Archive of SID

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شمارهٔ ۶۲ (تابستان ۱۳۸۳)، صفحات ۵۴-۴۷

کلونینگ و توالی یابی بخشی از ژن فسفولیپاز B۱ در *آسپرژیلوس فومیگاتوس*

دکتر عبدالحسن کاظمی: استادیار قارچ شناسی پزشکی با گرایش مولکولی، گروه ایمنی شناسی و انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

چکیده

زمینه و اهداف: قارچ کپکی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به عنوان میکروارگانیسمی پاتوژن، آلرژن، آلوده کننده مواد غذایی، مولد میکوتوکسین و عامل میکوتوکسیکوز مورد توجه بوده و نظر به ازدیاد فزاینده موارد عفونت ناشی از این میکروارگانیسم و بروز مقاومت دارویی، اهمیت بالینی آن رو به افزایش گذاشته است. قدرت تولید انواع فسفولیپازها، به ویژه فسفولیپاز B۱ ، از عوامل مؤثر در ویرولانس این قارچ به شمار می رود. به این جهت، کلونینگ و توالی یابی ژن فسفولیپاز B۱ برای بررسی و تجزیه و تحلیل ویژگی های ژن سنتز کننده آن در میکروارگانیسم مذکور و مقایسه خصوصیات ژن و فرآورده آن با ژن فسفولیپاز سایر میکروارگانیسم ها انجام شد.

روش بررسی: DNA ژنومی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* موجود در خلط یک بیمار مبتلا به آسپرژیلوس ریوی استخراج و تلخیص شد و با استفاده از PCR دژنراتیو قطعه اولیه از ژن plb۱ به طول bp ۵۴۵ به دست آمد. برای جداسازی قطعه طویل تری از این ژن، DNA ژنومی با تعدادی منتخب از اندونوکلئازهای با اثر برشی محدود هضم شد و قطعات حاصل ازهضم بااستفاده از DNA لیگاز T۴ به صورت حلقوی در آمد و سپس از طریق PCR معکوس قطعه طویل تری به طول bp ۱۸۰۰ به دست آمد. توالی نوکلئوتیدی قطعه ژن حاصل متعاقب استخراج از ژل، خالص سازی، پیوند به وکتور مناسب، ترانسفورماسیون، استخراج از سلول میزبان و نهایتاً تلخیص تعیین شد. با تلفیق این توالی با توالی قطعه اولیه، در نهایت، توالی ای به طول bp ۲۱۹۷ حاصل گردید.

یافته ها: تجزیه و تحلیل فرآورده PCR دژنراتیو اولیه و همچنین قطعه حاصل از PCR معکوس با بلاست X درسطح اسیدنوکلئیک حداکثر۷۶٪ همسانی با توالی ژنتیکی لیزوفسفولیپاز ۱ آسپرژیلوس اوریزه و حداقل ۴۵٪ همسانی با توالی ژنتیکی فسفولیپاز B *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* را نشان داد.

نتیجه گیری: وجود ژن فسفولیپاز B۱ در ژنوم میکروارگانیسم و همسانی بسیار بالای قطعه توالی شده با ژن فسفولیپاز سایر میکروارگانیسم های با یا بدون قرابت فیلوژنیک با این قارچ نزدیک نشان دهنده انتقال محافظه کارانه آن در مسیر تکاملی از ژنوم دودمانی و همچنین نقش اساسی آن در ویرولانس میکروارگانیسم است. توالی نوکلئوتیدی حاصل می تواند برای مشابه سازی ژن کامل plb۱، تعیین توالی ژن کامل و تعیین و تجزیه و تحلیل خصوصیات پروتئین (آنزیم) حاصل از ژن، و نهایتاً، طراحی و سنتز واکسن یا داروی مؤثر علیه میکروارگانیسم مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ژن فسفولیپاز B، کلونینگ، توالی یابی

مقدمه

قارچ های کپکی جنس *آسپرژیلوس* و به ویژه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* عامل مسبب بروز علایم بالینی متنوعی از عفونت های سطحی تا عمقی در نواحی آناتومیکی مختلف پیکر انسان و حیوان است و از نظر آلودگی مواد غذایی، تولید میکوتوکسین ها و بروز میکوتوکسیکوز اولیه و ثانویه نقشی منفی دارد و از نظر تجزیه مواد مختلف و بازگرداندن مواد ساده اولیه به چرخه گردش عناصر در طبیعت نقشی مثبت ایفا می کند (۱و۲). اهمیت بالینی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با توجه به افزایش موارد بیماری ناشی از این قارچ به ویژه به صورت حالات بالینی مهاجم ریوی در افراد +HIV، بیماران دچار نقص ایمنی، مصرف کنندگان داروهای بیولوژیک، دریافت کنندگان عضو پیوندی و بروز مقاومت دارویی به شدت افزایش یافته است (۵-۳). یکی از اصلی ترین عوامل مؤثر در بیماریزایی این قارچ قدرت تولید و ترشح فسفولیپازهای گروه B است (۶و۷) که باعث ایجاد آسیب های بافتی و تخریب غشای سیتوپلاسمی سلولهای موردتهاجم می شود، زیرا فسفولیپیدها در ساختمان غشای سیتوپلاسمی سلولهای حیوانی سهم عمده ای دارند (۱۰-۸)؛ به عنوان مثال، وجود رگه های خون درخلط افراد مبتلا به آسپرژیلوس ریوی مهاجم به علت تخریب بافتی بسیار چشمگیر است (۱۱). همچنین ترکیبات و اجزای حاصل از تأثیر فسفولیپازهای گروه B بر روی غشا سیتوپلاسمی و تخریب آن به عنوان واسطه های شیمیایی و پیامبران ثانویه درون سلولی، تعادل فیزیولوژیک سلول و بافت مورد تهاجم را به هم می زنند(۱۲و۱۳) و به عنوان نمونه، با تولید و فعال کردن پروتئین کیناز C، اینترلوکین ها، پروستاگلاندین ها، اسید آراشیدونیک، نظم متابولیکی سلول را به هم می ریزند (۱۸-۱۴). تحقیقات متعددی در مورد ایفای نقش مؤثر به وسیله فسفولیپازها در ویرولانس میکروارگانیسم هایی نظیر *کریپتوکوکوس نئوفرمنس*، *کاندیدا آلبیکانس* و سایر *کاندیداها*، *کلستریدیوم پرفرنژنس*، *کلستریدیوم نویه*، *کلستریدیوم سپتیکوم*، *آنتامباهیستولیتیکا*، *سودوموناس آئروژینوزا*، جنس *مایکوباکتریوم*، *باسیلوس سرئوس*، *مالاسزیا فورفور* (۲۵-۱۹) صورت گرفته که اهمیت این آنزیم ها

www.SID.ir

Archive of SID

را نشان می دهد، به طوری که اخیراً استفاده از آنها برای تهیه واکسن یا شاخص های آزمایشگاهی تشخیص عفونت مورد توجه جدی واقع شده است (۲۸-۲۶).

مواد و روش ها

DNA ژنومی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از کلنی های حاصل از کشت خلط یک بیمار مبتلا به آسپرژیلوس ریوی مهاجم با استفاده از روش پایه «ریدر و برود» (۲۹) با اندکی اصلاح استخراج شد. بدین منظور، عناصر قارچی در نیتروژن مایع آسیاب و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۶۵°c با حجم مساوی از بافر استخراج DNA مخلوط شد، سپس با افزودن حجم مساوی از کلروفرم و ایزومیل الکل (نسبت ۲۴:۱) به مدت ۳۰ دقیقه درلابه لای یخ قرار داده شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ xg و در حرارت ۴ °c سانتریفوژ شده، لایه بالایی به لوله استریل جدید منتقل و با استفاده از حجم مساوی ایزوپروپانول و سانتریفوژ به مدت ده دقیقه در ۴۰۰۰xg، DNA ژنومی رسوب کرد و نهایتاً با شستشو به وسیله اتانول ۷۰٪ و حل نمودن رسوب DNA در ddH_2O و افزودن RNAase A، ماده ژنتیکی حاصل برای مصارف آتی در دمای ۲۰- °c نگهداری شد. به عنوان نمونه شاهد مثبت، DNA ژنومی *کاندیدا آلبیکانس* نیز به روش فوق تهیه و ذخیره شد. لازم به ذکر است که نمونه بالینی مورد استفاده با شماره ۹۰۲۵۴ در مجموعه کشت های نوع آمریکایی[1] (ATCC) ثبت و ذخیره شده است.

PCR دژنراتیو: با استفاده از ردیف های نوکلئوتیدی محفوظ برای ژن plb در *کاندیدا آلبیکانس*، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، *ساکارومایسس سرویسیه و پنسیلیوم کرایزوژنوم*، پرایمرهای DBF و DBP برای تکثیر یک قطعه تخمینی به طول ۵۰۰bp طراحی شد. تکثیر قطعه مورد نظر با روش PCR دژنراتیو از DNA ژنومی در میکروارگانیسم هدف و شاهد در ترموسایکلر با شرایط ۳ دقیقه در ۹۴ °c، یک دقیقه در ۴۸ °c و ۹۰ ثانیه در ۷۲ °c برای یک دور، یک دقیقه در ۹۴ °c، یک دقیقه در ۴۸ °c و ۹۰ ثانیه در ۷۲ °c برای ۲۸ دور و نهایتاً یک دقیقه در ۹۴ °c، یک دقیقه در ۴۸ °c و هفت دقیقه در ۷۲ °c برای یک دور با موفقیت انجام شد و فرآورده PCR در ژل آگارز الکتروفورز تهیه شده با بافر TBE و با استفاده از اتیدیوم بروماید[2] رنگ آمیزی و تجزیه شد و تصویر نوار حاصل تهیه گردید.

کمیت سنجی DNA: کمیت سنجی DNA ژنومی استخراج شده از میکروارگانیسم مورد نظر و شاهد مثبت، با استفاده از دو روش مقایسه غلظت DNA رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورز با غلظت DNA استاندارد (DNA شاخص GIBCO BRL, 1kb) و غلظت سنجی DNA در محلول تهیه شده با استفاده از OD ۲۶۰=۱ در اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

کلونینگ و تعیین توالی اولیه: مقدار کافی (۵۰ul) از فرآورده PCRدر ژل الکتروفورز تهیه شده با بافر TAE تجزیه شد و پس از برش نوار مورد نظر از روی ژل، قطعه حاصل از ژل استخراج و تلخیص گردید (کیت تلخیص سریع ژل QIA[3]). نوار ۵۵۰ bp استخراج شده به وکتور pGEMT-Easy پیوند زده شد و سپس به سلول میزبان (*E.coli Top 10F'*) تغییر شکل یافت. غربالگری کلنی های آبی ـ سفید در محیط کشت LB حاوی ۵- برومو، ۴ - کلرو ، ۳ - ایندول بتا دی گالاکتوپیرانوزید (X-gal) و ایزوپروپیل بتا ـ دی تیوگالاتوپیرانوزید (IPTG) انجام شد و پس از انتخاب تعدادی کلنی (۱۲-۶ کلنی) حاوی وکتور ترانسفورم شده، کلنی های حاصل در محیط LB[4] مایع کشت داده شد و متعاقب آن با وکتور حاوی قطعه PCR از مجموعه باکتری های تک تک محیط های LB مایع با انجام لیز سلولی و مراحل بعدی آن جدا گردید. برش قطعه PCR از ناحیه کلونی (MCS)[5] وکتور با استفاده از اندونوکلئاز محدودالاثر *Eco* RI انجام گردید و پس از تأثیر دو ساعتی آنزیم فوق در ۳۷° C بر روی وکتور، فرآورده حاصل در ژل آگاروز حاوی بافر TAE تجزیه و تحلیل شد و نوار مورد نظر با برش از ژل و انجام مراحل مربوط به تلخیص قطعه DNA از ژل به صورت خالص به دست آمد. برای انجام مراحل مربوط به تعیین توالی نوار هدف PCR مجدد با استفاده از پلاسمید M۱۳ و پرایمرهای MBR و MBF ساخت شرکت داروسازی «آمرشام» انگلستان در ترموسایکلر و با شرایط ۹۶ °c به مدت چهار دقیقه برای یک دور، ۹۶ °c به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ °c به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ °c به مدت چهار دقیقه برای ۲۵ دور انجام گرفت و تعیین توالی نوکلئوتیدها در فرآورده نهایی PCR با استفاده از روش ABI خودکار انجام شد و توالی قطعه ای از ژن *plb1* *آسپرژیلوس فومیکاتوس* به طول ۵۴۵ bp به دست آمد.

ساترن بلاتینگ: به منظورتأیید وجود ژن plb در ژنوم میکروارگانیسم، بررسی تعداد کپی ژن در ژنوم و همچنین تخمین اندازه مناسب قطعه ژنومی برای کلونینگ و توالی یابی مرحله بعدی، DNA ژنومی با سریالی از اندونوکلئازهای محدودالاثر شامل *Apa* I و *Brf* I و *Bji* I و *Kpn* I و *Sal* I و *Xba* I و *Xho* I هضم شد و ساترن بلاتینگ از طریق پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسی جنین[6] انجام گرفت و قطعات DNA حاوی تمام یا قسمتی از ژن *plb1* به ترتیب به طول های تخمینی ۹/۶ kb و ۱۱/۲ kb و ۶/۱ kb و ۱۰/۱ kb و ۳ kb و ۵/۷ kb و ۲/۲ kb در شرایط بحرانی شناسایی شد. با توجه به نتایج بلاتینگ ساترن ، فقط وجود یک نسخه از ژن *plb1* در ژنوم میکروارگانیسم تأیید شد.

کلونینگ و توالی یابی ثانویه: برای کلونینگ و توالی یابی طول بیشتری از ژن *plb1* دو روش پایه ای غربالگری گنجینه ژنی دارای اندازه محدود[7] یا غربالگری کلنی و استفاده از PCR معکوس[8] (IPCR) مورد استفاده قرار گرفت که علی رغم شناسایی چند کلنی بالقوه مثبت از نظر وجود ژن مورد نظر در کلنی ها، با روش غربالگری کلنی با عنایت‌به پیشرفت مطلوب تر مراحل آزمایشگاهی روش IPCR، این‌روش برای‌جداسازی و تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن *plb1* مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، DNA ژنومی هضم شده با اندونوکلئاز محدودالاثر *Xho* I به طول ۲/۲ kb که در بردارنده طولی نامشخص از ژن *plb1* بود، انتخاب شد و برای مراحل بعدی جستجوی توالی نوکلئوتیدها مورد استفاده قرار گرفت.

قطعه ۲/۲ kb خطی فوق الذکر ابتدا تحت تأثیر آنزیم DNA لیگاز T۴ به یک قطعه DNA حلقوی تبدیل و موفقیت این مرحله از آزمایش ارزیابی شد. با طراحی پرایمرهای اختصاصی IB1F , IB1R

1. American Type Culture Collection
2. ethidium bromide
3. QIAquick gel extraction kit
4. Luria-Burtani
5. Multi Cloning Site
6. Digoxigenin
7. Size limited library screening
8. Inverse PCR

www.SID.ir

Archive of SID

جهت انجام IPCR، تکثیر DNA حلقوی حاوی طول نامشخص از ژن *plb*، در ترموسیکلر با شرایط ۳ دقیقه در°c ۹۴ برای یک دور، یک دقیقه در °c ۹۴ ، یک دقیقه در °c ۶۳ و سه دقیقه در°c ۷۰ برای ۱۰ دور، یک دقیقه در °c ۹۴ ، یک دقیقه در °c ۶۳، سه دقیقه به اضافه پنج ثانیه اضافی به ازای انجام هر دور در °c ۷۰ برای ۲۴ دور، یک دقیقه در °c ۹۴ ، یک دقیقه در °c ۶۳ و هفت دقیقه در °c ۷۰ یک دور انجام گرفت.

توالی نوکلئوتیدها در فرآورده حاصل از IPCR با انجام مجدد موفقیت آمیز مراحل ذکر شده در قسمت کلونینگ و توالی یابی اولیه شناسایی گردید که شامل قطعه ای به طول bp ۱۸۰۰ از ژن*plb* *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود.

یافته ها

از تلفیق توالی bp۱۸۰۰ با توالی قطعه ژن حاصل از PCR اولیه bp۵٤۵، توالی ای به طول bp ۲۱۹۷ حاصل شد که bp ۹۶۰ آن مربوط به ژن *plb*، در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود. توالی نوکلئوتید ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (bp ۹۶۰ از مجموع طول ۲۱۹۷bp) همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در سایر میکروارگانیسم ها نشان می دهد. جستجوی بانک های اطلاعاتی ژنوم در وب[1] با استفاده از BLAST X همسانی ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با ژن لیزوفسفولیپاز یک (*lpl1*) *آسپرژیلوس اوریزه*آ به میزان حداکثر ۷۶٪ و با ژن فسفولیپاز B *plb* *کریپتوکوکوس نئوفرمنس* به میزان حداقل ۴۴٪ و مقادیر بین این دو را برای سایر میکروارگانیسم ها در سطح اسید نوکلئیک نشان می دهد (*جدول و شکل۱*).

قطعه توالی یابی شده به طول bp ۲۱۹۷، در برگیرنده bp ۹۶۰ مربوط به ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از مجموع انتهای ۳َ ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* است. قسمتی از تجزیه توالی نوکلئوتیدها در شکل انجام شده است.

جدول ۱: درصد تطابق توالی نوکلئوتیدی ژن *plb af*، *آسپر ژیلوس فومیگاتوس* با توالی نوکلئوتیدی ژن های plb منتشر شده قارچ ها

گونه	تقسیم بندی	همسانی با ژن های فسفولیپاز B۱
آسپرژیلوس اوریزه LPL۱ AX ۱۱۲۰۸۲-۱	آسکو مایستا	٪۷٦
آسپرژیلوس اوریزه LPL۲ AX ۱۱۲۰۸٤-۱	آسکو مایستا	٪٦٤
آسپرژیلوس نیجر LPL۱ AX ۱۱۲۷۸-۱	آسکو مایستا	٪٦٤
آسپرژیلوس نیجر LPL۲ AX ۱۱۲۰۸۰-۱	آسکو مایستا	٪٦۱
پنسیلیوم کرایزوژنوم LPL P ۳۹٤۵۷	آسکو مایستا	٪٦٦
نوروسپورا کراسا LPL AF ۰٤۵۵۷٤	آسکو مایستا	٪۵۲
تورولاسپورا دلبروکئی LPL Q ۱۱۱۲۱	آسکو مایستا	٪٤۸
کلویورومایسس لاکتیس PLB AB ۰۱٤٤۹۵	آسکو مایستا	٪٤۹
ساکارومایسس سرویسیه LPL۱ S ۵۳۳۰۳۷	آسکو مایستا	٪٤۹
ساکارومایسس سرویسیه LPL۲ S ۵۳۰۳۵	آسکو مایستا	٪٤٦
کاندیدا آلبیکنس LPL۱ BAA ۳٦۱٦۲	آسکو مایستا	٪٤۹
کاندیدا آلبیکنس LPL۲ AAC ۷۲۲۹٦	آسکو مایستا	٪٤۵
کریپتوکوکوس نئوفرمنس PLB AAF ٦۱۹٦٤/۱	بازیدیو مایستا	٪٤٤

1. Web

www.SID.ir

Archive of SID


```
1     CTCGAGTATCTAGGAACCAAATTCAATGGCGGCTCAGTCCCAAGTAATGAGAGCTGTGTG
61    CGTGGCTTTGACAATGTTGGCTTTGTCATGGGTACGTCCTCTACTCTCTTCAATCAATTC
121   CTTCTTCAGATCAACTCAACGGCTTTGCCGGATTGGCTGAAATCCGTCTTCACCGACATC
181   TTGAAGGACATTGGCGAGAATGACGAGGACATTGCTCAATATGCTCCTAACCCATTCTAC
241   CACTTTTCCAACACAACCAACCCTAGTGCCGCTGAATTGGAACTGGATTTGGTGGATGGT
301   GGTGAAGATCTGCAGAATATACCACTGCACCCGTTGATTCAGCCAGAGCGACATGTCGAT
361   GTGATCTTCGCCGTCGATTCCTCTGCCGATACCACGTACAGCTGGCCCAACGGAACTGCC
421   CTTGTCGCTACTTATGAGCGTAGCCTAAATTCCTCAGGCATCGCCAACGGTACTTCCTTT
481   CCTGCAATTCCCGATCAGAATACCTTCGTCAACAAGGGCTTGAACACTCGACCTACGTTT
541   TTCGGGTGCAATAACTCAAACACCACTGGCCCGTCGCCCTTGATTGTATATCTTCCGAAC
601   TACCCCTACACGGCTTACTCCAACTTTTCTACTTTCCAGCCAGACTATACCGAACAAGAG
661   CGAGATTCTACCATTCTGAACGGGTATGATGTGGTGACAATGGGTAACAGCACTCGCGAC
721   GGCAACTGGTCAACCTGTGTCGGCTGTGCTATCTTGAGTCGGTCTCTCGAACGCACCAAC
781   ACTAACGTGCCGGAAATCTGCAAACAATGTTTCCAGAGGTATTGCTGGAACGGCACCGTC
841   AACAGCACCACCCCTGCGGGTTACGAGCCGGTCACGATTTTGGATAGTGCAGCCTCTGGG
901   ATCATTCCAAGTATTTCCACTGTTGCAATGGCCGTTGTTTTTGCCGCCTGGACAATTTTC
961   TAAGTTTCATTTTGGAATTATTCGAAAATGTCGATTTCTACCGGATCTAATGTGGTCTGA
1021  GCTATATCCATACCTCACAGACTTTTATCAGATGCCAATGTTATCACAGTTGGGAGGTTT
1081  AACGAGCAATATTGTTTCTCTAATCTATCTATTTATCGTTTTGTACCCCCTTTTTGTATTA
1141  TAAATTATGCAAAAAAACAACATCATCCTGTCTGATATTGCGTCCATAGAATGATATCCA
1201  CTTAACTAGGCTAAGCAGGAGGTACAAGGTTCACGATCGGCGGGGAATACATCACGTGCT
1261  TATGAGGCTACGGCTGTTGCTGTGACAACGCTCACGTGATTTCTCAAAGGAGAAAGCCAA
1321  GGACAAACGCCGCAGCTCTTGCGGGCGGCCAAACAGCTGGAAGTCAACAACACATATATA
1381  ATCAACGAGTCAAGTCTACTTAATAGCCACAGCAAAACCCCTGCTTGAAAACTTTTCTGC
1441  AGGTGCGCCTTTGTGGTTAGTCGAATCTGTCATTCCTCTGCTGCGAAGTTCAGCTCATGA
1501  TGAGCGCATCGGGCTTGTCAACACCGACCCTTCTTCGTTACTAACAGCAGAGAAACCGTA
1561  CAAGTGCACAGCCGCCTGAGATACAAATTTTTTGGGTGCATAATTCTCTGTTATTGATTC
1621  AAAATGGCTCGCGCAGCTATCATCCCAAAGTCATCCCCAAAACGGGCCACCCGTGGCCGT
1681  CCCCCAGCCAACACAGTCAAAGCCGCCAGTCTCACCACTGCCAGCAAACCGGTCGTGAGG
1741  ACGGCGAGGACAAAGTCAGGAACTTCTGCGACAGAAACCAGAAAAAAAACTACGAGAACA
1801  GCAACGGCGACCAGCGCCAGGACTAGACAGGCAGACTCTGACACGGATGAGGCTACGGAC
1861  GACGAACTGGGACTCATAGATACGAAGGAAAAAGCGAAACCAGGCAGACCCAAAGGGAAG
1921  AGCTCAACTTCTTCCACAAGCGCTACAGGTCGGGGAAGAAGACCCGCGACTCCTGCAGCT
1981  GCAGAGTGCGAGAGCGACAACGACGAGGACGAGCTTGCCCAGACCGATGCCCCCAAGAAG
2041  CGACCTGGACGGCCAAGGACAAAGCCGCTGCCAAAGGAGGACGAAGTTAAACCCGAGGCA
2101  GCGCCTAGACCGAGAGGTCGGCCAAGGGCAACTGCCGCGACGAAGCCTACTGTCACTACA
2161  GGCGCTGATAAAGACAGTACAAAGAAGAAGACTCGAG
```

شکل ۱ : توالی ژن *afplb1* 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 نرم افزار رایانه ای CAP به دست آمده است. محل اثر *Xho* I به رنگ قرمز و دارای خط زیرین، و موقعیت پرایمرهای IPCR به صورت خمیده و دارای خط زیرین مشخص شده است. کل توالی ۲۱۹۷ bp است. تجزیه و تحلیل قطعه فوق با نرم افزارهای BLAST X و GeneFinder نشان داد که ۹۶۰ bp اولیه مربوط به انتهای ´۳ ژن *afplb1* آ. *فومیگاتوس* است. رمز پایانی به رنگ آبی و خط زیرین، و دنباله A به رنگ زرد و خط زیرین نشان داده شده است. ترجمه توالی نوکلئوتیدهای انتهای ´۳ ژن مذکور به اسیدآمینه و توالی اسیدهای آمینه پروتئین حاصل نیز در شکل ۲ نشان داده شده است.

```
1   LEYLGTKFNGGSVPSNESCVRGFDNVGFVMGTSSTLFNQFLLQINSTALP
51  DWLKSVFTDILKDIGENDEDIAQYAPNPFYHFSNTTNPSAAELELDLVDG
101 GEDLQNIPLHPLIQPERHVDVIFAVDSSADTTYSWPNGTALVATYERSLN
151 SSGIANGTSFPAIPDQNTFVNKGLNTRPTFFGCNNSNTTGPSPLIVYLPN
201 YPYTAYSNFSTFQPDYTEQERDSTILNGYDVVTMGNSTRDGNWSTCVGCA
251 ILSRSLERTNTNVPEICKQCFQRYCWNGTVNSTTPAGYEPVTILDSAASG
301 IIPSISTVAMVVFAAWTIF
```

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲: ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن *afplb1* به اسید آمینه. توالی های نشان داده شده به رنگ قرمز بخش های کاتالیتیک محافظت شده آنزیم های لیزوفسفولیپاز یوکاریوتی را در مسیر تکامل نشان می دهد که دارای همسانی بسیار بالایی در ژنوم یوکاریوت های مختلف است.

```
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-----SVYAFAPLQYLGSRFENGSIPDNGTCVSGFDNAGFIM
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 TSLVATYER
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  . . .....*.**. .*....**... . **.*.*.*.*.*..  **....*..*.**.


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----------------------
```

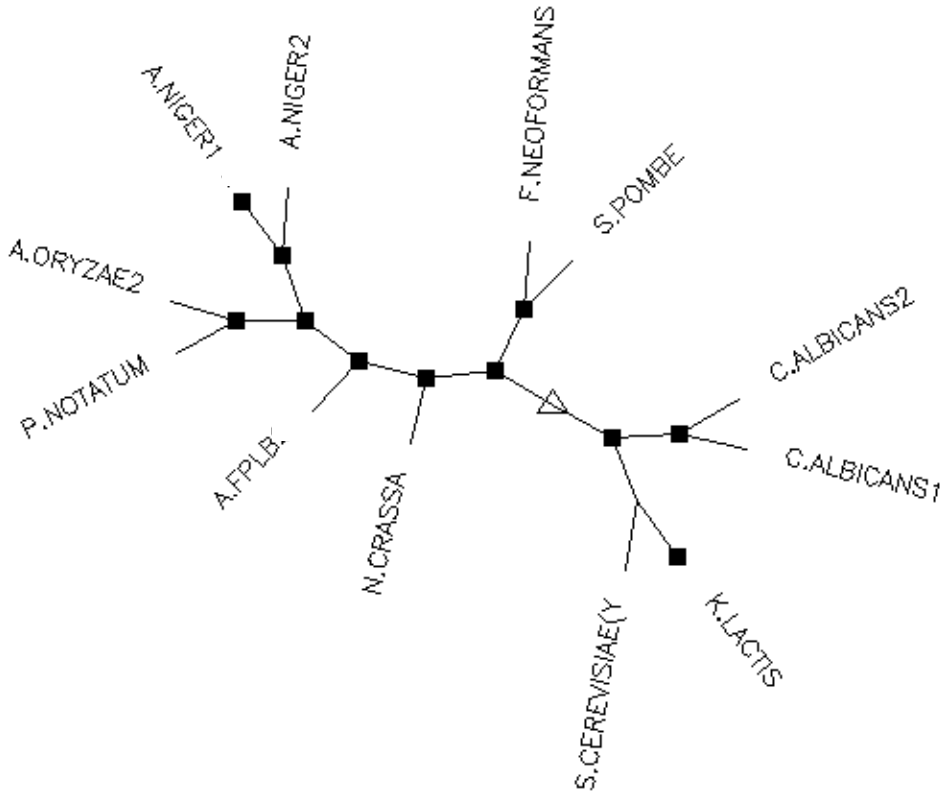
www.SID.ir

Archive of SID


```
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 : همسانی قطعه ای از ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با *plb*، و LpL منتشر شده سایر قارچ ها در سطح اسید آمینه

نمودار فیلوژنیک:



شکل٤: شجره نامه فیلوژنیک قطعه ژن *afplb1*. شجره نامه فیلوژنیک فوق با نرم افزار رایانه ای http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html ترسیم شده است. این شجره نامه نشان دهنده کثرت خوشه آنزیم های Plb بوده و قرابت فیلوژنیک بیشتر *آ. فومیگاتوس* با *نوروسپورا کراسا* را در قیاس با سایر قارچ ها نمایان می سازد.

بحث و نتیجه گیری

تلفیق توالی قطعه ٥٤٥ bp حاصل از PCR اولیه با قطعه ۱۸۰۰bp 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 ۳´←٥´ توالی های هر دو مرحله، و در نهایت، حذف ردیف های تکراری از نوکلئوتیدها امکان پذیر شد. در نتیجه، از جمع جبری ۲۳۴۵ bp نوکلئوتید حاصل از دو مرحله، ۲۱۹۷ bp باقی ماند و ۱۴۸ bp حذف شد.

مقایسه همسانی بین توالی نوکلئوتیدهای بخشی از ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با ژن مشابه در سایر میکروارگانیسم ها نشان دهنده همسانی بسیار بالای توالی اسیدهای نوکلئیک این ژن با ژن *plb* و همچنین ژن لیزوفسفولیپاز در میکروارگانیسم هایی است که توالی ژنتیکی این ژن ها در آن میکروارگانیسم ها شناسایی شده است. مطابق استانداردهای محافل علمی و بانک های اطلاعات ژنومی، همسانی توالی اسیدهای نوکلئیک بین دو ژن در حد ۲۵٪ مشابهت زیاد و نشانه قرابت فیلوژنیک تلقی می شود، و بدین جهت، همسانی حداکثر ۷۶٪ بخشی از ژن *lpl*، *آسپرژیلوس اوریزه آ*

1. Division
2. Ascomycota
3. Class
4. Kingdom

www.SID.ir

Archive of SID

نشان دهندهٔ قرابت فیلوژنیک بسیار زیاد بین این دو میکروارگانیسم در میراث ژنومی و انتقال کاملاً محافظه کارانه گنجینه ژنی در طول مسیر تکاملی در بین گونه های مختلف جنس آسپرژیلوس است. چنان که حداقل همسانی ۴۴٪ بین ژن *Plb* قارچ مخمری *کریپتوکوکوس نئوفرمنس* نیز از استاندارد تشابه ۲۵٪ بسیار زیادتر است و می تواند دلالت بر این امر داشته باشد که در مسیر تکاملی سلسلهٔ قارچ ها، انتقال میراث ژنی در مورد ژن های دارای نقش اساسی در ساختار حیاتی و ژنتیکی این میکروارگانیسم ها به نحو بسیار محافظه کارانه ای انجام گرفته است، زیرا جنس آسپرژیلوس و گونه های مختلف آن به شاخه[1] *اسکومیکوتا*[2] و ردهٔ[3] اسکومیست ها، ولی جنس *فیلوبازیدیلا* و *بازیدیومایکوتا* و ردهٔ *بازیدیومیست* ها تعلق دارند که از نظر تکاملی از *آسکومیکوتاها* تکامل یافته تر هستند ولی علی رغم وجود فاصله تکاملی بین این دو شاخه از میکروارگانیسم های سلسله[4] قارچی همسانی توالی نوکلئوتیدهای ژن های *plb*، در آنها در حدی بسیار بالاتر از حداقل استاندارد تشابه زیاد مشاهده می شود. همچنین توجه به توازن سیر نزولی درصد همسانی توالی ژن های *lpl* و *plb* میکروارگانیسم های مختلف با ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در *جدول ۱* می تواند نشان دهنده افت میزان همسانی توالی ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با میکروارگانیسم هایی باشد که قرابت فیلوژنیک آنها با *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به تدریج کمتر می شود، به نحوی که *lpl* قارچ های کپکی *پنیسیلیوم نوتاتوم*، *آ. اوریزه آ*، *آ. نیجر* و *نوروسپوراکراسا* با توجه به تعلق آنها به آسکوسیت ها (همانند آسپرژیلوس ها) و قرار گرفتن در راسته[1] *ترایکوکوماسه* در مرحله تولید مثل جنسی (همانند *آ. فومیگاتوس*) تشابه بیشتری را (۵۲٪–۷۶٪) با ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نشان می دهد، در حالی که *plb* قارچ های مخمری و شبه مخمری مانند *ک. نئوفرمنس*، *ک. آلبیکانس*، *ش. پومبه*، *س. سرویسیه*، *ک. لاکتیس* به علت قرار گرفتن این قارچ در مرحله تولید مثلی در راسته ای دیگر، تشابه کمتری (۴۴٪–۴۸٪) را با توالی ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نشان می دهد، و در نهایت، انعکاس این همسانی بسیار بالا در تطبیق توالی این ژن ها با همدیگر در سطح اسید آمینه نمایان می شود که نواحی محفوظ متعدد و طولانی را بین این ژن ها در *شکل ۳* نشان می دهد. در این جا ذکر این نکته لازم است که لیزوفسفولیپازها و فسفولیپازهای B دارای فعالیت آنزیمی مشابهی هستند و در تقسیم بندی درونی انواع فسفولیپازها به دو گروه آسیل هیدرولازها و فسفودی استرازها، هر دو آنزیم فوق الذکر در گروه اول قرار می گیرند.

در این بررسی در مراحل نهایی جستجوی طول بیشتری از توالی ژن *plb*، دو روش غربالگری گنجینه ژنی دارای اندازه محدود یا غربالگری کلنی و PCR معکوس (IPCR) مورد استفاده قرار گرفتند. روش اول، در واقع، روش استاندارد و مرسوم برای جداسازی ژن کامل یا طول بیشتری از توالی ژن در مراحل بعد از PCR اولیه است و استفاده از PCR معکوس به علت حساسیت ها و ظرافت های لازم روشی مرسوم محسوب نمی شود. به ویژه تبدیل قطعات DNA خطی حاصل از هضم DNA ژنومی میکروارگانیسم به قطعات DNA حلقوی در مرحله اول این روش نقطه‌ای بحرانی برای مراحل بعدی جستجو است که موفقیت مراحل بعدی بستگی تام به این تبدیل وضعیت DNA دارد، و علاوه بر آن، حساسیت بسیار زیاد این روش به غلظت $MgCl_2$ در مخلوط PCR همراه با مشکلات مربوط به تکثیر قطعه ای طویل از DNA ، استفاده شایع از این روش را به عنوان روش مرسوم مقدور نمی سازد ولی در این بررسی نهایتاً با غلبه بر تمام این مشکلات، امکان تکثیر و تعیین توالی قطعه ای به طول ۲۱۹۷bp از ژنوم *آسپرژیلوس فومیگاتوس* فراهم شد که ۱۲۳۷ bp آن متعلق به قسمت مادون[2] ژن *plb*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ۹۶۰ bp آن مربوط به انتهای ´۳ این ژن است که کدون Triplet یا کدون متوقف کننده و علامت دنباله پلی Aرا در بر می گیرد.

مطالعات مربوط به تعیین توالی ژن هایی که فرآورده های نهایی آنها دارای نقش اساسی در ویرولانس میکروارگانیسم ها هستند، عمدتاً با هدف تعیین میزان مشارکت بیان ژن در قدرت بیماریزایی میکروارگانیسم، تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد فیزیولوژیک فرآورده ژن برای خود میکروارگانیسم و میزبان مورد تهاجم در بافت و استنباط اطلاعات پایه ای برای ارایه شیوهٔ مصونیت بخشی، تهیه واکسن، طراحی دارو یا تهیه مسدود کننده برای فرآورده ژن، استفاده از فرآورده ژن به عنوان شاخص آزمایشگاهی تشخیص عفونت و... صورت می گیرد. با توجه به شناسایی نقش مؤثر فسفولیپازها در ویرولانس میکروارگانیسم هایی نظیر *کریپتوکوکوس نئوفرمنس* (۶، ۷و ۲۹) *کاندیدا آلبیکانس*، انواع آسپرژیلوس ها، *پاراکوکسیدیوئیدس برازیلینیس* (۸، ۱۹، ۲۶و ۳۱)، *مالاسزیافورفور* (۲۰) انواع کلستریدیوم (۱۵)، *آنتامباهیستولیتیکا* (۱۴)، پژوهش های مقدماتی برای استفاده از این آنزیم برای طراحی و تهیه دارو (۲۷، ۳۰و ۳۱)، تشخیص آزمایشگاهی عفونت (۱۹و ۲۶) و تهیه واکسن (۲۸) انجام گرفته است. کلونینگ ژن کامل *plb* و شناسایی کامل توالی نوکلئوتیدهای این ژن و اشراف بر ساختمان پروتئین حاصل از بیان ژن موفقیتی اساسی برای برداشتن گامی بلند در جهت نیل به اهداف فوق خواهد بود.

تقدیر و تشکر

از تشریک مساعی دکتر جفری رابسون و کلیه همکاران گروه PME دانشکده علوم حیاتی دانشگاه منچستر انگلستان برای تمهید مقدمات این پژوهش سپاسگزاری می شود.

1. Order
2. downstream

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Latge, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.
2. Denning, D.W. Aflatoxin and human disease. A review. *Adv drug react acut Pois Rev* 1987; 4: 175-209.
3. Denning D.W. Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections in the immunocompromised host. *J Antimicrob Chemother* Oct; 28 Suppl 1991; B: 1-16.
4. Denning, D.W., Follansbee, S.E., Scolaro, M., Norris, S., Edelstein, H, Stevens, D.A. (1991) Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 7;324(10):654-62.
5. Denning, D.W. Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* Feb 2000; 5;355(9202):423-4.
6. Chen, S.C.A., Muller, M., Zhou, JZ., Wright, L.C., Sorrell, T.C. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *Journal of Infectious Diseases* 1997a ; 175(2): 414-420.
7. Chen, S.C.A., Wright, L.C., Santangelo, R.T., Muller, M., Moran, V.R., Kuchel, P.W., Sorrell, T.C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infection* and *Immunity* 1997b ; 65(2):405-411.
8. Ghannoum, M.A. (1998) Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. *Jpn J Med Mycol* 39:55-59.
9. Titball, R.W. Bacterial phospholipases. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1998; 27:127S-137S.
10. Songer, J.G. Bacterial phospholipases and their roles in virulence. *Trends Microbiol* 1997; 5: 156-161.
11. Denning, D.W. Diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Curr Clin Top Infect Dis* 1996; 16:277-99.
12. Serhan, C.N., Haeggstrom, J.Z., Leslie, C.C. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996; 10:1147-1158.
13. Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M., Hannun, Y.A. Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB J* 1991; 5:2068-2077.
14. Eckmann, L., Reed, S.L., Smith, J.R., Kagnoff, M.F. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1. *J Clin Investig* 1995; 96:1269-1279.
15. Titball, R.W. Bacterial phospholipases C. *Microbiol. Rev* 1993; 57:347-366.
16. Walker, T. S., Brown, J.S., Hoover, C.S., Morgan, D.A. Endothelial prostaglandin secretion: effects of typhus rickettsiae. *J Infect Dis* 1990; 162:1136-1144.
17. Meyers, D.J., & Berk, R.S. Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. *Infect Immun* 1990; 58: 659-666.
18. Oishi, K., Raynor, R.L., Charp, P.A., Kuo, J.F. Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. *J Biol Chem* 1988; 263: 6865-6871.
19. Leidich, S.D., Ibrahim, A.S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., et al. Cloning and disruption of ca*PLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998; 273(40):26078-26086.
20. Plotkin, L.I., 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.
21. Hermans, E., Octave, J.N., Maloteaux, J.M. 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; 49(2):365-72.
22. Johansen, K.a., Gill, R.E., and Vasil, M. L. Monocytogenes biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in Mycobacteria. *Infection* and *immunity* 1996; 64:3259-3266.
23. Kaplanski, G., Teysseire, N., Farnarier, C., Kaplanski, S., Lissitzky, J., Durand, J., 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 Investig* 1995; 96: 2839-2844.
24. Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M . L. Molecular comparision of a nonhaemolytic and a haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeroginosa*. *Journal of bacterilogy* 1990 ; (172): 5915-5923.
25. Gilmore, M.S., Cruz-Rodz, A.L., Leimeister-Wachter, M., Kreft, J., Goebel, W. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cerolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes; nucleotide sequence and genetic linkage. *Journal of Bacteriology* 1989; 171:744-753.
26. Ghannoum, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Micro Rev* 2000; 13:122
27. Hänel, H., Kirsch, R., Schmidts, H.L., Kottmann, H. New systematically active antimycotics from

www.SID.ir

Archive of SID

the beta-blocker category. *Mycoses* 1995; 38: 251-264

28. Williamson, E.D. Titball, R.W. A genetically engineered vaccine against the alpha - toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine* 1993; 11(12): 1253-1258.
29. Reader, U and Brode, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett App Microbiol 1985; 1:17-20.
30. Vidotto, V., Leone, R., Sinicco, A., ItoKuwa, S., Criseo, G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. *Mycopathologia* 1998; 142(2):71-76.
31. Swenson, C.E., Perkins, W.R., Roberts, P., Ahmad, I., Stevens, R., Stevens, D.A., Janoff, A.S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of amphotericin B lipid complex: Are phospholipases important? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 42(4):767-71.

www.SID.ir