



دراسة التعبير الجيني لجين *phzA* المسؤول عن إنتاج صبغة البايوسيانين لبكتريا *P. aeruginosa* باستخدام تقنية qPcr.

بلال علي عواد ا.د.أحمد محمد تركي

جامعة الانبار - كلية العلوم

الخلاصة:

شخصت في هذه الدراسة 66 عزلة بكتيرية تعود الى *P. aeruginosa* وبواقع 46 عزلة مرضية و 20 عزلة بيئية من اصل 207 عينة مجموعة. استخدمت طريقة أطباق المعايرة الدقيقة Microtitration plates method (MTP) للكشف عن قدرة العزلات على إنتاج صبغة Pyocyanin, إذ تباينت العزلات في إنتاج الصبغة بين منتجة بكفاءة عالية جدا ومتوسطة الكفاءة وذات كفاءة قليلة. لغرض دراسة التعبير الجيني لهذه العزلات تم استخلاص RNA لجميع العزلات وبعد ذلك تم قياس كمية التعبير الجيني بتقنية qPCR لجين *phzA* المسؤول عن إنتاج صبغة Pyocyanin للعينات المدروسة والمتمثلة ب 56 عزلة كعزلات معاملة و 10 عزلات سيطرة للجين وبطريقة الخطوة الواحدة One Step Real time-PCR وكان التعبير الجيني لجين *PhzA* ضمن المدى من 0.93 الى 2.12 وبفروقات معنوية عالية بمستوى احتمالية $(P < 0.001)$.

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/02/20
تاريخ القبول: 2017/03/23
تاريخ النشر: 2017 / 12 / 27

DOI: 10.37652/juaps.2016.135143

الكلمات المفتاحية:

المقدمة:

البايوفيردين Pyoverdine ذات لون اصفر مخضر وتتألق هذه الصبغة عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية وتنتج بكترة في الوسط الذي يكون فيه الحديد منخفضا وصبغة Pyomelanin سوداء اللون وصبغة Pyorubin ذات اللون الأحمر (2) تعد بكتريا *P. aeruginosa* مسببا مرضيا مشهورا بقدرته على مقاومة الكثير من مجاميع المضادات الحيوية شائعة الاستعمال حاليا ، إذ أدى الاستخدام الواسع للمضادات الحيوية وبشكل عشوائي في علاج الاخماج التي تسببها هذه البكتريا إلى ظهور سلالات ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، وازدادت هذه المقاومة مع مرور الزمن لذا اصبحت هذه المقاومة احدى اكبر المشاكل الشائعة (3).

ان تقنية Real-time PCR تعد من التقنيات الحديثة التي تسمح بمعدل تضخيم ال DNA والتي تقاس من خلال الكشف عن المجس او الصبغة الموسومة التي تكون الوميض المشع في كل دورة

تعد بكتريا *P. aeruginosa* من أكثر أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام مسببة للإمراض في تاريخ البشرية لأنها تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي لها أثراً في أمراضيتها، ومنها المقترن بالخلية كالاسواط Flagellam والأهداب من نوع Pili IV التي تستعملها في عملية الالتصاق على الخلايا الظهارية والاستيطان ومن ثم تكوين الغشاء الحيوي Biofilm في موضع الإصابة، بعد أن تتجمع بأعداد كبيرة، والغشاء الحيوي يحميها من دفاعات الجسم ويزيد مقاومتها للمضادات الحيوية (1). كما تنتج بكتريا *P. aeruginosa* العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين Pyocyanin التي تكون ذات لون ازرق مخضر ويمكن ملاحظة هذه الصبغات على سطح الطبق الزراعي ويشار لها بالقيح الأزرق وهي من صبغات الإصابات التقيحية الناتجة بفعل هذه البكتريا، فضلا عن وجود صبغات أخرى منها صبغة

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science .E-mail address:

الانتخابي لبكتريا الزوائف الزنجارية وكذلك زرعت على وسط الماكونكي
MacConkey agar وكذلك زرعت على اكار الدم Blood base
agar لتشخيص صفاتها المزرعية ايضا من حيث شكل ولون
المستعمرات(7), واستخدام فحوصات البايوكيميائية مثل Oxidase
و Catalase.

استخدام الأليزا في تقدير صبغة البايوسيانين :Pyocyanin Stain

حيث يتم زرع بكتريا *P. aeruginosa* في 3 مل من وسط
زرعي سائل Nutrient broth وحضنت بدرجة حرارة 35 م وبفترات
متفاوتة من (يوم وثلاثة ايام واسبوع), ثم اخذ بعد ذلك واحد مل من
العالق البكتيري وأخضع الى طرد مركزي بقوة 4000 دورة/دقيقة لمدة
10 دقائق وبعد ذلك اهمل الراسب وتم ترشيع العالق بورق ترشيع
غشائي قطر مسامتها 20 مايكروميتر ثم تم نقلها الى حفر صفيحة
الأليزا مع حفر سيطرة التي تتمثل بوسط زرعي خال من البكتريا وهنا
سوف تكون ثلاث قراءات القراءة الاولى في اليوم الاول والثانية في
اليوم الثالث والقراءة الثالثة في اليوم السابع لنفس العينات في طول
موجي 690 nm في جهاز الأليزا (8).

دراسة التعبير الجيني

عزل RNA باستخدام كاشف الاكازول Accuzol Reagent

تم استخلاص وتنقية RNA باستخدام عدة استخلاص RNA
الكلي وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Bioneer).

التعبير الجيني لانتاج صبغة Pyocyanin

تم دراسة التعبير الجيني باستخدام جين *phzA* المسؤول عن
انتاج صبغة Pyocyanin لبكتريا *P.aeruginosa* بطريقة سلسلة
تفاعلات البلمرة الانزيمي ذوالخطوة الواحدة (الخطوة - الواحدة التفاعل
التسلسلي الكمي) (Real-Time PCR (one-step RT-qPCR)
وباستعمال البادئ الخاص بالجين *phzA* الخاص بتكوين الغشاء

من دورات التفاعل(4) , والتي الغرض منها تقدير كمية DNA حيث ان
في الكشف المعتمد على صبغة SYBR Green يحدد الفحص من
خلال ارتباط الصبغة في شريطي DNA بدلا من الارتباط بشريط واحد
ويتم رصد الوميض المتكون مره واحدة لكل دورة بعد انتاج الاستطالة
لخيطي DNA ويزداد الوميض بعد كل دورة معتمدا على تركيز القالب
DNA الاولي (5), كما يمكن أن تكون البداية مع كميات ضئيلة من
الحمض النووي ونحديد المنتج النهائي بدقة مما يوفر الموارد والوقت.
هذه المزايا بالاضافة للجزيئات المرسله للوميض (fluorescence)
التي يعتمد عليها qPCR. أحدثت ثورة كاملة في تقدير كمية كل من
DNA و RNA كما انه لا يحدث تلوث لان انظمة التفاعل تكون مغلقة
كل هذه المزايا مكنت من استعمال تلك التقنية في عدة مجالات تحديد
مدى التعبير الجيني تحديد كفاءة الادوية والطب الشرعي و الطب
الحيوي و علم الأحياء الدقيقة و العلوم البيطرية والزراعة والتكنولوجيا
الحيوية وعلم السموم (6).

المواد وطرق العمل

جمع وتشخيص العزلات

جمعت (207) عينة من مرضى يعانون من مختلف الحالات
المرضية شملت أخماج الحروق والجروح والتليف الكيسي والتهاب الان
الوسطى ومن التهاب العيون, إذ تم الحصول على العينات من مختبرات
بعض المستشفيات في بغداد شملت مستشفى الطفل المركزي ومستشفى
الكندي التعليمي ومستشفى ابن البلدي للنسائية والاطفال ومستشفى
النعمان.

تم تشخيص العزلات باستخدام الطرائق الزرعية وباستعمال عدة
اوساط من خلال ملاحظة قدرتها على النمو على وسط اكار
السيدوموناس *Pseudomonas agar*, الوسط الخاص ببكتريا
Pseudomonas, وسط اكار السترمبايد Cetrimide agar والوسط

جدول (3) نسب بكتريا *P. aeruginosa* في عينات الحالات السريرية والبيئية.

ت	مصدر عذلة العينة	عدد العينات	العينات الموجبة	النسبة المئوية %
1-	الحروق	63	48	76.19%
2-	الجروح	45	33	73.33%
3-	العيون	20	14	70%
4-	الأنف	30	18	60%
5-	التليف الكيسي	9	6	66.66%
6-	التربة	20	18	90%
7-	المياه	20	16	80%
	المجموع	207	153	73.91%

أظهرت النتائج ان جميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة لها القدرة على إنتاج صبغة Pyocyanin باستعمال طريقة أطباق المعايرة الدقيقة Microtitration plates method (MTP) ونسبة 100% , كما اظهر التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية واضحة بمستوى معنوية $(P<0.01)$.

تم استخلاص RNA لجميع العزلات البكتيرية التي شخضت من الحالات المرضية والبيئية وكان مجموعها 66 عذلة شكل (1). تم الحصول على الحامض النووي RNA بتركيز ونقاوة عالية, تراوح تركيزه بين (122-198) نانوغرام امايكروليتر بينما تراوحت درجة النقاوة المقاسة بنسبة (260\ 280) بين (1.38 - 1.82).

تم قياس التعبير الجيني بتقنية qPCR لجين PhzA المسؤول عن إنتاج صبغة Pyocyanin للعينات المدروسة والمتمثلة ب 56 عذلة كعزلات معاملة و 10 عزلات سيطرة للجين. كمية التعبير الجيني الذي تم قياسه بطريقة الخطوة الواحدة One Step الذي يتم فيه تحويل RNA الى cDNA في انبوب واحد. تم قياسها بالطريقة الكمية النسبية Relative Quantification والتي يتم قياس التعبير الجيني فيها للعينة اعتمادا على عينة مرجعية تعرف بالموازنة او السيطرة control وقد تم استخدام عينات التربة كعينات طبيعية Normal flora والتي كانت اقل مقاومة للمضادات واقل ضراوة. تم قياس قيمة التعبير الجيني في كلتا

الحيوي والبادئ *gyrB* المستخدم لمعايرة النتائج كما موضح في الجدول (1)، وحسب البرنامج الذي ورد في (9) على النحو المذكور في الجدول (2).

حساب قيمة Ct

أستخدمت معادلة **Method Livak** لحساب قيمة Cycle (Ct) Threshold ومن ثم قيمة التعبير الجيني على النحو الآتي :

$$\Delta Ct(\text{treated sample}) = Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{gyrB}}$$

$$\Delta Ct(\text{control}) = Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{gyrB}}$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{treat.}) - \Delta Ct(\text{con.}).$$

$$\text{Fold}1 = 2^{-\Delta \Delta Ct}.$$

جدول (1): البوادي المستعملة في تقنية سلسلة تفاعلات البلمرة الانزيمي qPCR.

النتائج قاعدة لكل زوج (bp)	تسلسل القواعد 5'→3' Primer sequence (5'-3')	اسم البادئ
306	GCAACTGGACCAC GGAAA	phzA-F phzA-R
	CTATTCCTCAATGC ACGCAATTT	
190	GGCGTGGGTGTG GAAGTC	gyrB -F gyrB -R
	TGGTGGCGATCTT GAAGTC	

PhzA البادئ الخاص بالفضاء الحيوي, , *gyrB* البادئ المستخدم لمعايرة نتائج qPCR.

الجدول (2): النظام والدورات للتفاعل qRT-PCR.

الخطوة	درجة الحرارة °C	الفترة	عدد الدورات
Reverse Transcription	42	5 min	Hold
Enzyme inactivation	95	3 min	Hold
Denaturation	95	3 sec	40 دورة
Annealing	59	20 sec	
Extension	72	20 sec	

النتائج والمناقشة:

بعد اجراء التشخيص للعزلات البكتيرية المعزولة من حالات مرضية وبيئية تم الحصول على (66) عذلة تعود لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من اصل 207 عينة جمعت من حالات مرضية وبيئية مختلفة ويوضح الجدول (3) عدد العزلات والنسب المئوية موزع حسب الحالات المرضية والبيئية.

1.59 ثم تلاها عزلات التليف الكيسي بمعدل تعبير جيني كان 1.48 ثم عزلات الحروق التي بلغ معدل تعبيرها الجيني 1.44 اما عزلات العيون فهي الاقل تعبيراً من بين العزلات السريرية والتي كان معدل تعبيرها هو 1.29 اما العينات البيئية المتمثلة بالمياه فقد كان تعبيرها الجيني لجين *phzA* قد بلغ 1.09 وهي العزلات الاقل تعبيراً مقارنة بالعزلات السريرية جدول (5) , كما اظهر التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية عالية بمستوى احتمالية ($P < 0.001$).

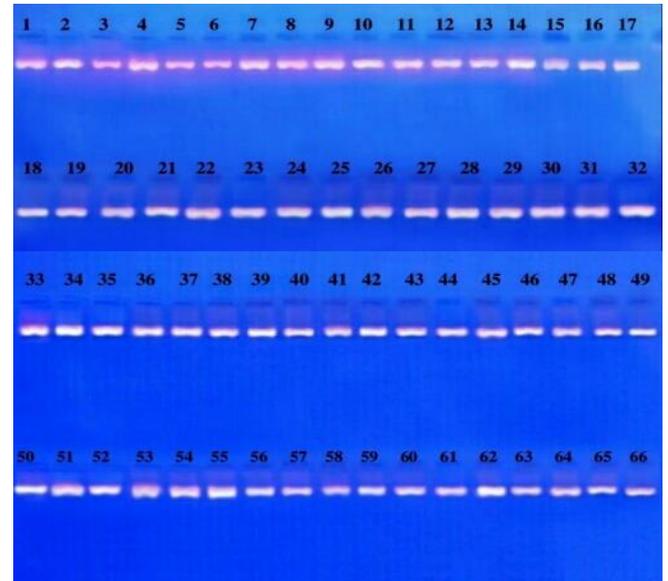
جدول (5) قيم التعبير الجيني للجين *phzA* في العزلات المدروسة.

Folding	Samples										Mean	P value
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Burns	1.26	1.2	1.5	1.1	1.4	1.5	1.4	1.8	1.4	1.9	1.44	0.001
Ear	1.95	2.03	1.92	1.97	2.06	1.89	1.92	2.08	2.1	1.9	1.98	
Eyes	1.3	1.27	1.07	1.43	1.25	1.57	1.1	1.46	1.2	1.5	1.29	
Wounds	1.44	1.32	1.64	1.38	1.51	1.93	1.21	2.12	1.91	1.55	1.59	
Water	1.1	0.96	1.3	1.15	1.12	0.93	1.19	1.0	0.98	1.2	1.09	
Cystic Fibrosis	1.55	1.29	1.45	1.5	1.64	1.42	-	-	-	-	1.48	
Mean	1.438	1.345	1.490	1.218	1.282	1.503	1.364	1.692	1.518	1.610		
P value	0.001											

P value <0.001

أظهرت نتائج العزل ان اكثر العزلات المرضية التي تم الحصول عليها كانت من الحروق والجروح وبنسبة 76.19% و 73.33% على التوالي وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة نوعاً ما مع (10) إذ وجد أن بكتريا *P.aeruginosa* كانت هي الأكثر انتشاراً في عينات أخماج الحروق والجروح المأخوذة من مستشفيات بغداد وكانت بنسبة 76%,

العينتين كذلك تم مقارنة نتائج Ct لكل عذلة مع نتائج Ct للتعبير الجيني لجين *gyrB* الذي يمثل جينات الخدمة House keeping gene لبكتريا الزوائف الزنجارية الجدول (4).



شكل (1): الترحيل الكهربائي للحامض النووي RNA المستخلص من 66 عذلة تابعة لبكتريا *P. aeruginosa* , تمثل المسار (1-10) عزلات الحروق , المسار (11-20) عزلات التهاب العيون , المسار (21-30) عزلات التهاب الانن , المسار (31-40) عزلات المياه , المسار (41-50) عزلات التربة , المسار (51-60) عزلات الجروح والمسار (61-66) عزلات التليف الكيسي.

جدول (4) قيم Ct وقيم ΔCt لجين *phzA* لعينات السيطرة.

قيم Ct وقيم ΔCt للجين <i>phzA</i> لعينات السيطرة	
<i>phzA</i>	18.99
<i>gyrB</i>	17.05
ΔCt	1.94
<i>phzA</i>	17.31
<i>gyrB</i>	15.11
ΔCt	2.2
<i>phzA</i>	17.01
<i>gyrB</i>	15.41
ΔCt	1.60
<i>phzA</i>	18.72
<i>gyrB</i>	16.34
ΔCt	2.38
<i>phzA</i>	17.29
<i>gyrB</i>	15.31
ΔCt	1.98
<i>phzA</i>	19.71
<i>gyrB</i>	17.50
ΔCt	2.21
<i>phzA</i>	18.43
<i>gyrB</i>	16.66
ΔCt	1.77
<i>phzA</i>	17.12
<i>gyrB</i>	15.14
ΔCt	1.98
<i>phzA</i>	16.98
<i>gyrB</i>	15.12
ΔCt	1.86
<i>phzA</i>	17.60
<i>gyrB</i>	15.72
ΔCt	1.88

أظهرت نتائج التعبير الجيني لجين *phzA* المسؤول عن صبغة Pyocyanin أن العزلات التي كان مصدرها التهاب الانن قد سجلت أعلى معدل تعبير جيني لجين *phzA* والذي كان 1.98 جاء بعد ذلك العزلات التي مصدرها الجروح والتي بلغ معدل التعبير الجيني لها

على أنتاج صبغة Pyocyanin في 30 سلالة من سلالات *P. aeruginosa* , Chin-A- (15) جاءت نتائج هذه الدراسة متطابقة مع ماتوصل اليه (16) في كندا والذي وجد ان نسبة التعبير الجيني لجين *phzA* هي 100% وبنفس الفرق المعنوي ذو القيمة ($P < 0.001$) , كما اتفقت نتائج دراستنا تماما مع توصل اليه (17) في الصين في دراسة التعبير الجيني لجين *phzA* الذي وجد ان نسبة التعبير الجيني كانت 100% كما اتفقت نتائج هذه الدراسة مع معدلات التعبير الجيني الذي حصل عليها والتي كانت ضمن المدى (1.00 - 1.61) , كما تطابقت النتائج المدروسة مع (18) في ولاية تكساس الذي وجد ان نسبة التعبير الجيني لصبغة Pyocyanin لعينات بيئية كان 100%.

المصادر:

1. أخالصي ، علي حسين علأ الدين. (2014). دراسة تأثير التثبيطي لعسل النحل المحلي ضد الإصابة البكتيرية واستعماله في معالجة الجروح والحروق. كلية التربية الأساسية ، الجامعة المستنصرية.
2. المشهداني، أحمد محمد يوسف ياسين. (2016). التباين المظهري والجزيئي لبعض الجينات الخاصة بالضرارة والصفات التشخيصية للعزلات المرضية للزوائف الزنجارية ، رسالة ماجستير ،كلية العلوم ،جامعة الانبار.
3. النعيمي ،علا عبد الكريم كاظم. (2015). دراسة تأثير البروباوتك في تكوين الغشاء الحيوي وانتاج أنزيم البروتيز لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من أخماج الحروق والجروح ، رسالة ماجستير،كلية التربية الأساسية ،جامعة المستنصرية.

كذلك الحال مع دراسة (11) إذ كانت نسبة إصابة أخماج الجروح والحروق ببكتريا *P. aeruginosa* هي الأكثر شيوعا ونسبة 73.1% , كما اشارت دراسة (12) في نتائج دراستها أن أعلى نسبة لبكتريا *P. aeruginosa* كانت 78.57% من التهابات الحروق والتي تتوافق مع نتائج هذه الدراسة.

بلغت نسبة انتاج صبغة Pyocyanin لدرستنا الحالية 100% التي اقتربت مع النتائج التي حصل عليها (13) حيث وجد ان 92% من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* كانت لها القابلية على أنتاج صبغة Pyocyanin , يأتي التفاوت في انتاج تلك الصبغة كونها تعمل كمضادات حيوية اذ تتداخل سلبيا مع عدد من وظائف خلايا الإنسان, ومن أهمها خلايا الجهاز التنفسي ونمو خلايا الجلد وتوازن الكالسيوم وتحرير الانترولوكين. كما ان هذه الصبغة تعمل على تثبيط الكلوبيولينات المناعية Immunoglobulines المنتجة من الخلايا للمقاومة البائية وهذا مايشير الى إن هنالك علاقة وثيقة بين إنتاج الصبغة وامراضية البكتريا (14).

ان التفاوت في قيم التعبير الجيني والمظهري قد يعود الى عدة اسباب منها انه تم تحديد جينين من سبع جينات لتخليق صبغة Pyocyanin تقع ضمن اوبرونين (*phzA1B1C1D1E1F1G1*) و (*PhzA2B2C2D2E2F2G2*) كما ان جين *phzA* يشتمل على جينين مجموعة مع بعضهما هما (*phzA1* و *phzA2*) والتي تشفر للجين مجتمع مع بعضها بالإضافة الى جينين هما (*PhzM* و *phzS*) الواقعة على مقربة من الاوبرون *phzA1-G1* الذي يعمل على تحويل Phenazine-1-carboxylic acid الى صبغة Pyocyanin كل تلك الجينات تساهم في التعبير المظهري فيما كان التعبير الجيني هو لجين *phzA* وجاءت أهمية جين *phzA* الذي يعمل

- virus DNA by real-time PCR using efficient TaqMan probe and extraction of virus DNA. *J. World J Gastroenterology*. 12(45): 7365-7370.
13. Mavroid, D. V. ; Bonsall, R. F. ; Delaney, S. M. ; Soule, M. J. ; Phillips, G. and Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*; 183(21): 6454-6465.
14. Nidhi Shah, Natasha Klaponski, Carrie Selin , Rachel Rudney, W.G. Dilantha Fernando, Mark F. Belmonte and Teresa R. de Kievit. (2016). *PtrA Is Functionally Intertwined with GacS in Regulating the Biocontrol Activity of Pseudomonas chlororaphis* PA23;7(1512):1-13.
15. Pierce, K.E.; Rice, J.E.; Sanchez, J.A.; Brenner, C. and Wangh, L.J. (2000). Real-Time PCR using molecular beacons for accurate detection of the Y chromosome in single human blastomeres. *J. molecular human reproduction*; 6(12):1155-1164.
16. Rada B, Lekstrom K, Damian S, Dupuy C, Leto TL (2008). The *Pseudomonas* toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *The journal of immunology.*; 181: 4883-4893.
17. Rastegar, L.A.R.; Alaghebandan, R. and Akhlaghi, L. (2005). Burn wound infections and antimicrobial resistance in tehran, Iran: an increasing problem. *Annals of Burns and Fire Disasters*; 453(2): 1-9.
18. Zubair, M.; Malik, A.; Ahmad, J.; Rizvi, M.; Farooqui, K.; Rizvi, M. (2011). A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. *J. Bio. Med.*; 3(2): 147-157.
4. Baron, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007). *Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology*. 9th ed. Mosby Company. Missouri.
5. Bin Ren, Huifeng Shen, Zhi John Lu, Haiming Liu , Yuquan Xu (2014). The *phzA2-G2* Transcript Exhibits Direct RsmA-Mediated Activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PLoS ONE*; 9(2): 1-13.
6. Brooks, G.F.; Carroll, K.C; Butel, J.S.; Mores, S.A. and Mietzner, T.A. (2010). *Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology*. 25th ed. thr McGraw-Hill companies, United states of American.
7. Can Attila. (2008). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors via a Poplar Tree Model. College of Science. Istanbul Technical University, Turkey.
8. Chin-A-Woeng, T. (2000). Molecular basis of biocontrol of tomato foot and root rot by *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391. PhD thesis, University of Leiden, Leiden, The Netherlands.
9. Dumas, J.L.; Delden, C.V.; Perron, K. and Delden, T.K. (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.*; 254:217-225.
10. Jacoby, G.A. (2009). AmpC beta-lactamase. *Clin. Microbiol Rev.* 22(1): 161-182.
11. Kaltenboeck B and Wang C (2005). Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem*; 40:219-49.
12. Lu, Y.Q.; Han, J.X.; Qi, P.; Xu, W.; Zu, Y.H. and Zhu, B. (2006). Rapid quantification of hepatitis B

Study Gene Expression for *phzA* Gene for *PHzA* Gene Responsible of Pyocyanin Production of *P. aeruginosa* by qPCR.

Bilal A. Awad

Ahmed M. Turkey

E.mail:

Abstract

Identification of 66 bacterial isolates obtained from different sources has been should belonging to the bacterium *P. aeruginosa* in arate of 46 infection isolation and 20 environmental isolates which confirmed by Microscopy diagnosis and Biochemical tests. Micro titration plates method was (MTP) used for detection of isolates abilites to produce Pyocyanin dye. The isolates were differed in their production of Pyocyanin dye between productive with high efficiency, medium efficiency and low efficiency. For the study of gene expression of these isolates, extracted RNA was obtained from of all isolates, then measure the amount of gene expression by qRT- PCR technology for gene *PhzA* responsible for production of Pyocyanin dye, was studied the isolates incuded were 56 as treatment isolates and 10 as control isolates of each gene using the One Step Real time-PCR. It was found that the *phzA* gene expression by relative Quantification method ,within the range (0.93-2.12) ,with highly significant differences and probability ($P < 0.001$).