

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شماره ۶۲ (تابستان ۱۳۸۳)، صفحات ۵۴-۴۷

کلونینگ و توالی یابی بخشی از ژن فسفولیپاز B₁ در اسپرزیلوس 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 اسپرزیلوس فومیگاتوس به عنوان میکروارگانسمی پاتوژن، آلرژن، آلوده کننده مواد غذایی، مولد میکوتوکسین و عامل میکوتوکسیکوز مورد توجه بوده و نظر به ازدیاد فزاینده موارد عفونت ناشی از این میکروارگانسم و بروز مقاومت دارویی، اهمیت بالینی آن رو به افزایش گذاشته است. قدرت تولید انواع فسفولیپازها، به ویژه فسفولیپاز B₁، از عوامل مؤثر در ویروانس این قارچ به شمار می رود. به این جهت، کلونینگ و توالی یابی ژن فسفولیپاز B₁ برای بررسی و تجزیه و تحلیل ویژگی های ژن سنتز کننده آن در میکروارگانسم مذکور و مقایسه خصوصیات ژن و فرآورده آن با ژن فسفولیپاز سایر میکروارگانسم ها انجام شد.

روش بررسی: DNA ژنومی اسپرزیلوس فومیگاتوس موجود در خلط یک بیمار مبتلا به اسپرزیلوس ریوی استخراج و تلخیص شد و با استفاده از PCR دژنراتیو قطعه اولیه از ژن plb₁ به طول ۵۴۵ bp به دست آمد. برای جداسازی قطعه طویل تری از این ژن، DNA ژنومی با تعدادی منتخب از اندونوکلازهای با اثر برشی محدود هضم شد و قطعات حاصل از هضم با استفاده از DNA لیگاز T₄ به صورت حلقوی در آمد و سپس از طریق PCR معکوس قطعه طویل تری به طول ۱۸۰۰ bp 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 ۲۱۹۷ bp حاصل گردید.

یافته ها: تجزیه و تحلیل فرآورده PCR دژنراتیو اولیه و همچنین قطعه حاصل از PCR معکوس با بلاست X در سطح اسیدنوکلئیک حداکثر ۷۶٪ همسانی با توالی ژنتیکی لیزوفسفولیپاز ۱ اسپرزیلوس اوریزه و حداقل ۴۵٪ همسانی با توالی ژنتیکی فسفولیپاز B کریپتوکوکوس نفورمنس را نشان داد.

نتیجه گیری: وجود ژن فسفولیپاز B₁ در ژنوم میکروارگانسم و همسانی بسیار بالای قطعه توالی شده با ژن فسفولیپاز سایر میکروارگانسم های با یا بدون قرابت فیلوژنتیک با این قارچ نزدیک نشان دهنده انتقال محافظه کارانه آن در مسیر تکاملی از ژنوم دودمانی و همچنین نقش اساسی آن در ویروانس میکروارگانسم است. توالی نوکلئوتیدی حاصل می تواند برای مشابه سازی ژن کامل plb₁ 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 میکروارگانسم مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: اسپرزیلوس فومیگاتوس، ژن فسفولیپاز B₁، کلونینگ، توالی یابی

مقدمه

قارچ های کپکی جنس اسپرزیلوس و به ویژه اسپرزیلوس فومیگاتوس عامل مسبب بروز علائم 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 (۱ و ۲). اهمیت بالینی اسپرزیلوس 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 (۳-۵). یکی از اصلی ترین عوامل مؤثر در بیمارزایی این قارچ قدرت تولید و ترشح فسفولیپازهای گروه B است (۶ و ۷) 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 (۸-۱۰)؛ به عنوان مثال، وجود رگه های خون در خلط افراد مبتلا به اسپرزیلوس 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 (۱۲ و ۱۳) 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 ویروانس میکروارگانسم هایی نظیر کریپتوکوکوس نفورمنس، کاندیدا آلبیکانس و سایر کاندیداها، کلستریادیوم پرفرنس، کلستریادیوم نویه، کلستریادیوم سپتیکوم، آنتامباهیستولیتیکا، سودوموناس آئروژینوزا، جنس مایکوباکتریوم، باسیلوس سرئوس، مالاسزیا فورفور (۲۵-۱۹) صورت گرفته که اهمیت این آنزیم ها

سلول میزبان (*E. coli Top 10F*) تغییر شکل یافت. غربالگری کلنی های آبی - سفید در محیط کشت LB حاوی ۵- برومو، ۴- کلرو، ۳- ایندول بتا دی گالاکتوپیرانوزید (X-gal) و ایزوپروپیل بتا - دی تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام شد و پس از انتخاب تعدادی کلنی (۱۲-۶ کلنی) حاوی وکتور ترانسفورم شده، کلنی های حاصل در محیط LB^۴ 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) و وکتور با استفاده از اندونوکلاز محدودالایثر *Eco RI* انجام گردید و پس از تأثیر دو ساعته آنزیم فوق در 37°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 M13 و پرایمرهای MBR و MBF ساخت شرکت داروسازی «آمرشام» انگلستان در ترموسایکلر و با شرایط 96°C به مدت چهار دقیقه برای یک دور، 96°C به مدت ۳۰ ثانیه، 50°C به مدت ۱۵ ثانیه، 60°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* اسپریلیوس فومیکاتوس به طول ۵۴۵ bp به دست آمد.

ساترن بلائینگ: به منظور تأیید وجود ژن *plb* در ژنوم میکروارگانسیم، 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 اندونوکلازهای محدودالایثر شامل *Apa I* و *Bfi I* و *Kpn I* و *Sal I* و *Xba I* و *Xho I* هضم شد و ساترن بلائینگ از طریق پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسی جنین^۱ انجام گرفت و قطعات DNA حاوی تمام یا قسمتی از ژن *plb* 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 بلائینگ ساترن، فقط وجود یک نسخه از ژن *plb* در ژنوم میکروارگانسیم تأیید شد.

کلونینگ و توالی یابی ثانویه: برای کلونینگ و توالی یابی طول بیشتری از ژن *plb* دو روش پایه ای غربالگری گنجینه ژنی دارای اندازه محدود^۲ یا غربالگری کلنی و استفاده از PCR معکوس^۳ (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 عنایت به پیشرفت مطلوب تر مراحل آزمایشگاهی روش IPCR، این روش برای جداسازی و تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن *plb* مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، DNA ژنومی هضم شده با اندونوکلاز محدودالایثر *Xho I* به طول ۲/۲ kb که در بردارنده طولی نامشخص از ژن *plb* 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 T4 به یک قطعه DNA حلقوی تبدیل و موفقیت این مرحله از آزمایش ارزیابی شد. با طراحی پرایمرهای اختصاصی IBIF, IBIR

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 اسپریلیوس فومیکاتوس از کلنی های حاصل از کشت خلط یک بیمار مبتلا به اسپریلیوس 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 65°C با حجم مساوی از بافر استخراج DNA مخلوط شد، سپس با افزودن حجم مساوی از کلروفورم و ایزومیل الکل (نسبت ۱:۲۴) به مدت ۳۰ دقیقه در لایه لای یخ قرار داده شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در $12000 \times g$ و در حرارت 4°C سانتریفوژ شده، لایه بالایی به لوله استریل جدید منتقل و با استفاده از حجم مساوی ایزوپروپانول و سانتریفوژ به مدت ده دقیقه در $4000 \times g$ ، DNA ژنومی رسوب کرد و نهایتاً با شستشو به وسیله اتانول ۷۰٪ و حل نمودن رسوب DNA در ddH₂O و افزودن RNAase A، ماده ژنتیکی حاصل برای مصارف آتی در دمای 50°C -۲۰ نگهداری شد. به عنوان نمونه شاهد مثبت، DNA ژنومی *کاندیدا آلیکانس* 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^۱ (ATCC) ثبت و ذخیره شده است.

PCR دژنراتیو: با استفاده از ردیف های نوکلئوتیدی محفوظ برای ژن *plb* در *کاندیدا آلیکانس*، کریپتوکوکوس تنوفورمنس 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 میکروارگانسیم هدف و شاهد در ترموسایکلر با شرایط ۳ دقیقه در 94°C ، یک دقیقه در 48°C و ۹۰ ثانیه در 72°C برای یک دور، یک دقیقه در 94°C ، یک دقیقه در 48°C و ۹۰ ثانیه در 72°C برای ۲۸ دور و نهایتاً یک دقیقه در 94°C ، یک دقیقه در 48°C و هفت دقیقه در 72°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^۴ رنگ آمیزی و تجزیه شد و تصویر نوار حاصل تهیه گردید.

کمیت سنجی DNA: کمیت سنجی DNA ژنومی استخراج شده از میکروارگانسیم 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 OD₂₆₀=1 در اسپکترومتر انجام گرفت.

کلونینگ و تعیین توالی اولیه: مقدار کافی (۵۰۰ul) از فرآورده PCR در 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^۳). نوار ۵۰۰ bp استخراج شده به وکتور pGEMT-Easy پیوند زده شد و سپس به

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

کلونینگ و توالی یابی بخشی از ژن فسفولیپاز B₁ در / ۴۹

ژن *plb₁* آسپرژیلوس فومیگاتوس (960 bp) از مجموع طول (2197bp) همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در سایر میکروارگانیسم ها نشان می دهد. جستجوی بانک های اطلاعاتی ژنوم در وب¹ با استفاده از BLAST X همسانی ژن *plb₁* آسپرژیلوس فومیگاتوس با ژن لیزوفسفولیپاز یک (*lpl₁*) آسپرژیلوس اوریزه² به میزان حداکثر ۷۶٪ و با ژن فسفولیپاز *plb B* 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 شکل ۱).

قطعه توالی یابی شده به طول 2197 bp، در برگرنده 960 bp مربوط به ژن *plb₁* آسپرژیلوس فومیگاتوس از مجموع انتهای 3 ژن *plb₁* آسپرژیلوس فومیگاتوس است. قسمتی از تجزیه توالی نوکلئوتیدها در شکل انجام شده است.

جهت انجام IPCR، تکثیر DNA حلقوی حاوی طول نامشخص از ژن *plb₁* در ترموسیکلر با شرایط 3 دقیقه در 94 °C برای یک دور، یک دقیقه در 94 °C، یک دقیقه در 63 °C و سه دقیقه در 70 °C برای 10 دور، یک دقیقه در 94 °C، یک دقیقه در 63 °C سه دقیقه به اضافه پنج ثانیه اضافی به ازای انجام هر دور در 70 °C برای 24 دور، یک دقیقه در 94 °C، یک دقیقه در 63 °C و هفت دقیقه در 70 °C 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 1800 bp از ژن *plb₁* آسپرژیلوس فومیگاتوس بود.

یافته ها

از تلفیق توالی 1800 bp با توالی قطعه ژن حاصل از PCR اولیه 545 bp، توالی ای به طول 2197 bp حاصل شد که 960 bp آن مربوط به ژن *plb₁* در آسپرژیلوس فومیگاتوس بود. توالی نوکلئوتید

جدول ۱: درصد تطابق توالی نوکلئوتیدی ژن *plb₁* آسپرژیلوس فومیگاتوس با توالی نوکلئوتیدی ژن های *plb* منتشر شده قارچ ها

گونه	تقسیم بندی	همسانی با ژن های فسفولیپاز B ₁
آسپرژیلوس اوریزه LPL ₁ AX 112082-1	آسکو مایستا	۷۶٪
آسپرژیلوس اوریزه LPL ₂ AX 112084-1	آسکو مایستا	۶۴٪
آسپرژیلوس نیچر LPL ₁ AX 11278-1	آسکو مایستا	۶۴٪
آسپرژیلوس نیچر LPL ₂ AX 112080-1	آسکو مایستا	۶۱٪
پنسیلیوم کرایزوزنوم LPL P 39457	آسکو مایستا	۶۶٪
نوروسپورا کراسا LPL AF 045574	آسکو مایستا	۵۲٪
تورولاسپورا دلبروکنی LPL Q 11121	آسکو مایستا	۴۸٪
کلویورومایسس لاکتیس PLB AB 014495	آسکو مایستا	۴۹٪
ساکارومایسس سرویسیه LPL ₁ S 533037	آسکو مایستا	۴۹٪
ساکارومایسس سرویسیه LPL ₂ S 53035	آسکو مایستا	۴۶٪
کاندیدا آلبیکنس LPL ₁ BAA 37162	آسکو مایستا	۴۹٪
کاندیدا آلبیکنس LPL ₂ AAC 72296	آسکو مایستا	۴۵٪
کریپتوکوکوس نئوفرمنس PLB AAF 61966/1	بازیدیو مایستا	۴۴٪

1 **CTCGAG**TATCTAGGAACCAAATTC AATGGCGGCTCAGTCCCAAGTAATGAGAGCTGTGTG
 61 CGTGGCTTTGACAATGTTGGCTTTGTCATGGGTACGTCCCTCTACTCTCTTCAATCAATTC
 121 CTCTTCAGATCAACTCAACGGCTTTGCCGGATTGGCTGAAATCCGTCTTCACCGACATC
 181 TTGAAGGACATTTGGCGAGAATGACGAGGACATTTGCTCAATATGCTCCTAACCCATTCTAC
 241 CACTTTTCCAACACAACCAACCCTAGTGCCGCTGAATTTGGAACGGATTTGGTGGATGGT
 301 GGTGAAGATCTGCAGAATATACCCTGCACCCGTTGATTCAGCCAGAGCGACATGTTCGAT
 361 **GTGATCTTCGCCGTCGAT**TCCCTCGCCGATACCACGTACAGCTGGCCCAACGGAACCTGCC
 421 CTTGTCTGCTACTTATGAGCGTAGCCTAAATTCCTCAGGCATCGCCAACGGTACTTCCCTTT
 481 CCTGCAATTCCCGATCAGAATACCTTCGTCAACAAGGGCTTGAACACTCGACCTACGTTTT
 541 TTCGGGTGCAATAACTCAAACACCCTGGCCCGTCGCCCTTGAATGTATATCTTCCGAAC
 601 TACCCCTACACGGCTTACTCCAACCTTTCTACTTTCCAGCCAGACTATACCGAACAAGAG
 661 CGAGATTCTAC**CAATCTGAACGGGTATGATGTGGTGACAATGGGTAACAGCACTCGCGAC**
 721 GGCAACTGGTCAACCTGTGTGGCTGTGCTATCTTGAGTCCGGTCTCTCGAACGCACCAAC
 781 ACTAACGTGCCGGAAATCTGCAACAATGTTTCCAGAGGTATTGCTGGAACGGCACCCGTC
 841 AACAGCACCACCCCTGCGGGTTACGAGCCGGTACGATTTTGGATAGTGCAGCCTCTGGG
 901 ATCATTCCAAGTATTTCCACTGTTGCAATGGCCGTTGTTTTTGGCCGCTGGACAATTTTC
 961 **TAA**GTTTCATTTTGGAAATATTCGAAAATGTCGATTTCTACCGGATCAATGTGGTCTGA
 1021 GCTATATCCATACCTCACAGACTTTTATCAGATGCCAATGTTATCACAGTTGGGAGGTTT
 1081 AACGAGCAATATGTTTCTCTAATCTATCTAATTTATCGTTTTTGTACCCCTTTTTG**TATA**
 1141 **TAAAT**TATGCAAAAAACAACATCATCCTGTCTGATATTGCGTCCATAGAATGATATCCA
 1201 CTTAAGTAGGCTAAGCAGGAGGTACAAGGTTACGATCGGGCGG**GGAATACATC**ACGTGCT
 1261 TATGAGGCTACGGCTGTTGCTGTGACAACGCTCACGTGATTTCTCAAAGGAGAAAGCCAA
 1321 GGACAAAACGCCGAGCTCTTGCGGGCGGCCAAAACAGCTGGAAGTCAACAACACATATATA
 1381 ATCAACGAGTCAAGTCTACTTAATAGCCACAGCAAAACCCCTGCTTGAAAACTTTTCTGC
 1441 AGGTGCGCCTTTGTGGTTAGTCCAATCTGTCAATTCCTCTGCTGCGAAGTTACAGTCAATGA
 1501 TGAGCGCATCGGGCTTGTCAACACCGACCCCTTCTTCGTTACTAACAGCAGAGAAACCGTA
 1561 CAAGTGCACAGCCGCTGAGATACAAATTTTTTGGGTGCATAATCTCTGTTATTGATTC
 1621 AAAATGGCTCGCGCAGCTATCATCCCAAAGTCAATCCCAAACGGGCCACCCGTGGCCGT
 1681 CCCCAGCCAACACAGTCAAAGCCGCGAGTCTCACCCTGCCAGCAAAACCGGTCGTGAGG
 1741 ACGGCGAGGACAAAAGTCAAGAACTTCTGCGACAGAAACCAGAAAAAAACTACGAGAACA
 1801 GCAACGGCGACACAGCGCCAGGACTAGACAGGCAGACTCTGACACGGATGAGGCTACGGAC
 1861 GACGAACTGGGACTCATAGATACGAAGGAAAAAGCGAAACCAGGCAGACCCAAAGGGAAG
 1921 AGCTCAACTTCTTCCACAAGCGCTACAGGTCCGGGGAAGAAGACCCCGACTCCTGCAGCT
 1981 GCAGAGTGGAGAGCGACAACGACGAGGACGAGCTTGCCAGACCCGATGCCCCCAAGAAG
 2041 CGACCTGGACGGCCAAGGACAAAGCCGCTGCCAAAGGAGGACG**AGTTAAACC**CGAGGCA
 2101 GCGCTAGACCGAGAGGTCCGCCAAGGGCAACTGCCCGACGAAGCCTACTGTCTACTACA
 2161 GCGGCTGATAAAGACAGTACAAAGAAGAAG**CTCGAG**

شکل ۱: توالی ژن *apflb1* 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 *apflb1* 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 اسیدآمینو و توالی اسیدهای آمینو پروتئین حاصل نیز در شکل ۲ نشان داده شده است.

1 LEYLGTKFNGGSSVPSNESCVRG**FDNVGFVMGTSSTLFNQFL**LQINSTATLP
 51 DWLKS VFTDILKDIGENDEIDIAQYAPNPFYHFSNTTNP SAAE LELDL**VDG**
 101 **GEDLQNIPLHPLIQPERHVDVIFAVDSSADTTYSWP**NGTALVATYERSLN
 151 SSGIANGTSFPAIPDQNTFVNKGLNTRPTFFGCNNSNTTGP SPLIVYLPN
 201 YPYTAYSNFSTFQPDYTEQERDSTILNGYDVVVTMGNSTRDGNWSTCVGCA
 251 ILSRSLERTNTNV**PEICKQCFQRYCWNGTV**NSTTPAGYEPVTILDSAASG
 301 IIPSISTVAMVVFAAWTIF

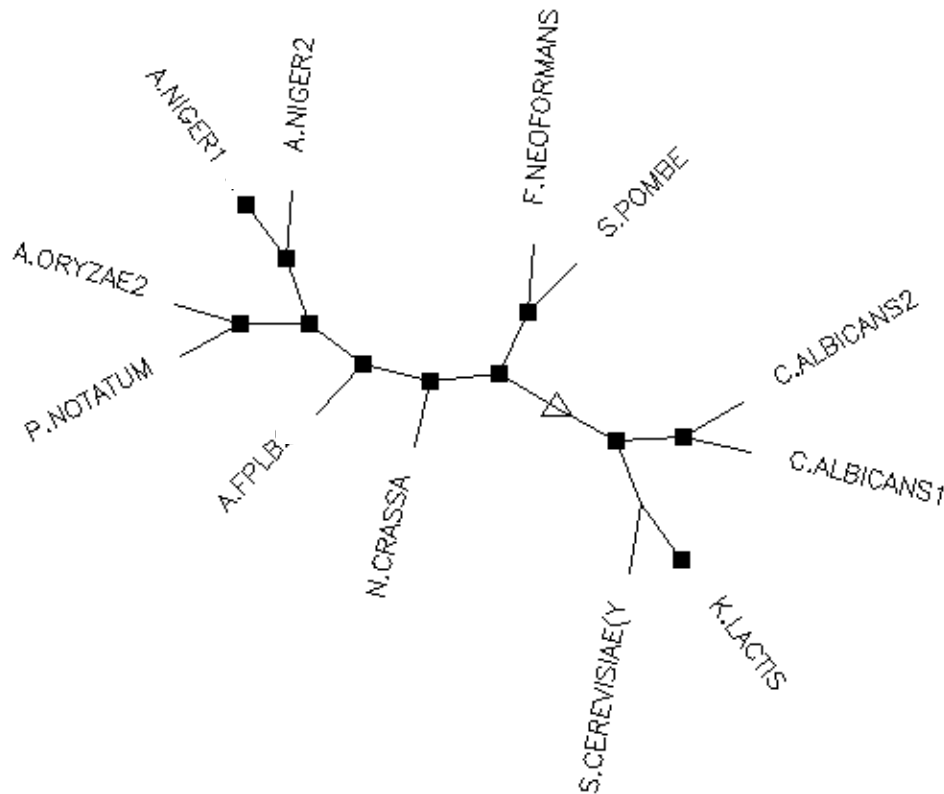
شکل ۲: ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن *afplb1* به اسید آمینه. توالی های نشان داده شده به رنگ قرمز بخش های کاتالیتیک محافظت شده آنزیم های لیزوفسفولیپاز یوکاریوتی را در مسیر تکامل نشان می دهد که دارای همسانی بسیار بالایی در ژنوم یوکاریوت های مختلف است.

<i>A.fumigatus</i> PLB1	1	-----LEYLGT	TKFN	GGSV	PSNES	SCVR	GFDN	VGFV
<i>C.albicans</i> PLB1	260	LNSTV	IELT	PYE	FGS	WDP	-----	SLNE
<i>C.albicans</i> PLB2	258	FNSTV	FELT	PYE	VG	SWDP	-----	SLRS
<i>A.oryzae</i> LLPL2	296	SNATV	YEFNP	WE	FGT	FDP	-----	TVYGF
<i>P.chrysogenum</i> PLB	238	SNSTV	YEFN	WE	FGT	FDP	---	TIFGF
<i>A.niger</i> LLPL1	293	SNSTV	YEFNP	WE	FGS	FDP	-----	SIFGF
<i>A.niger</i> LLPL2	295	TNATV	YEVNP	WE	FGS	FDP	-----	SVYAF
<i>A.oryzae</i> LLPL1	280	SNSTV	YEFNP	WE	FGS	FDP	-----	SVYGF
<i>N.crassa</i> LPL	270	LNATN	YEFNP	FE	TGS	WDP	-----	TVYGF
<i>C.neoformans</i> PLB	268	ENATV	WEFT	PYE	FGS	WAF	GSQYK	SPGA
consensus	301
<i>A.fumigatus</i> PLB1	31	GTSS	TLFN	QFL	LQIN	STAL	PDWL	KS
<i>C.albicans</i> PLB1	313	GTSS	ALFN	EAVL	SITE	ANIP	PSFL	KDI
<i>C.albicans</i> PLB2	312	GTSS	SLFN	IVL	QQLN	NMIP	PPFL	KELI
<i>A.oryzae</i> LLPL2	351	GTSS	SLFN	QFL	LQVN	STSL	PDFL	KTA
<i>P.chrysogenum</i> PLB	288	GTSS	SLFN	Q	LQINT	TSL	SFIK	DV
<i>A.niger</i> LLPL1	348	GTSS	SLFN	QFL	LKNT	T	DIP	STL
<i>A.niger</i> LLPL2	350	GSST	TLFN	QFL	LQIN	STSI	PTIL	KDA
<i>A.oryzae</i> LLPL1	335	GTSS	SLFN	QFL	LR	LNGT	DI	PNL
<i>N.crassa</i> LPL	325	GTSS	TLFN	QFL	L	ANIS	SYD	GVA
<i>C.neoformans</i> PLB	326	GTSA	TLFN	GAF	LE	LNGT	DSG	LL
consensus	361
<i>A.fumigatus</i> PLB1	89	SAAE	LELD	LDV	GGED	LQNI	PLH	PLI
<i>C.albicans</i> PLB1	372	ISQ	SKNLY	LDV	GGED	GQNI	PIS	PLLH
<i>C.albicans</i> PLB2	371	IAQ	SRTLY	LAD	GGED	GQNV	PL	LPLH
<i>A.oryzae</i> LLPL2	409	AAHQ	QELM	VD	GGED	LQNI	PLH	PLI
<i>P.chrysogenum</i> PLB	340	YAAQ	KLLD	VD	GGED	GQNV	LH	PLI
<i>A.niger</i> LLPL1	406	YEK	TP	LDV	VD	GGED	KQNL	PLH
<i>A.niger</i> LLPL2	408	YATA	KDLL	VD	GGED	GQNI	PLH	PLI
<i>A.oryzae</i> LLPL1	393	YSTP	ELDV	VD	GGED	GQNV	PLH	PLI
<i>N.crassa</i> LPL	385	NADT	LELD	LDV	GGED	LQNI	PLN	PLI
<i>C.neoformans</i> PLB	382	IYNL	TYIT	LDV	AGET	NQNI	PLE	P
consensus	421
<i>A.fumigatus</i> PLB1	149	LNSSG	-IANGT	SFPA	IPDQ	NTFVN	KGLN	TR
<i>C.albicans</i> PLB1	429	FSSQ	---GNGI	AFFPY	VPDQ	YTFRN	LN	LT
<i>C.albicans</i> PLB2	428	FSSQ	---GDG	I	AF	FPY	VPDQ	NTF
<i>A.oryzae</i> LLPL2	469	LNSTG	-IANGT	SFPA	IPDQ	NTFVN	KGLN	TR
<i>P.chrysogenum</i> PLB	394	LNSSG	-IAN	T	AF	FPY	VPDQ	TF
<i>A.niger</i> LLPL1	466	LNSTG	-IGNG	T	AF	FP	IP	PK
<i>A.niger</i> LLPL2	468	LEPS	---IANGT	A	FP	VPDQ	NTFVN	KGLN
<i>A.oryzae</i> LLPL1	453	LNTTG	-IANGT	SFPA	VPDQ	NTFVN	KGLN	TR
<i>N.crassa</i> LPL	444	FGSI	---SNGT	L	F	P	IP	DD
<i>C.neoformans</i> PLB	442	KILA	EHENT	R	V	L	M	E
consensus	481
<i>A.fumigatus</i> PLB1	202	PYTAY	S	N	S	T	F	Q
<i>C.albicans</i> PLB1	486	PFTY	WS	N	T	S	T	F
<i>C.albicans</i> PLB2	485	PFTY	F	S	N	I	S	T
<i>A.oryzae</i> LLPL2	522	PYVS	Y	S	N	W	S	T
<i>P.chrysogenum</i> PLB	42	PYSY	H	S	N	I	S	F
<i>A.niger</i> LLPL1	519	PYTT	L	S	N	K	S	T
<i>A.niger</i> LLPL2	520	PYTY	D	S	N	F	S	T
<i>A.oryzae</i> LLPL1	506	PYTA	E	S	N	T	S	T
<i>N.crassa</i> LPL	500	PYTAL	S	N	V	S	T	F
<i>C.neoformans</i> PLB	492	PWS	F	A	A	N	T	S
consensus	541
<i>A.fumigatus</i> PLB1	260	NTNV	PE	I	C	K	Q	C
<i>C.albicans</i> PLB1	544	GIEQ	TE	Q	C	K	C	F
<i>C.albicans</i> PLB2	543	GIEQ	TE	Q	C	K	C	F
<i>A.oryzae</i> LLPL2	580	NTQV	P	D	A	C	T	Q
<i>P.chrysogenum</i> PLB	495	GTTL	P	D	I	C	S	C
<i>A.niger</i> LLPL1	579	NTQV	P	D	M	C	S	Q
<i>A.niger</i> LLPL2	578	NTSL	P	D	I	C	T	C
<i>A.oryzae</i> LLPL1	564	NTKL	P	D	I	C	N	T
<i>N.crassa</i> LPL	558	GRQT	P	A	A	C	K	T
<i>C.neoformans</i> PLB	548	SEN	R	S	T	T	C	Q
consensus	601
<i>A.fumigatus</i> PLB1	318	TIF	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>C.albicans</i> PLB1	604	KA	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>C.albicans</i> PLB2	603	RDDL	SN	-----	-----	-----	-----	-----

<i>A.oryzae</i> LLPL2	639	TL	L-----
<i>P.chrysogenum</i> PLB	549	IL	V-----
<i>A.niger</i> LLPL1	639	MM	-----
<i>A.niger</i> LLPL2	638	L	-----
<i>A.oryzae</i> LLPL1	624	FMTI	-----
<i>N.crassa</i> LPL	618	GVVAATLLL	-----
<i>C.neoformans</i> PLB	608	GTASSGAARKMGVGMGMVALTAGLGLML	-----
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:



شکل ۴: 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

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

تلفیق توالی قطعه ۵۴۵ bp حاصل از PCR اولیه با قطعه ۱۸۰۰bp حاصل از IPCR با شناسایی و مشخص نمودن توالی نوکلئوتیدهای ویژه آندونوکلتاز محدودالانثر *Xho* I پرایمرهای مربوط به PCR دژنراتیو و IPCR در توالی هر دو قطعه، توجه به جهت ۳→۵ 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.

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

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 میکروارگانسیم به قطعات DNA حلقوی در مرحله اول این روش نقطه ای 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 مقدر 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^۲ 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 A را در بر می گیرد.

مطالعات مربوط به تعیین توالی ژن هایی که فرآورده های نهایی آنها دارای نقش اساسی در ویروالانس میکروارگانسیم ها هستند، عمدتاً با هدف تعیین میزان مشارکت بیان ژن در قدرت بیماریزایی میکروارگانسیم، تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد فیزیولوژیک فرآورده ژن برای خود میکروارگانسیم و میزان مورد تهاجم در بافت و استنباط اطلاعات پایه ای برای ارایه شیوه مصنوعیت 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 ویروالانس میکروارگانسیم هایی نظیر کریبتوکوکوس *نئوفرمنس* (۶، ۷ و ۲۹) *کاندیدا آلبیکانس*، انواع *آسپرژیلوس* ها، *پاراکوکسیدیوئیدس برازیلیینس* (۸، ۱۹، ۲۶ و ۳۱)، *مالاسزیا فورفور* (۲۰) انواع کلسترییدیوم (۱۵)، *آنتامبا هیستولیتیکا* (۱۴)، پژوهش های مقدماتی برای استفاده از این آنزیم برای طراحی و تهیه دارو (۲۷، ۳۰ و ۳۱)، تشخیص آزمایشگاهی عفونت (۱۹) و (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.

نشان دهنده قرابت فیلوژنیک بسیار زیاد بین این دو میکروارگانسیم در میراث ژنومی و انتقال کاملاً 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 کریبتوکوکوس *نئوفرمنس* نیز از استاندارد تشابه ۲۵٪ بسیار زیاده تر است و می تواند دلالت بر این امر داشته باشد که در مسیر تکاملی سلسله قارچ ها، انتقال میراث ژنی در مورد ژن های دارای نقش اساسی در ساختار حیاتی و ژنتیکی این میکروارگانسیم ها به نحو بسیار محافظه کارانه ای انجام گرفته است، زیرا جنس *آسپرژیلوس* و گونه های مختلف آن به شاخه *اسکومیکوتا*^۲ رده^۳ اسکومیست ها، ولی جنس *فیلوبازیدیا* و *بازیدیومایکوتا* و رده^۳ *بازیدیومیست* ها تعلق دارند که از نظر تکاملی از *اسکومیکوتا*ها تکامل یافته تر هستند ولی علی رغم وجود فاصله تکاملی بین این دو شاخه از میکروارگانسیم های سلسله^۴ 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 *plb* و *lpl* میکروارگانسیم های مختلف با ژن *plb* *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در جدول ۱ می تواند نشان دهنده افت میزان همسانی توالی ژن *plb* *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با میکروارگانسیم هایی باشد که قرابت فیلوژنیک آنها با *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به تدریج کمتر می شود، به نحوی که *lpl* قارچ های کپکی پنسیلیوم *نوتانوم*، *آ. اوریزه*، *آ. نیچر* و *نوروسپورا کراسا* با توجه به تعلق آنها به اسکوسیت ها (همانند *آسپرژیلوس* ها) و قرار گرفتن در راسته^۱ *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 لیزوفسولپازها 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

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 *caPLB1*, 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 pathophysiological 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 comparison of a nonhaemolytic and a haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 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

- 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.