

التسلسل التتابعي لجين *LasB* في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض الحالات السريرية

رنا مجاهد عبدالله الشويخ

قسم علوم الحياة / كلية التربية ابن الهيثم للعلوم الصرفة/ جامعة بغداد

استلم في: 11 تشرين الأول 2015 قبل في 15 كانون الأول 2015

الخلاصة

حصل على 75 عزلة تعود الى بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل 120 عينة جمعت من حالات مرضية مختلفة. أظهرت نتائج التحري عن جين الضراوة لانزيم Elastase (Pseudolysin) *LasB* في بكتيريا *P. aeruginosa* الى وجود هذا الجين في 63 عزلة وبنسبة 84% وكان الحجم الجزيئي للجين 300 زوج قاعدة بعد ترحيله كهربائياً. حلل التسلسل التتابعي لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa*. بينت النتائج ان هنالك طفرات وراثية في دنا الجين *LasB*، حدثت هذه الطفرات في تسلسل القواعد النتروجينية وكان اغلبها من نوع الاستبدال والاضافة والحذف وكانت نسبة التطابق 97% مع التسلسل التتابعي للجين الاصلي، كذلك تبين من مطابقة التسلسل التتابعي للقواعد النتروجينية المترجمة مع تسلسل الحامض الاميني الذي يشفر عن هذا الجين، لم يكن للطفرات تأثير في نتائج ترجمة البروتين وذلك لكونها طفرات صامتة.

الكلمات المفتاحية:- *P. aeruginosa*، جين *LasB*، التسلسل التتابعي لجين *LasB*.

المقدمة

تعد بكتريا *P. aeruginosa* من انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام وهي من الانواع البكتيرية السريرية الانتهازية Relevant opportunistic ، تتميز هذه البكتريا بمقاومتها العالية والمتعدده للمضادات الحيوية المختلفة Multidrug resistant (MDR) [1] تنتشر البكتريا في البيئة وتسبب العديد من الامراض والالتهابات لانواع من الكائنات ومنها اللبائن Mammals والحشرات Insects والديدان Nematodes والنباتات Plants ، تسبب العديد من الاصابات للانسان منها التهاب العيون Keratitis والتهاب القرنية Corneal infection والتهاب ذات الرئة Pneumonia والتهابات الجروح والحروق Wound and burn infection [2] والتهابات الرئة المزمنة Chronic lung infection فضلا عن انها تؤدي الى الموت احيانا في حالات اصابة التليف الرئوي Cystic fibrosis [1] . تسبب حالات تسمم الدم Sepsis وكذلك العديد من الامراض التي تنتقل عبر المراجعة الى المستشفيات Hospital-acquired bacterial infection ، فضلا عن مقاومتها العالية للمضادات الحيوية التي تجعل علاجها صعبا فلا يمكن ايجاد علاج سريع لها وتكون انواع المضادات التي تستعمل في العلاج محدوده [4,3] ، تسبب اصابات خطيرة للاشخاص المصابين بالكبت المناعي Immunocompromised ، وتسبب الالتهابات عند نقل الاعضاء للاشخاص Organ Transplant infection [5]. ان معظم سلالات بكتريا *P. aeruginosa* تنتج سموما وانزيمات خارجية منها انزيم Phospholipases وانزيم Proteases الذي يؤدي دورا مهما في العديد من الامراض منها Corneal ulceration واصابات الحروق Burn infection والالتهاب الرئوي المزمن Chronic pulmonary colonization وتمتلك ايضا صبغات منها Pyocyanin وامتلاكها لطبقة Alginate (Exopolysaccharide) المسئول عن تكوين Mucoïd phenotype الموجودة ضمن جدار الخلية [6].

تنتج السلالات المختلفة من بكتريا *P. aeruginosa* العديد من الانزيمات المحللة للبروتين الخارجي Extracellular proteolytic enzyme التي عوامل ضراوة للبكتريا وتكون هذه الانزيمات على انواع متعدده تتضمن Protease IV و Alkaline protease (aeruginolysin) المشفر من قبل الجين *aprA* وانزيم Elastase الذي يكون على نوعين (LasA) Staphylolysin المشفر من قبل الجين *LasA* gene وانزيم Pseudolysin (LasB) المشفر من قبل الجين *LasB* gene ويكون انتاج الانزيم *LasA* واطنا في الخلايا ولكنه مهم في فعالية *LasB* ، تتطور الانزيمات المحللة للبروتين حسب نوع الاصابة بالمضيف وتتداخل مع النظام المناعي للمضيف [2,7] ويعد انزيم Elastase LasB من عوامل الضراوة لهذه البكتريا وله دور في امراضية البكتريا ، اذ يعمل على تحطيم انسجة المضيف وتعطيل التقاطعات بين الخلايا الظهارية للرئة وتدهور للجهاز المناعي وبينت دراسات عديدة ان حدوث طفرات وراثية في الجينات المشفرة لهذا الانزيم يؤثر في ضراوة البكتريا [8].

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص البكتريا :- جمعت 120 عينة من حالات مرضية مختلفة تضمنت التهابات الجروح والحروق والمجاري البولية و الاذن الوسطى وعينات الدم للمدة من 9/1/ 2014 لغاية 11/30/ 2014. ومن عدة مستشفيات في بغداد مثل مستشفى الطفل المركزي و مستشفى مدينة الامامين الكاظمين الطبية ومستشفى ابن البلدي ومستشفى الصدر ومستشفى الحروق والمختبرات التعليمية / مدينة الطب ، شخّصت العزلات البكتيرية باستعمال الاختبارات المجهرية والزربية والبايوكيميائية المعتمدة من قبل [9] كما تم تأكيد التشخيص باستعمال نظام API20E وحسب تعليمات الشركة المصنعة له.

عزل DNA :- عزل الدنا باستعمال عده خاصة في استخلاص الدنا من عزلات البكتريا والمصنعة من قبل شركة Geneaid Biotech kit system , UK وحسب النشره المرفقة مع عدة الاستخلاص .

الكشف عن جين *LasB* :- حضرت البودائ بتركيز 10 بيكومول/ مايكروليتر بعد اذابتها في الماء الخالي من النيكلوز وبعد ذلك أخذ 10 مايكروليترات من البادئ واضيف له 90 مايكروليترا من الماء الخالي من النيكلوز ومزج بوساطة الهزاز Vortex جيداً وحفظ البادئ في درجة الحرارة - 20 °م مع مراعاة مزج البادئ بعد اخراجه من الثلج باستعمال الهزاز Vortex لمجانسته قبل الاستعمال [6].

وباستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وتم التحوير بالبرنامج ليصبح بالظروف التفاعلية الموضحة في الجدول ادناه [6]

:-

primer	Primer sequence ' 5 → ' 3	Product size (bp)	PCR condition
<i>LasB</i> F	GGAATGAACGAAGCGTTCTC	300	94 °C 3min
<i>LasB</i> R	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG		94 °C 30sec 55 °C 1min 72 °C 1min 72 °C 5 min

فصلت نتواتج التفاعل باستعمال الاكاروز بتركيز 1.5 % الحاوي على 5 مايكروترات من صبغة Eithidium bromide وباستعمال DNA ladder (100 زوج قاعدة) وبفرق جهد 75 فولتا لمدة ساعة وصورت باستعمال جهاز التوثيق UV transilluminator [10].

التسلسل المتتابعي لجين *LasB* Sequencing of *LasB* genes - ارسلت عينات DNA لجين *LasB* مع البوادي F Primer , R Primer الى شركة NICEM الامريكية وباستعمال جهاز التحليل الوراثي Genetic analyser ، قرنت النتائج حسب برنامج Bioedit لتحديد عدد النيوكليوتيدات ولمعرفة الطفرات ، ومن ثم عمل ترجمة لمواقع التغيير في الاحماض الامينية [11].

النتائج والمناقشة

حصل على 75 عزلة تعود الى بكتريا *P. aeruginosa* من اصل 120 عينة جمعت من حالات مرضية مختلفة. للتحري عن جين الضراوة *LasB* في بكتيريا *P. aeruginosa* ، أظهرت النتائج وجود هذا الجين في 63 عزلة بنسبة 84% في العزلات قيد الدراسة ، كما موضح في الشكل (1) . كان الحجم الجيني للجين 300 زوج قاعدة بعد ترحيله كهربائيا كما موضح بالشكل (2) .

وكانت هذه النتائج مقارنة مع كل من [13,12] الذين بينوا ان جميع عزلات بكتريا *P. aeruginosa* كانت تمتلك الجين *LasB* وينسبة 100 % ويعد انزيم البروتيز من الانزيمات المهمة في ضراوة هذه اليكتريا الذي يعمل على تحطيم نسيج المضيف ويساعد البكتريا على اختراق الانسجة وتحطيمها وبمساعدة كل من انزيمات Hemolysin و Cytotoxin و *LasB* Elastase [14] . وجود هذا الانزيم بوثر في تكوين الغشاء الحياتي Biofilm في البكتريا ، فقد وجد في دراسة للباحث Yu وجماعته ان حصول طفرات في الجين المسؤول عن انتاج انزيم *Las B* Elastase بوثر بشكل سلبي في تكوين طبقة الغشاء الحياتي Biofilm في بكتريا *P. aeruginosa* [8] . وتوصلت الباحثة Garalla عام 2015 في دراسة محلية الى ان 30.76% فقط من عزلاتها المعزولة من حالات التليف الحوصلي كانت منتجة لانزيم *LasB* [15].

حل التسلسل المتتابعي لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa* باستعمال جهاز التحليل الوراثي وقورنت مع التسلسل المتتابعي للجين نفسه Refseq والموجود في موقع NCBI تحت الرقم (*P. aeruginosa* PAO1 ID:NC002516.21) . بينت النتائج ان هنالك طفرات وراثية في DNA لجين *LasB* لبكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من التهابات الاذن الوسطى Ear infection . حدثت هذه الطفرات في تسلسل القواعد النروجينية وكانت اغلبها من نوع الاستبدال والاضافة والحذف اذ كانت 6 طفرات للعزله الاولى و 3 طفرات للعزله الثانية و 12 طفره للعزله الثالثة ، وتم حذف القاعدة النروجينية الثايمين Thymine في الموقع 4169362 للشماله Sbjct 4169373 واستبدلت القاعدة النروجينية السايوتوسين Cytosine بالقاعدة النروجينية الثايمين Thymine في الموقع 4169304 عند الشماله Sbjct 4169313 وفي الموقع 4169263 عند الشماله Sbjct 4169253 . في حين استبدلت القاعدة النروجينية الثايمين Thymine بالقاعدة النروجينية السايوتوسين Cytosine في الموقع 4169187 في الشماله Sbjct 4169193 . واستبدلت القاعدة النروجينية الثايمين Thymine بالقاعدة النروجينية الادنين Adenine بالموقع 4169325 للشماله Sbjct 4169133 . واستبدلت القاعدة النروجينية الادنين Adenine بالموقع 4169320 للشماله Sbjct 4169133 . وكانت نسبة التطابق مع الجين الاصلي مع بيانات NCBI 97% . كما في الشكل (3) . وحذفت القاعدة النروجينية الثايمين Thymine بالموقع 4169364 للشماله Sbjct 4169371 . واستبدلت القاعدة النروجينية السايوتوسين Cytosine بالقاعدة النروجينية الادنين Adenine في الموقع 4169353 للشماله Sbjct 4169371 وبالموقع 4169344 للشماله Sbjct 4169371 وكانت نسبة التطابق مع الجين الاصلي مع بيانات NCBI 99% . كما في الشكل (4) . حذفت القاعدة النروجينية الكوانين Guanine في الموقع 4169377 للشماله Sbjct 4169381 وحذفت القاعدة النروجينية الثايمين

Thymine في الموقع 4169364 للثماله 4169381 Sbjct ؛ واستبدلت القاعدة النتروجينية الساييتوسين Cytosine بالقاعدة النتروجينية الادنين Adenine بالموقع 4169372 للثماله 4169381 Sbjct واستبدلت القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine الى القاعدة النتروجينية Adenine في الموقع 4169112 وكذلك استبدلت الساييتوسين Cytosine بالادنين Adenine بالموقع 4169110 عند الثماله 4169141 Sbjct وفي الموقع 4169062 للثماله 4169081 Sbjct . في حين استبدلت القاعدة النتروجينية الساييتوسين Cytosine بالقاعدة النتروجينية بالثايمين Thymine في الموقع 4168970 في الثماله 4169021 Sbjct . واستبدلت القاعدة النتروجينية الساييتوسين Cytosine بالقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine بالموقع 4168920 واستبدلت الثايمين Thymine بالكوانين Guanine بالموقع 4168938 للثماله 4168961 Sbjct . واستبدلت القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine بالموقع 4168938 للثماله 4168961 Sbjct . واستبدلت القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine بالموقع 4168898 للثماله 4168901 Sbjct. واضيفت القاعدة النتروجينية الكوانين Guanine بالموقع 4168892 للثماله 4168901 Sbjct ، وكانت نسبة التطابق مع الجين الاصلي في بيانات NCBI 98 % كما في الشكل (5).

وبينت دراسة الباحث Cowell وجماعته ان هنالك العديد من الطفرات الوراثية في جيني *LasA* و *LasB* المسؤول عن تكوين انزيم Protease وان هذه الطفرات قسم منها يؤثر في امراضية البكتريا ، اذ يعمل على زيادة غزو البكتريا *Invsion* للمضيف وتكون زيادة الامراضية عند حصول طفرات بنسبة 15 % في حين كان هنالك طفرات للجين نفسه ولكنها لم تحدث اية فعالية اضافية او تاثير في الخلايا [7] . وبينت العديد من الدراسات ان انواع طفرات الاضافة Insertion (المقتحمة او الحشر) الناتجة من اضافة نيوكليوتيدة واحدة او اكثر لشريط ال DNA وطفرات الحذف Deletion التي يتم ازالة نيوكليوتيدة واحدة او اكثر وكلا النوعين من هذه الطفرات يطلق عليها طفرات الازاحة Frameshift mutation قد لاتؤثر في وظيفة وترجمة البروتين [16] .

بينت نتائج تحليل الطفرات ان جميع الطفرات التي وجدت كانت من نوع الطفرات الصامتة Silent mutation التي تنتج الحامض الاميني نفسه ، وعند اجراء ترجمة للحامض الاميني لهذا الجين مقارنة مع ترجمة الحامض الاميني الاصلي وجد ان هذه الطفرات لم تؤثر في ترجمة البروتين كما موضح بالشكل (6) الذي يبين نتائج تحليل ترجمة الاحماض الامينية لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa* (العزلة الاولى) مقارنة مع الحامض الاميني الاصلي .

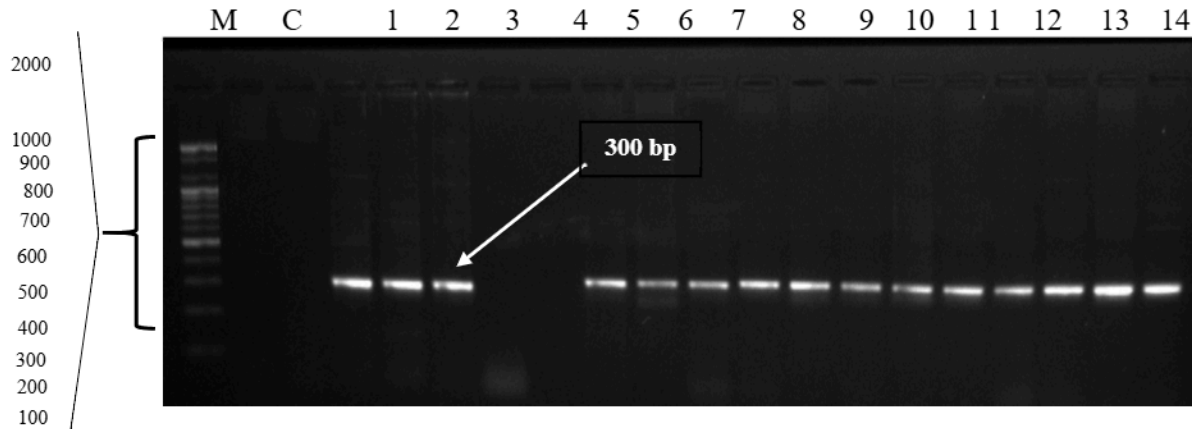
المصادر

1. Jeukens, J. ; Boyle, B. ; Bianconi, I. ; Kukavica-Ibrulj, I. ; Tümmler, B. ; Bragonzi, A. and Levesque , R.C. (2013). Complete Genome Sequence of Persistent Cystic Fibrosis Isolate *Pseudomonas aeruginosa* Strain RP73. Genome Announcements. 1 (4): e00568-13.
2. Andrejko, M; Zdybicka-Barabas, A.; Janczarek, M. and Cytryńska, M. (2013). Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. Acta Biochemical Polonica. 60(1) 83–90.
3. Overhage J.; Bains, M.; Brazas, M. D. and Hancock, R. E. W. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a Complex Adaptation Leading to Increased Production of Virulence Factors and Antibiotic Resistance. J. Bacteriol. 190(8): 2671–2679.
4. Ortiz-Severín, J.; Varas, M.; Bravo-Toncio, C. Guiliani, N. and Chávez, F. (2015). Multiple antibiotic susceptibility of polyphosphate kinase mutants (ppk1 and ppk2) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as revealed by global phenotypic analysis. Biological Res. 22-48: 1-6.
5. دلول ؛ رياض عبدالحسين و محمود ؛ الاء محمد (2015). دراسة مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لمضادات الكوينولونات. مجلة ديالى للعلوم الصرفة . 11 (2): 1-6.

6. Sonbol, F. I; Khalil, M. A. E.; Mohamed, A.B. and Ali, S.S. (2015). Correlation between antibiotic resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Turkish J. of Med. Sci. 45: 568-577.
7. Cowell , B. A.; Twining, S. S. ; Hobden, J. A.; Kwong, M. S. F. and Fleiszig, S.M. J. (2003). Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. Microbiology. 149: 2291–2299.
8. Yu, H.; He, X.; Xie, W.; Xiong, J., Sheng, H.; Guo, S.; Huang, C.; Zhang, D. and Zhang, K. (2014). Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. Can. J. Microbiol. 60: 227–235.
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. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring Harbor, NY: cold spring Harbor Laboratory press.
11. Hall, T. A. (1999). Bioedit: a user –friendly biological sequence alignment editor and analysis program windows 95/98/ N. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
12. Mitov, I. M.; Tanya, S. and Boyka, M. (2010). Prevalence of virulence gene among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Microbiol. 41(3): 588-595.
13. Cotar, A. I.; Chifiriuc, M. C.; Dinu, S.; Bucur, M.; Iordache C.; Banu, O.; Dracea, O.; Larion, C. and Lazar, V. (2010). Screening of Molecular Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Infections. Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Bucharest. Int. J. Mol. Sci. 1:5273-5291.
14. Hua, Y.; He, X.; Xie, W.; Xiong, J.; Sheng, H.; Guo, S.; Huang, C.; Zhang, D. and Zhang, K. (2014). Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. Can. J. Microbiol. 60 (4):227-235.
15. Garalla, E.T. (2015). Molecular analysis of some virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis sources. Thesis University of Mustanslriyah , College of Science.
16. 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.



شكل (1) : النسبة المئوية المنوية لامتلاك بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لجين *LasB*.



شكل (2) : الترحيل الكهربائي لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa* باستعمال 1.5 % من الاكاروز وبفرق جهد 75 فولت لمدة ساعة . Marker : M (100-2000) bp ؛ السيطرة : C ؛ العزلات : 1-17.

Query	12	GCCGAGTTCTA-ATGCGCGGCAAGAACGACTTCCTGATCGGCTACGACATCAAGAAGGGC	70
Sbjct	4169373 4169314	GCCGAGTTCTATATGCGCGGCAAGAACGACTTCCTGATCGGCTACGACATCAAGAAGGGC	
Query	71	AGCGGTGCGTTGCGCTACATGGACCAGCCAGCCGCGACGGGCGATCCATCGACAACGCC	130
Sbjct	4169313 4169254	AGCGGTGCGCTGCGCTACATGGACCAGCCAGCCGCGACGGGCGATCCATCGACAACGCC	
Query	131	TCGCAGTACTACAACGGTATCGACGTGCACCACTCCAGCGGCGTGTACAACCGTGC GTTC	190
Sbjct	4169253 4169194	TCGCAGTACTACAACGGCATCGACGTGCACCACTCCAGCGGCGTGTACAACCGTGC GTTC	
Query	191	TACCTGCTGGCCAACCTCGCCGGGCTGGGATACCCGCAAGGCCTTCGAGGTGTTCTGTCGAC	250
Sbjct	4169193 4169134	TACCTGTTGGCCAATTGCGCCGGGCTGGGATACCCGCAAGGCCTTCGAGGTGTTCTGTCGAC	
Query	251	GCCAACCGCAACAACTGGACC	272
Sbjct	4169133	GCCAACCGCTACTA-CTGGACC	4169113

شكل (3): التسلسل التتابعي لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa* (العزلة الاولى) مقارنة مع الجين الاصلي
 (ID:NC002516.21) لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* PAO10 الموجود في الموقع www.Ncbi.nlm.gov

Query	16	CGAGTTC-ATATGCGCGGAAAGAACGAATTCCTGATCGGCTACGACATCAAGAAGGGCAG	74
Sbjct	4169371	CGAGTTCATATGCGCGGCAAGAACGACTTCCTGATCGGCTACGACATCAAGAAGGGCAG	
	4169312		
Query	75	CGGTGCGCTGCGCTACATGGACCAGCCAGCCGCGACGGGCGATCCATCGACAACGCGTC	134
Sbjct	4169311	CGGTGCGCTGCGCTACATGGACCAGCCAGCCGCGACGGGCGATCCATCGACAACGCGTC	
	4169252		
Query	135	GCAGTACTACAACGGCATCGACGTGCACCACTCCAGCGGCGTGTACAACCGTGCCTTCTA	194
Sbjct	4169251	GCAGTACTACAACGGCATCGACGTGCACCACTCCAGCGGCGTGTACAACCGTGCCTTCTA	
	4169192		
Query	195	CCTGTTGGCCAATTCGCCGGGCTGGGATACCCGCAAGGCCTTCGAGGTGTTTCGTCGACGC	254
Sbjct	4169191	CCTGTTGGCCAATTCGCCGGGCTGGGATACCCGCAAGGCCTTCGAGGTGTTTCGTCGACGC	
	4169132		
Query	255	CAACCGCTACTACTGGACC	273
Sbjct	4169131	CAACCGCTACTACTGGACC	4169113

شكل (4): التسلسل التتابعي لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa* (العزلة الثانية) مقارنة مع الجين الاصلي
 (ID:NC002516.21) لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* PAO10 الموجود في الموقع www.Ncbi.nlm.gov

Query	5	GCGA-GCTGACGAGTTC-ATATGCGCGGCAAGAACGACTTCCTGATCGGCTACGACATCA	62
Sbjct	4169381	GCGAGGCTGCCGAGTTCTATATGCGCGGCAAGAACGACTTCCTGATCGGCTACGACATCA	
	4169322		
Query	63	AGAAGGGCAGCGGTGCGCTGCGCTACATGGACCAGCCCAGCCGCGACGGGCGATCCATCG	122
Sbjct	4169321	AGAAGGGCAGCGGTGCGCTGCGCTACATGGACCAGCCCAGCCGCGACGGGCGATCCATCG	
	4169262		
Query	123	ACAACGCGTCGCAGTACTACAACGGCATCGACGTGCACCACTCCAGCGGCGTGTACAACC	182
Sbjct	4169261	ACAACGCGTCGCAGTACTACAACGGCATCGACGTGCACCACTCCAGCGGCGTGTACAACC	
	4169202		
Query	183	GTGCGTTCTACCTGTTGGCCAATTCGCCGGGCTGGGATACCCGCAAGGCCTTCGAGGTGT	242
Sbjct	4169201	GTGCGTTCTACCTGTTGGCCAATTCGCCGGGCTGGGATACCCGCAAGGCCTTCGAGGTGT	
	4169142		
Query	243	TCGTCGACGCCAACCGCTACTACTGGACCACAACCAGCAACTACAACAGCGGCGCCTGCG	302
Sbjct	4169141	TCGTCGACGCCAACCGCTACTACTGGACCACAACCAGCAACTACAACAGCGGCGCCTGCG	
	4169082		
Query	303	GGGTGATTTCGCTCGGCGCAAAACCGCAACTACTCGGCGGCTGACGTACCCGGGCGTTCA	362
Sbjct	4169081	GGGTGATTTCGCTCGGCGCAGAACCGCAACTACTCGGCGGCTGACGTACCCGGGCGTTCA	
	4169022		
Query	363	GCACCGTCGGCGTGACCTGCCCGAGCGCGTTGTAAGCTCGGTGGTCCC GGCTGGCACTCC	422
Sbjct	4169021	GCACCGTCGGCGTGACCTGCCCGAGCGCGTTGTAAGCTCGGTGGTCCC GGCTGGCACTCC	
	4168962		
Query	423	AGGAAGGAATGCCGGTCGGGTCCTCAAGCCGGCTTCCGCTAGGAGGGCGGCTGCTTTA	482
Sbjct	4168961	AGGAAGGAATGCCGGTCGGGTCCTCAAGCCGGCTTCCGCTAGGAGGGCGGCTGCTTTA	
	4168902		
Query	483	TGTCCTTGGTGCCGTTGGCCTC	505
Sbjct	4168901	TGTCGCTTGG-GCCGTTGGCCTC	4168880

شكل (5): التسلسل النتابعي لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa* (العزلة الثالثة) مقارنة مع الجين الاصلي

(ID:NC002516.21) لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* PAO10 الموجود في الموقع www.Ncbi.nlm.gov

Query 1

SGALRYMDQPSRDGRSIDNASQYYNGIDVHSSGVYNRAFYLLANSPGWDTRKAFEVFVD

Subject 1

SGALRYMDQPSRDGRSIDNASQYYNGIDVHSSGVYNRAFYLLANSPGWDTRKAFEVFVD

شكل (6): نتائج تحليل ترجمة الاحماض الامينية لجين *LasB* في بكتريا *P. aeruginosa* (العزلة الاولى) مقارنة مع الحامض الاميني الاصلي.



DNA Sequences of *LasB* Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Some Clinical Cases

Rana M. A. Al-Shwaikh

*Dept. of Biology, College of Education For Pure Science Ibn-Al Haitham,
University of Baghdad

Received in :11October 2015 Accepted in :15December2015

Abstract

Out of 120 isolates from different clinical cases, only 75 were found and confirmed that they belong to the *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. The result revealed that the *LasB* virulent gene was present in 63 isolates with 63% percentage. The gel electrophoresis showed that the molecular weight of *LasB* gene was 300 bp. DNA sequences of *LasB* gene was done, and the results showed the presence of some gene mutations like substitution, addition and deletion with 97% identity with the Refseq gene. From the other side, the results of identities of translated nucleotides sequence with the original sequence of amino acids revealed that there are no effects of gene mutations on translation of the product protein.

Key word: - *Pseudomonas aeruginosa*, *LasB* gene, Sequencing.