پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست‌شناسی – بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان

تهیه نانوبادی های نوترکیب مشتق شده از آنتی بادی های زنجیره سنگین شتری بر علیه لیپوپلی ساکارید باکتری *ویبریو کلرا*

اساتید راهنما

دکتر سید لطیف موسوی گرگری

دکتر معصومه رجبی بذل

استاد مشاور

دکتر محمد محمدی

دانشجو

ولید ابراهیمی زاده

دانشکده علوم پایه

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی
با تاییدات الهی و استعانت از حضرت ولیعصر "عج"

جلسه دفاعیه پایان نامه آقای **ولید ابراهیمی زاده** به شماره دانشجویی **۸۷۷۵۸۶۵۰۲** در رشته **بیوتکنولوژی گرایش میکروبی** در مقطع **کارشناسی ارشد**

تحت عنوان:

تهیه نانوبادی نوترکیب مشتق شده از آنتی بادی های زنجیره سنگین شتری علیه لیپوپلی ساکارید *Vibrio cholerae*

به ارزش **۸ واحد** راس ساعت ۱۰ روز **چهار شنبه** مورخ **۱۳۹۰/۶/۱۶** در دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد تشکیل گردید. هیات داوران پس از استماع دفاعیات و پرسش های لازم، نمره و درجه ایشان را به شرح زیر اعلام میدارند:

نمره پایان نامه به عدد ۲۰ نمره پایان نامه به حرف بیست درجه عالی

درجه عالی۲۰-۱۸ بسیار خوب ۱۷/۹۹-۱۶ خوب ۱۵/۹۹-۱۴ قابل قبول ۱۳/۹۹-۱۲ و غیر قابل قبول کمتر از ۱۲

عنوان	نام ونام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	امضا
استاد راهنمای اول	دکتر سید لطیف موسوی گرگری	دانشیار	
استاد راهنمای دوم	دکتر معصومه رجبی بذل	استادیار	
استاد مشاور	دکتر محمد محمدی	استادیار	
داور اول	دکتر جعفر امانی	استادیار	
داور دوم	دکتر ایرج رسولی	استاد	
نماینده تحصیلات تکمیلی گروه	دکتر منیژه کرمی	استادیار	

شماره :

تاریخ:

اظهار نامه دانشجو

اینجانب ولید ابراهیمی زاده دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی گرایش میکروبی دانشکده علوم پایه دانشگاه شاهد، گواهی می دهم که پایان نامه / رساله تدوین شده حاضر با عنوان" تهیه نانوبادی های نوترکیب مشتق شده از آنتی بادی های زنجیره سنگین شتری بر علیه لیپوپلی ساکارید باکتری *ویبریو کلرا*" به راهنمایی استاد محترم سرکار خانم دکتر/ جناب آقای دکتر سیدلطیف موسوی گرگری / دکتر معصومه رجبی بذل توسط شخص اینجانب انجام و صحت و اصالت مطالب تدوین شده در آن، مورد تایید است و چنان چه هر زمان، دانشگاه کسب اطلاع کند که گزارش پایان نامه/ رساله حاضر صحت و اصالت لازم را نداشته، دانشگاه حق دارد، مدرک تحصیلی اینجانب را مسترد و ابطال نماید هم چنین اعلام می دارم در صورت بهره گیری از منابع مختلف شامل گزارش های تحقیقاتی، رساله، پایان نامه، کتاب، مقالات تخصصی وغیره، به منبع مورد استفاده و پدید آورنده آن به طور دقیق ارجاع داده شده و نیز مطالب مندرج در پایان نامه/ رساله حاضر تاکنون برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی توسط اینجانب و یا سایر افراد به هیچ کجا ارایه نشده است. در تدوین متن/ رساله حاضر، چار چوب (فرمت) مصوب تدوین گزارش های پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشگاه شاهد به طور کامل مراعات شده و نهاینا" این که کلیه حقوق مادی ناشی از گزارش پایان نامه/ رساله حاضر، متعلق به دانشگاه شاهد می باشد.

نام و نام خانوادگی دانشجو(دست نویس)

ولید ابراهیمی زاده

امضاء دانشجو:

تاریخ:

۹۰/۷/۲۰

بسم الله الرحمن الرحیم

ملکا تو آنی که خود گفتی و چنانکه گفتی آنی من چه دانستم که این دود آتش داغ است. من پنداشتم که هر جا آتشی است چراغ است من چه دانستم که در دوستی کشته را گناهست. و قاضی خصم را پناهست من چه دانستم که حیرت به وصال تو طریق است و تو را او میش جوید که در غریق است خوانندگان از و برد او بیارند خواهندگان او کم، گویندگان از درد بی درد او بسیارند و صاحب درد کم.

الهی چون از یافت تو سخن گویند از علم خود بگریزم بر زهره خود بترسم در غفلت آویزم همواره از سلطان عیان در پرده غیب می آویزم نه کامم بی لکن خویشتن را در غلطی افکنم تا دمی برزنم.

خداوند نثار دل من امید دیدار تست بهار جان من مرغزار وصال تست.

خداوندا یافته می جویم بادیده در می گویم که دارم چه جویم که بینم چه گویم شیفته این جستجویم گرفتار این گفتگویم.

خداوندا خود کردم و خود خریدم آتش بر خومن خود افروزانیدم از دوستی آواز دادم دل و جان فرانماز دادم. مهربانا اکنون که در غرقابم دستم گیر که گرم افتادم.

الهی چه یاد کنم که خود همه یادم. من خرمن نشان خود فراباد دادم یاد کردن کسب است و فراموش نکردن زندگانی وراء دو گیتی است و کسب چنانکه دانی.

خداوندا کار آنکس کند که تواند و عطا آنکس بخشد که دارد پس رهی چه دارد و چه تواند چون توانائی تو کرا توانست؟ و در ثنا تو کرا زبانست؟ و بی مهر تو کرا سر در جانست؟ چه غم دارد او که تو را دارد؟ کرا شاید او که ترا نشاید؟ آزاد آن نفس که بیاد تو یازان و آباد آن دل که به مهر تو نازان. و شاد آنکس که با تو در میان از غیر جدا شدن سر میدانست کار آن دارد که با تو در میانست.

الهی اگر از دنیا نصیبی است به بیگانگان دادم و اگر از عقبی مرا ذخیره یی است به مومنان دادم. در دنیا مرا یاد تو بس و در عقبا مرا دیدار تو بس دنیا و عقبا دو ساعند بهایی و دید تقدیست عطائی.

قومی مینم باین جهان از و مشغول قومی از هر دو جهان بوی مشغول گوش فرا داشته که تا نسیم سعادت از جانب قربت کی دمد؟ و آفتاب وصلت از برخ عنایت که تابد؟ بزبان بیخودی و به حکم آرزومندی میزارند و میگویند.

کریما مشتاق تو بی تو زندگانی چون گذرد؟ آرزومند تو از دست دوستی تو یک کنار خون دارد. بی تو ای آرام جانم زندگانی چون کنم؟ چون نباشی در کنارم شادمانی چون کنم؟

گزیده ای از مناجات

خواجه عبدالله انصاری

اعتراف می‌کنم که نه زبان شکر تو را دارم و نه توان تشکر از بندگان تو، و اما بر حسب وظیفه:

از کلیه اساتید ارجمند که در طول سال های به یاد ماندنی شاگردیشان تجربیات فراوان کسب نمودم تشکر می‌نمایم. از اساتید ارجمند آقای دکتر سید لطیف موسوی گرگری، خانم معصومه رجبی بذل و آقای دکتر محمد محمدی جهت راهنمایی، مشاوره و هدایت این پایان‌نامه و همچنین از اساتید گرامی آقای دکتر امانی، آقای دکتر نظریان، خانم دکتر علیپور که در دوران تحصیل و در تحقیق انجام شده مشوق اینجانب بوده و همواره از ایده‌های خوب آنان بهره‌مند گردیده‌ام، خاضعانه سپاسگزارم.

تشکر ویژه ای از استاد گرامی خانم دکتر رجبی بذل دارم که همواره در دوران تحصیل راهگشا و راهنمای اینجانب بوده اند و بدون راهنمایی ایشان این پایان نامه سرانجام نمی یافت.

از اساتید ارجمند آقایان دکتر رسولی و دکتر امانی جهت قبولی داوری و راهنمایی های آنان صمیمانه قدر دانی می‌کنم.

از همکاران گرامی در دانشگاه شاهد آقایان مهدی داداش پور، محمد پاکزاد، زارع، باخرد، نصرتی، دهقانی و افتخاریان و خانم ها صفایی، شریعتی مهر، ملک شاهی، آل رسول، باقری و تمامی دوستان دیگر در آزمایشگاه تحقیقاتی، میکروبیولوژی و فیزیولوژی گیاهی صمیمانه سپاسگزارم.

از مدیران و کارشناسان محترم دانشکده‌علوم پایه که همکاری‌های صمیمانه آنان را هیچگاه فراموش نخواهم کرد، تشکر می‌کنم.

ابراهیمی زاده

شهریور ۱۳۹۰

فهرست

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۲ *ویبریو کلرا* ۲
۱-۳ اپیدمیولوژی ۳
تفاوت سویه O139 *با نوع* O1 ..... ٤
۱-٤ آنتی بادی های زنجیره سنگین ٥
۱-٥ نمایش فاژی ۸
۱-٦ هدف ۱۱
۱-۷ ضرورت ۱۱
۱-۷-۱ وبا در ایران ۱۱
۱-۷-۲ استفاده از آنتی بادی تولید شده بوسیله این روش در تشخیص سریع عامل بیماری ۱۲
۱-۷-۳ استفاده از آنتی بادی تولید شده بوسیله این روش در درمان و کنترل بیماری وبا ۱۲
۲- تاریخچه و مروری بر مقالات ۱٥
۲-۱ باکتری شناسی *ویبریو کلرا* ۱٥
۲-۱-۱ خانواده ویبریوناسه ۱٥
۲-۱-۲ خصوصیات بیوشیمیایی و رشد ۱۷
۲-۱-۳ ساختار آنتی ژنی و طبقه بندی *ویبریو کلرا* ۲۰
طبقه بندی هایبرگ ۲۲
I - *ویبریو کلرا گروه* O1 ..... ۲۲
I- *ویبریو کلرا* O1 *غیر معمول* ۲۳
III- *ویبریو کلرا* O1 *غیر آگلوتینه کننده* ۲۳
IV- سایر ویبریو ها ۲۳
۲-۱-٤ بیماری زایی، تشخیص و درمان ۲۳
۲-۱-٥ اپیدمیولوژی ۲٦
۲-۲ لیپوپلی ساکارید ۲۸
۲-۲-۱ لیپوپلی ساکارید به عنوان توکسین ۲۸
۲-۲-۲ نقش لیپوپلی ساکارید در غشای خارجی باکتری ۳۰

۲-۲-۳ ساختار لیپوپلی ساکارید ۳۱
۲-۲-۳-۱ لیپید A: ۳۲
۲-۲-۳-۲ هسته R یا پلی ساکارید R: ۳۲
۲-۲-۳-۳ آنتی ژن سوماتیک O یا پلی ساکارید O: ۳۳
۲-۲-٤ نقش لیپوپلی ساکارید در بیماری زایی باکتری هایی گرم منفی ۳۵
I- نقش پلی ساکارید O در بیماری زایی ۳۵
II- نقش لیپید A در بیماری زا ۳٦
۲-۲-۵ مکانیزم اثر لیپوپلی ساکارید بر میزبان ۳۷
۲-۳ آنتی بادی های زنجیره سنگین شتری ۳۹
۲-۳-۱ ویژگی های آنتی بادی های زنجیره سنگین ٤۲
۲-۳-۲ تولید VHH ها در میکروارگانیسم ها ٤٦
۲-۳-۳ کاربرد های VHH در زمینه های درمانی و بیوتکنولوژی ٤۷
۲-٤ تکنیک نمایش فاژی ۵۱
۲-٤-۱ ویژگی های تکنیک نمایش فاژی ۵۲
۲-٤-۲ چگونگی نمایش پپتید ها بر روی سطح فاژ ۵٤
۲-٤-۳ انواع سیستم های نمایش فاژی ۵۷
۳- مواد و روش ها ٦۱
۳-۱ مواد و دستگاه های مورد نیاز ٦۱
۳-۱-۱ مواد و محلول‌های مورد نیاز ٦۱
أ. مواد استفاده شده: ٦۱
ب. آنتی بیوتیک ها ٦۲
ت. آنزیم‌ها ٦۲
ث. کیت‌های آزمایشگاهی ٦۲
ج. میزبان های باکتریایی *E.coli* ٦۳
ح. باکتری *Vibrio cholera* Inaba O1 ..... ٦۳
خ. حامل های DNA استفاده شده در این تحقیق ٦۳
د. توالی پرایمر ها ٦۳
ذ. محیط های کشت ٦٤
ر. بافر ها و محلول‌های مورد نیاز ٦٤

۳-۱-۲ وسایل و دستگاههای مورد نیاز ٦٦
أ. وسایل ٦٦
ب. دستگاه ها: ٦٦
۳-۲ روش ها ٦٧
۳-۲-۱ استخراج لیپوپلی ساکارید ٦٧
۳-۲-۲ تعیین غلظت لیپوپلی ساکارید ٦٧
۳-۲-۳ بررسی لیپوپلی ساکارید بر روی Tricine-SDS-PAGE ٦٩
۳-۲-٤ رنگ آمیزی نیترات نقره تغییر یافته ۷۰
۳-۲-۵ بررسی ایمنی زایی لیپوپلی ساکارید تخلیص شده ۷۲
۳-۲-۵-۱ تزریق لیپوپلی ساکارید به موش های نژاد BALB/c ۷۲
۳-۲-۵-۲ بررسی ایمنی زایی لیپوپلی ساکارید ۷۳
۳-۲-٦ تهیه کتابخانه cDNA از لنفوسیت های شتر یک کوهانه ۷٤
۳-۲-٦-۱ خون گیری از شتر یک کوهانه ۷٤
۳-۲-٦-۲ تهیه آنتی بادی های خرگوشی بر علیه ایمونوگلوبولین های شتری ۷۵
أ. تخلیص ایمونوگلوبولین های شتر ۷۵
ب. تعیین غلظت پروتئین ۷٦
ت. تهیه آنتی بادی های خرگوشی بر علیه ایمونوگلوبولین های شتر ۷۸
ث. بررسی روند ایمنی زایی ۷۸
ج. تخلیص آنتی بادی های خرگوشی تولید شده ۷۸
ح. بررسی تمایل آنتی بادی تخلیص شده ۸۰
۳-۲-٦-۳ تخلیص لنفوسیت ۸۱
۳-۲-٦-٤ استخراج RNA از لنفوسیت ۸۱
استخراج RNA از سلول‌های لنفوسیت ۸۲
۳-۲-٦-۵ بررسی RNA تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۸۳
۳-۲-٦-٦ انجام RT-PCR ۸۳
۳-۲-٦-۷ تکثیر ژن VHH ۸٤
- PCR اول ۸٤
- تخلیص محصول PCR اول ۸٦
- PCR دوم ۸٦

۳-۲-٦-۸ استخراج فاژمید pComb3x ۸۸
۳-۲-٦-۹ برش آنزیمی وکتور pComb3x و ژن VHH ۸۸
۳-۲-٦-۱۰ الحاق قطعه VHH به و وکتور pComb3x ۸۹
۳-۲-٦-۱۱ تهیه فاژ کمکی ۹۰
➢ تعیین تیتر فاژ های کمکی ۹۲
۳-۲-٦-۱۲ انتقال الکتریکی محصول الحاق به باکتری E.coli TG-1 ..... ۹۲
أ. تهیه باکتری های مستعد جهت انتقال الکتریکی ۹۲
ب. انتقال الکتریکی وکتور های نوترکیب به باکتری مستعد ۹۳
۳-۲-٦-۱۳ بررسی اتصال قطعات ژن VHH به وکتور pComb3x ۹۵
۳-۲-۷ انجام مراحل Panning جهت جداسازی VHH مورد نظر ۹۵
۳-۲-۷-۱ تکثیر فاژمید های نوترکیب و رها سازی آن ها با استفاده از فاژ کمکی ۹٦
۳-۲-۷-۲ تخلیص و تغلیظ فاژ ها جهت استفاده در مراحل Panning ۹٦
۳-۲-۷-۳ جداسازی آنتی بادی های دارای میل پیوندی به آنتی ژن ۹۷
۳-۲-۷-٤ تکثیر فاژ های جدا شده در مرحله Panning ۹۸
۳-۲-۷-۵ تهیه ذخیره سلولی از باکتری های مراحل Panning ۹۹
۳-۲-۸ تکثیر فاژ های بدست آمده در مراحل Panning ۱۰۰
۳-۲-۹ بررسی پیشرفت مراحل Panning توسط تکنیک فاژ-الایزا ۱۰۱
أ. آنتی ژن الایزا ۱۰۱
ب. باکتری-الایزا ۱۰۱
۳-۲-۱۰ بیان آنتی بادی VHH در فاز محلول ۱۰۲
۳-۲-۱۰-۱ انتخاب کلون مناسب به منظور بیان VHH در فاز محلول ۱۰۲
۳-۲-۱۰-۲ بیان آنتی بادی VHH توسط فاژمید pComb3x ۱۰۳
أ. تخلیص فاژمید ها به روش لیز قلیایی ۱۰۳
ب. تهیه باکتری های مستعد به روش کلرید کلسیم ۱۰٤
ت. ترانسفورماسیون باکتری های مستعد توسط فاژمید ها ۱۰۵
ث. بیان VHH توسط فاژمید pComb3x ۱۰٦
ج. بهینه سازی شرایط بیان ۱۰۷
ح. بیان آنتی بادی VHH در مقیاس آزمایشگاهی ۱۰۸
۳-۲-۱۱ تخلیص آنتی بادی های VHH با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل ۱۰۸

۳-۲-۱۲ لکه گذاری وسترن جهت تایید بیان پروتئین ۱۱۰
٤- نتایج ۱۱۳
٤-۱ استخراج لیپوپلی ساکارید ۱۱۳
٤-۲ بررسی لیپوپلی ساکارید بر روی Tricine-SDS-PAGE ۱۱۳
٤-۳ بررسی ایمنی زایی لیپوپلی ساکارید در موش های نژاد BALB/c ۱۱٤
٤-٤ تهیه آنتی بادی های خرگوشی بر ایمونوگلوبولین های شتری ۱۱٦
٤-٤-۱ تخلیص ایمونوگلوبولین های شتر ۱۱۷
٤-٤-۲ بررسی روند ایمنی زایی در خرگوش ها ۱۱۸
٤-٤-۳ تخلیص آنتی بادی خرگوشی ۱۱۹
٤-٥ تخلیص لنفوسیت و استخراج RNA ۱۲۰
٤-٦ تهیه cDNA و انجام Nested PCR ۱۲۱
٤-۷ تهیه فاژمید نوترکیب ۱۲۲
٤-۸ بررسی اتصال قطعات VHH به فاژمید pComb3x ۱۲۳
٤-۹ بررسی پیشرفت در مراحل Panning توسط الایزا ۱۲٤
٤-۱۰ انتخاب کلون مناسب جهت بیان آنتی بادی VHH در فاز محلول ۱۲٥
٤-۱۱ بیان آنتی بادی های VHH با استفاده از فاژمید pComb3x ۱۲٦
٤-۱۱-۱ تخلیص آنتی بادی های VHH با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل ۱۲۷
٤-۱۱-۲ لکه گذاری وسترن جهت تایید بیان آنتی بادی ۱۲۷
٥- بحث و پیشنهادات ۱۳۰
٥-۱ بحث ۱۳۰
٥-۱-۱ رویکرد کلی پژوهش ۱۳۰
٥-۱-۲ تخلیص و سنجش غلظت لیپوپلی ساکارید ۱۳٤
أ. تخلیص لیپوپلی ساکارید ۱۳٤
ب. سنجش غلظت لیپوپلی ساکارید ۱۳٥
٥-۱-۳ روش های تخلیص ایمونوگلوبولین ۱۳۷
٥-۱-٤ تخلیص RNA ۱۳۹
٥-۱-٥ تکثیر ژن های VHH ۱٤۰
٥-۱-٦ بررسی آنتی بادی های بدست آمده ۱٤۱
٥-۱-۷ بررسی نتایج بدست آمده ۱٤۲

۵-۲ پیشنهادات ۱۴۵
۶- منابع ۱۴۷
پیوست ها ۱۶۱
ABSTRACT ۱۷۵

فهرست اشکال

شکل ۲-۱: کلنی های باکتری *V.cholerae* O1 بر روی محیط حاوی ۵٪ خون گوسفند..... ۱۶
شکل ۲-۲: رنگ آمیزی گرم از باکتری های *ویبریو کلرا*..... ۱۸
شکل ۲-۳: کلنی های باکتری *ویبریو کلرا* بر روی محیط TSBC..... ۱۹
شکل ۲-٤: استرینگ تست..... ۲۰
شکل ۲- ۵: ساختار غشای خارجی باکتری های گرم منفی..... ۲۹
شکل ۲-٦: نقشه کلی لیپوپلی ساکارید..... ۳۱
شکل ۲- ۷: شکل شماتیک آنتی بادی های معمول..... ٤۰
شکل ۲-۸ : نمایش شماتیک انواع آنتی بادی ها..... ٤۱
شکل ۲-۹: تفاوت های بین VH و VHH..... ٤۳
شکل ۲-۱۰: چگونگی عرضه قطعات آنتی بادی بر روی فاژ نوترکیب..... ۵۵
شکل ۲-۱۱: نحوه اتصال پپتید ها به پروتئین های پوششی..... ۵٦
شکل ۲-۱۲: انواع سیستم های نمایش فاژی..... ۵۷
شکل ٤-۱: رنگ آمیزی کوماسی بلو و نیترات نقره..... ۱۱٤
شکل ٤-۲ خرگوش های استفاده شده..... ۱۱٦
شکل ٤-۳: بررسی ایمونوگلوبولین های شتری تخلیص شده..... ۱۱۷
شکل ٤-٤: تخلیص آنتی بادی خرگوشی توسط Salt-out..... ۱۱۹
شکل ٤-۵: تخلیص آنتی بادی های خرگوشی بوسیله کروماتوگرافی DEAE-Cellulose..... ۱۲۰
شکل ٤-٦: تخلیص لنفوسیت..... ۱۲۰
شکل ٤-۷: بررسی RNA تخلیص شده..... ۱۲۱
شکل ٤-۸: بررسی محصول PCR اول و دوم..... ۱۲۲
شکل ٤-۹: هضم آنزیمی وکتور pComb3x و قطعات VHH..... ۱۲۳
شکل ٤-۱۰: تایید اتصال قطعات VHH به فاژمید pComb3x..... ۱۲۳
شکل ٤-۱۱: بیان آنتی بادی های VHH در فاژمید pComb3x..... ۱۲٦
شکل ٤-۱۲: تخلیص آنتی بادی های VHH..... ۱۲۷
شکل ٤-۱۳: لکه گذاری وسترن..... ۱۲۸

فهرست جدول ها

جدول ۲-۱: انواع ویبریو های بیماری زا در انسان..... ۱۶
جدول ۲-۲: تست های تشخیص بیوشیمیایی *ویبریو کلرا* از دیگر باکتری ها..... ۲۰
جدول ۲-۳: تست های افتراقی بیوتیپ های التور و کلاسیک *ویبریو کلرا*..... ۲۲
جدول ۲-٤: انواع واکسن های موجود جهت ایمنی زایی بر علیه *ویبریو کلرا*..... ۲۶
جدول ۲-۵: پاندمی های ایجاد شده توسط *ویبریو کلرا*..... ۲۷
جدول ۲-٦: مقایسه اگزوتوکسین ها و اندوتوکسین های باکتریایی..... ۳۰
جدول ۲-۷: آنتی بادی های VHH تولید شده بر علیه برخی از بیماری ها و مشخصات آن ها..... ٤۹
جدول ۳-۱: غلظت قند های استفاده شده جهت رسم نمودار استاندارد سنجش کربوهیدرات..... ٦۸
جدول ۳-۲: بافر های مورد استفاده در Tricine-SDS-PAGE ٦۹
جدول ۳-۳: محلول های استفاده شده در رنگ آمیزی نیتریت نقره..... ۷۱
جدول ۳-٤: محلول های استاندارد جهت رسم نمودار تعیین غلظت برادفورد..... ۷۷
جدول۳-۵: واکنش زنجیره ای پلی مراز اول..... ۸۵
جدول ۳-٦: مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز ۸۵
جدول ۳-۷: مواد استفاده شده و مقادیر آن در انجام PCR دوم..... ۸۷
جدول ۳-۸: مراحل انجام PCR دوم و زمان هریک..... ۸۷
جدول ۳-۹: اجزای واکنش هضم آنزیمی و مقادیر هریک..... ۸۹
جدول ۳-۱۰: اجزای واکنش الحاق و مقادیر هر یک از آن ها..... ۹۰
جدول ۳-۱۱: تعداد دفعات شستشو و در صد Tween در بافر TBS-T در مراحل مختلف Panning..... ۹۸
جدول ۳-۱۲: محلول های استفاده شده و مقدار هر یک از آن ها در ساخت SDS-PAGE..... ۱۰۷

فهرست نمودار ها

نمودار ٤-١: بررسی ایمنی زایی لیپوپلی ساکارید در موش های نژاد BALB/c..... ١١٤

نمودار ٤-٢: بررسی اختصاصیت آنتی بادی های تولید شده در موش های نژاد BALB/c..... ١١٥

نمودار ٤-٣: بررسی اثر طولانی مدت ایمنی زایی لیپوپلی ساکارید..... ١١٦

نمودار ٤-٤: بررسی روند ایمنی در خرگوش ها ١١٨

نمودار ٤-٥: بررسی تمایل آنتی بادی های جدا شده پس از هر مرحله Panning..... ١٢٥

نمودار٤-٦: جذب نوری کلون های Panning پنجم در فاژ الایزا..... ١٢٥

چکیده

شتر ها قادر به تولید آنتی بادی هایی فاقد زنجیره سبک می باشند و قطعات حاصل از انتهای آمین این آنتی بادی ها VHH یا نانوبادی نام داشته و دارای توانایی کامل اتصال به آنتی ژن می باشند. برخی از مزایای نانوبادی ها قابلیت تولید آسان و انبوه آن ها در میکروارگانیسم ها و توانایی استفاده از آن ها در سیستم هایی از قبیل نمایش فاژی، مخمری یا ریبوزومی می باشد. هدف این پژوهش تهیه نانوبادی هایی با قابلیت اتصال به لیپوپلی ساکارید باکتری *ویبریو کلرا* اینابا O1 با استفاده از سیستم نمایش فاژی می باشد. به این منظور پس از جداسازی لنفوسیت ها از خون شتر غیر ایمن، RNA تخلیص و با استفاده از پرایمر های Oligo dT به cDNA تبدیل شدند. قطعات کد کننده VHH توسط Nested PCR تکثیر شده و پس از هضم توسط آنزیم اندونوکلئاز *SfiI* به فاژمید pComb3X الحاق شدند. فاژمید های نوترکیب با استفاده از الکتروپوریشن به باکتری TG-1 *E.coli* منتقل گردیده و جهت آزادسازی آن ها هنگامی که OD_{600} به ۰/۷ رسید توسط فاژ های کمکی M13K07 آلوده شدند. فاژ های مورد نظر توسط Panning با استفاده از لیپوپلی ساکارید باکتری *ویبریو کلرا* اینابا O1 به عنوان آنتی ژن جدا شدند. پس از انتقال آنتی بادی جدا شده به فاز محلول، قابلیت اتصال، اختصاصیت و تمایل آن به آنتی ژن مورد نظر و همچنین باکتری *ویبریو کلرا* اینابا O1 توسط لکه گذاری وسترن و الایزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده بیانگر اتصال اختصاصی این آنتی بادی به لیپوپلی ساکارید باکتری *ویبریو کلرا* اینابا O1 و همچنین باکتری *ویبریو کلرا* اینابا O1 بود.

کلمات کلیدی: نانوبادی، لیپوپلی ساکارید، ویبریو کلرا اینابا O1 ، نمایش فاژی، Panning

فصل اول

مقدمه

۱ -مقدمه

۱ ۲ *ویبریو کلرا*

وبا نوعی بیماری عفونی است که توسط باکتری *ویبریو کلرا* ایجاد می شود و در طی قرن گذشته مسئول پاندمی جهانی و مشکلات بسیار دیگری بوده است [۱]. وبای اپیدمیک هنوز یکی از مشکلات اصلی بهداشت عمومی در دنیای در حال توسعه است [۲-۳]. تمامی اعضای این جنس باسیل های گرم منفی خمیده و بی هوازی اختیاری هستند و جهت رشد نیازمند به نمک می باشند. این باکتری ها با داشتن یک یا دو تاژک قطبی، به طور فعال متحرک می باشند [٤]. ویبریو ها در طبیعت پیش از همه در رودخانه ها و خلیج های جزر و مد دار و در شرایط شوری متوسط زندگی می کنند. این ارگانیسم ها در ماه های تابستان که دمای آب به بیش از ۲۰ درجه سانتی گراد می رسد تکثیر می یابند [٤-٦]. لذا شیوع بیماریهای ناشی از این ارگانیسم ها در ماه های گرم سال افزایش می یابد. وبا در طول تاریخ هفت بار همه‌گیری جهانی داشته است [۷-۹]. در قرن نوزدهم چندین بار در اروپا همه گیر شده است. امروزه وبا بیشتر در کشور های جهان سوم و به علت وضعیت ناسالم و غیر بهداشتی آب های آشامیدنی دیده می‌شود. وبا نوعی بیماری اسهالی حاد است که می تواند در عرض چند ساعت به دهیدراتاسیون شدید و پیشرونده و در نهایت به مرگ منجر شود [٤, ۱۰-۱۱]. بر همین اساس، وبا به خصوص در موارد اپیدمیک آن، بیماری خطرناکی است.

وبا یکی از مشکلات کشور های توسعه نیافته و در حال توسعه می‌باشد و قادر به ایجاد اپیدمی های گسترده بوده و به عنوان یکی از کشنده ترین عوامل عفونی مطرح شده‌است [۱۲]. بیماری در آغاز به صورت آندمیک بود و اپیدمی های گسترده ایجاد نمی‌کرده. اولین پاندمی بین سالهای ۱۷-۱۸۱٦ شروع شد و خاور میانه، خاور نزدیک، جنوب آسیا و ژاپن را فرا گرفت [۷, ۱۳].

بیماری وبا برای نخستین بار به شکل علمی توسط پزشک پرتغالی، گارسیا ده اورتا[1] در هندوستان در سال ۱٥٦۳ توصیف شد [٤]. جان اسنو[2] پزشک مخصوص ملکه انگلستان، ارتباط

[1] Garcia de Orta
[2] John Snow

میان وبا و آشامیدن آب را در سال ۱۸۵٤ کشف کرد [١٤] و رابرت کخ[1] پزشک آلمانی برای اولین بار در سال ۱۸۸۳ میلادی باکتری وبا را جداسازی و شناسایی نمود. این باکتری، سی سال پیش از آن، بدست کالبد شناس ایتالیایی فیلیپ پاسینی[2] جدا و شناسایی شده بود ولی نتایج کار های وی ناشناخته بود [١٥].

۱ ۳ اپیدمیولوژی

اولین پاندمی شناخته شده وبا در سالهای ۱۸۱۷ تا ۱۸۲۳ در کشور های آسیایی گسترش یافت و از آنجا به سایر نقاط دنیا گسترش پیدا کرد و کشورهای هندوستان، روسیه، لهستان، اتریش، آلمان، سوئد، کانادا و آمریکا را درگیر نمود [٧].

پاندمی سوم از سال ۱۸٤۸تا ۱۸٦۲ به اروپا و آمریکا رسید [٧, ١٦].

پاندمی چهارم از سال ۱۸٦٤تا ۱۸۷٥ اکثر کشور های آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا را آلوده نمود [٧].

پاندمی پنجم از سال ۱۸۸۳تا ۱۸۹٦ از مصر شروع و به سرعت کشور های آسیایی، روسیه و سایر کشور های اروپا را فرا گرفت [٧, ١٣].

پاندمی ششم از سال ۱۸۹۹تا ۱۹۲۳ ادامه یافت و آسیا، مصر، جنوب شرقی، اروپا، روسیه و بعضی نقاط دیگر جهان را آلوده نمود [٨].

پاندمی هفتم از سال ۱۹٦۱ تاکنون ادامه دارد ولی در این مورد عامل بیماری *ویبریو کلرا* O1 بیوتیپ التور می باشد [٨, ١٢].

بالاترین رقم تلفات براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی درسال ۱۹۷۱ بوده است.

در مجموع تا کنون هفت پاندمی وبا اتفاق افتاده است و عامل پاندمی‌های پنجم و ششم، *ویبریو کلرا* O1 بیوتیپ کلاسیک شناسایی گردید و پاندمی موجود که هفتمین می‌باشد بوسیله بیوتیپ التور Eltor این باکتری ایجاد شده‌است [٧, ١٢]. این پاندمی در سال ۱۹٦۱ از ناحیه بنگال

[1] Robert koch
[2] Filippo Pacini

هندوستان و بنگلادش شروع و آفریقا، اروپای غربی، فیلیپین و دیگر نواحی آسیای جنوب شرقی را در بر گرفت و تا کنون نیز ادامه دارد.

گونه *ویبریو کلرا* به دو دسته تقسیم می شود، آن هایی که در مجاورت آنتی بادی علیه آنتی ژن گروه O آگلوتینه می شوند و آن هایی که آگلوتینه نمی شوند.

این باکتری براساس آنتی ژن O (لیپوپلی ساکارید) به چندین سروگروه تقسیم می شود [۱۷-۱۸]. بیماری وبا اغلب توسط دو سروگروه O139 و O1 ایجاد می گردد. سروگروه O1 (مسئول هفتمین پاندمی) دارای سروتیپ های اوگاوا، اینابا و هیکوجیما می باشد. هر سه سروگروه دارای آنتی ژن مشترک A هستند، سروتیپ اوگاوا دارای آنتی ژن اختصاصی B و سروتیپ اینابا دارای آنتی ژن اختصاصی C و سروتیپ هیکوجیما هر سه آنتی ژن را دارا می باشد [٤, ٦, ١٨]. این آنتی ژن ها به حرارت مقاوم بوده و در اپیدمیولوژی بیماری از اهمیت بسزایی برخوردار هستند. در بررسی‌های اپیدمیولوژیک سویه هایی از باکتری که با آنتی سرم پلی والانت O1 آگلوتینه می‌شوند در سروگروه O1 و آن هایی که آگلوتینه نمی‌شوند جزو سروگروه‌های non-O1 قرار می‌گیرند [٦].

شناسایی *ویبریو کلرا* O1 و سروتیپ های آن براساس آنتی بادی اختصاصی گروه (Anti-A) و آنتی بادی اختصاصی سروتیپ (Anti-B,C) صورت می گیرد. این آنتی سرم ها بوسیله تزریق باکتری به خرگوش و ایمن ساختن حیوان تهیه می شود و سپس واکنش متقاطع میان آن ها بر طرف می گردد [۱۹].

از آنجایی که اختلاف اصلی این باکتری ها در آنتی ژن O است، اکثر محققین مطالعات خود را در جهت شناسایی لیپوپلی ساکارید *ویبریو کلرا* معطوف داشته اند و متوجه شده اند که آنتی ژن های A، B و C در بخش پلی ساکاریدی(PS) قرار دارند و تفاوت دو آنتی ژن A و B تنها در وجود گروه 2-O-methyl در پلی ساکارید سروتیپ اوگاوا و عدم وجود این گروه در PS سروتیپ اینابا می باشد [۲۰].

تفاوت سویه O139 با نوع O1

- تولید لیپوپلی ساکارید جدید O139