تحليل تسلسل الحامض النووي لجين *tox A* المعزول من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*
DNA Sequences Analysis of *tox A* Gene Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria.

رنا مجاهد عبدالله عباس فالح الارناؤوطي
كلية التربية ابن الهيثم للعلوم الصرفة/ جامعة بغداد
Rana M. Abdullah Al-Shwaikh Abbas Falih Alornaaouti
College of Education Ibn-Al Haitham/ Baghdad University

E-mail: dr.rana_alshwaikh@yahoo.com

الملخص

تم الحصول على (75) عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* جمعت من حالات سريرية مختلفة. أظهرت النتائج وجود 54 عزلة التي تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* تمتلك الجين *tox A* وبنسبة 72% ، في حين كانت 21 عزله وبنسبة 28 % من العزلات لاتمتلك هذا الجين ، وعند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم ذات وزن جزيئي 352 زوج قاعدة حللت تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* في بكتريا *P. aeruginosa* وبينت النتائج ان هنالك طفرات وراثية في DNA لجين *tox A* حدثت هذه الطفرات في تسلسل القواعد النتروجينية وكانت اغلبها من نوع الاستبدال والاضافة وكانت نسبة التطابق 96 و 99% مع الجين الاصلي. عند تحليل نتائج الترجمه للاحماض الامينية للجين *tox A* مع نتائج الترجمة للحامض الاميني الاصلي حسب موقع NCBI وجد ان الطفرات نقطية الحاصلة في الجين غيرت في مسار ترجمة البروتين حيث تم تحول الحامض الاميني من الالانين A Alanine (Ala) الى ثريونين T Threonine (Thr) وتغيير الحامض الاميني الالانين A Alanine (Ala) الى الحامض الاميني جلوتامين Glutamine E (Glu) وتحول الحامض الاميني الالانين A Alanine (Ala) الى الحامض الاميني كلايسين G Glycine (Gly) ، وتحول الحامض الاميني ليوسين L Leucine (Leu) الى الحامض الاميني فالين V Valine (Val) وتحول الحامض الاميني ارجنين Arginine (Arg) R الى الحامض الاميني ليوسين L Leucine (Leu) .

الكلمات الدالة: *P. aeruginosa* ، جين *tox A* ، تحليل تسلسل الحمض النووي.

Abstract

75 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* was obtained from different clinical conditions. The result showed that 54 isolates which were related to *P. aeruginosa* have *tox A* gene will a ratio (72%), while 21 isolates will a ratio (28%) from the isolates didn't have this gene and when we compared the duplicated bands with a suitable DNA marker, the size of the gene was found to be 352 base pair. The analysis of nucleotide sequence for *tox A* genes of *P. aeruginosa* was revealed there was some mutations in the DNA of this gene occurred in the nitrogen base sequence which almost included substitution type and insertion. The percentage of identities 96 and 99 % with the original gene. DNA sequencing analysis of amino acid translation of *tox A* genes revealed that most isolates display different point mutation as compared with NCBI data. Point mutation was detection in *P. aeruginosa tox A* causes conversion of Alanine to Threonine, Alanine to Glutamine, Alanine to Glycine, Leucine to Valine and Arginine to Leucine.

Key word: *Pseudomonas aeruginosa* , *tox A* gene, Sequencing.

المقدمة

تعد بكتريا *P. aeruginosa* من انواع البكتريا التي تسبب العديد من الامراض السريرية التي تنتقل عبر المستشفيات وتصيب الاشخاص المصابين بالايدز AIDS المتسبب عن فايروس HIV والمرضى المصابين بالسرطان Cancer والاشخاص الذين يعانون من نقص المناعة Immune compromised وتنتقل خلال اجراء العمليات الجراحية وعند حالة التسمم الدوائي Cytotoxic drugs وتسبب التهابات الجروح wound والحروق Burn والتهابات المجاري البولية Urinary tract infection والتهاب الرئة Pulmonary tract infection والتليف الحويصلي Cystic fibrosis والاشخاص المرضى المتواجدين في وحده العناية المركزة Intensive Care Unite ؛ ذات الرئة Pneumonia اضافة الى الامراض المزمنة الاخرى [2,1] . وتزداد نسبة الوفيات عند الاشخاص المصابين بذات الرئة وخاصة حالات التنفس الاصطناعي حيث تعمل البكتريا على التنخر السريع في الرئة وتسبب البكتريا التهاب الرئة الحاد وتنتقل الى الدم مسببه تعفن الدم ثم تؤدي الى الموت [3] . تتواجد البكتريا في التربه والبيئة المحيطة للانسان اضافة الى تواجدها في البيئة المائية والسطوح والمرافق الطبية وتكون عدوى هذه البكتريا عن طريق المستشفيات وتكون من اكثر انواع البكتريا التي تسبب التهابات المجاري التنفسية الحاده والمزمنة والالتهابات الرئوية [4] . وتتميز هذه البكتريا بمقاومتها العالية والمتعدده للمضادات الحيوية اضافة الى امتلاكها للعديد من الانزيمات والسموم اضافة الى تكوينها لطبقة الغشاء الحياتي Biofilm formation الذي يعد من عوامل الفوعة يساهم في تعزيز امراضية البكتريا [5]. تمتلك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة ومنها انزيم elastases (*Las A* , *Las B*) و Alkaline protease و Pyocyanine و Rhamnolipide [2] وتمتلك انزيم Phospholipases C و Alginale و Exotoxine A والذي يشفر من قبل الجين *tox A* [6].

ان انزيم Exotoxin A (Exo A , tox A) ذو وزن جزيئي 66 كيلو دالتون يكون ذو طبيعة بروتينة وبفعالية عالية ويعد من عوامل الضراوة الرئيسية لبكتريا *P. aeruginosa* مشابهه للسموم المنتجة من قبل بكتريا *Corynebacterium diphtheriae* وان حقن Exo A المضعف كلقاح في الحيوانات المختبرية تنتج لديها مناعة ضد سمية Antitoxin وعند حقن السم toxin المنقى في الحيوانات المختبرية يسبب تلف في الكبد Leucopaenia hepatica تنخر Necrosis، انخفاظ ضغط الدم Hypotension و الصدمة Shock وتخريب الكولاجين Collagen disruption ويحصل قتل لكل من خلايا Epithelial cell , Endothelial ويوثر هذا الانزيم على تنخر الانسجة Tissue necrosis [8,7].

جاءت اهداف البحث للتحري عن انواع الطفرات الوراثية الحاصله في جين *tox A* المعزول من بكتريا *P. aeruginosa* وتاثير هذه الطفرات على ترجمة البروتين.

المواد وطرائق العمل

عزل البكتريا

جمعت (75) عزلة من حالات مرضية مختلفة (الجروح ؛ الحروق ؛ التهاب المجاري البولية ؛ التهاب الاذن الوسطى ؛ عينات الدم) للفترة من 1/9/ 2014 لغاية 30/11/ 2014 ومن عدة مستشفيات في بغداد (مستشفى الطفل المركزي ؛ مستشفى مدينة الامامين الكاظمين الطبية ؛ مستشفى ابن البلدي ؛ مستشفى الصدر؛ مستشفى الحروق والمختبرات التعليمية / مدينه الطب).

تشخيص العزلات:

شخصت العزلات باستعمال الطرائق الزرعية التشخيصية وذلك باستخدام الاوساط الزرعية MacConkey agar و Blood agar و Citrimide agar و Pseudomonas agar واستعملت الفحوصات البايوكيميائية مثل Oxidase و Catalase وكما تم التاكد من الفحوصات البكتيريولوجي باستعمال API 20 E للتشخيص النهائي [9].

عزل DNA

تم استعمال عدة خاصة لاستخلاص DNA من عزلات البكتريا وحسب تعليمات الشركة المصنعه (Geneaid Biotech kit system , UK).

الكشف عن جين *tox A*

-حضر محلول بتركيز 10 بيكومول/ مايكروليتر (وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من محلول البادئ الخزين Stock واضافة له 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني) وحفظ مع المحاليل الخزينة Stock للبوادئ في درجة الحرارة – 20 م° مع مراعاة مزج محلول البادئ بعد اخراجه من الثلج بأستعمال المازج Vortex (Griffin England) لمجانسته قبل الأستخدام . وباستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبالظروف التفاعلية الموضحة في جدول رقم (1) [10].

جدول (1) : البادئ المستعمل في هذه الدراسة والظروف التفاعلية المستعملة في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

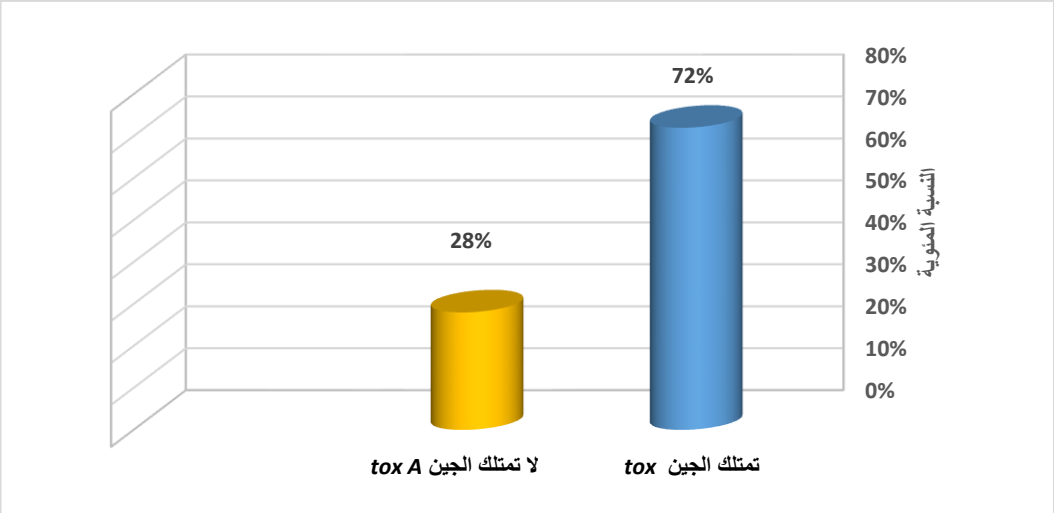
primer	Primer sequence 5 ⟶ 3	Product size (bp)	PCR condition For 30 cycles
tox A F	GGTAACCAGCTCAGCCACAT		94 °C 3min
tox A R	TGATGTCCAGGTCATGCTTC	352	94 °C 30sec
			55 °C 1min
			72 °C 1min
			72 °C 5 min

فصلت نتواتج التفاعل باستخدام الاكاروز Bio Basic INC (Canada) بتركيز 1% الحاوي على 5 مايكروليتر من صبغة Eithidium bromide Bio Basic INC (Canada) وباستعمال DNA ladder (100) زوج قاعده وبفرق جهد 75 فولت لمدة ساعة وتم التصوير باستخدام UV light Optima(Japan) [11].

تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* (Sequencing of *tox A* genes):- تم ارسال عينات DNA لجين *tox A* مع ال Primer F , Primer R الى شركة NICEM الامريكية تم قراءة النتائج حسب برنامج BLAST (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool) المتوفر على موقع NCBI (National Center for Biotechnology Information) لتحديد عدد النيوكليوتيدات ولمعرفة عدد ونوع الطفرات .

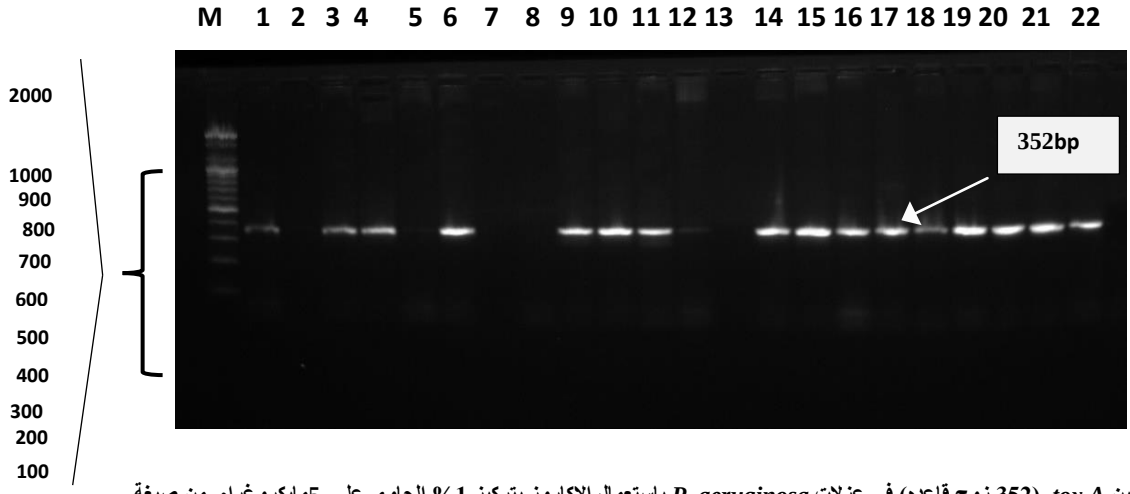
النتائج والمناقشة

تم الحصول على (75) عزلة تعود الى بكتريا *P. aeruginosa* من حالات سريرية مختلفة أظهرت نتائج الPCR وجود 54 عزلة التي تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* تمتلك الجين *tox* A وبنسبة 72% كما موضح في شكل (1)، في حين كانت 21 عزله وبنسبة 28% من العزلات التي لاتمتلك هذا الجين.



شكل (1): النسبة المئوية لامتلاك بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لجين *tox A* باستخدام تقنية PCR.

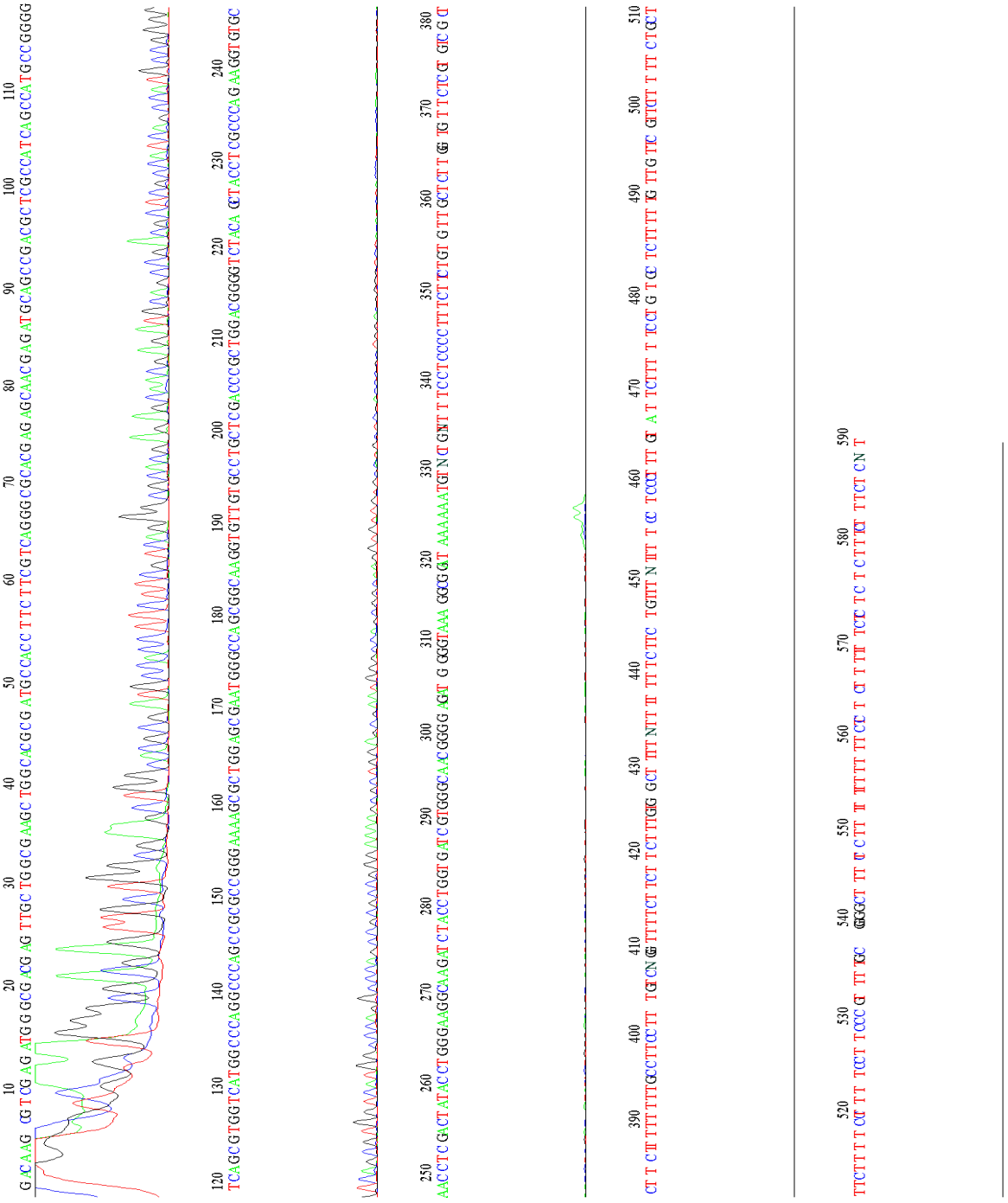
وعند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي قدره 352 زوج قاعدة كما في الشكل (2). واتفقت النتائج مع Garallah [12] التي بينت ان 73 % من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات التليف الحويصلي وحالات مرضيه اخرى والتي شملت الجروح والتهاب الاذن والادرار والدم والقشع وغسيل الرئه تمتلك هذا الجين *tox A* . اوضحت الدراسات Taee وجماعته و Xing وجماعته ان 81.5 % من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات الحروق ومرض التليف الحويصلي تمتلك جين *tox A* وان هذا الجين يشفر للسموم من نوع Exotoxin A والذي يتميز بسميته العالية وكذلك له دور في تنخر الانسجة في موقع الاصابة [13،14] . وبين Nikbin وجماعته [1] ان 90% من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزوله من حالات الحروق كانت تمتلك جين *tox A* . وان امتلاك هذا الجين والذي يشفرعن انتاج Exotoxin A والذي يعد ثاني عامل ضراوة للبكتريا اذ يعمل على تحطيم الانسجة Tissue damage وانخفاض في نشاط الالتهام Decreased phagocytic activity خاصة عند الاشخاص المصابين بالحروق [15].



شكل (2): جين *tox A* (352 زوج قاعده) في عزلات *P. aeruginosa* باستعمال الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على 5مايكروغرام من صبغة Eithidium bromide وباستعمال DNA ladder (M) (100bp-2000bp) وبفرق جهد 75 فولت لمدة ساعة.
Marker:M ؛ السيطرة : C ؛ 1 -22 العزلات.

حللت تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* في بكتريا *P. aeruginosa* باستعمال برنامج BLAST وبالمقارنة مع العزلة *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ID:NC002516.21) وبينت النتائج ان هنالك طفرات وراثية في DNA لجين *tox A* لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التهابات الاذن الوسطى المزمن حدثت هذه الطفرات في تسلسل القواعد النتروجينية وكانت اغلبها من نوع الاستبدال والاضافة ، حيث بينت نتائج التحليل للعزلة A1F حصول استبدال القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة الادنين Adenine في الموقع 1241988 للثمالة Sbjct 1242022 واستبدلت القاعده النتروجينية الادنين Adenine بالكوانين Guanine في الموقع 1241805 عند الثماله Sbjct 1241842 واستبدلت السايتوسين Cytosine بالادنين Adenine في الموقع 1241792عند الثماله Sbjct 1241842.في حين استبدلت القاعدة النتروجينية السايتوسين Cytosine بالقاعدة الكوانين Guanineفي الموقع 1241787 والموقع 1241789 على التوالي، واستبدلت الكوانين Guanine بالثايمين Thymine في الموقع 1241788 في الثمالة Sbjct 1241842. وتم استبدال القاعده النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعده النتروجينية الثايمين Thymine بالموقع 1241774 للثماله

Sbjct 1241782 وحصل استبدال للكوانين Guanine بالثايمين Thymine واستبدال السايتوسين Cytosine بالادنين Adenine واستبدال السايتوسين Cytosine بالثايمين Thymine واستبدال السايتوسين Cytosine بالكوانينGuanine بالمواقع 1241749 ، 1241744 ، 1241740 ، 1241739 للتمالة Sbjct 1241782 وكانت نسبة التطابق مع الجين الاصلي في بيانات NCBI 96 %. كما في الشكل (3 أ وب). وعند تحليل نتائج الترجمه للاحماض الامينية للجين *tox A* مع نتائج الترجمة للحامض الاميني الاصلي وجد ان هنالك تاثير للطفرات الحاصلة في الجين على ترجمه الاحماض الامينية حيث حصل تغيير في مسار ترجمة البروتين حيث تم تحول الحامض الاميني من الالانين Alanine (Ala) A الى ثريونينThreonine (Thr) T وتغيير الحامض الاميني الالانين Alanine (Ala) A الى الحامض الاميني جلوتامين Glutamine (Glu) E وتحول الحامض الاميني الالانينAlanine (Ala) A الى الحامض الاميني الكلايسين Glycine (Gly) G، وتحول الحامض الاميني ليوسين Leucine (Leu) L الى الحامض الاميني فالين Valine (Val) V وتحول الحامض الاميني ارجنين Arginine (Arg) R الى الحامض الاميني ليوسين Leucine (Leu) L كما موضح بالشكل (4) وجدول (2). واتفقت النتائج مع Garallah عام 2015 [12] التي بينت حدوث طفرة نقطية في الجين *tox A* لعزلة بكتريا *P.aeruginosa* المسببه للتليف الحويصلي حيث حولت القاعدة النتروجينية الكوانين الى الادنين محدثة تحول في الحامض الاميني الارجنين الى هستدين وحصلت طفرة اخرى حولت القاعدة النتروجينية الادنين الى الكوانين مسبب تحول الحامض الاميني الثريونين الى اللنين وقد يفسر ذلك سبب الضراوة العالية لبعض العزلات. وبين Galland وجماعته عام 2000 [16] ان جميع عزلات البكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من حالات للتليف الحويصلي CF حصل فيها طفرات نقطية Point Mutation للجين *tox A* وغيرت في ترجمه البروتين اذ تغيرت الاحماض الامينية السيرين Ser 515 الى الكلاسين Gly Glycine والسيرين Ser 410 الى اسبارتين Asn والالالنين Alanine (Ala 476) الى جلوتامينGlutamine (Glu) هذه الطفرات الحاصلة يمكن ان تسبب التهابات الرئة المزمنة CF الناتج عن بكتريا *P. aeruginosa* . وبينت Garallahعام 2015 [12] ان هنالك طفرات نقطية Point Mutation حصلت للجين *tox A* المعزول من بكتريا *P. aeruginosa* والمعزوله من حالات التهاب المجاري البولية UTI والدم Blood وحالات غسيل الرئه Bronchial wash وقد حصلت طفرات غيرت القاعده النتروجينية الكوانين G الى القاعدة النتروجينية ادنين A والذي ادى الى تغيير في ترجمة البروتين اذ تم تغيير الحامض الاميني ثريونين Threonine الى الالانين Alanine وقد تكون هذه الطفرات سببا في الضراوة العالية للعزلات اكثر من غيرها.



شكل (3 أ): نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* لبكتريا *P. aeruginosa* 1.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
475 bits(257)	4e-131	279/290(96%)	0/290(0%)	Plus/Minus

Features:
exotoxin A1

```
Query  9        TCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCACGCGATGCCACCTTCTTCGTCAGGG  68
                |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1242022  TCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCCACCTTCTTCGTCAGGG  1241963

Query  69       CGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAGCGTGG  128
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241962  CGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAGCGTGG  1241903

Query  129      TCATGGCCCAGGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGG  188
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241902  TCATGGCCCAGGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGG  1241843

Query  189      TGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAGCTACCTCGCCCAGAAGGTGTGCA  248
                |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| ||   ||||
Sbjct  1241842  TGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAACTACCTCGCCCAGCAGCGCTGCA  1241783

Query  249      ACCTCGACTATACCTGGGAAGGCAAGATCTACCTGGTGATCGTGGGCAAC  298
                |||||||| ||||||||||||||||||||| |||| |||  ||||||
Sbjct  1241782  ACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAAC  1241733
```

شكل (3 ب): نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* لبكتريا (Sequencing of *tox A* genes) 1 *P. aeruginosa* مقارنة مع الجين الاصلي (ID:NC002516.21) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

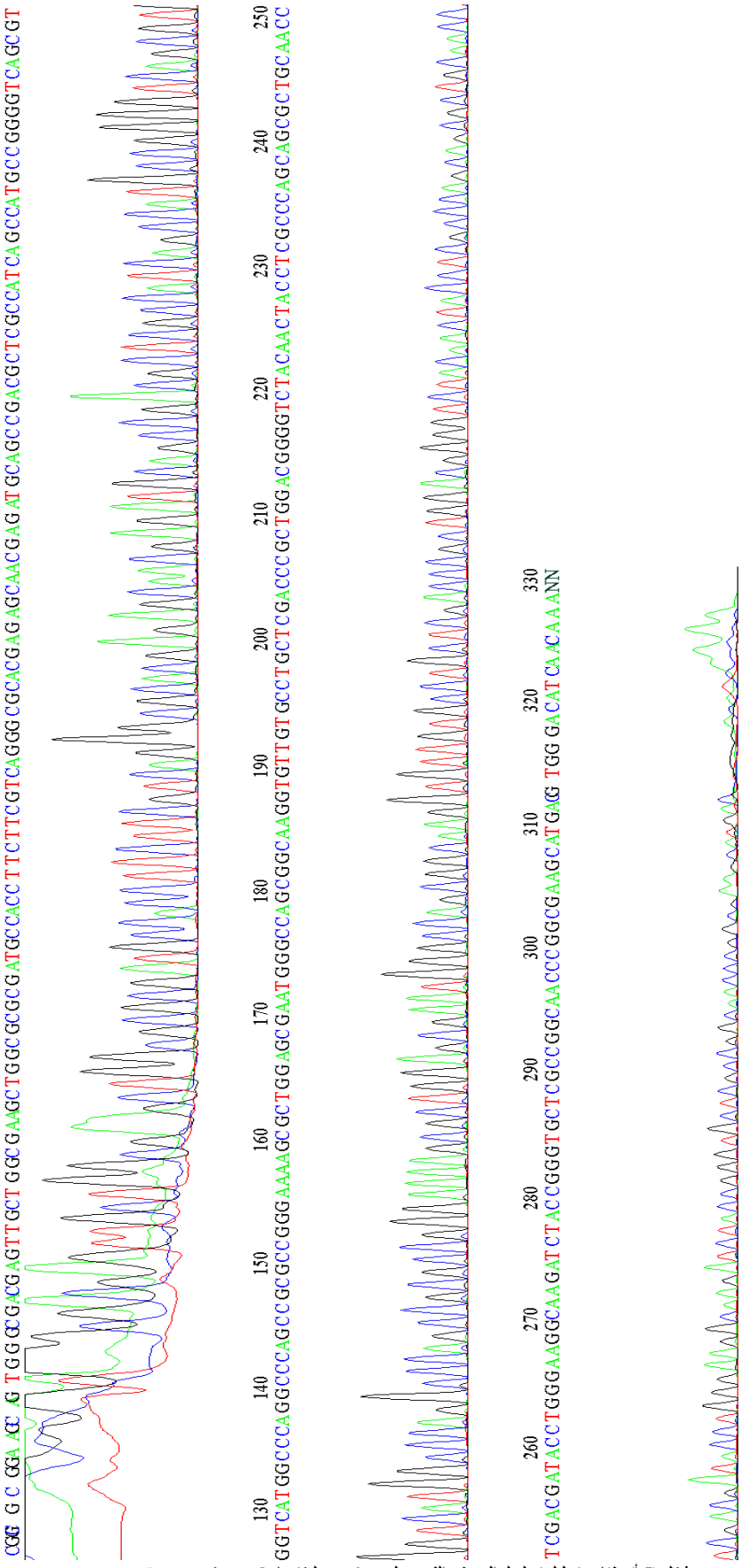
Query1:EAGTRCHLLRQGAREQRDAADARHQPCRGQRGHGPGPAAPGKALERMG
QRQGVVPARPAGRGLQLPRPEGVQPRLYLGX
Subject1:EAGARCHLLRQGAREQRDAADARHQPCRGQRGHGPGPAAPGKALER
MGQRQGVVPARPAGRGLQLPRPAALQPRRYLGX

شكل (4): نتائج تحليل ترجمة الاحماض الامينية لجين *tox A* لبكتريا 1 *P. aeruginosa* مقارنة مع الحامض الاميني الاصلي.

جدول (2): الطفرات الوراثية الحاصلةفي القواعد النيتروجينية وتأثيرها على ترجمة الحامض الاميني

القواعد النتروجينية	التغيير الحاصل في القواعد النتروجينية	الموقع	عند الثماله	الحامض الاميني	التغيير الحاصل في الاحامض الامينية
الادنين Adenine	الكوانين Guanine	1241805	1241842	الالانينAlanine	ثريونينThreonine
السايتوسين Cytosine	الادنين Adenine	1241792	1241842	الالانينAlanine	جلوتامين Glutamine
السايتوسين Cytosine	الكوانين Guanine	1241787	1241842	الالانينAlanine	الكلايسين Glycine
السايتوسين Cytosine	الكوانين Guanine	1241789	1241842	ليوسين Leucine	فالين Valine
الكوانين Guanine	الثايمين Thymine	1241788	1241842		
الكوانين Guanine	الثايمين Thymine	1241774	1241782	ارجنينArginine	ليوسين Leucine

وعند تحليل النتائج للعزله A2F فقد حصل اضافة القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine في الموقع 1241714 للثماله Sujct 1241716 وكانت نسبة التطابق مع الجين الاصلي في بيانات NCBI 99 %. كما في الشكل (5أ و ب). وعند اجراء تحليل لترجمة البروتين مقارنة مع ترجمة الحامض الاميني الاصلي لم تؤثر الطفرة على ترجمه البروتين. وبينت الدراسات ان انواع طفرات الاضافة Insertion (المقتحمة او الحشر) وطفرات الحذف Deletion هي من انواع الطفرات التي يطلق عليها طفرات الازاحة Frameshift mutation قد لاتؤثر في وظيفة وترجمة البروتين [17] .



شكل (5 أ): نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* لبكتريا *P. aeruginosa* 2.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
562 bits(304)	2e-157	309/311(99%)	1/311(0%)	Plus/Minus

Features:

exotoxin A2

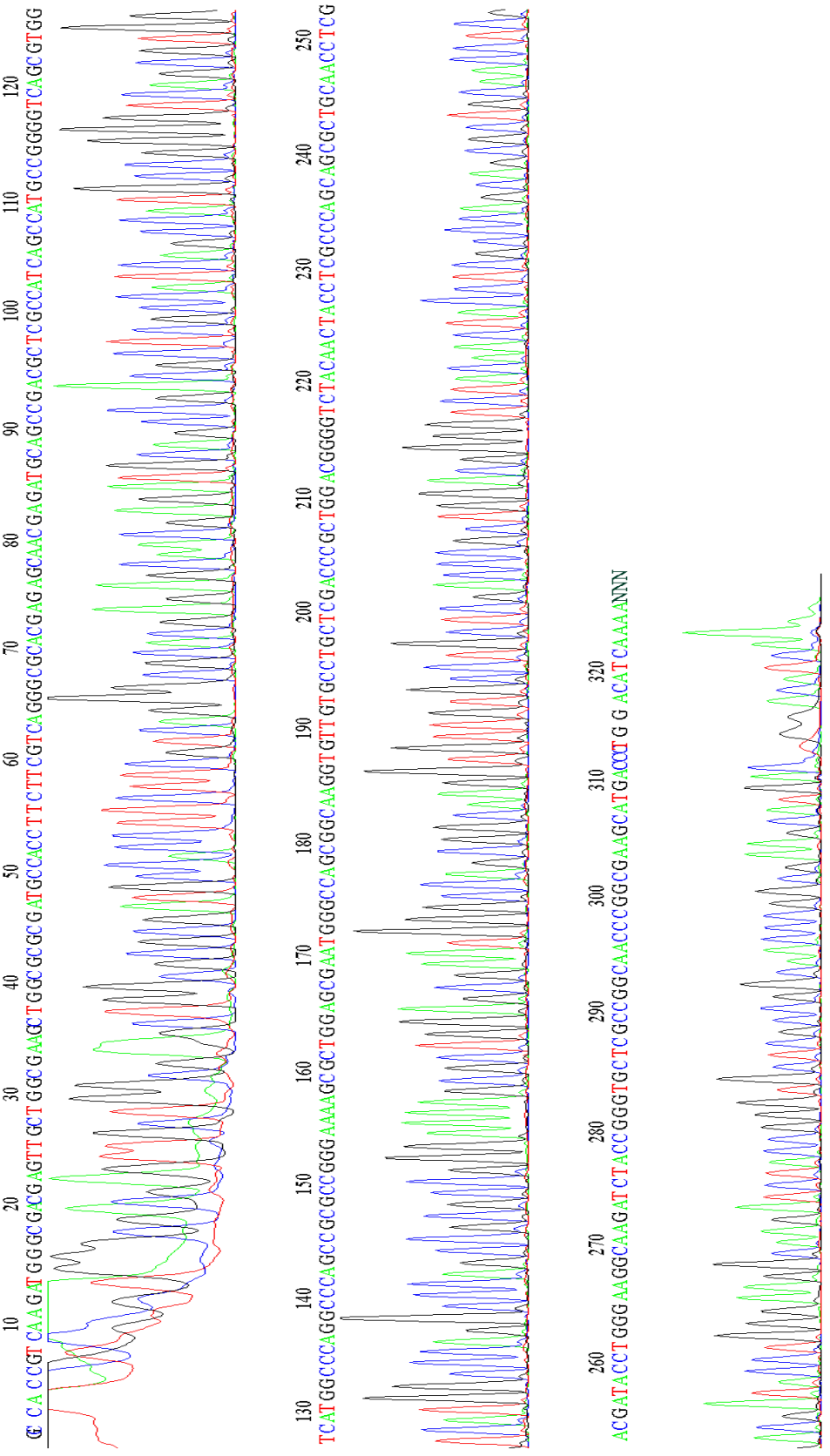
```
Query  15       TGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCCACCTTCTTCGTCAGGGCGCACG  74
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1242016  TGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCCACCTTCTTCGTCAGGGCGCACG  1241957

Query  75       AGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAGCGTGGTCATGG  134
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241956  AGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAGCGTGGTCATGG  1241897

Query  135      CCCAGGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGGTGTTGT  194
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241896  CCCAGGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGCCAGCGGCAAGGTGTTGT  1241837

Query  195      GCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAACTACCTCGCCCAGCAGCGCTGCAACCTCG  254
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241836  GCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAACTACCTCGCCCAGCAGCGCTGCAACCTCG  1241777

Query  255      ACGATACCTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACG  314
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241776  ACGATACCTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACC  1241717

Query  315      TGGGACATCAA  325
                ||| |||||||
Sbjct  1241716  TGG-ACATCAA  1241707
```

شكل (5 ب): نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* (Sequencing of *tox A* genes) لبكتريا *P. aeruginosa* 2 مقارنة مع الجين الاصلي (ID:NC002516.21) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

اما عند تحليل النتائج للعزله A3F استبدلت القاعده النتروجينية الكوانين Guanine الى القاعده النتروجينية Adenine واستبدال Adenine بالقاعدة Guanine في الموقع 1242020 وفي الموقع 12422023 للثماله Sujct 1242027. وتم اضافة السايتوسين Cytosine في الموقع 1241717 للثماله Sujct 1241727 . وكانت نسبة التطابق مع الجين الاصلي في بيانات NCBI 99 % كما في الشكل (6 أ وب). وبينت نتائج تحليل الطفرات ان جميع الطفرات التي وجدت كانت من نوع الطفرات الصامته Silent mutation وهي تنتج نفس الحامض الاميني حيث عند اجراء ترجمة للحامض الاميني لهذا الجين مقارنة مع ترجمة الحامض الاميني الاصلي وجد ان هذه الطفرات لم تؤثر على ترجمة البروتين. وبينت العديد من الدراسات ان انواع الطفرات الاضافة Insertion وطفرات الحذف (Deletion) الناتجة من اضافة او ازاله نيوكليوتيده واحدة او اكثر لشريط ال DNA قد لاتؤثر على ترجمة و وظيفة البروتين [17].

الاستنتاجات

وجد في هذه الدراسة ان اغلب الطفرات التي وجدت كانت من نوع الطفرات الصامته Silent mutation وهي تنتج الحامض الاميني نفسه وان هذه الطفرات لم تؤثر على ترجمة البروتين في حين كانت هنالك طفرات قليله غيرت في ترجمه الحامض الاميني.



شكل (6 أ): نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* لبكتريا *P. aeruginosa* 3.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
577 bits(312)	6e-162	319/322(99%)	1/322(0%)	Plus/Minus

Features:

exotoxin A3

```
Query  3        CACCGTCAAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCCACCTTCTTCGT  62
               |||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1242027  CACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCGAAGCTGGCGCGCGATGCCACCTTCTTCGT  1241968

Query  63       CAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAG  122
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241967  CAGGGCGCACGAGAGCAACGAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAG  1241908

Query  123      CGTGGTCATGGCCCAGGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGCCAGCGG  182
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241907  CGTGGTCATGGCCCAGGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGCCAGCGG  1241848

Query  183      CAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAACTACCTCGCCCAGCAGCG  242
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241847  CAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAACTACCTCGCCCAGCAGCG  1241788

Query  243      CTGCAACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGC  302
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1241787  CTGCAACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAAGATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGC  1241728

Query  303      GAAGCATGACCCTGGACATCaa  324
               |||||||||| ||||||||||
Sbjct  1241727  GAAGCATGACC-TGGACATCAA  1241707
```

شكل (6 ب): نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *tox A* لبكتريا *P. aeruginosa* 3 (Sequencing of *tox A* genes) مقارنة مع الجين الاصلي (ID:NC002516.21) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

References

1. Nikbin, V.S., Aslani, M.M., Sharafi, Z., Hashemipour, M., Shahcheraghi, F., and Ebrahimipour, G. H. (2012). Molecular Identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. Iranian Journal of Microbiology. 4(3):118-123.
2. Senturk, S., Ulusoy, S., Bosgeimez- Tinaz, G., and Yagci, A. (2012). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection. Journal Infection Dev. Ctries: 6 (6): 501-507.
3. Sawa, T. (2014). The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. Journal of Intensive Care. 2014. 2:1:1-11.
4. Gellatly, S.L., and Hancock, R.E.W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host Defenses. Pathogens and Disease. 67: 159–173.

5. Finlayson, E.A., and Brown, P.D. (2011). Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. West Indian Medical Journal. 60 (1): 24-32.

6. Wolska, K., and Szweda, P. (2009). Genetic Features of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. Polish journal of Microbiology. 58(3): 255-260.

7. Al-Daraghi, W.A., and Abdullah, Z. H. (2013). Detection of Exotoxin A gene in *Pseudomonas aeruginosa* from Clinical and Environmental samples. Journal of Al-Nahrain University. 16(2): 167-172.

8. Holban, A., Chifiriue, M. C., Cotar, A. I., Bleotu, C., Grumezescu, A. M., Banu, O., and Lazar, V. (2013). Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital-acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. Romanian Biotechnological Letters. 18(6): 8843-8854.

9. Baron, E. J., Finegold, S.M., and Peterson, I. L. R. (2007). Bailey and Scott‹s Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri.

10. Lanotte, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegar-Lari, A., Goudeau, A., and Quentin, R. (2004). Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from others origins. J. Medical Microbiology. 53: 73-81.

11. Sambrook, J., and Rusell, D. W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring Harbor, NY: cold spring Harbor Laboratory press.

12. Garallah, E.T. (2015). Molecular analysis of some virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis sources. Thesis. University of Mustansiriya, College of Science.

13. Taee, S.R., Khansarinejad, B., Abtahi, H., Najafimosleh, M., and Ghaznavi-Rad, E. (2014). Detection of *alg D, opr L and exo a* genes by new specific primers as an efficient, rapid and accurate procedure for direct diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* strains in clinical samples. *Jundishapur* J. Microbiol. 7(10): 1-10.

14. Xing, D., Youle, R., Fitzgerald, D., and Pastan, I. (2010). *Pseudomonas* exotoxin a mediated apoptosis is bak dependent and proceeded by the degradation of Mci-1. J. PMC. 1: 1-9.

15. Hossein, H.M., Mehdi, R.M., Masoumeh, A., Gholamreza, A., and Masoud, D. M. (2015). Molecular Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Patients in Burn Ward, ICU, CCU and ITU in a Number of Hospitals Spitals in Kerman Province. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences.5 (S2). 1428-1431.

16. Galland, C., Raivio, T., Olson, J., Donald, E., and Douglas, G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP- ribosyltransferase activity and cytotoxicity. Microbiology. 146: 1891-1899.

17. Lmhof, M., and Schlotterer, C. (2001). Fitness effects of advantageous mutation in evolving *Escherichia coli* populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.98 (3).1112-1128.