

جدا سازی ژن زیر واحد G آنزیم V-ATPase از قارچ *Trichophyton rubrum* و کلونینگ آن در *E. coli*

هاجرالسادات قادری^{۱*}، ساسان رضایی^۲، فاطمه نوربخش^۳، مهتاب وفایی^۱، کامیار متواضع^۱،
مسعود امامی^۱، محمدرضا صفری^۴

(۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
(۲) بخش بیولوژی مولکولی، گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
(۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رامین-پیشوا
(۴) گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
نویسنده رابط: هاجرالسادات قادری، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
تلفن: ۰۲۱-۵۵۳۸۳۰۱۸ hajar.gh2006@yahoo.com

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۹/۲۰

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۲/۱۷

چکیده:

زمینه و اهداف: *Trichophyton rubrum (T. rubrum)* شایع‌ترین عامل کچلی انسان در سراسر دنیا می‌باشد. درمان این بیماری کامل نیست و پس از قطع دارو عود کننده است. اخیراً زیرواحد G از آنزیم V-ATPase به عنوان هدف برای داروها مورد توجه قرار گرفته. هدف مطالعه کلون کردن ژن کدکننده زیرواحد G آنزیم V-ATPase قارچ *T. rubrum* در باکتری *E. coli* به منظور نگهداری و مطالعه بر روی پروتئین حاصل از آن بود. روش بررسی: DNA و RNA از قارچ درماتوفیت *T. rubrum* جدا شد، سپس توسط PCR و RT-PCR تکثیر یافت و محصول RT-PCR در پلاسمید pTG19-T الحاق شد. پلاسمید نو ترکیب با روش شوک حرارتی به داخل *E. coli* وارد شد. باکتری کشت داده شد و کلنی‌های مشکوک جدا شدند و مجدداً کشت داده شدند. سپس PCR طبق روش قبل انجام شد.

یافته‌ها: وزن مولکولی DNA استخراج شده حدود 750bp و cDNA تقریباً 700bp بود. با کشت *E. coli* بر روی LB Agar (Luria agar) کلنی‌های آبی و سفید دیده شد. PCR کردن DNA حاصل از کلنی‌های مشکوک نشان داد ۵ کلون از ۸ کلون دارای ژن مورد نظر بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که این ژن دارای اینترون است. کلنی‌های سفید رنگ به احتمال زیاد دارای ژن مورد نظر می‌باشد. نتایج حاصل از PCR در آخرین مرحله نشان دهنده کلون شدن ژن مورد نظر است.

کلید واژه‌ها: کلون کردن، زیرواحد G-V-ATPase، *Trichophyton rubrum*، PCR.

مقدمه:

واکوئل‌های قارچی ارگان‌های برجسته‌ای هستند که دارای وظایف متعددی از قبیل تجزیه ماکرومولکول‌ها، محل ذخیره، اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها، فسفات معدنی، یون‌ها و تنظیم متابولیت‌ها و یون‌ها و همچنین انجام برخی هیدرولیزها هستند. pH این واکوئل‌ها به وسیله آنزیم V-ATPase تنظیم می‌شود که وابسته به ATP است و پروتون را به بیرون سلول پمپ می‌کند (۱، ۲).

V-ATPase یک پمپ پروتونی است که در ارگان‌های اسیدی درون سلولی تمام سلول‌های یوکاریوت (حیوانات، گیاهان، قارچ‌ها) مثل لیزوزوم، اندوزوم، دستگاه گلژی، و زیکول‌های ترشحی، ارگان‌های ذخیره پروتئین و غشاء سلول‌ها یافت می‌شود (۴-۲). این آنزیم در یوکاریوت‌ها نیز گزارش شده که به یون Na وابسته است. آنزیم مشابه آن در آرکی‌باکترها با دو عملکرد وابسته به ATP و سنتز ATP می‌باشد که برای پمپ کردن پروتون از میان غشاء مورد نیاز است (۵).

عملکرد این آنزیم ایجاد شیب الکتروشیمیایی پروتون در بین غشاء اندامک‌های درون سلولی و همچنین نگهداری pH همئوستازی در بخش درون سلولی می‌باشد (۶).

دانشمندان در این مورد توافق دارند که ساختار، عملکرد شیمیایی و فیلوژنی V-ATPase با F-ATPase مشابه است (۷)، و این آنزیم از قارچ‌ها تا گیاهان و حیوانات بسیار حفاظت شده است (۸).

V-ATPase یک آنزیم هترومولتی‌مریک است که دارای دو بخش می‌باشد: یکی از آنها کمپلکس آب‌دوست است که در بین غشا قرار دارد (V1) (peripheral) و به نظر می‌رسد ناحیه کاتالیتیکی آنزیم است. کمپلکس آب‌گریز (V0) که در بخش درون غشائی (Integral) قرار دارد، دیگر بخش این آنزیم است (Stalk). کمپلکس V1 در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها به ترتیب از ۸ زیرواحد (A-H) و ۷ زیرواحد (A-G) تشکیل شده است. کمپلکس V0 در یوکاریوت‌ها از زیرواحدهای a,c,d و در پروکاریوت‌ها از زیرواحدهای I,k,c تشکیل شده است. (۲، ۷، ۹). بخش V1 دارای محل اتصال برای ATP است و بخش V0 به‌عنوان کانالی برای عبور پروتون عمل

می‌کند. (۸)

عملکرد V-ATPase مشابه F-ATPase است که با هیدرولیز ATP پروتون را منتقل می‌کند. هردو آنها دارای دو بخش Rotor و Stator هستند. به نظر می‌رسد چرخش زیرواحد پروتئولپیدی در بخش مرکزی پایه راهی را برای عبور پروتون از میان غشاء پروتئینی و زیرواحد پروتئولپیدی ایجاد می‌کند. بنابراین، این زیرواحدها در عملکرد این آنزیم نقش اساسی ایفا می‌کنند (۲، ۹).

مطالعه و بررسی ژن کدکننده این آنزیم درک بهتری از فیزیولوژی قارچ را امکان‌پذیر می‌کند، و هدف مناسبی را برای تنظیم بیان یا ساخت داروهای مهارکننده این ژن در اختیار محققین قرار می‌دهد. هدف مطالعه کلون کردن ژن کدکننده زیرواحد G آنزیم V-ATPase قارچ *T. rubrum* در باکتری *E. coli* بود. تا به این ترتیب بتوان پروتئین حاصل از آن را نگهداری کرد و بر روی آن مطالعه نمود.

مواد و روش‌ها:

جداسازی اسیدهای نوکلئیک:

Total RNA و DNA از *Trichophyton rubrum* جدا شد. روش جداسازی DNA به‌طور خلاصه به‌شرح ذیل است:

مسیلیوم جداشده از محیط کشت قارچ را به‌وسیله نیتروژن مایع به‌طور ناگهانی منجمد کرده و در داخل بوتله چینی کوبیده شد تا وقتی که به یک پودر سفیدرنگ تبدیل شود. این پودر در DNA extracted buffer (Tris HCl:0/5 M pH:8, EDTA:0/5M, SDS:3%, Proteinase 1% β mercaptoethanol) و 50 μ l از K حل شد.

محلول به‌دست آمده برای یک ساعت در 65 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس در 3000-x g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. 7-8 μ l از محلول RNase H (10mg/ml) افزوده شد و در 37 درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن فنول - کلوروفورم - ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) و کلوروفورم - ایزو

کلون کردن DNA :

محصول RT-PCR (cDNA) که به وسیله PCR تکثیر شده بود در پلاسمید pTG19-T ساخت شرکت Generay Biotech , Shanghai ، این پلاسمید به وسیله شرکت سازنده برش یافته است و دارای انتهای آزاد T می باشد. اتصال با پروتوکل کیت کلونینگ (Generay Biotech , Shanghai) انجام شد که به طور خلاصه عبارت است از:

Vector: 2 µl, PCR product: 4 µl, 10xbuffer: 1 µl, T4DNAligases: 1 µl

و با آب مقطر استریل به حجم 20 µl رسید. پلاسمید به وسیله روش شوک حرارتی به سلول *E.coli* سویه Competent شده DH5α داخل شد. روش شوک حرارتی به طور خلاصه بدین شرح بود:

5 µl از محصول الحاق را به 50 µl سلول های *E.coli* که Competent شده افزوده شد. مخلوط حاصل در 0 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه گرمخانه گذاری می شود سپس به سرعت به دمای 42 درجه سانتی گراد منتقل شد 2 دقیقه در این دما نگه داشته شد. دوباره 2 دقیقه در دمای 0 درجه سانتی گراد قرار داده شد و در نهایت محیط کشت LB مایع (Luria Broth), (Bacto Trypton 10g/L, NaCl 5g/L) به آن افزوده شد و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 1 ساعت گرمخانه گذاری شد.

جدا سازی کلون های مشکوک :

پس از یک ساعت محصول انتقال داده شده را در محیط کشت LB Agar (Luria agr) واجد ایندول بتا D گالاکتوز یا X-gal و آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شده و در دمای 37°C به مدت یک شبانه روز انکوبه شده است. سپس هر یک از کلنی های رشد یافته *E.coli* را که به رنگ سفید است در محیط کشت LB medium به مدت 4-2 ساعت کشت داده تا به کدورت مورد نظر برسد.

جدا سازی DNA نو ترکیب از *E.coli* و PCR آن:

200 µl از محصول کشت *E.coli* در 10000-x g به مدت 2 دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب حاصل در

آمیل الکل (۱:۲۴) اضافه شد و با افزودن استات سدیم و الکل سرد مطلق رسوب گیری انجام شد و در 20- درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز گرمخانه گذاری شد. برای به دست آوردن رسوب DNA سانتریفوژ شد و رسوب DNA با الکل ۷۰٪ شستشو شد و با آب مقطر استریل به حالت محلول در آورده شد.

در روش جدا سازی RNA به طریق ذیل عمل شد:

پودر میسلیم طبق روش بالا تهیه شد، به آن GITC (Guanodin iso tio cyanait) که محتوی (sodium acetate 3M, phenol, Chloroform) بود، افزوده شد. پس از حل کردن در 12000-x g برای 5 دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از آن ایزوپروپانول افزوده شد و به مدت یک ساعت در 20- درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. تکرار این مرحله و گرفتن رسوب RNA با سانتریفوژ در 12000-x g به مدت 5 دقیقه انجام شد. رسوب RNA با اتانول شستشو داده شد و در بافر TE8 حل گردید.

PCR and RT-PCR

PCR و رونوشت برداری معکوس RT-PCR بر روی DNA و RNA استخراج شده انجام شد. از پرایمر سنتتیک شرکت سیناژن به فرمول ذیل استفاده شد:

5':CACCAGGCAAGACAGACCGAC3'
5':GTCAAGTCTCAACCGAGCCGT3'

پروتوکل ما برای تهیه Master mix به شرح ذیل بود:

10x buffer 5 µl, dNtpmix: 1 µl (0.2-1 µM), primer (sense & antisense): 2.5 µl (0.5 µM), DNA template: 1 µl and thermostable DNAPolymerase 1 µl (2.5 unit/reaction) (cinna Gen Co)

و با آب مقطر استریل به حجم 50 µl رسید.

چرخه PCR:

94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، 62 درجه سانتی گراد به مدت 60 ثانیه، 72 درجه سانتی گراد به مدت 90 ثانیه با 35 چرخه در دستگاه thermal cycler (Techne, UK). محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز 1٪ تایید شد. سپس از روی ژل به وسیله کیت (Genei India) استخراج شد و برای کلون کردن مورد استفاده قرار گرفت.

و 18s و RNA میتوکندریایی استخراج RNA را تایید نمود.

PCR و RT-PCR:

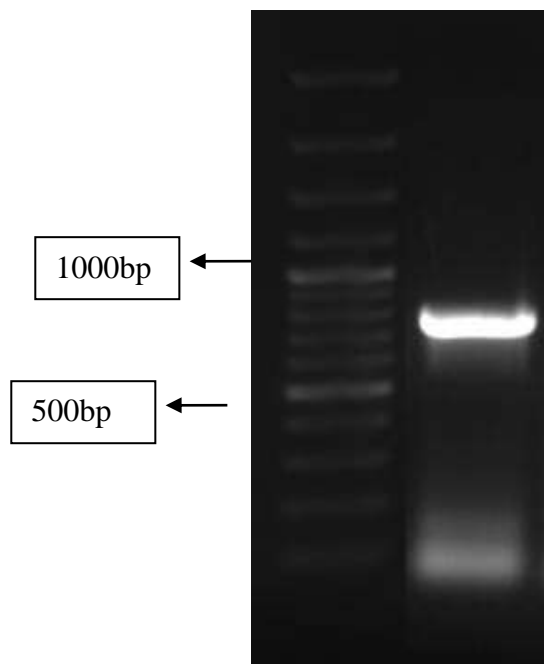
محصول PCR که در کنار مارکر (Fermentas) الکتروفورز شد نشان داد DNA دارای وزن مولکولی حدود 750bp است (شکل ۱). cDNA با الکتروفورز در کنار مارکر (Fermentas) به وزن مولکولی تقریبی 700bp مشخص شد (شکل ۲). با توجه به نتایج به دست آمده که اختلاف وزنی در حدود 50bp بین DNA با cDNA را نشان داد و نیز سکانس شدن ژن توسط رضایی و همکاران (۱۰) به نظر می‌رسد این ژن دارای ایترون باشد. بنابراین، ما برای کلون کردن ژن از cDNA که توسط PCR تکثیر یافته استفاده کردیم.

آب مقطر استریل حل شد و در $10000 \times g$ سانتریفوژ گردید. حل نمودن مجدد کامل رسوب و سانتریفوژ در $10000 \times g$ به مدت ۱ دقیقه، دور ریختن مایع رویی و حل کردن مجدد در $40 \mu\text{l}$ آب مقطر و نگهداری در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سانتریفوژ با نیروی $10000 \times g$ به مدت ۱ دقیقه مراحل بعدی بودند. $5 \mu\text{l}$ از DNA استخراج شده طبق روشی که قبلاً ذکر شد PCR گردید و محصول آن با ژل آگارز ۱٪ کنترل شد.

یافته‌ها:

استخراج RNA و DNA:

الکتروفورز DNA و مشاهده باند 1000bp استخراج آن را تایید کرد. الکتروفورز RNA و مشاهده باندهای 25s



شکل ۱: محصول PCR حاصل از DNA قارچی در کنار مارکر (GeneRuler EU, Fermentas) Load، شده DNA با وزن حدود 750bp

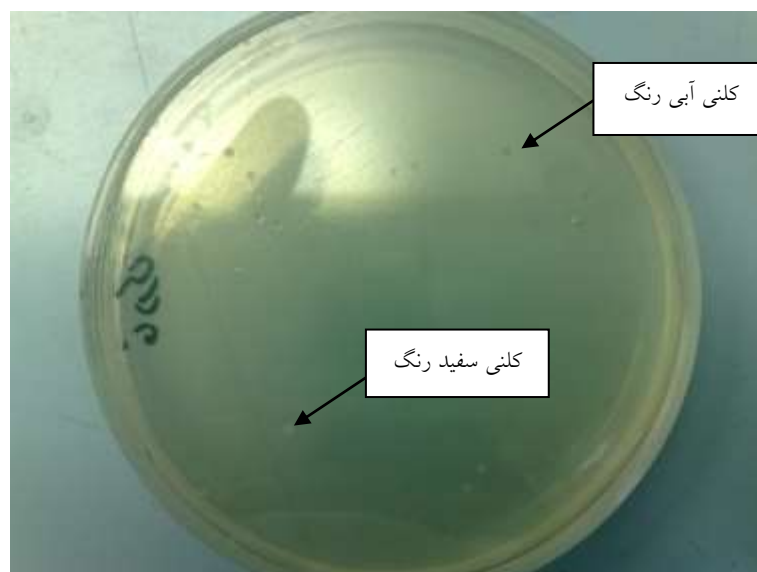


شکل ۲: محصول PCR از cDNA که در کنار مارکر (GeneRuler EU) Fermentas (Load شده DNA با وزن حدود 700bp

کلون کردن cDNA :

LacZ می باشد که آنزیم بتا گالاکتوزیداز را کد می کند. این آنزیم سویسترای X-gal را می شکند و ماده حاصله رنگ آبی تولید می کند و کلنی هایی که این ژن در آنها وجود دارد آبی رنگ می شوند. کلنی هایی که عملکرد این ژن در آنها مختل شده به رنگ سفید هستند. الحاق DNA به داخل پلاسمید باعث مختل شدن عملکرد ژن این آنزیم می شود. بنابراین، کلنی های سفید به احتمال زیاد دارای پلاسمید به همراه DNA مورد نظر بودند (شکل ۳).

با توجه به اینکه آنزیم Tag در انتهای رونویسی یک باز A باقی می گذارد و پلاسمید نیز در محل برش دارای یک T آزاد است، بنابراین cDNA از طریق اتصال باز مکمل A با T به پلاسمید pTG19-T الحاق می شود. پس از انتقال پلاسمید به *E.coli* و کشت در LB Agar با گذشت ۱۸ ساعت کلنی هایی با رنگ های آبی و سفید بر روی محیط کشت رشد کردند. این پلاسمید دارای ژن



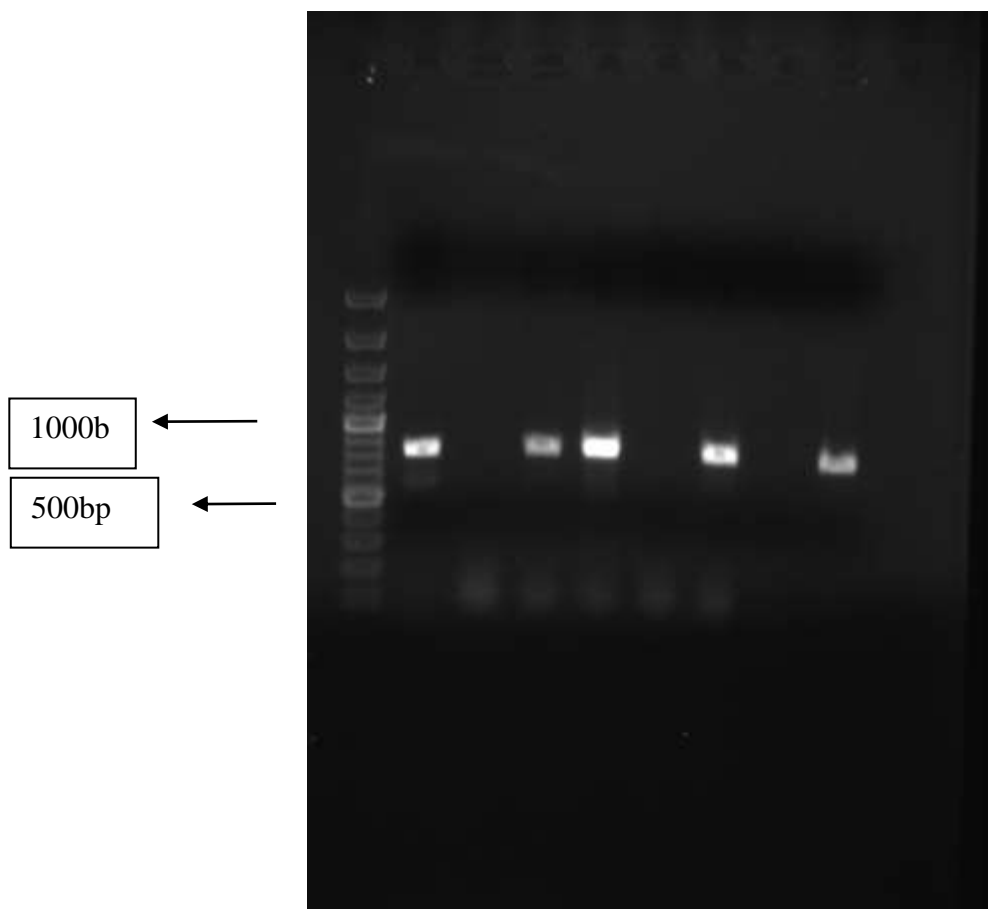
شکل ۳: ظاهر شدن کلنی های سفید و آبی بر روی محیط LB Agar بعد از ۱۷-۱۸ ساعت

جداسازی کلنی‌های مشکوک:

هر یک تک کلنی سفید رنگ رشد یافته بر روی محیط LB Agar در لوله‌های اپندورف حاوی محیط LB medium کشت داده شد، و به مدت ۴-۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه متحرک قرار گرفت. پس از گذشت ۴ ساعت OD آن به حدود ۰/۳ رسید که مشخص شد کدورت به مقدار مورد نظر (تعداد *E.coli*) برای استخراج DNA رسیده است.

DNA نو ترکیب استخراج شده که با پروتوکل اولیه تکثیر یافته بود به وسیله الکتروفورز بررسی شد. به نظر رسید از ۸ کلنی سفید جدا شده و کشت داده شده حداقل ۵ کلنی پس از PCR دارای زیر واحد G ژن V-ATPase بودند. زیرا محصول ران شده در کنار مارکر همان وزن مولکولی مشابه ژن *T.rubrum* یعنی 700bp را نشان داد (شکل ۴).

استخراج و تکثیر



شکل ۴: محصول PCR حاصل از DNA نو ترکیب استخراج شده از *E.coli* دارای باند با وزن مورد نظر 700bp.

درماتوفیت‌ها گروهی از قارچ‌ها هستند که توانایی تهاجم به بافت کراتینی انسان و حیوانات را دارند (پوست، مو،

بحث:

نیز وجود دارد. برای درمان قطعی به داروهای کاراثری نیاز است. برای این کار اطلاعات بیوشیمیایی و ژنتیکی در مورد قارچ‌ها مورد نیاز است (۱۲، ۱۴). به‌تازگی دانشمندان V-ATPase را به‌عنوان هدفی برای داروهای ضد قارچی مورد توجه قرار داده‌اند (۱۰). مطالعه اثر داروها بر روی این زیرواحد با روش‌هایی برپایه کشت به‌زمان و هزینه‌های زیادی نیاز دارد. در حالیکه کلون کردن این زیر واحد در *E. coli* باعث کاهش هزینه‌ها و زمان می‌شود و به‌طور کلی مقرون به‌صرفه است. در سال‌های اخیر به‌کارگیری روش‌های نوین بر پایه اطلاعات موجود در ژنوم ارگانیسم‌ها هم برای تشخیص و افتراق گونه‌ها و هم برای آزمایش‌های دارویی مورد استقبال فراوانی قرار گرفته است. در عین حال کلون کردن ژن باعث می‌شود که بتوان آن را برای مدت طولانی‌تری نگهداری کرد. زیرا، ژن در درون ارگانیسم در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد می‌تواند برای مدت بسیار طولانی در حدود ۱-۲ سال بدون تغییر باقی‌بماند. در حالی که محصول PCR همین ژن نهایتاً برای ۶ ماه قابل استفاده است.

نتیجه‌گیری:

این ژن به‌عنوان هدف برای داروهای ضد قارچی و به‌عنوان هدف برای داروهای ضد سرطانی در انسان مورد توجه قرار گرفته است. روشن است که نیاز به مطالعات فراوان و زمان بر دارد. بنابراین، ما زیر واحد G از ژن V-ATPase را کلون کردیم تا برای مطالعات دارویی مسیری هموارتر را مهیا کنیم.

تقدیر و تشکر:

با سپاس فراوان از آزمایشگاه داروسازی دانشگاه تهران و جناب آقای دکتر سپهری زاده که ما را در انجام این مهم یاری رساندند.

ناخن) و ایجاد عفونت می‌کنند. درماتوفیتوزیس به‌نام عمومی Ring worm شناخته می‌شود (۱۱).

Trichophyton rubrum مهم‌ترین و شایع‌ترین عامل کچلی بدن، دست، پا و ناخن در سراسر دنیا است (۱۲، ۱۳) و در بین انسان‌ها و حیوانات عمومیت دارد (۱۴، ۱۵). برای درمان این بیماری‌ها به اطلاعات جامعی درباره بیوشیمی و ژنتیک درماتوفیت‌ها نیاز است. به‌تازگی ژن V-ATPase به‌عنوان هدفی برای داروهای ضد قارچی مورد نظر قرار گرفته است. برای استفاده از این ژن در مطالعات دارویی لازم است تا اطلاعات ژنتیکی و بیوشیمیایی زیر واحدهای آن به‌دست آید. در دیگر مطالعات تاکنون ژن‌هایی که زیر واحدهای C, B, A, E را در پستانداران کد می‌کنند شناسایی و کلون شده‌اند (۱۶). زیرواحدهای G, C نیز در گیاهان شناسایی و کلون شده‌اند (۴، ۱۷). ژن‌های Ca^{2+} -ATPase در انگل‌هایی نظیر *Plasmodium* (۱۸، ۱۹) و A1-ATPase از *Archaneobacteria* (۲۰)، Na^{+} -ATPase در انگل‌ها (۲۱) و حشرات (۲۲) شناسایی و کلون شده‌اند.

H^{+} -ATPase از لحاظ بیوشیمیایی و مولکولی در قارچ‌هایی نظیر *Canndida albicans* (۲۳) *Aspergillus* (۵) و *Erysiphe cichorocearum* (۲۴) *oryzea* (۲۲، ۲۳) *Zygosaccharomyces rouxii* (۲۵) مطالعه شده، شناسایی و کلون شده است.

زیر واحد G از قارچ *Trichophyton rubrum* شناسایی و توالی‌یابی شده است (۲۶). این زیر واحد به‌صورت محلول است و به‌نظر می‌رسد برای فعالیت آنزیم V-ATPase و اتصال زیرواحدهای آن ضروری است. این زیرواحد با زیرواحد b در F-ATPase هومولوگ است (۱۶، ۲۷، ۲۸). احتمالاً با غیر فعال کردن این زیرواحد می‌توان مانع فعالیت و به‌هم پیوستگی این آنزیم شد و درنهایت باعث مرگ سلول قارچی گردید. درمان بیماری‌های قارچی اغلب طولانی است و امکان عود مجدد

فهرست مراجع:

1. Melin. P, Schnu" rer J E , Wagner GH. Disruption of the gene encoding the V-ATPase subunit a results in inhibition of normal growth and abolished sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Mic* . 2004 ;**150**:743–748.
2. Ohira.M, Smardon A M, Charsky C M H, Liu J, Tarsio M, Kane P M. The E and G subunits of the yeast V-ATPase interact tightly and are both present at more than one copy per V1 complex. *J. Biol Chem* 2006;**281**:22752–22760.
3. Kane PM. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Molecul biolo Revi* 2006; **70** :177-191.
4. Rouquie"è.D, Tournaire-Roux IC, Szponarski W, Rossignol M, Doumas.P. Cloning of the V-ATPase subunit G in plant: functional expression and sub-cellular localization. *FEBS Letters* 1998; **437**: 287-292.
5. Finbow ME, HARRISON AM. The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochemistry J* 1997; **324** : 697-712 .
6. Quivey RG, Kuhnert1 W L . Genetic and biochemical characterization of the F-ATPase operon from *Streptococcus sanguis*. *J. Bacteriology* 2003;**185**:1525–1533.
7. Chaban Y L, Coskun U, Keegstra W , Oostergetel G T, Boekema E J, Gru" ber G. Structural characterization of an ATPase active F1-/V1-ATPase ($\alpha\beta\beta\text{3EG}$) hybrid complex. *J. Biol Chem* 2004; **279** :47866–47870.
8. Sambade M, Alba M, Smardon A M, West R W, Kane P M . A genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants *genetics* 2005; **170**:1539-1551.
9. Nelson N, Harvey W. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiology reviews* 1999; **79**: 361-385.
10. Rezaie S, KhodadadiV, Noorbakhsh F, Safari MR . Molecular characterization of subunit G of the vacuolarATPase in pathogen Dermatophyte *Trichophyton rubrumIranian*. *J Publ Health* ; 2005;**35**:33-37 30).
11. Collier L, *Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed. London: Arnold, 1998; PP: 215-236.
12. Weitzman I C, Summerbell R. The Dermatophytes. *C Microb Revie* 1995;**8**:240–259.
13. Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek C, Brna C, Tschachler E . Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2000; **241**:27-33.
14. Baron S, Livingston C. Associate editor, Paula M. Jennings. *Medical microbiology* . 4th ed . University of Texas medical branch. 1996; PP: 910-911.
15. Jawetz.E , Adelberg E, Melnic J : *medical Microbiology* .24th ed. USA; MacGraw Hill . 2004; PP: 630-634.
16. Nelson N, Nelson H, Mandiyan S. A bovine cDNA and a yeast gene (VMA8) encoding the subunit D of the vacuolar H⁺-ATPase. *Proc Nat l Aca Sci USA* 1995; **92** :497-501.
17. Dietza K , Tavakolia N, Eckerskornb C, Gollmacka D. Subunit C of the vacuolar H⁺-ATPase of *Hordeum vulgare*. *FEBS Letters* 1999; **456** :68-72.
18. Xiongfong C, Menchi C, Baiyang W, Ray W. Cloning of a Ca²⁺-ATPase gene and the role of cytosolic Ca²⁺ in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant.J* 1997; **11** ;363-371.
19. Kimura M, Yamaguchi Y, Takada S, Tanabe.K. Cloning of a Ca²⁺ -ATPase gene of *Plasmodium falciparum* and comparison with vertebrate Ca²⁺ -ATPases. *J. Cell Science* 1993; **104** :1129-1136.
20. Yasunami R, Iwamoto M. Ihara K, Nakamura S. Molecular cloning of A1-ATPase gene from extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica* Strain TR-1. *Oxford University press* 1999 ; **42** : 75-76
21. Nara T, Iizumi K, Mikami Y, Hashimoto M, Hara Y, Aoki T. Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophysic Acta* 2006 ;**1758**:738–746 25.
22. Gr"af R, Novak F J S, Harvey W R , Wiczorek H . Cloning and sequencing of cDNA encoding the putative insect plasma

- membrane V-ATPase subunit A. *Febs letters* 1992; **300** :119-122.
23. Perlin DS, Soteropoulos P, Vaz T, Santangelo R P, Huang D Y, Tama's M J. Molecular characterization of the plasma membrane H1-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:2349-2355.
24. Kuroki Y, Juvvadi P R, Arioka M, Nakajima H, Kitamoto K. Cloning and characterization of *vmaA*, the gene encoding a 69-kDa catalytic subunit of the vacuolar H⁺-ATPase during alkaline pH mediated growth of *Aspergillus oryzae*. *Fems Microbiol Letters* 2002; **209** :277-282 9.
25. Watanabe Y, Shiramizu M, Tamai. Y. Molecular cloning and sequencing of plasma membrane H⁺ATPase gene from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Japan Biocheml Soc* 1991; **110**:237-240.
26. Rezaie S, Ban J, Mildner M, Poitschek C, Brna C, Tschachler E. Characterization of a cDNA clone, encoding a 70 kDa heat shock protein from the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2000; **241** : 27-33.
27. Graham.L A, Hill V, Stevens T H. Assembly of the yeast vacuolar H1-ATPase occurs in the endoplasmic reticulum and requires a Vma12p/Vma22p assembly complex. *J cell biology* 2008; **142**: 39-49.
28. Grab M, Wang H, OsterG. The mechanism of V-ATPase proton pumps. *Biophysical J* 2000; **78**:2798-2813.