; 268(20): 14572-5.

[28] Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Ahmad I, Stevens R, Stevens DA, et al. In vitro and in vivo antifungal activity of amphotericin B lipid complex: are phospholipases important? Antimicrob Agents Chemother, 1998 Apr; 42(4): 767-71.

[29] Titball RW. Bacterial phospholipases. Symp Ser Soc Appl Microbiol, 1998; 27: 127S-137S.

[30] Titball RW. Bacterial phospholipases C. Microbiol Rev, 1993 June; 57(2): 347–366.

[31] Vidotto V, Leone R, Sinicco A, Ito-kuwa S, Criseo G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. Mycopathologia, 1998; 142(2): 71-6.

[32] Walker TS, Brown JS, Hoover CS, Morgan DA. Endothelial prostaglandin secretion: effects of typhus rickettsiae. J Infect Dis, 1990 Nov; 162(5): 1136-44.

[33] Williamson ED, Titball RW. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. Vaccine, 1993 Sep; 11(12): 1253-8.

www.SID.ir