مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۵، شماره‌ی ۶۰ پاییز ۱۳۸۶، صفحات ۳۵ تا ٤٦

شناسایی مولکولی فسفولیپاز D به عنوان عامل مؤثر در رشد و بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌ها

دکتر عبدالحسن کاظمی*، دکتر جفری رابسون**، دکتر دیوید دنینگ***

نویسنده‌ی مسئول: تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز Kazemi1338@Gmail.com

دریافت: ۸۶/۵/۱۴ پذیرش: ۸۶/۹/۵

چکیده

زمینه و هدف: *فسفولیپازهای ترشحی خارج سلولی عموما در هیدرولیز فسفولیپیدهای خارج سلولی و در نتیجه، تهیه‌ی منابع تغذیه‌ای کربن، نیتروژن و فسفات برای سلول دخالت داشته ولی فسفولیپازهای درون‌سلولی در کنترل اعمال متابولیکی سلول مؤثر بوده و نقش تنظیمی برای فعالیت بیولوژیکی سلول برعهده دارند. تولید فسفولیپازها در میکروارگانیسم‌های مختلف بیماری‌زا و مکانیسم اثر آن‌ها در بیماری‌زایی این میکروارگانیسم‌ها اخیرا مورد توجه بسیار گسترده‌ای قرارگرفته است.*

روش‌بررسی: *در این پژوهش، DNA ژنومی کپک آسپرژیلوس‌فومیگاتوس استخراج گردیده و متعاقب تکثیر قطعه‌ی مورد نظر با تکنیک PCR دژنراتیو از DNA ژنومی میکروارگانیسم، قطعه‌ی استخراج شده به pGEMT-Easy vector پیوند زده شده و سپس به سلول میزبان (E.coli Top 10 F') جهت انجام مراحل بعدی برای شناسایی توالی ژن فسفولیپاز D منتقل گردید.*

یافته‌ها: *سکوانس نوکلئوتیدی ژن pld_1 کپک آسپرژیلوس فومیگاتوس به طول ۵۵۰ نوکلئوتید به دست آمد که همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه در سایر میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد.*

نتیجه‌گیری: *مطالعات مربوط به تعیین سکوانس ژن‌ها عمدتا با هدف تعیین میزان مشارکت بیان ژن در بیماری‌زایی میکروارگانیسم؛ تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد فیزیولوژیک محصول ژن برای استنباط اطلاعات پایه جهت ارایه‌ی شیوه‌ی مصونیت‌بخشی، تهیه‌ی واکسن، دارو یا بلوکر برای محصول ژن و استفاده از محصول ژن به عنوان شاخص تشخیص عفونت صورت می‌گیرد و کلونینگ بخشی از ژن فسفولیپاز D به منظور شناسایی توالی کامل نوکلئوتیدهای این ژن برای رسیدن به اهداف فوق مؤثر خواهد بود.*

واژگان کلیدی: بیماری‌زایی، میکروارگانیسم، فسفولیپاز D، آسپرژیلوس فومیگاتوس

مقدمه

فسفولیپازها آنزیم‌هایی دارای فعالیت استرازی می‌باشند که در همه‌ی موجودات زنده یافت می‌شوند و با توجه به نوع فعالیت آنزیمی خود به دو گروه آسیل‌هیدرولازها و فسفودی‌آسترازها تقسیم می‌گردند. اسیل‌هیدرولازها، شامل فسفولیپاز A1، A2 وB و لیزوفسفولیپازها بوده و فسفودی‌استرازها شامل فسفولیپاز C و فسفولیپاز D

---

* دکترای تخصصی بیولوژی ملکولی، دانشیار دانشگاه تبریز

** دکترای بیولوژی ملکولی، دانشیار دانشگاه منچستر

** دکترای تخصصی بیماری‌های عفونی و فوق‌تخصصی میکوزهای ریوی، استاد دانشگاه منچستر

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشند علی‌رغم امکان وجود تفاوت‌های فراوان در فعالیت فسفولیپازهای مختلف در میکروارگانیسم‌های مختلف، دو فعالیت اصلی برای این آنزیم‌ها شناسایی شده است. فسفولیپازهای ترشحی خارج‌سلولی عموما در هیدرولیز فسفولیپیدهای خارج‌سلولی و در نتیجه، تهیه‌ی منابع تغذیه‌ای کربن، نیتروژن و فسفات برای سلول دخالت دارند (۳-۱) ولی فسفولیپازهای درون‌سلولی عموما دارای فعالیت کاتالیتیکی اندکی بوده و در قیاس با فسفولیپازهای ترشحی خارج‌سلولی در حد بسیار پایینی تولید می‌گردند. فسفولیپازهای درون‌سلولی در کنترل اعمال متابولیکی سلول مؤثر بوده و نقش تنظیمی برای فعالیت بیولوژیکی سلول بر عهده دارند و برای جلوگیری از سیتولیز خود سلول‌های تولیدکننده‌ی این آنزیم‌ها فعالیت آن‌ها تحت‌کنترل چندجانبه قرار دارد (۴) هم‌چنین این آنزیم‌ها از نظر دخالت در تولید تعدادی از واسطه‌های بیوشیمیایی مانند دی‌آسیل‌گلیسریل، لیزوفسفاتیدیک‌اسید و اینوزیتول‌تری‌فسفات مورد توجه هستند. تولید فسفولیپازها در میکروارگانیسم‌های مختلف بیماری‌زا و مکانیسم اثر آن‌ها در بیماری‌زایی این میکروارگانیسم‌ها اخیرا مورد توجه بسیار گسترده‌ای قرارگرفته است. مقایسه‌ی بیماری‌زایی بیست و سه استرین *کریپتوکوکوس نئوفرمنس* (*Cryptococcus neoformans*) به عنوان مرگبارترین میکوز در مبتلایان به ایدز رابطه‌ی معنی‌دار بین تولید فسفولیپاز و بیماری‌زایی این میکروارگانیسم را در بیست و دو استرین نشان داد (۶،۵). هم‌چنین متعاقب کلون نمودن ژن‌های فسفولیپاز *کریپتوکوکوس نئوفرمنس* (*C. neoformans*) و تولید موتانت‌های فاقد این ژن و مقایسه‌ی بیماری‌زایی استرین اولیه و موتانت تفاوت معنی‌داری مابین آن‌ها گزارش شده است (۷). قدرت تولید فسفولیپازها و ارتباط آن با بیماری‌زایی قارچ بیماری‌زای *کاندیدا آلبیکانس* (*Candida albicans*) نیز در مقایسه‌ی یازده نمونه‌ی جداشده از خون بیماران مبتلا به کاندیدیازیس سیستمیک با یازده نمونه‌ی کومنسال جدا شده از حفره‌ی دهان افراد سالم داوطلب مورد تأیید قرارگرفته است (۸) و نتیجه‌ی مشابهی نیز در پژوهش بر روی مدل حیوانی به دست آمده است (۹). هم‌چنین بررسی میزان بیان ژن‌های فسفولیپاز در مرحله‌ی عفونت‌زایی *کاندیدا آلبیکانس* در حالات بالینی مختلف در پژوهش‌های مختلف نیز نشان داده است که میزان بیان ژن‌های فسفولیپاز در مرحله‌ی عفونت‌زایی این میکروارگانیسم به شدت افزایش می‌یابد (۱۴-۱۰). این یافته‌ها با نتایج به دست‌آمده در مورد نقش فسفولیپازها در بیماری‌زایی باکتری‌ها مشابه است به این صورت که فسفولیپازها با افزایش قدرت اتصال میکروارگانیسم‌های مختلف به سلول‌های بافت میزبان و ورود به درون سلول، باعث افزایش بیماری‌زایی می‌شوند (۱۷-۱۵). با توجه به مطالب فوق و یافته‌های پیشین محققین در مورد نقش فسفولیپازها در بیماری‌زایی قارچ‌های مشابه، کلونینگ و تعیین توالی بخشی از ژن فسفولیپاز D در مرحله‌ی اول و سپس شناسایی توالی کامل نوکلئوتیدهای این ژن برای انجام مطالعات تکمیلی بعدی مدنظر قرارگرفت.

روش بررسی

DNA ژنومی قارچ بیماری‌زای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (*Aspergillus fumigatus*) از کلنی‌های حاصل از کشت خلط یک بیمار مبتلا به آسپرژیلوس ریوی مهاجم (تشخیص ابتلای بیمار با نتیجه‌ی مثبت انجام آزمایش مستقیم و کشت نمونه‌ی خلط در سه سری از محیط کشت سابرودز دکستروز آگار + کلرامفنیکل انجام شد)، با استفاده از روش پایه ریدر و برود (Reader and Brode)، (۱۸) با اندکی اصلاح استخراج گردید. برای این منظور عناصر قارچی در نیتروژن مایع آسیاب شده و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با حجم مساوی از بافر استخراج DNA مخلوط شده و سپس با افزودن مساوی از کلروفرم و ایزومیل‌الکل

Archive of SID
www.SID.ir

(نسبت ۲۴:۱) به مدت ۳۰ دقیقه در میان یخ قرار داده شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ xg و در حرارت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شده، لایه‌ی بالایی به لوله‌ی استریل جدید منتقل و با استفاده از حجم مساوی ایزوپروپانول و سانتریفوژ به مدت ده دقیقه در ۴۰۰۰xg، DNA ژنومی رسوب داده شد و در نهایت با شستشو به وسیله‌ی اتانول ۷۰ درصد و حل نمودن رسوب DNA در ddH2O و افزودن RNAase A، ماده‌ی ژنتیکی حاصله برای مصارف آتی در۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

PCR دژنراتیو:

با استفاده از توالی نوکلئوتیدی محفوظ برای ژن *pld* در *کاندیدا آلبیکانس*، *کریپتوکوکوس نئوفرمنس* (*C. neoformanse*)، *ساکارومایسس سرویسیه* (*Saccharomyces cereviciae*) و *پنسیلیوم کرایزوژنوم* (*Penicillium chrysogenum*)، پرایمرهای DBF (GCY GTI TCI TCR TAR ACY TCC AT) و DBP (CRI ACI GTR CCT TGY ACY CC) برای تکثیر یک قطعه‌ی تخمینی به طول ۸۵۰bp طراحی شد. تکثیر قطعه‌ی موردنظر با تکنیک PCR دژنراتیو از DNA ژنومی میکروارگانیسم‌ها در ترموسایکلر با شرایط ۳ دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک سیکل، یک دقیقه در۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد یک دقیقه در ۴۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲۹ سیکل و در نهایت یک دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه در۴۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و هفت دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 رنگ‌آمیزی و آنالیز شد و از باندهای حاصله تصویرتهیه گردید.

کمیت‌سنجی DNA:

کمیت‌سنجی DNA ژنومی استخراج شده از میکروارگانیسم موردنظر و شاهد مثبت با استفاده از دو تکنیک: ۱- مقایسه‌ی غلظت DNA رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورز با غلظت DNA استاندارد (DNA شاخص GIBCO BRL, 1kb) و ۲- غلظت‌سنجی DNA در محلول تهیه شده با استفاده از جذب نوری (۲۶۰ OD) در اسپکتروفتومتر انجام گرفت که در تکنیک اول با مقایسه‌ی 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 می‌شود و در تکنیک دوم، میزان جذب نوری در اسپکتروفتومتر در طول موج معین به‌وسیله‌ی محلول DNA دارای رقت مشخص، محاسبه‌ی میزان DNA در باند حاصل از PCR را امکان‌پذیر می‌سازد (۱۸).

کلونینگ و تعیین سکوانس:

مقدار کافی (۵۰ میکرولیتر) از محصول PCR در ژل الکتروفورز تهیه شده با بافر TAE آنالیز شده و پس از برش باند موردنظر از روی ژل، قطعه‌ی حاصله از ژل استخراج و تلخیص گردید (QIAquick gel extraction kit). باند ۸۵۰ جفت باز استخراج شده به pGEMT-Easy vector پیوند زده شد و سپس به سلول میزبان (*E.coli Top 10 F'*) ترانسفورم شد. غربالگری کلنی‌های آبی _ سفید در محیط کشت LB (Luria-Burtani) حاوی _۵ _برومو _ ۴ _ کلرو _ ۳ _ ایندول _ بتا _ دی _ گالاکتوپیرانوزید (X-gal) و ایزوپروپیل _ بتا _ دی _ تیوگالاتوپیرانوزید (IPTG) انجام شده و پس از انتخاب تعدادی (۶ تا ۱۲ کلنی) حاوی وکتور ترانسفورم شده، کلنی‌های حاصله در محیط LB مایع کشت داده شده و متعاقب آن با وکتور حاوی قطعه‌ی PCR از مجموعه‌ی باکتری‌های تک‌تک محیط‌های LB مایع با انجام لیز سلولی و مراحل بعدی آن جدا گردید. برش قطعه‌ی PCR از ناحیه‌ی محل‌های متعدد برش

Archive of SID

www.SID.ir

(Multiple Cloning Site [MCS]) وکتور با استفاده از انـدونوکلئاز محـدودالاثر *Eco* RI انجـام گردیـده و پس از تأثیر دو ساعته آنزیم فوق در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی وکتور، محصول حاصله در ژل آگاروز حاوی بافر TAE آنالیز گشته و باند مورد نظر با برش از ژل و انجام مراحل مربوط به تخلیص قطعه‌ی DNA از ژل، به صورت خالص به دست آمد که در باندهای حاصله، باندهای ۳، ۴ و ۸ باندهای نامطلوب و سایر باندها، باندهای مطلوب از نظر هدف این مطالعه با توجه به اندازه‌ی باند ۸۵۰ جفت باز حاصله از PCR دژنراتیو اولیه بودند. برای انجام مراحل مربوط به تعیین سکوانس باند هدف، PCR مجدد با استفاده از پلاسمید M13 و پرایمرهای MBR و MBF (Amersham Pharmacia.uk) در ترموسایکلر و با شرایط ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه برای یک سیکل، ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه برای ۲۵ سیکل انجام گردید و تعیین توالی نوکلئوتیدها در محصول نهایی PCR با استفاده از تکنیک ABI اتوماتیک انجام شد و سکوانس قطعه‌ای از ژن *pld*$_1$ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به طول ۸۵۰ جفت باز به دست آمد. برای تأیید صحت محصول حاصل از PCR دژنراتیو، متعاقب تعیین سکوانس باندهای به دست آمده، تعیین همسانی و میزان مشابهت سکوانس نوکلئوتیدی ژن‌های pld$_1$ *آسپرژیلوس فومیگاتوس، کاندیدا آلبیکانس* و سایر قارچ‌ها مانند *ساکارومایسس سرویسیه و شیزوساکرومایسس پومبه* به وسیله‌ی BLAST X، همسانی بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در سایر میکروارگانیسم‌ها نشان داد که نشان‌دهنده‌ی توفیق در تکثیر بخشی از طول ژن مورد نظر در آسپرژیلوس فومیگاتوس با PCR دژنراتیو می‌باشد.

ساترن بلاتینگ:

با توجه به تصمیم برای ادامه پژوهش در مورد ژن PLD در ژنوم *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و به منظور تأیید وجود ژن PLD در ژنوم این میکروارگانیسم، بررسی تعداد کپی ژن در ژنوم و هم‌چنین تخمین اندازه‌ی مناسب قطعه‌ی ژنومی برای کلونینگ و سکوانیسینگ مرحله‌ی بعدی، DNA ژنومی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* 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 با استفاده از پروب DNA نشان‌دار شده با دیگوکسی‌جنین (Digoxigenin [DIG]) انجام و قطعات DNA حاوی تمام یا قسمتی از ژن *pld*$_1$ به ترتیب به طول‌های تخمینی ۹/۶، ۱۱/۲، ۶/۱، ۱۰/۱، ۳، ۵/۷ و ۲/۲ در شرایط بحرانی شناسایی شد. با توجه به نتایج ساترن‌بلاتینگ، فقط وجود یک نسخه از ژن *pld*$_1$ در ژنوم میکروارگانیسم تأیید شد.

یافته‌ها

با استفاده از توالی نوکلئوئیدی محفوظ برای ژن pld، PCR دژنراتیو انجام گردید که منجر به تکثیر قطعه‌ای در حدود ۸۵۰ نوکلئوتید شد (شکل ۱). سپس ژن *pld*$_1$ در وکتور PGEMT-Easy vector کلون گردید (شکل ۲). و پس از انتقال باند مورد نظر به وکتور مناسب و با استفاده از پرایمرهای MBR و MBF مترادف قطعه‌ی ژن *pld*$_1$ مشخص گردید (شکل ۳). در مرحله بعد وجود ژن *pld*$_1$ در ژنوم میکروارگانیسم آسپرژیلوس فومیگاتوس توسط روش ساترن بلات تأیید شد (شکل ۴). سکوانس نوکلئوتیدی ژن‌های *pld*$_1$ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در میکروارگانیسم‌هایی مانند *کاندیدا آلبیکانس، شیزوساکرومایسس پومبه و ساکارومایسس سرویسیه* نشان

Archive of SID

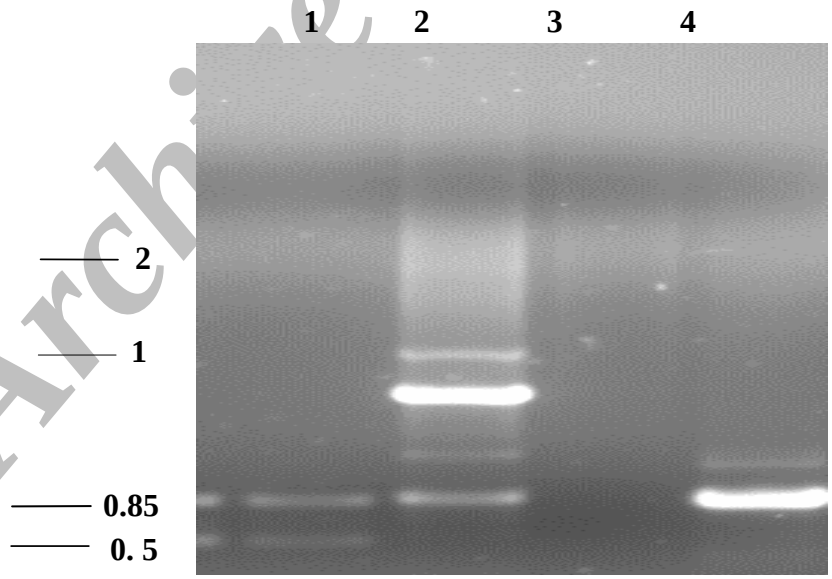
www.SID.ir

می‌دهد. جستجوی بانک‌های اطلاعاتی ژنوم در وب (Web) با استفاده از BLAST X همسانی ژن‌های pld_1 حاصل را با ژن لیزوفسفولیپاز یک و دو *ساکارومایسس سرویسیه* pld_2 و pld_1 به میزان حداکثر۳۳ تا ۳۴ درصد و با ژن فسفولیپاز D (*pld*) *شیزوساکرومایسس پومبه* به میزان حداقل۳۲ درصدرا برای سایر میکروارگانیسم‌ها در سطح اسیدنوکلئیک نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱: درصد تطابق توالی ژن af pld1 آ. فومیگاتوس با سکوانس ژن‌های pld سایر قارچ‌ها

درصد همسانی	رده‌بندی	جنس و گونه
۳۴	همی اسکومیست	ساکارومایسس سرویسیه PLD1
۳۳	همی اسکومیست	ساکارومایسس سرویسیه PLD2
۳۳	همی اسکومیست	*کاندیدا آلبیکانس*
۳۲	همی اسکومیست	*شیزوساکرومایسس پومبه*

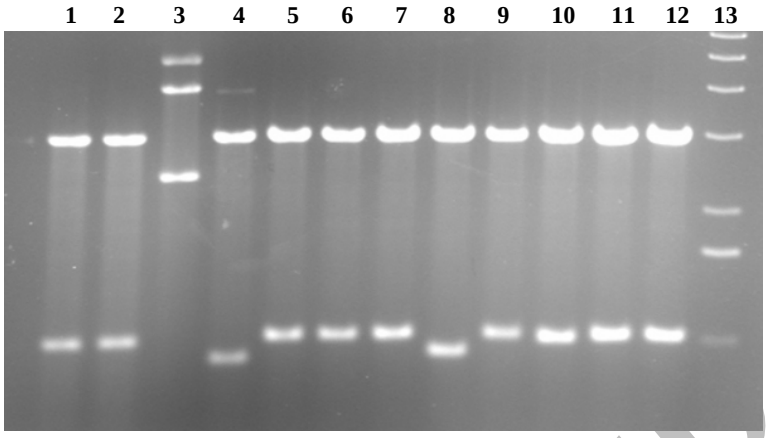
* اعداد بیان‌گر درصد می‌باشد.



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR دژنراتیو:

ستون‌های ۴-۱ (غیر از ستون سه) باندهای مربوط به محصولات PCR دژنراتیو از DNA ژنومی قارچ‌های آسپرژیلوس‌نیجر (A. niger)، آسپرژیلوس فومیگاتوس (A. fumigatus) و کاندیدا آلبیکانس (C. albicans) را به ترتیب نشان می‌دهد. ستون سه مربوط به نمونه کنترل فاقد DNA ژنومی است. اعداد سمت چپ نشان‌دهنده‌ی اندازه‌ی باند (Kb) می‌باشند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: تصویر الکتروفورز باندهای کلون شده در PGEM. پس از هضم با آنزیم محدودالاثر محصولات PCR دژنراتیو پس از پیوند به وکتور pGEMT-Easy vector و کلون شدن در سلول میزبان (E. coli Top 10 F') با آنزیم محدودالاثر Eco RI هضم شده و در ژل آگاروز الکتروفورز گردید.

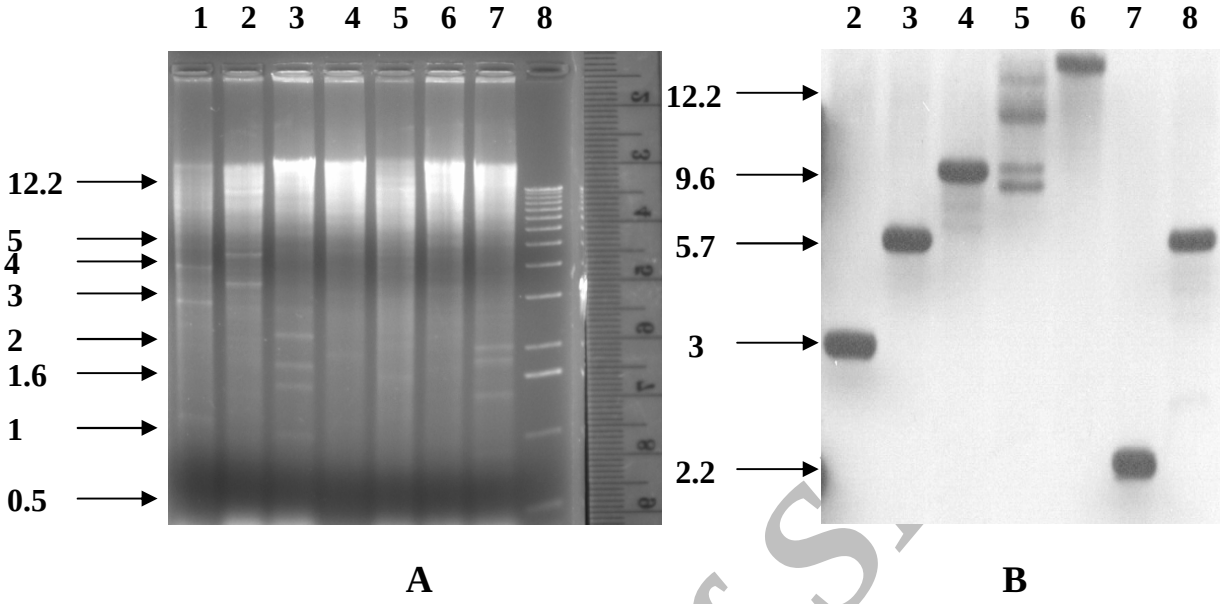
ستون ۱۳، باندهای شاخص و ستون‌های ۱تا۱۲ باندهای مربوط به دوازده کلون را پس از هضم با آنزیم محدودالاثر Eco RI نشان‌می‌دهد.

```
1      GCTGTTTCTTCGTAGACCTCCATATTCGACGCAAGAATGGAGACTCGATCAAGTGCTCAA
61     GCACCGCGCTGAAGCTGGCGTTAAAATATATGTGATTGTTTACAAGGAGGTTCGTCGGCC
121    ATATTGAACTGCGTTTAGTTGGTACAACTAACAAGATTCAGGTCAATCAAGCACTGACGT
181    GCAACTCAGCGCATACGAAACACGCGCTCCACAGTCTCTGCCCCGAAGGAACTCCGGGTC
241    ACGGAAACATCAAAGTTCTACGGCATCCGGATCACAATATTTTTGAAAATGCAGCAGATA
301    TGACATTTTACTGGGTAAGTCCGTCGCAGATTGTAGTTATAGTCAGGGTTATGCTGACAT
361    TATAGGCGCATCATGAAAAATTCATTGTCATTGACTACGCTGTCGCCTTCATTGGTGGTA
421    TCGATTTATGTTTTGGTAGATGGGATGCTCACCAACACCCCCTGGCAGACGTTCATCCGG
481    CCAACTTGAAGGACGAAATATTCCCAGGTCAAGATTGGAACAACAACCGTATTATGGATT
541    TCCAGAGCGTTGCAGATTGGCAGTCAAATGAAGTAAGCAAAGCAGACTATGGTCGAATGC
601    CATGGCATGATGTAGCGATGGGCTTGGTTGGTGATTGCGTCTATGATATCGCCGAGCATT
661    TTGTTCTTCGATGGAACTTTGTCAAGCGAGATAAGTACAAGCGTGACCATGGCGTCGACT
721    GGCTTTTGCTGGAGGGCCGCACCGGCGATGACGAAGATCTTGTCGGGGTACAACGTCCAA
781    AGTATCCTTGTGGACAGTATATTCAACATCCTCTCAATCCGCTAGACACCAAGCCGCGAG
841      GGATGCAAGGCACTGTGCG

1      LFLRRPPYSTQEWRLDQVLKHRAEAGVKIYVIVYKEVNQALTCNSAHTKHALHSLCPEGT
61     PGHGNIKVLRHPDHNIFENAADMTFYWAHHEKFIVIDYAVAFIGGIDLCFGRWDAHQHPL
121    ADVHPANLKDEIFPGQDWNNNRIMDFQSVADWQSNEVSKADYGRMPWHDVAMGLVGDCVY
181    DIAEHFVLRWNFVKRDKYKRDHGVDWLLLEGRTGDDEDLVGVQRPKYPCGQYIQHPLNPL
241      DTKPRGMQGTV
```

شکل ۳: توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن pld_1آ. فومیگاتوس و ترجمه‌ی پروتئینی آن

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴: ساترن بلاتینگ DNA ژنومی آسپرژیلوس فومیگاتوس.

A: الکتروفورز DNA ژنومی آسپرژیلوس فومیگاتوس پس از هضم با آنزیم‌های محدودالاثر Apa I، Brf I، Bji I، Kpn I، Sal I، Xba I و Xho I. ستون۸، باندهای شاخص و ستون‌های ۱تا ۷ باندهای مربوط به هضم DNA ژنومی آسپرژیلوس‌فومیگاتوس را پس از هضم با آنزیم محدودالاثر فوق‌الذکر نشان می‌دهد.

B: باندهای حاصل از ساترن‌بلاتینگ DNA ژنومی آسپرژیلوس‌فومیگاتوس با استفاده از پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسی‌جنین Digoxigenin (DIG).

بحث

مقایسه‌ی همسانی بین توالی نوکلئوتیدهای بخشی از ژن *pld_1 آسپرژیلوس فومیگاتوس* با ژن مشابه در میکروارگانیسم‌هایی مانند *کاندیدا آلبیکانس* و سایر قارچ‌ها مانند *شیزوساکرومایسس* و *ساکارومایسس* نشانه‌ی همسانی بسیار بالای توالی اسیدهای نوکلئیک این ژن با ژن *pld_1* و هم‌چنین ژن لیزوفسفولیپاز در میکروارگانیسم‌هایی است که سکوانس ژنتیکی این ژن‌ها در آن میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده است. مطابق استانداردهای محافل علمی و بانک‌های اطلاعات ژنومی، همسانی توالی اسیدهای نوکلئیک بین دو ژن در حد ۲۵ درصد، مشابهت زیاد (High Identity) و نشانه‌ی قرابت فیلوژنیک تلقی می‌گردد و به این جهت همسانی حداکثر ۳۴ درصد بخشی از ژن *LPL1 آسپرژیلوس اوریزه*آ با بخشی از ژن *pld_1 آسپرژیلوس فومیگاتوس*، نشان‌دهنده‌ی قرابت فیلوژنیک بسیار زیاد بین این‌دو میکروارگانیسم در میراث ژنومی و انتقال کاملا محافظه‌کارانه‌ی گنجینه‌ی ژنی در طول مسیر تکاملی در بین گونه‌های مختلف جنس *آسپرژیلوس (Aspergillus SP)* می‌باشد هم چنان که حداقل همسانی ۳۲ درصد بین ژن PLD قارچ مخمری *شیزوساکرومایسس پومبه* نیز از استاندارد تشابه ۲۵ درصد زیادتر بوده و می‌تواند دلالت بر این امر داشته باشد که در مسیر تکاملی سلسله‌ی قارچ‌ها، انتقال میراث ژنی در مورد ژن‌های دارای نقش اساسی در ساختار حیاتی و ژنتیکی این میکروارگانیسم‌ها، به نحو بسیار محافظه‌کارانه‌ای انجام گرفته است. در این‌جا ذکر این نکته لازم است که لیزوفسفولیپازها LPL و فسفولیپازهای D،

Archive of SID

www.SID.ir

(PLD)، دارای فعالیت آنزیماتیک مشابهی بوده و در تقسیم‌بندی درونی انواع فسفولیپازها به دو گروه آسیل‌هیدرولازها و فسفودی‌استرازها هر دو آنزیم فوق‌الذکر در گروه اول قرار می‌گیرند. مطالعات مربوط به تعیین سکوانس ژن‌هایی که محصولات نهایی آن‌ها دارای نقش کلیدی در بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند؛ عمدتا با هدف تعیین میزان مشارکت بیان ژن در بیماری‌زایی میکروارگانیسم و استنباط اطلاعات پایه برای ارایه‌ی شیوه‌ی مصونیت‌بخشی، تهیه‌ی واکسن، طراحی دارو یا تهیه‌ی بلوکر برای محصول ژن، استفاده از محصول ژن به عنوان شاخص آزمایشگاهی تشخیص عفونت و ... صورت می‌گیرد. با توجه به شناسایی نقش مؤثر فسفولیپازها در بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌هایی نظیر *کریپتوکوکوس. نئوفرمنس* (۷-۵) کاندیدا *آلبیکانس*(۱۰-۸)، انواع *آسپرژیلوس‌ها* (*Aspergillus SP*) (۱۲-۱۱) *پاراکوکسیدیوئیدس برازیلینریس* (*Paracoccidioido brasiliansis*) (۱۹)، *مالاسزیا فور فور* (۲۰) انواع *کلستریدیوم* (*Clostridium SP*) (۲۱و ۳-۱)، انواع *باسیلوس* (*Bacillus SP*) (۱۶) انواع سودوموناس (*Pseudomonas* SP) (۲۳-۲۲)، انواع ریکتزیا (*Rickettsia* SP) (۲۴)، *آنتامبا هیستولیتیکا*(۲۵)، پژوهش‌های مقدماتی برای استفاده از این آنزیم برای طراحی و تهیه‌ی دارو (۲۶ و ۱۲،۱۳)، تشخیص آزمایشگاهی عفونت (۲۸-۲۶)، تهیه‌ی واکسن (۲۱) انجام گرفته است و کلونینگ بخشی از ژن *pld* و سپس شناسایی کامل توالی نوکلئوتیدهای این ژن در میکروارگانیسم‌های مختلف و در نهایت اشراف بر ساختمان پروتئین حاصل از بیان ژن، گامی در جهت نیل به اهداف فوق می‌باشد که این نوشتار با ارایه‌ی توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن pld_1 در *آسپرژیلوس فومیگاتوس* سعی در گشودن مسیر علمی و پژوهش لازم برای انجام مطالعات تکمیلی مانند شناسایی توالی کامل نوکلئوتیدی این ژن، ایجاد جهش در ساختار ژن و یا استفاده از RNAi برای تعیین نحوه‌ی اثر این ژن در رشد و بیماری‌زایی قارچ دارد.

نتیجه‌گیری

مطالعات مربوط به تعیین سکوانس ژن‌ها عمدتا با هدف تعیین میزان مشارکت بیان ژن در بیماری‌زایی میکروارگانیسم؛ تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد فیزیولوژیک محصول ژن برای استنباط اطلاعات پایه جهت ارایه‌ی شیوه‌ی مصونیت‌بخشی، تهیه‌ی واکسن، دارو و یا بلوکر برای محصول ژن، استفاده از محصول ژن به عنوان شاخص تشخیص عفونت و ... صورت می‌گیرد و کلونینگ بخشی از ژن فسفولیپاز D به منظور شناسایی توالی کامل نوکلئوتیدهای این ژن برای رسیدن به اهداف فوق مؤثر خواهد بود.

منابع:

1- Birch M, Denning DW, Robson GD. Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental Aspergillus fumigatus isolates. *Med Mycol*. 2004; 42(1): 81-6.

2- Titball RW. Bacterial phospholipases. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1998; 27: 127S-37S.

3- Titball Rw, Fearn AM, Williamson ED. Biochemical and immunological properties of the C-terminal domain of the alph*a*-toxin of Clostridium perfringens. *FEMS Microbiol Lett*. 1993; 110: 45-50.

Archive of SID

www.SID.ir

4- 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; 49(2): 365-72.

5- 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): 71-6.

6- Vidotto V, Sinicco A, DiFraia D, et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 1996; 136(3): 119-23.

7- Cox GM, McDade HC, Chen SC, et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2001; 39(1): 166-75.

8- Hong S, Horiuchi H, Ohta A. Molecular cloning of a phospholipase D gene from *Aspergillus nidulans* and characterization of its deletion mutants. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 224(2): 231-7.

9- Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.*1995; 63: 1993-8.

10- Ghannoum MA, Filler SG, Ibrahim AS, et al. Modulation of interactions of *Candida albicans* and endothelial cells by fluconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992; 36: 2239-44.

11- Guo BZ, Xu G, Cao YG, Holbrook CC, Lynch RE. Identification and characterization of phospholipase D and its association with drought susceptibilities in peanut (Arachis hypogaea). *Planta*. 2006; 223(3): 512-20.

12- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Micro Rev*. 2000; 13: 122-143.

13- Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, et al. Genes and molecules involved in Aspergillus fumigatus virulence. *Rev Iberoam Micol.* 2005; 22(1): 1-23.

14- Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, et al. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence *in vivo*. *Microbiology*. 2001; 147(P9): 2585-97.

15- Leon C, Taylor R, Bartlett KH, Wasan KM. Effect of heat-treatment and the role of phospholipases on Fungizone-induced cytotoxicity within human kidney proximal tubular (HK-2) cells and Aspergillus fumigatus. *Int J Pharm.* 2005; 298(1): 211-8.

16- Shen DK, Noodeh AD, Kazemi A, et al. Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 239(1): 87-93.

17- Silverman DJ, Santucci LA, Meyers N, Sekeyova Z. Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. *Infect Immun.*1992; 60: 2733-40.

Archive of SID

www.SID.ir

18- Reader U, Brode P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett App Microbiol*. 1985; 1: 17-20.

19- Heise N, Travassos LR, Dealmeida MLC. *Paracoccidioides-brasiliensis* expresses both glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and a potent phospholipase-C. *Exp Mycol*. 1995; 19(2): 111-9.

20- 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): 163-9.

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

22- Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML. Molecular comparision of a nonheamolytic and a haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeroginosa*. *J Bacteriol. 1990*; (172): 5915-23.

23- Meyers DJ, Berk RS. Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. *Infect Immun. 1990*; 58: 659-66.

24- Kaplanski G, Teysseire N, Farnarier C. 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: 2839-44.

25- 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. *J Clin Investig*. 1995; 96: 1269-79.

26- Hänel H, Kirsch R, Schmidts HL, Kottmann H. New systematically active antimycotics from the beta-blocker category. *Mycoses*. 1995; 38: 251-64.

27- Swenson CE, Perkins WR, Roberts P. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of amphotericin B lipid complex: Are phospholipases important? *Antimicrob Agents Chemothe*. 1998; 42(4): 767-71.

28- Hong S, Horiuchi H, Ohta A. Molecular cloning of a phospholipase D gene from *Aspergillus nidulans* and characterization of its deletion mutants. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 224(2): 231-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of Phospholipase D Gene as a Contributing Factor in Growth and Virulence of Microorganisms

Kazemi A, Robson G, Denning W

Corresponding Author's Address: Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Email: Kazemi1338@Gmail.com

Background and Objective: Secretory extracellular Phospholipases are generally involved in hydrolysis of extracellular phospholipids and thus providing nutritive source of carbon, nitrogen, and phosphate. However, intracellular phospholipases perform metabolic functions and adjust biologic activities. Synthesis of phospholipases in different pathogenic microorganisms and their mode of action in virulence of the microorganism have been the center of attention in recent studies.

Materials and Methods: During this study using degenerate primers based on homologous amino acid sequences of phospholipase D (PLD) search for detection of *Aspergillus fumigatus* was carried out. DNA extraction of *A. fumigatus* was performed and then using degenerate primers based on nucleotide sequences of Phospholipase D gene was degenerated. Predicted 850 bp product from *A. fumigatus* was cloned in *pGEMT-Easy vector* and then transformed into *E. coli Top 10 F'* competent cell for extraction of cloned DNA fragment.

Results: Sequence analysis of 850 bp fragments revealed a sequence for the PLD gene of *A. fumigatus* with a high homology to published PLD sequences in other microorganisms.

Conclusion: Gene sequence studies are generally conducted to determine the participation of gene expression in pathogenecity of microorganisms, the evaluation of biochemical features and physiologic function of gene product for understanding the basic knowledge to provide immunity, production of vaccine, drug, or blocker for gene product, utilizing the gene product, utilizing the gene product for infection detection and so on. Thus, cloning of a part of phospholipase D gene in order to full identification of nucleotides sequence of this gene could contribute to achieve those goals.

Key words: Virulence, Microorganisms, Phospholipase D, Aspergillus fumigatus

Archive of SID

www.SID.ir