مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره سوم (پیاپی ۱۶) پاییز ۱۳۹۲
صفحات ۲۱۸-۲۱۲

Original Article

بررسی وجود ژن کد کننده اسکوالن اپواکسیداز در قارچ درماتوفیت *ترایکوفایتون ویولاسئوم*

فاطمه نوربخش*[۱]، مهدی میررحیمی[۲]، ساسان رضایی[۳]، هاتف آجودانی فر[۴]

[۱] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده زیست شناسی، گروه میکروب شناسی، [۲] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۳] استاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، [۴] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *ترایکوفایتون ویولاسئوم* یک قارچ درماتوفیت است که پوست، ناخن و موی انسان را مورد تهاجم قرار می دهد. اما مطالعات کمی بر روی زیست شناسی مولکولی این قارچ انجام شده است. این مطالعه با هدف بررسی حضور ژن کد کننده اسکوالن اپواکسیداز در قارچ *ترایکوفایتون ویولاسئوم* انجام شده است.

مواد و روش ها: این مطالعه به صورت مقطعی بر روی قارچ *ترایکوفایتون ویولاسئوم* جدا شده از بیماران مراجعه کننده به بخش قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران با علایم کچلی، انجام گردید. پس از استخراج DNA، به کمک پرایمرهای اختصاصی، ژن کد کننده اسکوالن اپواکسیداز با روش PCR تکثیر و توالی آمینواسیدی آن با روش تعیین توالی مشخص گردید.

یافته ها: الکتروفورز محصول PCR حضور قطعه حدود ۶۰۰ جفت بازی، تایید کننده تکثیر ژن اسکوالن اپوکسیداز را نشان داد. این توالی با شماره دسترسی JX869101 در پایگاه جهانی ژن (NCBI) ثبت گردید. این قطعه، پروتئینی با ۲۲۰ آمینو اسید را رمز می نماید. مقایسه توالی این ژن با سایر ژن های موجود در بانک های اطلاعات ژنتیکی، همسانی بالا و معنی دار آن را با سایر ژن های کد کننده پروتئین آنزیم اسکوالن اپوکسیداز در قارچ ها و یوکاریوت های دیگر نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که توالی اسیدآمینه که پروتئین را می سازد حدود ۷۸ درصد با توالی اسکوالن اپواکسیداز سایر قارچ ها تشابه دارد.

واژگان کلیدی: *ترایکوفایتون ویولاسئوم*، اسکوالن اپواکسیداز، درماتوفیت.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۲

مقدمه

استرول‌ها چربی های ساختمانی هستند که در غشاهای موجود در بیشتر سلول های یوکاریوتی یافت می‌شوند. به دلیل سیال و نفوذپذیر بودن غشا، که از ویژگی های اساسی برای نقل و انتقال و فعالیت آنزیم های متصل به غشا است، استرول ها در این سلول ها مهم تلقی می‌گردند. در ساختمان غشا قارچ ها نوع دیگر استرول به نام ارگوسترول (Ergosterol) وجود دارد (۱). بیوسنتز استرول ها مسیر پیچیده ای است که با پیش ساز استات آغاز می گردد. در این مسیر ترکیبات کلیدی حد واسطی از جمله ترکیب ۳۰ کربنه به نام اسکوالن ساخته شده و پس از تغییرات دیگر (اکسیداسیون‌ها، برداشت یا جابه‌جایی گروه های متیل) منجر به تولید محصول نهایی(استرول) می گردد. با عمل آنزیم اسکوالن منواکسیژناز، یک اتم اکسیژن از O_2 به انتهای زنجیره اسکوالن اضافه می شود. این امر باعث ایجاد یک اپوکسید و سپس تشکیل پیوندهای دو گانه اسکوالن، ۲، ۳ اپوکسید می گردد. پس از این مرحله مسیرهای سنتتیک قدری متفاوت شده و استرول‌های دیگری تولید می شوند.

* آدرس برای مکاتبه: فاطمه نوربخش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا
تلفن: ۰۹۱۲۲۰۴۳۶۵۴ پست الکترونیک: fatemehnoorbakhsh@iauvaramin.ac.ir

از این جمله می توان به استیگماسترول در بسیاری از گیاهان و ارگوسترول در قارچ ها اشاره نمود (۲).

درماتوفیت ها قارچ های رشته ای و کراتین دوست هستند که در پوست، مو و ناخن انسان و حیوانات ایجاد کچلی می نمایند (۳). *ترایکوفایتون ویولاسئوم* (*Trichophyton violaceum*) یک درماتوفیت انسان دوست بوده که در ایجاد کچلی سر، بدن و ناخن نقش دارد. مناطق بومی این قارچ خاور نزدیک، اروپای شرقی، روسیه، آفریقا، مکزیک و آمریکای جنوبی می باشد. این قارچ از عوامل شایع کچلی سر در ایران، به ویژه در نواحی جنوبی به شمار می رود (۴). تهاجم این قارچ به مو از نوع اندوتریکس و حاوی تعداد زیادی آرتروکنیدیا در داخل ساقه مو می باشد. این امر باعث پیچ خوردگی مو و تولید لکه سیاه شده که تحت تاثیر نور فرابنفش، ایجاد فلورسنس نمی نماید (۴).

درماتوفیت ها در کنار ویژگی های اکولوژیک و تفاوت های ظاهری، کاملاً وابسته به ساختار ژنتیکی شان می باشند. شباهت های ریخت شناسی، تغییر پذیری و چند شکلی بودن درماتوفیت ها باعث می شود که برای تشخیص این گروه از میکروارگانیسم ها و بیماری های حاصل از آن ها زمان و مهارت زیادی صرف گردد. امروزه روش های زیست شناسی مولکولی مشکلات تشخیصی بر مبنای شکل ظاهری را حل و دانش اپیدمیولوژی عفونت پوستی (درماتوفیتوزیس) را بهبود بخشیده است. در این راستا توسعه بیشتر تشخیص مولکولی درماتوفیت ها به تحقیقات بیشتر شاخص های مولکولی نیاز دارد (۵). این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی و شناسایی ژن کد کننده اسکوالن اپوکسیداز در قارچ درماتوفیت و بیماری زای *ترایکوفایتون ویولاسئوم* انجام شد.

مواد و روش ها

الف) کشت قارچ: قارچ *ترایکوفایتون ویولاسئوم* از بیماران مراجعه کننده به بخش قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران که دارای علایم کچلی بودند جداسازی گردید. قارچ *ترایکوفایتون ویولاسئوم* در محیط کشت سابورودکستروز آگار (SDA) به صورت نشاکاری کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۳۷°C نگهداری شد. پس از یک هفته پلیت ها از نظر ماکروسکوپی بررسی گردیدند. همچنین به منظور بررسی شکل میکروسکوپی از آن اسلاید کالچر تهیه شد (۴).

ب) استخراج اسید نوکلئیک: میسلیوم قارچ های رشد کرده از محیط کشت سابورودکستروز براث جداسازی و با بافر ۱ X PBS شستشو گردیدند. میسلیوم ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس میسلیوم ها در داخل بوته چینی حاوی نیتروژن مایع کوبیده شدند تا به صورت پودر بسیار نرم و یکنواخت درآیند.

پودر میسلیوم *ترایکوفایتون ویولاسئوم* در بافر استخراج DNA حاوی SDS یک درصد، ۵۰ میلی مولار EDTA، ۵۰ میلی مولار Tris-HCL(pH 8) و ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس سوسپانسیون در دور ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جداسازی و یکبار با فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل و یکبار نیز با کلروفرم-ایزوآمیل الکل مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ محلول رویی جداسازی گردید. DNA با افزودن الکل و نگهداری به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد رسوب داده شد. در نهایت رسوب حاصل در آب مقطر استریل حل گردید (۵).

ج) تکثیر ژن کد کننده آنزیم اسکوالن اپوکسیداز توسط PCR: در ابتدا پرایمرهای اختصاصی مربوط به تکثیر ژن کد کننده پروتئین اسکوالن اپوکسیداز، در ارگانیسم های مختلف از بانک جهانی ژنی (GenBank) استخراج گردید. سپس از کدون آغازین (ATG) تا کدون خاتمه (TAA) بررسی شد.

در این مطالعه به منظور تکثیر ژن کد کننده پروتئین اسکوالن اپوکسیداز از توالی های یکسان نوکلئوتیدی به صورت 5`ATAGTGCCGTGAGGACATATGGA3` و 5`TGACGCATGTTCAGGGAATCACC3` برای طراحی پرایمر در نظر گرفته شد. پرایمرها توسط شرکت ژن فن آوران تهیه شدند. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۷ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۲/۵ میکرولیتر از

هر پرایمر (غلظت ۲۰ پیکومول)، یک میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۰/۲ میلی مولار)، یک میکرولیتر DNA الگو (غلظت ۱۰ نانوگرم) و یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید.

واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر Peqlab با شرایط دمایی ۱ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ، طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند.

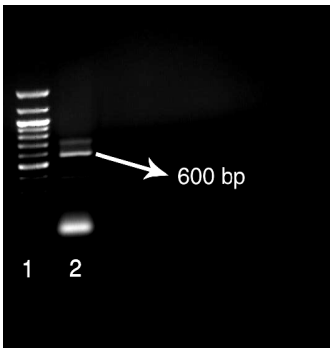
د) تعیین توالی ژن اسکوالن اپوکسیداز در قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون ویولاسئوم: پس از مشاهده باند مورد نظر از روی ژل، اقدام به خالص سازی آن کرده تا املاح و مواد ممانعت کننده در مراحل توالی یابی حذف گردد. به این منظور از کیت استخراج از ژل (Qiagen, USA) استفاده شد. پس از اتمام کار ۱۰ میکرولیتر از محلول نهایی با ۵ میکرولیتر، DNA loading Buffer بر روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید. مشاهده تنها یک نوار در کنار سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی صحت کار را تأیید می‌نمود.

یافته ها

الف) استخراج DNA: محصول حاصل از استخراج DNA در مجاورت مارکر در ژل آگاروز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز گردید. نتیجه به صورت نواری واضح مشاهده شد که نشان دهنده استخراج صحیح DNA می باشد.

ب) قطعه حاصل از تکثیر ژن آنزیم اسکوالن اپوکسیداز در قارچ ترایکوفایتون ویولاسئوم: الکتروفورز محصول PCR حضور قطعه ۶۰۰ جفت بازی را نشان داد. این امر تایید کننده تکثیر ژن اسکوالن اپوکسیداز در نمونه ها بود (شکل ۱).

ج) تعیین توالی ژن اسکوالن اپوکسیداز: پس تعیین توالی محصول PCR، توالی ۶۶۰ نوکلئوتیدی به دست آمد. این قطعه، پروتئینی با ۲۲۰ آمینو اسید را رمز می‌کند (شکل ۲). مقایسه توالی این ژن با سایر ژن های موجود در بانک های اطلاعات ژنتیکی، همسانی بالا و معنی دار آن را با سایر ژن های کد کننده پروتئین آنزیم اسکوالن



شکل ۱: ستون ۱) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲) ژن تکثیر شده اسکوالن اپوکسیداز (۶۰۰ جفت باز)

```
Y  G  Y  D  V  I  Y  F  G  N  G  V  K  I  P  F  P  S  D  A    20
tat gga tac gat gtg ata tat ttt ggc aat ggt gtg aag ata cct ttc cct agc gac gcc    60
N  D  K  I  L  E  G  R  C  F  H  H  G  R  F  I  M  R  L  R    40
aac gat aag atc ctg gaa ggc agg tgc ttc cac cac ggc cgc ttt atc atg cgc ctt cga   120
E  A  A  A  A  N  P  N  V  T  I  V  E  T  K  A  V  S  T  I    60
gag gcc gcg gcc gcg aac ccg aac gtc acc att gtc gag acc aag gcc gtt tct acc ata   180
K  S  T  H  T  G  D  V  L  G  V  Q  C  Q  T  D  G  K  Q  D    80
aaa tcc acg cat aca ggg gat gtc ctt gga gtc cag tgc cag act gat ggc aaa caa gac   240
F  Y  F  G  P  L  T  V  V  A  D  G  Y  A  S  T  F  R  K  E   100
ttt tat ttt ggg ccc ctg acc gtt gtc gcg gat ggt tat gcc tct acg ttc cga aag gaa   300
Y  L  P  I  Q  P  V  A  K  S  K  F  W  G  L  E  L  I  D  A   120
tat ctc ccc ata caa cca gtc gcc aaa tcg aaa ttc tgg ggc ctg gag ctt ata gat gcg   360
K  L  P  I  P  G  H  G  H  V  V  L  G  D  F  P  P  I  L  I   140
aaa tta ccc ata ccg ggc cac ggc cat gtt gtc ctg ggt gat ttc ccg ccc ata ttg ata   420
Y  Q  I  G  E  H  E  T  R  I  L  I  D  I  P  D  N  L  P  S   160
tac cag att gga gag cat gag act cga atc cta att gat ata cca gac aac ctg cct tcg   480
A  S  V  A  N  G  G  V  K  G  H  M  R  N  V  V  L  P  S  L   180
gcg tca gtt gcc aac gga ggt gta aag ggt cac atg cgg aat gtc gtc ctt cct tct ttg   540
P  E  C  I  R  P  S  F  E  A  A  L  E  K  G  G  F  R  S  M   200
cca gag tgt att cgg ccc tca ttt gaa gct gcg ttg gag aag gga ggg ttt cgg tca atg   600
P  N  S  F  L  R  P  V  T  N  R  I  P  G  L  M  F  L  G  D   220
cca aat tcc ttc ctc aga ccc gtc acg aat agg atc ccc gga ttg atg ttc cta ggt gat   660
```

شکل ۲: تعیین توالی ژن اسکوالن اپوکسیداز و توالی آمینواسیدی پروتئین کد کننده آن

اپوکسیداز در قارچ ها و یوکاریوت های دیگر نشان داد. این توالی با شماره دسترسی JX869101 در پایگاه جهانی ژن (NCBI) ثبت گردید.

بحث

در این مطالعه برای اولین بار ژن کد کننده آنزیم اسکوالن اپواکسیداز در قارچ درماتوفیت *ترایکوفایتون ویولاسئوم* با موفقیت تکثیر و توالی یابی گردید.

امروزه استفاده از روش های مولکولی با استقبال زیادی همراه شده است. زیرا این امر آگاهی ما را در مورد درک فیزیولوژی، متابولیسم و بررسی ژنتیک و مورفولوژی موجودات زنده افزایش می‌دهد. با این وجود بیشتر این روش ها پیچیده و مشکل بوده و به همین دلیل در تشخیص معمول قارچ ها به کار گرفته نمی‌شود. اگر چه به دلیل روش تشخیص سریع و درصد خطای کمتر آن، سعی بر افزایش به کارگیری این روش ها شده است.

اسکوالن اپوکسیداز آنزیمی است که نقش بسیار مهمی در بیوسنتز کلسترول، استیگماسترول و ارگوسترول دارد. از این میان تنها ارگوسترول در قارچ ها وجود دارد. از آنجایی که نقش این آنزیم در تمام یوکاریوت ها یکسان است مطالعه بر روی یوکاریوت های دیگر از جمله *ترایکوفایتون روبروم* (*T. rubrum*)، *ترایکوفایتون تونسورنس* (*T. tonsurans*)، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (*A. fumigatus*)، *ساکارومایسس سروزیه* (*S. cerevisia*) و *کاندیدا آلبیکنس* (*C. albicans*) انجام شده است (۱۱-۶). اسکوالن اپوکسیدازها علاوه بر نقش در بیوسنتز، هدف بسیاری از داروهای ضد قارچی نیز می باشند. اما جهش هایی که در ژن سازنده این آنزیم صورت گرفته سبب شده که برخی از آن ها، از جمله *ترایکوفایتون روبروم* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* نسبت به برخی از این داروها از جمله تربینافین مقاومت نشان دهند (۶ و ۱۲).

ترایکوفایتون ویولاسئوم در انسان ایجاد کچلی بدن، پا، دست، مو و ناخن می نماید. هم چنین ممکن است منجر به واکنش های التهابی خفیف تا شدید در بدن نیز گردد (۴). از این رو در پژوهش حاضر یکی از جنبه های مهم مولکولی این قارچ که احتمالاً بر بیماری زایی و مقاومت آنتی بیوتیکی آن تاثیر می گذارد، مورد بررسی قرار گرفت.

ژن اسکوالن اپواکسیداز قارچ *ترایکوفایتون ویولاسئوم* پس از تکثیر، تعیین توالی گردید. توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن اسکوالن اپواکسیداز *ترایکوفایتون ویولاسئوم* در پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به ثبت رسید.

با مقایسه توالی های نوکلئوتیدی DNA ژنومی با نرم افزار Blast وجود اینترون در این قطعه دیده نشد. بنابراین قطعه تکثیر یافته در قسمت ORF (Open Reading Frame) ژن قرار دارد. با استفاده از نرم افزار Blast توالی نوکلئوتیدی این ژن و نیز توالی اسیدهای آمینه این آنزیم با سایر موجودات به منظور بررسی همسانی آن مقایسه گردید. نتایج نشان داد که همولوژی این آنزیم با سایر موجودات، معنی‌دار می باشد. به طوری که این قارچ با *ترایکوفایتون روبروم* ۹۵٪، با *امرسیلا نیدولانس* (*E. nidulans*) ۷۰٪، با *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۶۹٪ و با *آسپرژیلوس نایجر* (*A. niger*) ۶۳٪ مشابهت دارد.

در بررسی پروتئین های حاصل از این ژن مشخص گردید که این قطعه غنی از گلایسین (۱۰ درصد)، لوسین و پرولین (۸/۱۸ درصد) می باشد. در حالی که از نظر تریپتوفان (۰/۴۵ درصد)، سیستئین (۱/۳۶ درصد)، متیونین (۱/۸۱ درصد) فقیر می باشد.

نتایج به دست آمده در این مطالعه با بررسی های افراد دیگر بر روی میکروارگانیسم های دیگر مطابقت دارد. در پژوهش اوسبورن (Osborn) و همکاران بر روی این آنزیم در قارچ *ترایکوفایتون روبروم* نیز میزان لوسین و گلایسین بیشترین و تریپتوفان کمترین مقدار را داشتند. مشابه این نتایج را روشا (Rocha) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با بررسی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به دست آوردند. به طوری که لوسین و آلانین بالاترین و تریپتوفان و سیستئین پایین ترین مقادیر آمینو اسیدی را در این قارچ داشتند (۱۳). داو (Dave) نیز با مطالعه بر روی *آسپرژیلوس نایجر* از نظر آمینو اسیدهای غالب نتایج مشابه ای به دست آورد. به طوری که در این میکروارگانیسم تریپتوفان حداقل مقدار را داشت (۱۴).

متواضع (Motavaze) و همکاران میزان اسیدهای آمینه در قارچ *ترایکوفایتون تونسورنس* را در گلایسین، لوسین، تریپتوفان و گلوتامین به ترتیب ۹/۱۳، ۸/۶، ۰/۵۳ و ۱/۰۷ درصد ارزیابی نمودند (۱۱).

با توجه به نتایج به دست آمده در تمامی موارد تریپتوفان کمترین مقدار را نشان می دهد و دیگر این که میزان شباهت بین خود درماتوفیت ها بسیار بیشتر از آن ها نسبت به سایر موجودات است.

به طور کلی می توان نتیجه گرفت تشابه زیادی بین توالی نوکلئوتیدی ژن اسکوالن اپواکسیداز و اسید آمینه *ترایکوفایتون ویولاسئوم* با سایر قارچ ها و یوکاریوت ها وجود دارد و در نتیجه می تواند به عنوان هدف طراحی دارو و تحقیقات بیشتر بر روی این ژن قرار گیرد.

نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار ژن کد کننده آنزیم اسکوالن اپواکسیداز در قارچ درماتوفیت ترایکوفایتون ویولاسئوم استخراج گردید و در (NCBI,NIH) ثبت گردید و با مقایسه توالی سکانس نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مشخص شد تشابه زیادی با سایر قارچ ها دارد از اینرو با بررسی بیشتر روی ساختار این ژن شاید بتوان داروهای جدید ضد قارچی و یا واکسن های قارچی را طراحی و تهیه نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه قارچ شناسی مولکولی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل همکاری صمیمانه در انجام این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Nelson DL, Cox MM, Lehningrer. Principle of Biochemistry. New York, Worth Publisher; 2000.
2. Fuller LC, Child FJ, Midgley G, Higgins EM. Diagnosis and management of scalp ring worm. BMJ. 2003; 326: 539.
3. Poisson DM, Reousseau D, Defo D, Esteve E. Outbreak of tinea corporis gladiatorum, a fungal skin infection due to *Trichophyton tonsurans* in a French high level Judo team. Euro Surveill. 2005; 10(9): 187-190.
4. Zeini f, Mahbod A, Emami M. Medical Mycology. Tehran, Tehran University publisher;1383 [In Persian]
5. Kanbe T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathol. 2008; 166(5-6): 307-317.
6. Lui W, May GS, lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Extra copies of the *Aspergillus fumigatus squalene epoxidase* gene confer resistance to terbinafine: genetic approach to studying gene dose-dependent resistance to antifungals in *A. fumigates*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(7): 2490-2496.
7. Osborne CS, Leitner I, Favre B, Ryder NS. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(7): 2840-2844.
8. Pasrija R. Squalene epoxidase encoded by ERG1 affects morphogenesis and drug susceptibilities of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2005; 55(6): 905-913.

9. Ruckenstuhl C, Eidenberger A, Turnowsky F. Single amino acid exchanges in FAD-binding domains of squalene epoxidase of *Saccharomyces cerevisiae* lead to either loss of functionality orterbinafine sensitivity. Biocheml Soc Trans. 2005; 33(5): 1197-1201.

10. Ruckenstuhl C, Lang S, Poschenel A, Eidenberger A, Kumar Baral P, Kohut P, Hapala I, Gruber K, Turnowsky F. Characterization of squalene epoxidase of *Saccharomyces cerevisiae* applying terbinafine sensitive variants. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(1): 275-284.

11. Motavaze K, Namvar Z, Emami M, Noorbakhsh F, Rezaie S. Molecular characterization of *squalene epoxidase* gene in dermatophyte pathogen *Trichophyton tonsurans*. Iran Biomed J. 2008; 12(1): 55-58.

12. Osborne CS, Leitner I, Hofbauer B, Fielding CA, Favre B, Ryder NS. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(6): 2234-2236.

13. Rocha EMF, Gradiner RE, Park S, Martinez-Rossi NM, Perlin DS. A phe 389 leu substitution in Erg A confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigates*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(7): 2533-2536.

14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/acc.html, Accession no: AJ748126.

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 3, October 2013

Original Article

Characterization of squalene epoxidase encoding gene in dermatophyte pathogen *Trichophyton violaceum*

Fatemeh Noorbakhsh[1], **Mahdi Mirrahimi**[2], **Sasan Rezaie**[3], **Hatef Ajodanifar**[4]

[1] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Varamin, Iran.
[2] MS.c., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
[3] Professor, Department of Medical Mycology & Parasitology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Trichophyton violaceum* is one of the dermatophyte fungi which invades the skin, nail and hair of humans. Few studies were carried out in the field of molecular biology of this fungus. This study aimed to evaluate the presence of the squalene epoxidase encoding gene in *Trichophyton violaceum.*

Materials and Methods: This sectional study was performed on the *Trichophyton violaceum* isolated from the patients who were visited at department of Mycology, Medical division of Tehran University. Following DNA extraction, the squalene epoxidase encoding gene was amplified by PCR preformed and its specified primers. The amplified gene was finally sequenced and its aminoacid sequences were identified.

Results: Based on electrophoresis of PCR products, a fragment with 600bp nt was observed, which confirmed the amplification of *squalene epoxidase* gene. This gene was recorded in the national the NCBI gene bank as JX869101. This gene encodes a polypeptide with 220 aminoacids. PCR Nucleotide sequence comparison of this new gene with other existing genes in the gene bank revealed a significant homology with *squalene epoxidase* genes in other members of the fungi and other eukaryotes, as well.

Conclusion: The aminoacid sequence of the encoded protein was about 78% identical to the sequence of squalene epoxidase from other fungi.

Keywords: *Trichophyton violaceum*, Squalene epoxidase, Dermatophyte.

Correspondence to: Fatemeh Noorbakhsh

Tel: +989122043654

E-mail: fatemehnoorbakhsh@iauvaramin.ac.ir

Journal of Microbial World 2013, 6(3): 212-218.