

شناسایی، ایزولاسیون، کلونینگ و تعیین توالی ژن مقاومت دارویی به فلوکونازول در اسپرژیلوس فومیگاتوس

عبدالحسن کاظمی^{۱*}، جفری رابسون^۲، دیوید دنینگ^۳، محمد اصغر زاده^۳

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، NPMC، اندوکراین و بیماری های متابولیک، انکولوژی و هماتولوژی و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی تبریز^۱، گروه PME، دانشکده علوم حیاتی، دانشگاه منچستر^۲، گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز^۳

تاریخ دریافت: ۸۶۷/۲۶، تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۲۰

Identification, Isolation, Cloning and Sequencing of Fluconazole Resistance Gene in *Aspergillus Fumigatus*

Kazemi A.^{1*}, Robson G.D.², Denning D.W.², Asghar Zade M.³

¹Biotechnology, NPMC, Endocrine & Metabolic Disease, Oncology & Hematology, Tropical & Infectious Diseases Research Center, Tabriz University Of Medical Sciences, ²PME Division, School of Biological Sciences University Of Manchester, UK.,

³Biochemistry Dept., School of Medicine, Tabriz University Of Medical Sciences

Received: 2007/10/18, Accepted: 2008/3/10

Objectives: Development of azole resistance in opportunistic fungi is the most problematic reason in immunocompromised patients and at present time, there is an increased awareness of the morbidity and mortality associated with fungal infections caused by resistant fungi to imidazole. This research was carried out for cloning and sequencing of Fluconazole resistance gene. **Methods:** Using genomic DNA of *Aspergillus fumigatus* (ATCC strain 90254) a primary 800 bp PCR product and then a secondary 1750 bp inverse PCR product were obtained. The 1750 bp PCR product was gel purified and cloned into *E. coli* using the suitable plasmid. Plasmid was extracted from transformed *E. coli* and the presence of expected insert into plasmid, was confirmed by digestion of plasmid using Eco R1 restriction enzyme. Also southern analysis using standard protocol was carried out for investigation of gene expression. **Results:** Gel purified 1750 bp band was sequenced and after deletion of extra nucleotides from both side of residue a 1703 bp motif submitted at NCBI gene bank with accession No.: AY848856. **Conclusion:** In conclusion considering (resistant to fluconazole) *A. fumigatus* resistance gene to this compound was cloned and sequenced successfully in our lab. Since *A. fumigatus* is increasingly resistant to the widely used fluconazole, we emphasize for future additional studies for expression of this gene and its mRNA transcription to understand the effective and inhibitor factors for expression of gene.

Key words: Fluconazole resistance, Gene, Sequencing, *Aspergillus fumigatus*.

زمینه و هدف: گزارشی از مشاهده مقاومت به فلوکونازول در قارچ های بیماری زا در بیماران مبتلا به میکوز های مخاطی و احشایی وجود دارد و بعضی از این قارچ ها، ظاهراً به آزولهای دیگر نیز مقاومت متقاطع دارند. مکانیسم های مولکولی مقاومت دارویی به آزولها شامل بیان زیاد تعدادی از ژنهای پمپ مواد به خارج، ژن تسهیل کننده ماژور، بیان بیش از اندازه ژن ERG11 بر اثر ایجاد موتاسیون در این ژن و تغییرات در دیگر آنزیم های درگیر در بیوسنتز ارگوسترول می باشد؛ که این عملکرد، منجر به کاهش تجمع دارو در سلولهای سوشهای مقاوم می شود. این پژوهش با توجه به اهمیت مقاومت دارویی به فلوکونازول به وسیله عوامل میکوز های عمقی و زیر جلدی انجام گرفت زیرا این میکوزها در صورت عدم درمان صحیح و سریع پیش آگهی وخیمی دارند. **روش ها:** DNA ژنومی کپک *اسپرژیلوس فومیگاتوس* استخراج گردیده و پس از تکثیر قطعه DNA هدف با روش PCR دژنراتیو و برگشتی، قطعه تکثیر شده به حامل pGEMT-Easy vector وارد شده و برای انجام مراحل شناسایی توالی ژن مقاومت دارویی به فلوکونازول به میزبان حساس (*E. coli* Top 10 F') منتقل گردید. **یافته ها:** از قطعه ۱۷۵۰ نوکلئوتیدی حاصل از PCR دژنراتیو و PCR برگشتی، توالی ژن مقاومت دارویی به فلوکونازول شناسایی شده در *A. فومیگا* توس به طول نهایی ۱۷۰۳ نوکلئوتید، همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه در سایر میکروارگانیسمهای قارچی را نشان می دهد. نتیجه ساترن بلاتینگ نیز بیانگر وجود چند نسخه از این ژن در ژنوم *A. فومیگاتوس* می باشد. **نتیجه گیری:** مطالعات مربوط به تعیین توالی ژن ها به منظور تعیین میزان دخالت محصولات ژنی در بیماری زایی میکروارگانیسم؛ شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی و اعمال فیزیولوژیک حاصل از بیان ژن برای درک اطلاعات بنیادی انجام می گیرد. هدف این گونه مطالعات تولید محصولاتی مانند واکسن، دارو و یا بلوکر برای ژن و یا توضیح شرایط ایمنی بخشی محصولات حاصل از بیان ژن، بهره برداری از محصول ژن بعنوان شاخص شناسایی میکروارگانیسم و یا تشخیص عفونت و ... است و کلونینگ ژن مقاومت دارویی به برای رسیدن به موارد فوق کاربرد خواهد داشت.

واژه های کلیدی: ویروانس، قارچ، ژن، مقاومت دارویی، فلوکونازول.

*Corresponding Author: Dr Abdolhassan Kazemi, Associate Professor, NPMC, Endocrine & Metabolic Disease, Oncology & Hematology, Tropical & Infectious Diseases, Nutrition Research Center, Tabriz University of Medical sciences, Tel: 0411 3364665; Fax: 0411 3364665; E-mail: kazemi@adineh.net

*نویسنده مسئول: دکتر عبدالحسن کاظمی، دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، NPMC، اندوکراین و بیماری های متابولیک، انکولوژی و هماتولوژی، تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۵، نمابر: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۵

۱- مقدمه

فلوکونازول یک ترکیب سنتتیک تری آزول دوتایی است (شکل یک) که با ممانعت در مرحله دمتیلاسیون آنزیم وابسته به سیتوکروم P-450 در تشکیل ارگوسترول (استرول اصلی غشا سلولهای قارچی حساس) اختلال ایجاد می نماید. بنابراین، تقلیل و نقصان ارگوسترول و تجمع استرولهای متیلات منجر به تغییر برخی عملکردهای سلولی مرتبط با غشاء قارچ ها می شود (۵-۱). بیشترین فعالیت ضد قارچی فلوکونازول روی گونه های *کاندیدا*، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و *کوکسیدیدیوس ایمیتیس* است. فلوکونازول فعالیت محدودتری بر علیه *بلاستومایسیس درماتیتیدس*، *هیستوپلاسما کپسولانوم*، و *اسپوروتریکس سنکئی* داشته و به عنوان عامل خط دوم در عفونت های ناشی از این قارچها استفاده می شود (۷-۴). فلوکونازول بر علیه درماتوفیت ها (گونه های *ترایکوفایتون*، *میکروسپوروم* و *اییدرموفیتون*) فعال بوده اما ظاهراً روی اغلب کپکهای دیگر شامل گونه های *آسپرژیلوس* و *زایگومیست* بی اثر است (۹ و ۸ و ۵ و ۱). با وجود حساسیت برخی گونه های *کاندیدا* به فلوکونازول، *کاندیدا* *کروزه ایی* به طور طبیعی به آن مقاوم است (۱۰). ایزوله های *کاندیدا* *گلابراتا* به فلوکونازول حساسیت کمی داشته و حدوداً ۱۰٪ از گونه های ایزوله شده از جریان خون، نسبت آن مقاومند (۱۱ و ۱۰). گزارشات اندکی از ایجاد مقاومت *کاندیدا آلبیکنس* یا *کاندیدا* *تروپیکالیس* حین درمان کوتاه مدت با فلوکونازول در بیماران مبتلا به اشکال مخاطی و احشایی *کاندیدیا*زیس وجود دارد (۱۲). در بیماران مبتلا به ایدز، سوشهای مقاوم *کاندیدا آلبیکنس* به دنبال مصرف متناوب دوزهای درمانی اندک فلوکونازول در عفونت های دهانی و مری ظاهر شده اند. بعضی از این سوشهای *کاندیدا آلبیکنس* مقاوم به فلوکونازول، ظاهراً به آزولهای دیگر نیز مقاومت متقاطع دارند. در حال حاضر این موضوع مشکل نادری است (۱۷-۱۲ و ۲). تعداد اندکی گزارش در مورد سوشهای مقاوم *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* جدا شده از بیماران مبتلا به ایدز (با عفونت های عود کننده به دنبال درمان نگهدارنده طولی مدت فلوکونازول) وجود دارد (۱۸ و ۱۷ و ۱۲ و ۲).

چند مورد از مکانیسم های مولکولی ایجاد مقاومت دارویی آزولها در *کاندیدا آلبیکنس* روشن شده است. این مکانیسمها شامل، بیان بیش از اندازه تعدادی از ژنهای پمپ (مواد) به خارج (شامل ژنهای منتقل کننده ABC (۲۱-۱۹ و ۱۶ و ۸)، CDR1، CDR2 (۲۴-۲۲) ژن تسهیل کننده ماژور، MDR1 (۲۷-۲۵ و ۱۵ و ۸) می باشد، که این عملکرد، منجر به

کاهش تجمع دارو در سلولهای سوش های مقاوم می شود (۲۸ و ۱۲). دومین مکانیسم ایجاد مقاومت، موتاسیون نقطه ای در ژن ERG11 است که آنزیم هدف را به صورت رمز در می آورد (دی متیلاز α -14 لانونسترول) (۳۰-۲۹). این موتاسیونها با تغییر ساختمانی آنزیم باعث کاهش اتصال به داروهای ضد قارچ آزولی می گردند (۳۰ و ۱).

سومین مکانیسم ایجاد مقاومت، بیان بیش از اندازه ژن ERG11 شده که منجر به تولید بیش از اندازه آنزیم هدف می شود (۳۰ و ۲۹ و ۹). علاوه بر اینها، مستندات گرد آوری شده نشان می دهد که تغییرات در دیگر آنزیمها درگیر در بیوسنتز ارگوسترول (نظیر C5, C6 sterol desaturase, FCY2, AtrB, Fcrp1, CYP51-۳۳ و ۳۱ و ۲۴ و ۱۹ و ۱۱) می تواند در مقاومت آزولی نقش داشته باشد. مقاومت به فلوکونازول توسط *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نیز بر اثر مکانیسم های مختلفی مثلاً "دخال CYP51 گزارش شده است و بروز این مقاومت دارویی در قارچ ها و بویژه در کپک ها به فلوکونازول با توجه به پیش آگهی وخیم میکوزهای ناشی از *آسپرژیلوس فومیگاتوس* از نظر سلامت بیماران، انتخاب و تجویز پروتکل های درمانی مناسب برای بیماران و... حائز اهمیت فراوانی است (۳۵-۳۳). با توجه به این مباحث این پژوهش با توجه به اهمیت موضوع مقاومت دارویی به فلوکونازول به وسیله قارچ های عامل میکوز های عمقی و زیر جلدی انجام گرفت زیرا این میکوزها در صورت عدم درمان صحیح و سریع پیش آگهی وخیمی دارند (۳۶-۳۲ و ۱۷ و ۲).

۲- مواد و روش ها

۱-۲ میکروارگانسیم های مورد استفاده در مراحل

مختلف این تحقیق عبارت بودند از:

• موش قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (ATCC ۹۰۲۵۴)
از FGSC, Department of Microbiology, University of Kansas Medical Centre, Kansas, USA
• Plasmid pGEM[®]-T easy vector Promega, 2800 Woods Hollow Rd., Madison, U.S.A.

• *E. coli* Top10F['] Invitrogen, Leek, The Netherlands

• DNA ژنومی کپک *آسپرژیلوس فومیگاتوس*.

۲-۲ مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در مراحل

مختلف این تحقیق عبارت بودند از:

• مخلوط نوکلئوتیدی برای PCR و Taq DNA پلیمرز،

T4 DNA لیگاز، محلول MgCl₂, شاخص DNA 1 kb,

آنزیمهای محدودالایتر از شرکت سینژن،

۴۰۰۰g، DNA ژنومی رسوب داده شده و سپس با شستشو بوسیله اتانول ۷۰٪ و حل نمودن رسوب DNA در ddH₂O و افزودن RNAase A، ماده ژنتیکی حاصله برای مصارف آتی در C ۲۰- نگهداری گردید. کمیت سنجی DNA ژنومی استخراج شده از میکروارگانسیم مورد نظر و شاهد مثبت با استفاده از دو تکنیک ۱- مقایسه غلظت DNA رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورز با غلظت DNA استاندارد (DNA شاخص GIBCO BRL, 1kb) ۲- غلظت سنجی DNA در محلول تهیه شده با استفاده از OD ۲۶۰=۱ در اسپکتروفتومتر انجام گرفت که در تکنیک اول با مقایسه شدت رنگ و میزان وضوح باند حاصل از PCR دژنراتیو با شدت رنگ DNA شاخص، میزان DNA موجود در باند حاصل از PCR تخمین زده می شود و در تکنیک دوم، میزان جذب نور (OD) بر اساس A260 و A280 در اسپکتروفتومتر در طول موج معین بوسیله محلول DNA دارای رقت مشخص، محاسبه میزان DNA در باند حاصل از PCR را امکان پذیر می سازد.

۵-۲: دژنراتیو PCR

از توالی ژنتیکی محفوظ برای ژن مقاومت دارویی به فلوکونازول (frg) در کاندیدا آلبیکانس، *C. albicans* فیلو بازیدیل، *Filobasidiella neoformans* ساکارومایسس سرویسیه *Saccharomyces cerevisiae*، اسپریلیوس نیدولانس *A. nidulans*، آ. فلاووس *A. flavus* و شیزوساکرومایسس پومبه *Shizosaccharomyces pomb* پرایمرهای (GCY GTI TCI TCR TAR ACY TCC AT) و (CRI ACI GTR CCT TGY ACY CC) طراحی و برای تکثیر قطعه هدف تخمینی به طول ۸۰۰bp استفاده شد. تکثیر قطعه مورد نظر با تکنیک PCR دژنراتیو از DNA ژنومی در ترموسایکلر با شرایط ۱۵۰ ثانیه در C ۹۴ برای یک سیکل، یک دقیقه در C ۹۴، یک دقیقه در C ۵۰ و ۷۰ ثانیه در C ۷۲ برای ۲۹ سیکل و نهایتاً یک دقیقه در C ۹۴، یک دقیقه در C ۵۰ و پنج دقیقه در C ۷۲ برای یک سیکل با موفقیت انجام گردید و محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز تهیه شده با بافر TBE و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی صورت گرفته و تصویر لازم تهیه گردید (شکل دو).

۶-۲: کلونینگ و تعیین توالی

۵۰ul از محصول PCR با استفاده از ژل الکتروفورز تهیه شده با بافر TAE آنالیز شده و پس از بریدن قطعه هدف از روی ژل، DNA این قطعه با QIAquick gel extraction kit از ژل استخراج و تلیخیص گردید. باند ۸۰۰bp استخراج شده به

• DNA Pwo پلیمرز، Expand™ High prime labeling kit, high fidelity PCR, DIG detection kit, DIG high prime labeling kit, Nitrocellulose membrane (Boehringer Mannheim Lewes, E. Sussex, U.K.)
 • QIAquick PCR purification kit, QIAprep plasmid kit, QIAprep maxi plasmid kit, Qiagen Inc Valencia, (QIAquick gel extraction kit, California, U.S.A)
 • Wide Mini Sub Cell™ (DNA gel) (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel, Hempstead, Hertfordshire, U.K.), RNAase A (Gibco BRL, Paisley, IPTG, Blue-Gal, X-Gal, Renfrewshire, U.K.)
 • آمپی سیلین، اتیدیوم بروماید، توین ۲۰، اسید مالیک Sigma chemical company Ltd. Poole, Dorset, U.K.
 • عصاره مخمر، آگار باکتریولوژیک، تری-پتون از Oxiod Ltd., Basingstoke, Hampshire, U.K.

۳-۲: نرم افزارهای بیوانفورماتیکی برای تحلیل توالیهای اسیدهای نوکلئیک و آمینه

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (http://blast.genome.ad.jp/)
 (http://au.expasy.org/tools/dna.html)
 (http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html)
 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)
 (http://arep.med.harvard.edu/labgc/adnan/projects/Utilities/revcomp.html).
 (http://www.sequence.neurobio.upr.clu.edu/cap.cgi)
 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html)
 (http://darwin.bio.geneso.edu/~yin/WebGene/RE.html).
 http://www.molecularworkshop.com/programs/lorf100.html
 http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/#submission

۴-۲: روش انجام مطالعه

DNA ژنومی قارچ بیماریزای *Aspergillus fumigatus* فومیگا توس از پرگنه های این قارچ استخراج گردید. ابتدا پرگنه های قارچی در نیتروژن مایع آسیاب شده و بمدت ۲۰ دقیقه در C ۶۵ با حجم مساوی از بافر استخراج DNA مخلوط شده و بعد با افزودن مقدار یکسان از کلروفرم و ایزومیل الکل (نسبت ۱:۲۴) به مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در 12000 g و در C ۴۰ سانتریفوژ شده، لایه فوقانی به لوله استریل جدید منتقل و با استفاده از حجم مساوی ایزوپروپانول به مدت ده دقیقه در

حامل pGEMT-Easy vector با استفاده از روش استاندارد (تهیه مخلوط واکنش از باند ۸۰۰ bp استخراج PCR و حامل pGEMT-Easy vector به نسبت سه به یک همراه با بافر و مولکول های ATP و سپس انکوباسیون به مدت حدود ۱۶ ساعت در چهار درجه سانتی گراد پیوند زده شده و بعد به سلول میزبان حساس (سلول تیمار شده با کلریسد کلسیم و دارای غشا واجد قابلیت نفوذ پذیری به حامل pGEMT-Easy vector) مورد استفاده یعنی (*E. coli* Top 10 F') منتقل شد. با غربالگری کلنی های آبی - سفید حاصل از رشد *E. coli* Top 10 F' در محیط کشت LB حاوی ۵-برومو-۴-کلرو-۳-ایندولیل-بتا-دی-گالاکتو پیرانوزید (X-gal) و ایزوپروپیل - بتا - دی - تیوگالاتو پیرانوزید (IPTG) انجام شده و سپس از تعدادی کلنی (۱۳-۶) حاوی حامل ترانسفورم شده انتخاب گردید. کلنیهای منتخب در محیط LB (Luria-Burtani) مایع کشت داده شده و سپس حامل حاوی قطعه تکثیر شده با PCR از مجموعه باکتریهای تک تک محیط های LB مایع با تخریب سلولی و مراحل بعدی آن جدا گردید. برش قطعه PCR از ناحیه Multi Cloning Site (MCS) حامل با استفاده از اندونوکلاز محدودالایر *Eco* RI انجام گردیده و پس از تاثیر دو ساعته آنزیم فوق در 37°C بر روی حامل، محصول 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، بصورت خالص بدست آمد (شکل سه). تعیین توالی نوکلئوتیدها در محصول این PCR با استفاده از سیستم ABI اتوماتیک انجام گردید و توالی قسمتی از ژن *frg* اسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus* به طول ۸۰۰ bp بدست آمد (شکل ۳). برای تایید صحت محصول حاصل از PCR دژنراتیو، پس از تعیین توالی باندهای حاصله، تعیین همسانی توالی نوکلئوتیدی ژنهای *frg* فومیگا توس *A. fumigatus*، *C. albicans*، ساکارومایسس سرویسیه *S. cerevisiae*، *F. neoformans* و *A. flavus* فیلوبازیدیا نئوفورمنس با وسیله BLAST X، همسانی بالایی را با توالی نوکلئوتیدی ژن مشابه در سایر میکروارگانیسم ها نشان داد (جدول یک) که نشان دهنده توفیق در تکثیر بخشی از ژن مورد نظر در اسپرژیلوس فومیگا توس *A. fumigatus* با PCR دژنراتیو می باشد.

۷-۲: ساترن بلاتینگ

با توجه به ضرورت ادامه بررسی در مورد وجود *frg* در ژنوم *A. fumigatus* فومیگاتوس و تایید مجدد وجود *frg* در ژنوم این قارچ، بررسی تعداد کپی ژن در ژنوم و

همچنین تخمین اندازه مناسب قطعه ژنومی برای کلونینگ و تعیین توالی مرحله بعدی، DNA ژنومی *A. fumigatus* با سریالی از اندونوکلازهای محدودالایر شامل *Apa* I و *Brf* I و *Bji* I و *Kpn* I و *Sal* I و *Xba* I و *Xho* I هضم و ساترن بلاتینگ Southern blotting با استفاده از پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسی جنین (DIG) Digoxigenin انجام و قطعات DNA حاوی تمام یا قسمتی از *frg* به ترتیب به طولهای تخمینی ۱۲/۸ kb و ۸/۹ kb و ۵/۴kb و ۳/۱ kb و ۱/۲ kb و ۰/۷ kb در شرایط بحرانی شناسایی گردید. با توجه به نتایج ساترن بلاتینگ، وجود چند نسخه از ژن مقاومت دارویی به فلوکونازول در ژنوم *A. fumigatus* تایید شد و بنابراین قطعه ژن حاصله در این بررسی *affrg1* نامیده شد (شکل سه).

۸-۲ PCR برگشتی

برای کلون نمودن و تعیین توالی طول کامل ژن *affrg1* از روش PCR برگشتی (IPCR) استفاده شد (۳۹-۳۷). برای انجام این روش، قطعات خطی از DNA ژنومی هضم شده با اندونوکلاز های محدودالایر شامل *Apa* I و *Brf* I و *Kpn* I و *Sal* I و *Xba* I و *Xho* I ابتدا تحت تاثیر آنزیم DNA لیگاز T4 (T4 DNA Ligase) به قطعه DNA حلقوی تبدیل شده و بعد با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای انجام IPCR، تکثیر DNA حلقوی حاوی طول بیشتری از ژن *affrg1* در ترموسیکلر با شرایط ۳ دقیقه در 95°C برای یک سیکل، یک دقیقه در 95°C در 66°C و سه دقیقه در 69°C برای ۱۰ سیکل، یک دقیقه در 95°C ، یک دقیقه در ۶۵، سه دقیقه + پنج ثانیه اضافی به ازای انجام هر سیکل در 69°C برای ۲۴ سیکل، یک دقیقه در 95°C ، یک دقیقه در 66°C و ده دقیقه در 71°C برای یک سیکل با DNA پلیمرز Expand™ high fidelity انجام گردید و قطعه ای به طول حدود ۱۷۵۰ bp در الکتروفورز محصول IPCR شناسایی شد (شکل چهار). توالی پرایمرهای PCR برگشتی عبارت بودند از:

5' CGTCGAATTCGACGACGTATGTTTCC 3'

5' TGCTGCTGATCTCGCTGTATATCTCG 3'

توالی DNA در فرآورده حاصل از IPCR با انجام مجدد موارد مشروحه برای توالی یابی DNA ژنومی با ارسال آنها به شرکت MWG در آلمان با روش پیمودن طول قطعات با پرایمر (Primer Walking) شناسایی شد. در توالی نوکلئوتیدی به دست آمده، با حذف نوکلئوتیدهای مربوط به پرایمرهای طراحی شده از طول توالی و همچنین حذف ردیف های همپوشان Overlap مشابه در هر کدام از قطعات (شامل قطعه ۸۰۰bp اولیه و قطعات واقع در دو سمت قطعه

توالی طول کامل *affrg1* با توالی نوکلئوتیدی ژن مشابه در سایر قارچ ها با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مقایسه کننده همسانی توالی های نوکلئوتیدی مجهوا الهویه و یا مشکوک الهویه با توالی های نوکلئوتیدی دارای هویت مشخص و تایید شده در بانک های ژنی جهانی و معتبر، به منزله تایید کامل و قطعی هویت ژن شناسایی شده در این بررسی به عنوان ژن مقاومت دارویی به فلوکونازول در *frg* میکروارگانیزم مورد مطالعه یعنی *A. fumigatus* می باشد. همچنین با توجه به نتایج ساترن بلاتینگ برای ژنوم *A. fumigatus*، وجود چند نسخه از ژن مقاومت دارویی به فلوکونازول در ژنوم *A. fumigatus* تایید شد و بنابراین قطعه ژن حاصله در این بررسی *affrg1* نامیده شد تا در صورت شناسایی نسخه های دیگری از ژن *frg* در ژنوم *A. fumigatus*، در مطالعات آتی این ژنوم، هویت ژن شناسایی شده در این تحقیق مشخص باشد. ژن *affrg1* به دست آمده با شماره پذیرش AY۸۴۸۸۵۶ در بانک ژنی ایالات متحده امریکا (NCBI gene bank) به نام محققین و دانشگاه علوم پزشکی تبریز ثبت گردید.

۸۰۰bp اولیه که با استفاده از PCR برگشتی به دست آمدند، توالی های مربوط به قطعات *affrg1* با رعایت جهت 5'→3' بصورت دستی و با نرم افزار (CAP) Contig Assembly programme با یکدیگر تلفیق شدند و قطعه ای به طول ۱۷۰۳ bp برای *affrg1* به دست آمد (شکل پنج).

۳- نتایج

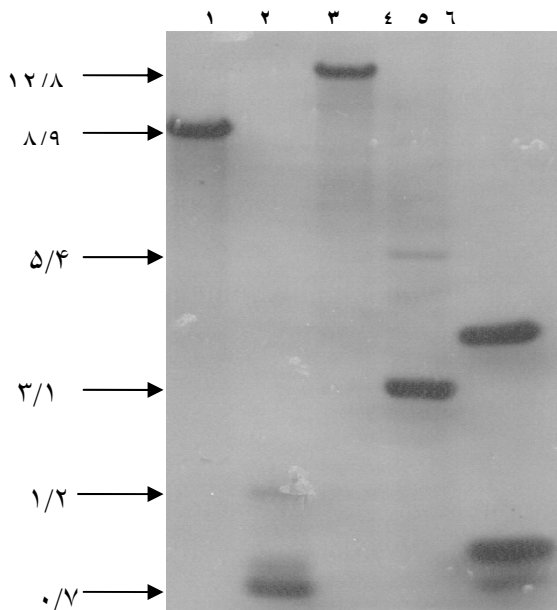
تشابه توالی حاصل با توالی ژن *frg* سایر قارچ ها و در نتیجه شناسایی آن بعنوان ژن *frg* در *A. fumigatus*، نتایج شناسایی این توالی با توالی های *frg* موجود در Gene bank انجام گرفت. این مقایسه با استفاده از نرم افزارهای کامپیوتری موسوم با بلاست BLAST در سایت National Center for Biotechnology Information (NCBI) یا نرم افزارهای مرکز بیوانفورماتیک دانشگاه توکیو و با ارائه توالی ژن به فرم فاستا FASTA به نرم افزار بیوانفورماتیکی انجام گردید و تشابه بالایی را مابین توالی طول کامل *affrg1* با توالی نوکلئوتیدی ژن مشابه در سایر قارچ ها را نشان داد (جدول دو) که با درصد تشابه توالی بخشی از طول *affrg1* (جدول یک) تفاوت اندکی دارد. شناسایی مشابهت بالا مابین

جدول ۱: درصد تطابق توالی بخشی از ژن *affrg1* *A. fumigatus* با توالی ژن های *frg* سایر قارچ ها

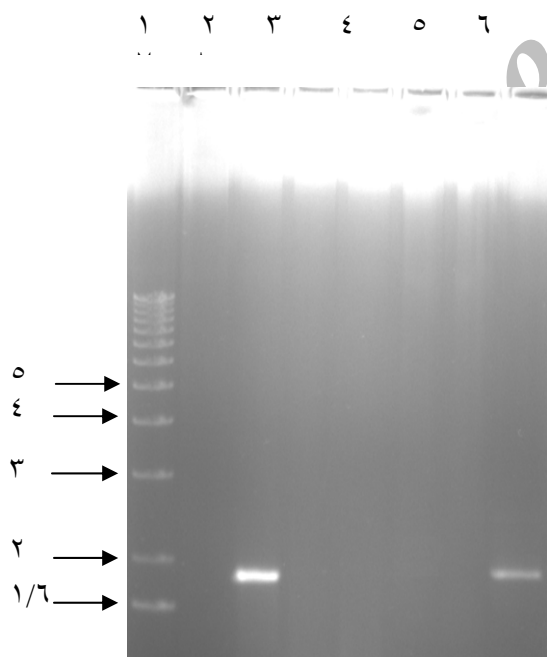
در صد همسانی	رده بندی	جنس و گونه
٪۷۴	همی اسکومیست	آسپرژیلوس نیدولانس
٪۶۹	همی اسکومیست	ساکارومایسس سرویسیه
٪۶۸	همی اسکومیست	کاندیدا آلبیکانس
٪۴۵	همی اسکومیست (تریکوکوماسه)	آسپرژیلوس فلاووس
٪۴۱	همی اسکومیست (آرکتو آسکومایستا)	فیلوبازیدیا نئوفرمئس

جدول ۲: درصد تطابق توالی بخشی از ژن *affrg1* *A. fumigatus* با توالی ژن های *frg* سایر قارچها

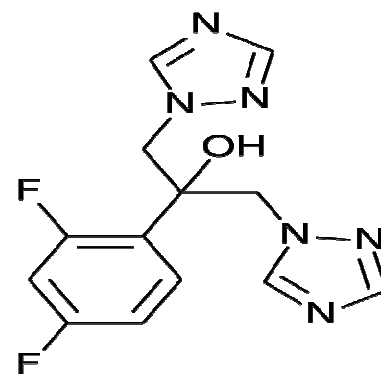
در صد همسانی	رده بندی	جنس و گونه
٪۷۱	همی اسکومیست	آسپرژیلوس نیدولانس
٪۶۷	همی اسکومیست	ساکارومایسس سرویسیه
٪۶۵	همی اسکومیست	کاندیدا آلبیکانس
٪۴۴	همی اسکومیست (تریکوکوماسه)	آسپرژیلوس فلاووس
٪۴۰	بازیدیو میست	فیلوبازیدیا نئوفرمئس



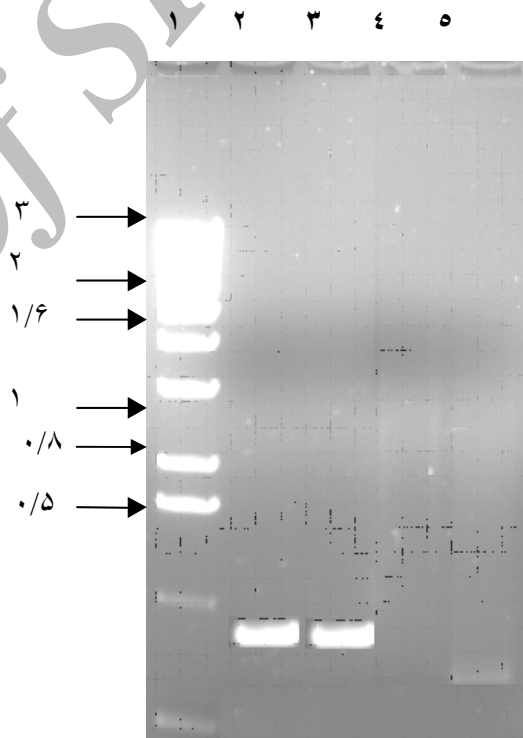
شکل ۳: ساترن بلائینگ DNA ژنومی اسپرژیلوس فومیگاتوس؛ باندهای حاصل از ساترن بلائینگ DNA ژنومی اسپرژیلوس فومیگاتوس با استفاده از پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسی جنین (DIG) Digoxigenin (DIG). علامت + جهت رانش را نشان می دهد. میزان DNA ژنومی اسپرژیلوس فومیگاتوس مورد استفاده برای هر چاهک ژل ۴۰ul بود.



شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR برگشتی؛ ستون های ۳ و ۸ باندهای محصولات PCR برگشتی از قطعات DNA حلقوی ژنومی *A. fumigatus*، را با غلظت های متفاوت $MgCl_2$ نشان می دهد. ستون یک، باندهای شاخص و دو و چهار الی هفت به ترتیب محصولات PCR مربوط به نمونه کنترل فاقد DNA، آب مقطر، با هر یک از دو پرایمر و آب مقطر همراه با هر دو پرایمر را نشان می دهد. علامت + جهت رانش را نشان می دهد.



شکل ۱: ساختار مولکولی فلوکنازول



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR دژنراتیو؛ ستون های ۲-۳ مربوط به محصولات PCR دژنراتیو از DNA ژنومی اسپرژیلوس فومیگاتوس *A. fumigatus*، را با دو غلظت متفاوت $MgCl_2$ نشان می دهد. ستون یک، باندهای شاخص و ستون چهار و پنج به ترتیب محصولات PCR مربوط به نمونه کنترل فاقد DNA ژنومی و با یک پرایمر را نشان می دهد. علامت + جهت رانش را نشان می دهد.

ATGGACCACCCAGAGACTTCCACTCTGGACTCGCATTCCGCCAAAGCTTTTCGACGATGAC
 CACCATGGCAGCCACCCGCTCGATAGCGCCAGTGAAGTGTCTCTCGGACGAAACGGTAGAC
 CATCTCGAACCCCTCGAGCTCACCCGCATCAACACCTACCGACTCCAGCAAAAGACCACC
 GTGGGCTCCACACGCGGCCCTGCACCACGCGAGACATGGCTGCCCATGGGCGCCGGCAAG
 GAATACCCCTCCCTTACTGCCCGATCCGGAACATACGTGCTCGAATTCGACGGAGCGGAG
 GATCCCTACACCCATAACAATGGTCCATGACCCGAAGAATCTTCCTGGTCTGCATCCTC
 TGCTACGGCACCTTCGCCGGCTCCTTCGCCAGTGCCGTCTTCTCCGCGGCCATCGCCTCC
 TCCAGCAAAGAATCCATATCAGCCAGGAAGTCGGCTCGCTCGGCGTCACGCTGTACGTG
 CTCGGCTTCGCCGCTGGGCCAACCATCTGGGCCCCCTGCCTCGGAGCTCATCGGACGGCGC
 TGGCCGCTGTCCCTGGGCCCTCCTGGGGTGGGGATTTTACCCTGGGCTGCGCAACGGGG
 AAGGACGTTTCAGACTCTCATGATCTGTGCGTCTTTTGGCGGCTTGTTCGCCCGAGCCCG
 ATCTCCGTCGTGCCTGCTGTCTTTGCGGATCTGTTCAACAATGCGCAGCGCGGGATCGTC
 ATGTGATCTTCTGCATGGCGGTGTTTATCGGTCCGTTTTCGCCGCGCCGTTTGTAGCGGG
 TTCATCACGATGAGTGGCTCGGTTGGCGCTGGACGATGTACATCTCTGCGATAATGGTG
 TTGCTGGGATTTGTGCTTGTGTGCTGTTCTCGGATGAGACCTATGCGCCTGTTATTCTG
 GTGCGCAAGGCGGCGACGCTGCGGCGGCAGACGCATAATTGGGGTATCCATGCGAAGCAG
 ATGAGGTCGAGGTTGATTTCCATGAAGTGGTGGGAATAATTTACGAGACCGCTGAAGA
 TGCTGTTACCGAGCCGATTTCTGCTGCTGATCTCGCTGTATATCTCGTTTATCTACGGGC
 TCATCTATGCCCTGCTCGGTGCATACCCCTGCTGCTTCCAGAGGGTGTACGGGATGAACA
 TGGGCGAGGGGGACTGGCGTTTGTGCGCCTGATCATTGGAGAATTGCTCGGTGGCGTCT
 TCATCCTGTTTCTCCAAGGCTCATACATCAAGAACTGGCTGCGAATGGAGACGTTCCCG
 TGCCGGAGTGGCGTCTTCCCCCGGCGATTGTGGGAGGAATCACCTTTGCTGCGGGCATGT
 TTTGGTTTCGGCTGGACTGGCTATACCTCGTCCATTCACTGGATGGTGCCTATTTTCATCTG
 GCGTCTGACTGGCTTTGGCATCTTCTGCATCTTCTCGAGTGTCTTCAACTACATCGTTG
 ACTGCTATCCTACTTTGGCTGCTTCCACAATCGCAGCCAACACCATCCTCCGTTCCCGCAG
 TCGGATGGCGATTTCCCTGTTCTCTCGGCAGATGATGGAGAACCCTTGGCGTACAATGGG
 CTGGGACGATGCTGGGCTGCATTCAGCAGTAATGGTGGCGATTCCAATTGCATTCATGG
 GTACGGCCCTTGGCTGAGAAGTAAGAGTCGATCAGCCGGTGTCTCCTGTCTATCCGGAGA
 CAAAAAAGCAGTATGATGTTTGA

شکل ۶: توالی نوکلئوتیدی ژن *affr1* آ. فومیگاتوس *A. fumigatus*

۴- بحث

و می تواند دلالت بر این امر داشته باشد که در مسیر تکاملی سلسله قارچ ها، انتقال میراث ژنی در مورد ژن *frg* در ساختار ژنتیکی این قارچ ها (۲۱ و ۱۱)، به صورت محافظت شده انجام یافته است.

۵- نتیجه گیری

مطالعات مربوط به تعیین توالی ژن ها برای تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد فیزیولوژیک محصول ژن برای خود میکروارگانیزم و میزبان مورد تهاجم و استنباط اطلاعات پایه برای ارائه شیوه مصونیت بخشی، تهیه واکسن، طراحی دارو و یا تهیه بلوکر برای محصول ژن، استفاده از محصول ژن بعنوان شاخص آزمایشگاهی تشخیص عفونت و ... صورت می گیرد.

با توجه به شناسایی نقش ژن *frg* در ویروانس تعداد زیادی از قارچ ها پژوهشهای مقدماتی برای استفاده از این آنزیم برای طراحی و تهیه دارو، تشخیص آزمایشگاهی عفونت، تهیه واکسن انجام گرفته است و لزوم ادامه پژوهش در این زمینه وجود دارد.

مقایسه تطابق بین توالی نوکلئوتیدی ژن *affr1* با ژن مشابه در سایر قارچ ها نشانه همسانی بسیار بالای توالی نوکلئوتیدی ژن *affr1* با ژن *frg* در قارچ هایی است که توالی ژن *frg* در آن میکروارگانیزم ها شناسایی شده است. مطابق استانداردهای علمی بانکهای اطلاعات ژنومی، تطابق توالی اسیدهای نوکلئیک ما بین دو ژن در حد ۲۵٪، مشابهت زیاد High identity و نشانه خویشاوندی تکاملی تسلی می گردد و به این جهت همسانی حداکثر ۷۱٪ ژن *frg* آ. نیدولانس *A. nidulans* با ژن *affr1* نشاندهنده خویشاوندی تکاملی بسیار زیاد بین این دو کپک در میراث ژنومی و انتقال محافظه کارانه گنجینه ژنی در مسیر تکاملی در بین گونه های مختلف جنس *Aspergillus* SP. می باشد همچنانکه حداقل همسانی ۴۰٪ ما بین ژن *frg* قارچ مخمری ف. *Neoformans* F. با توجه به تعلق این قارچ مخمری به گروه بازیدیو میست ها که گروهی غیر گروه *Aspergillus* ها یعنی اسکومیستها می باشد؛ از نیز از استاندارد تشابه ۲۵٪ زیادتر بوده

7- References:

- Lorand T, Kocsis B. Recent advances in antifungal agents. *Mini Rev Med Chem.* 2007; 7(9): 900-11.
- Black K.E, Baden L.R. Fungal infections of the CNS: treatment strategies for the immunocompromised patient. *CNS Drugs.* 2007; 21(4): 293-318.
- Wolff M, Bouadma L, Mourvillier B. Emerging azole antifungals. *Therapie.* 2006; 61(3): 227-33.
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E. et al. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(3): 917-21.
- Marichal P, Vanden B.H. Mechanisms of resistance to azole antifungals. *Acta Biochim Pol.*, 1995, 42(4):509-16.
- Posteraro B, Tumbarello M, La Sorda M, et al. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(8): 3046-7.
- Espinel-Ingroff A. Clinical utility of in vitro antifungal susceptibility testing. *Rev Esp Quimioter.*, 2000, 13(2): 161-6.
- Fachin A.L, Ferreira-Nozawa M.S, Maccheroni W Jr, et al. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 8):1093-9.
- Anderson J.B, Ricker N, Sirjusingh C. Antagonism between two mechanisms of antifungal drug resistance. *Eukaryot Cell.*, 2006; 5(8):1243-51.
- Metwally L, Hogg G, Coyle P.V, et al. Rapid differentiation between fluconazole-sensitive and -resistant species of *Candida* directly from positive blood-culture bottles by real-time PCR. *J Med Microbiol.*, 2007; 56(Pt 7):964-70.
- Rogers P.D, Vermitsky J.P, Edlind T.D, et al. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. *J Antimicrob Chemother.*, 2006; 58(2): 434-8.
- Masia C.M, Gutierrez R.F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis.*, 2002, 2(9): 550-63.
- Goffeau A, Park J, Paulsen I.T, et al. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast.*, 1997, 13(1): 43-54.
- Marr K.A, Lyons C.N, Rustad T.R, et al. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrob Agents Chemother.*, 1998, 42(10): 2584-9.
- Pfaller M.A, Messer S.A, Boyken L, et al. Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol.*, 2004, 42(7): 3137-41.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2005, 49(2): 668-79.
- Oshima K, Kanda Y, Asano-Mori Y, et al. Presumptive treatment strategy for aspergillosis in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(2):350-5.
- Vanden B.H, Dromer F, Improvisi I, Lozano et al. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Myco.*, 1998, 36 Suppl 1: 119-28.
- Andrade A.C, Del S.G, Van Nistelrooy J.G, et al. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology.*, 2000, 146 (Pt 8):1987-97.
- Del S.G, Schoonbeek H, De Waard MA. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet Biol.*, 2000, 30(1): 1-15.
- Selmecki A, Forche A, Berman J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science.* 2006; 21; 313(5785): 367-70.
- Holmes A.R, Tsao S, Ong S.W, et al. Heterozygosity and functional allelic variation in the *Candida albicans* efflux pump genes CDR1 and CDR2. *Mol Microbiol.*, 2006; 62(1):170-86.
- Larsen B, Anderson S, Brockman A, et al. Key physiological differences in *Candida albicans* CDR1 induction by steroid hormones and antifungal drugs. *Yeast.*, 2006; 23(11): 795-802.
- Shen H, An M.M, Wang de J, et al. Fcr1p inhibits development of fluconazole resistance in *Candida albicans* by abolishing CDR1 induction. *Biol Pharm Bull.*, 2007; 30(1): 68-73.
- Riggle P.J, Kumamoto C.A. Transcriptional regulation of MDR1, encodes a drug efflux determinant, in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains through an Mcm1p binding site. *Eukaryot Cell.*, 2006; 5(12): 1957-68.
- Hiller D, Sanglard D, Morschhauser J. Overexpression of the MDR1 gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2006; 50(4): 1365-71.
- Hiller D, Stahl S, Morschhauser J. Multiple cis-acting sequences mediate upregulation of the MDR1 efflux pump in a fluconazole-

- resistant clinical *Candida albicans* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2006; 50(7): 2300-8.
28. Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents.*, 2006; 27(5): 403-8.
29. Ribeiro M.A, Paula C.R. Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication? *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2007; 57(1): 71-5.
30. Wang Y.B, Wang H, Guo H.Y, et al. Analysis of ERG11 gene mutation in *Candida albicans* [Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao., 2005; 25(11):1390-3.
31. Markovich S, Yekutieli A, Shalit I, et al. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2004, 48(10): 3871-6.
32. Chapeland-Leclerc F, Bouchoux J, Goumar A, et al. (). Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes cross-resistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2005, 49(8): 3101-8.
33. Edlind T.D, Henry K.W, Metera K.A, et al. *Aspergillus fumigatus* CYP51 sequence: potential basis for fluconazole resistance. *Med Mycol.*, 2001, 39(3): 299-302.
34. Carrillo-Munoz A.J, Quindos G, Ruesga M, et al. In vitro antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One. *Mycoses.*, 2006; 49(4):293-7.
35. Randhawa H.S, Chowdhary A, Preeti Sinha K, et al. Evaluation of peptone glucose fluconazole agar as a selective medium for rapid and enhanced isolation of *Aspergillus fumigatus* from the respiratory tract of bronchopulmonary aspergillosis patients colonized by *Candida albicans*. *Med Mycol.*, 2006; 44(4):343-8.
36. Eloy J.A, Bederson J.B, Smouha EE. Petrous apex aspergillosis as a long-term complication of cholesterol granuloma. *Laryngoscope.*, 2007, 117(7): 1199-201.
37. Benkel B.F, Fong Y. Long range-inverse PCR (LR-IPCR): extending the useful range of inverse PCR. *Genet Anal.*, 1996, 13: 123-127.
38. Ochman H, Gerber A.S., Hartl D.L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics.*, 1988, 120:621-623.
39. Triglia T., Peterson, M.G., Kemp, D.J () A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16: 8186-8189.

Archive of SID