به نام خداوند جان و خرد

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم فریده دکتر زاده رشته باکتری شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان « ارزیابی پاسخ های ایمنی نانوذرات کونژوگه با فیوژن پروتئین کلراتوکسین B و ناحیه N انتهایی فلاژلین پسودوموناس آئروژینوزا در موش BALB/c » در تاریخ ۱۳۹۱/۲/۲۷ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر اشرف محبتی مبارز	
استاد مشاور	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد مشاور	دکتر مهریار حبیبی رود کنار	
استاد ناظر	دکتر بیتا بخشی	
استاد ناظر	دکتر فاطمه رهبری زاده	
استاد ناظر	دکتر فاطمه اطیابی	
استاد ناظر	دکتر اکبر میرصالحیان	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر شهین نجار پیرایه	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فریده دکترزاده** دانشجوی رشته **باکتری شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۶** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

۹۱/۳/۱۸

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **باکتری شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر اشرف محبتی مبارز** ، مشاوره **دکتر مهریار حبیبی رودکنار و دکتر مهدی فروزنده** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **فریده دکترزاده** دانشجوی رشته **باکتری شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی فریده دکترزاده
تاریخ و امضا
۹۶/۳/۱۸

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی پاسخ های ایمنی نانوذرات کونژوگه با فیوژن پروتئین کلرا توکسین B و ناحیه N انتهایی فلاژلین *پسودوموناس آئروژینوزا* در موش BALB/c

نگارش

فریده دکترزاده

استاد راهنما

دکتر اشرف محبتی مبارز

اساتید مشاور

دکتر مهریار حبیبی رودکنار

دکتر مهدی فروزنده مقدم

بهار ۱۳۹۱

تقدیم به

مادرم

تشکر و قدردانی

منت خدای را، عزّ و جلّ، که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت. هر نفس که فرو می رود ممدّ حیات است و چون برمی آید مفرّح ذات. پس در هر نَفَسی دو نعمت موجودست و بر هر نعمتی شکری واجب.

از دست و زبان که برآید کز عهده شکرش بدرآید
بنده همان به که ز تقصیر خویش عذر به درگاه خدای آورد
ور نه سزاوار خداوندیش کس نتواند که بجای آورد

سپاسگزارم از

استاد بزرگوار زنده یاد دکتر مرتضی ستاری، روحش شاد
استاد بزرگوار سرکار خانم دکتر اشرف محبتی مبارز
استاد بزرگوار جناب آقای دکتر مهریار حبیبی رودکنار
استاد بزرگوار جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم
استاد بزرگوار جناب آقای دکتر افشین محسنی فر

اساتید ارجمند گروه باکتری شناسی، سرکار خانم دکتر نجار پیرایه، سرکار خانم دکتر بخشی و جناب آقای دکتر بهزادیان نژاد.
جناب آقای دکتر مهدی مهدوی
کارشناسان محترم گروه سرکار خانم رفیعی، سرکار خانم صمیمی، جناب آقای میرسعید و جناب آقای عربگری.

دوستانم: مهشید محمدی پور، نیما خرم آبادی، شقایق انوری، حبیب ضیغمی، فخری حقی، هانیه آقابابا، ندا سلیمانی، ساناز پاکباطن، امید تیمور نژاد، رویا احمد رجبی، افسانه کرمستجی، صفورا درخشان، لیلی شکوهی زاده و سایر دوستانی که از راهنمایی و کمک آن ها سود بردم و در طول تحصیل لحظات خوشی را با هم گذراندیم.

و رامون

چکیده

فلاژلین، پروتئین ساختاری فلاژل، در انتهای آمینی و کربوکسیلی خود دارای دومین های حفاظت شده ای می باشد که با اتصال به TLR5 باعث برانگیختن پاسخ های ایمنی می شوند. هدف این مطالعه تولید فیوژن پروتئین کلراتوکسین B– انتهای آمینی فلاژلین تایپ a *پسودوموناس آئروژینوزا* (اسید آمینه های ۱-۱۶۱)، CTB-Flagellin$_{(1-161)}$، و کونژوگاسیون آن با نانوذرات طلا و نانوژل های کیتوزانی و بررسی پاسخ های ایمنی آن ها بود. پروتئین های نوترکیب Flagellin$_{(1-161)}$، CTB و CTB-Flagellin$_{(1-161)}$ تولید و آنتی ژنیسیتی آنها با وسترن بلاتینگ مورد تأیید قرار گرفت. آنتی سرم خرگوشی ضد Flagellin$_{(1-161)}$ به طور قابل توجهی حرکت *پسودوموناس آئروژینوزا* ۸۸۲۱M را در پلیت مهار کرد. فعالیت اتصالی CTB و CTB-Falgellin$_{(1-161)}$ با GM1-ELISA تأیید شد. نانوذرات طلا پس از تولید به Flagellin$_{(1-161)}$ و CTB-Flagellin$_{(1-161)}$ و نانوژل های کیتوزان پس از تولید به CTB-Flagellin$_{(1-161)}$ کونژوگه شدند. کونژوگاسیون با FTIR تأیید و نمونه ها به صورت زیر جلدی به موش های BALB/c تزریق شدند. آخرین رقت های IgG سرمی که با Flagellin$_{(1-161)}$ و *پسودوموناس آئروژینوزا سویه های* ۸۸۲۱M (تایپ a فلاژلین) و PaO1 (تایپ b فلاژلین) واکنش مثبت داشتند، برای هر موش تعیین شد. از سرم های غیر ایمن به عنوان کنترل منفی استفاده شد. اختلاف سطح IgG ضد فلاژلین در گروه های دریافت کننده پروتئین های کونژوگه یا امولسیفیه شده در ادجوانت فروند در مقایسه با گروه های دریافت کننده همان پروتئین ها بدون ادجوانت، به طور معنی داری بالاتر بود. آنتی سرم ها با سویه PaO1 میانکنش قابل توجهی نداشتند. آنتی بادی ضد پروتئین های کونژوگه یا امولسیفیه شده در ادجوانت فروند در مقایسه با آنتی بادی ضد همان پروتئین ها بدون ادجوانت، به طور معنی داری درصد مرگ اپسونیک بیشتری را باعث شد ($P < ۰/۰۵$). در نتیجه، انتهای آمینی فلاژلین دارای دومین های فعال ایمنی می باشد و ایمنی زایی علیه آن با کمک عوامل ادجوانتی مناسب می تواند راهی برای مبارزه با عفونت های *پسودوموناس آئروژینوزا* باشد.

واژگان کلیدی: *پسودوموناس آئروژینوزا*، انتهای آمینی فلاژلین، کلرا توکسین B، نانوذره طلا، نانوژل کیتوزان، ادجوانت

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱. *پسودوموناس آئروژینوزا* ۲

۱-۱-۱. خصوصیات کشت و کلنی ۳

۱-۱-۲. اپیدمیولوژی ۳

۱-۱-۳. فاکتور های بیماری زایی ۴

۱-۱-۴. مقاومت ضد میکروبی و درمان ۶

۱-۲. فلاژل و فلاژلین ۷

۱-۲-۱. ساختار فلاژل و نقش آن در بیماری زایی ۷

۱-۲-۲. ساختار فلاژلین و نقش آن در تحریک ایمنی ذاتی و اکتسابی ۹

۱-۲-۳. ارتباط بین انتهای آمینی فلاژلین و اتصال به TLR5 ..... ۱۴

۱-۳. کلرا توکسین و نقش آن به عنوان ادجوانت ۱۵

۱-۳-۱. ساختار زیر واحد B کلرا توکسین (CTB) ۱۶

۱-۳-۲. CTB به عنوان عامل رهاسازی آنتی ژن همراه ۱۷

۱-۳-۳. مکانیسم ادجوانتی CTB ۱۹

۱-۴. نانوذرات ۲۰

۱-۴-۱. نانوذرات طلای کلوئیدی ۲۰

۱-۴-۱-۱. تاریخچه ۲۱

۱-۴-۱-۲. روش های شیمیایی ساخت نانوذرات طلا ۲۲

۱-۴-۱-۲-۱. روش تورکویچ ۲۲

۱-۴-۱-۲-۲. روش بروست ۲۳

۱-۴-۱-۲-۳. روش پراولت ۲۳
۱-۴-۱-۳. ارزیابی نانوذرات طلا ۲۴
۱-۴-۱-۳-۱. میکروسکوپ الکترونی عبوری با رزولوشن بالا ۲۴
۱-۴-۱-۳-۲. اسپکتروسکوپی UV-vis ۲۴
۱-۴-۱-۴. نقش نانوذرات طلا در تحریک ایمنی ۲۵
۱-۴-۱-۵. اثرات سمی نانوذرات طلا ۲۷
۱-۴-۱-۶. کونژوگاسیون نانوذرات طلا به پروتئین ۲۹
۱-۴-۱-۶-۱. برخورد های الکترواستاتیک ۲۹
۱-۴-۱-۶-۲. پیوند های کووالان ۳۰
۱-۴-۲. هیدروژل ها و نانوذرات هیدروژلی (نانوژل ها) ۳۱
۱-۴-۲-۱. نانوژل های کیتوزان و خاصیت ادجوانتی آن ها ۳۱
۱-۴-۲-۲. تولید نانوژل های کیتوزان ۳۳
۱-۴-۲-۳. سمیت کیتوزان ۳۴
۱-۴-۲-۴. کونژوگاسیون نانوذرات کیتوزان به پروتئین ۳۴
۱-۵. ضرورت انجام و فرضیات این پژوهش ۳۵
فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده ۳۷
۲-۱. ایمونوتراپی و ایمونوپروفیلاکسی در برابر عفونت های *پسودوموناس آئروژینوزا* ۳۸
۲-۱-۱. فلاژل و فلاژلین ۳۹
۲-۲. CTB به عنوان ادجوانت ایمنی ۴۶
۲-۳. نانوذرات طلا به عنوان ادجوانت ایمنی ۴۷
۲-۴. نانوذرات کیتوزان به عنوان ادجوانت ایمنی ۵۰
فصل سوم: مواد و روش ها ۵۴

۳-۱. مواد ۵۵
۳-۱-۱. میکروارگانیسم ۵۵
۳-۱-۱-۱. سویه سم زای *ویبریوکلرا* ۵۵
۳-۱-۱-۲. پسودوموناس *آئروژینوزا* ۸۸۲۱M ۵۵
۳-۱-۱-۳. *اشریشیاکلی* DH5α ۵۵
۳-۱-۱-۴. *اشریشیاکلی* BL21(DE3) ۵۶
۳-۱-۱-۵. *اشریشیاکلی M15* ۵۶
۳-۱-۲. وکتور ها و کیت ها ۵۶
۳-۱-۲-۱. نقشه و ویژگی های وکتور pET28a ۵۶
۳-۱-۲-۲. نقشه و ویژگی های وکتور pQE30 ..... ۵۸
۳-۱-۲-۳. کیت ها ۵۹
۳-۱-۳. محیط های کشت باکتریایی ۶۰
۳-۱-۳-۱. محیط آب پپتونه قلیایی ۶۰
۳-۱-۳-۲. محیط تیوسولفات سیترات بایل سوکروز آگار (TCBS) ۶۰
۳-۱-۳-۳. محیط لوریا برتانی ۶۰
۳-۱-۳-۴. محیط لوریا برتانی حاوی کانامایسین و آمپیسیلین ۶۰
۳-۱-۴. محلول ها و بافر ها ۶۱
۳-۱-۴-۱. محلول IPTG ۶۱
۳-۱-۴-۲. بافر TAE 50X ۶۱
۳-۱-۴-۳. کلرید کلسیم ۰/۱ M ۶۱
۳-۱-۴-۴. مواد و محلول لازم برای الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) ۶۱
۳-۱-۴-۵. مواد و بافر های لازم برای وسترن بلاتینگ ۶۲

۳-۱-۴-۶. مواد و بافر های لازم برای خالص سازی پروتئین به روش هیبرید (Invitrogen)..... ۶۳
۳-۱-۴-۷. مواد و محلول های لازم برای آزمون الایزا..... ۶۴
۳-۲. روش ها..... ۶۵
۳-۲-۱. تهیه، کشت و شناسایی سویه سم زای *ویبریو کلرا*..... ۶۵
۳-۲-۲. تهیه، کشت و شناسایی سویه *پسودوموناس آئروژینوزای* تولید کننده فلاژل..... ۶۵
۳-۲-۳. جدا سازی قطعه ژنی کد کننده $Flagellin_{(1-161)}$ و ژن *ctxB*..... ۶۵
۳-۲-۳-۱. استخراج DNA ژنومی..... ۶۵
۳-۲-۳-۲. طراحی پرایمر..... ۶۶
۳-۲-۳-۳. تکثیر ژن های $Flagellin_{(1-161)}$ و *ctxB* با آنزیم Prime STAR..... ۶۷
۳-۲-۴. ساخت ژن فیوژن $ctxB\text{-}Flagellin_{(1-161)}$..... ۶۸
۳-۲-۴-۱. طراحی پرایمر..... ۶۸
۳-۲-۴-۲. تکثیر دو قطعه ژنی..... ۶۹
۳-۲-۴-۳. اتصال ژن های *ctxB* و $flagellin_{(1-161)}$..... ۶۹
۳-۲-۵. استخراج پلاسمیدها..... ۷۱
۳-۲-۶. کلون سازی ژن ها..... ۷۱
۳-۲-۶-۱. هضم آنزیمی ژن ها..... ۷۱
۳-۲-۶-۲. هضم آنزیمی پلاسمید های pET28a و pQE30..... ۷۲
۳-۲-۶-۳. اتصال ژن ها به پلاسمید های مناسب..... ۷۳
۳-۲-۶-۴. تهیه سلول مستعد از باکتری DH5α..... ۷۵
۳-۲-۶-۵. ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی..... ۷۶
۳-۲-۶-۶. غربالگری کلون‌های حاوی وکتورهای نوترکیب..... ۷۷
۳-۲-۷. بیان وکتورهای نوترکیب..... ۷۸

۳-۲-۷-۱. ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب در میزبان بیانی ۷۸
۳-۲-۷-۲. القاء بیان ژن های *flagellin$_{(1-161)}$, ctxB, ctxB-flagellin$_{(1-161)}$* ۷۹
۳-۲-۷-۳. ارزیابی بیان پروتئین های نوترکیب *Flagellin$_{(1-161)}$, CTB, CTB-Flagellin$_{(1-161)}$* ۷۹
۳-۲-۷-۴. الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۸۰
۳-۲-۷-۴-۱. ساخت ژل های متراکم کننده و جدا کننده ۸۰
۳-۲-۷-۴-۲. روش الکتروفورز ۸۱
۳-۲-۷-۴-۳. رنگ آمیزی و رنگ بری ژل ۸۱
۳-۲-۸. تخلیص پروتئین های نوترکیب ۸۱
۳-۲-۸-۱. کشت انبوه ۸۱
۳-۲-۸-۲. تهیه لیزات سلولی ۸۲
۳-۲-۸-۳. تخلیص با استفاده از کروماتوگرافی *میل ترکیبی* ۸۲
۳-۲-۸-۴. سنجش پروتئین به روش برادفورد ۸۳
۳-۲-۹. آزمون مهار حرکت ۸۴
۳-۲-۹-۱. تهیه آنتی سرم پلی کلونال علیه Flagellin$_{(1-161)}$ ۸۴
۳-۲-۹-۲. روش انجام آزمون ۸۴
۳-۲-۱۰.آزمون وسترن بلات ۸۵
۳-۲-۱۲. آزمون GM1-ELISA ۸۶
۳-۲-۱۲. ساخت نانوذرات ۸۷
۳-۲-۱۲-۱. ساخت نانوذرات طلا ۸۷
۳-۲-۱۲-۲. ساخت نانوارگانوژل ۸۸
۳-۲-۱۲-۳. ساخت نانوهیدروژل ۸۸
۳-۲-۱۳. ارزیابی نانوذرات ۸۹

۳-۲-۱۳-۱. اسپکتروفوتومتری UV-vis ۸۹
۳-۲-۱۳-۲. عکسبرداری با TEM ۸۹
۳-۲-۱۳-۳. عکسبرداری با SEM ۸۹
۳-۲-۱۴. کونژوگاسیون فیوژن پروتئین CTB-Flagellin$_{(1-161)}$ به نانوذرات ۸۹
۳-۲-۱۴-۱. کونژوگاسیون فیوژن پروتئین CTB-Flagellin$_{(1-161)}$ به نانوذرات طلا ۸۹
۳-۲-۱۵-۲. کونژوگاسیون فیوژن پروتئین CTB-Flagellin$_{(1-161)}$ به نانوژل های کیتوزان ۹۰
۳-۲-۱۵. تأیید کونژوگاسیون با روش طیف سنجی FTIR ۹۱
۳-۲-۱۶. بررسی میزان آلودگی نمونه ها به LPS ۹۱
۳-۲-۱۷. آزمون سمیت در موش ۹۱
۳-۲-۱۸. ارزیابی پاسخ های ایمنی ۹۲
۳-۲-۱۸-۱. ایمونیزاسیون فعال ۹۲
۳-۲-۱۸-۲. آزمون CheckerBoard ۹۳
۳-۲-۱۸-۳. سنجش سطح IgG سرمی علیه Flagellin$_{(1-161)}$ ۹۳
۳-۲-۱۸-۴. سنجش سطح IgG سرمی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* ۹۴
۳-۲-۱۹. آزمون اپسونوفاگوسیتوز ۹۵
۳-۲-۱۹-۱. جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش ۹۵
۳-۲-۱۹-۲. سرم حیوانات ایمن شده ۹۶
۳-۲-۱۹-۳. منبع خارجی کمپلمان ۹۶
۳-۲-۱۹-۴. سوسپانسیون باکتریایی ۹۶
۳-۲-۱۹-۵. روش انجام آزمون اپسونوفاگوسیتوز ۹۶
۳-۲-۲۰. محاسبات آماری ۹۷
فصل چهارم: یافته ها و نتایج ۹۸

۴-۱. کشت و شناسایی سویه سم زای *ویبریو کلرا* ۹۹
۴-۱-۱. کشت ۹۹
۴-۱-۲. رنگ آمیزی گرم ۹۹
۴-۱-۳. آزمون اکسیداز ۱۰۰
۴-۲. کشت و شناسایی *پسودوموناس آئروزینوزای* تولید کننده فلاژل ۱۰۱
۴-۲-۱. کشت ۱۰۱
۴-۲-۲. رنگ آمیزی گرم ۱۰۱
۴-۲-۳. آزمون اکسیداز ۱۰۲
۴-۳. جداسازی قطعه ژنی کد کننده $Flagellin_{(1-161)}$ و ژن *ctxB* ۱۰۲
۴-۳-۱ . تکثیر *ctxB* با PCR ۱۰۲
۴-۳-۲. تکثیر ژن $flagellin_{(1-161)}$ با PCR ۱۰۳
۴-۴. ساخت ژن فیوژن $ctxB\text{-}flagellin_{(1-161)}$ ۱۰۴
۴-۴-۱. تکثیر دو قطعه ژنی با PCR ۱۰۴
۴-۴-۲. هضم و اتصال محصول PCR ژن های *ctxB* و $flagellin_{(1-161)}$ ۱۰۴
۴-۴-۳. تکثیر ژن $ctxB\text{-}flagellin_{(1-161)}$ با PCR ۱۰۵
۴-۵. ساخت وکتور های نوترکیب ۱۰۶
۴-۵-۱. هضم دو آنزیمی وکتورها و ژن ها ۱۰۶
۴-۵-۲. اتصال وکتور ها و ژن ها ۱۰۶
۴-۵-۳. تأیید وکتورهای نوترکیب ۱۰۶
۴-۶. ثبت ژن های $flagellin_{(1-161)}$ و $ctxB\text{-}flagellin_{(1-161)}$ ۱۰۹
۴-۷. بیان پروتئین های نوترکیب CTB, $Flagellin_{(1-161)}$, $CTB\text{-}Flagellin_{(1-161)}$ ۱۰۹
۴-۸. تخلیص پروتئین های نوترکیب ۱۰۹

۴-۸-۱. بررسی اشکال پنتامریک پروتئین های CTB و $CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۱۱
۴-۸-۲. تعیین غلظت پروتئین ها..... ۱۱۱
۴-۹. آزمون مهار حرکت..... ۱۱۲
۴-۱۰. آزمون وسترن بلات..... ۱۱۳
۴-۱۱. آزمون GM1-ELISA..... ۱۱۶
۴-۱۲. یافته های مربوط به نانوذرات طلا و نانوژل های کیتوزان..... ۱۱۷
۴-۱۲-۱. ارزیابی نانوذرات طلا و نانوژل های کیتوزان..... ۱۱۷
۴-۱۲-۱-۱. اسپکتروسکوپی UV-vis ۱۱۷
۴-۱۲-۱-۲. عکس برداری با TEM ۱۱۸
۴-۱۲-۱-۳. عکس برداری با SEM ۱۱۹
۴-۱۲-۲. تأیید کونژوگاسیون با بررسی طیف سنجی FTIR ۱۱۹
۴-۱۲-۳. تعیین افیکیسی کونژوگاسیون..... ۱۲۰
۴-۱۳. بررسی میزان آلودگی نمونه ها به LPS ۱۲۰
۴-۱۴. آزمون سمیت در موش..... ۱۲۰
۴-۱۵. ارزیابی پاسخ های ایمنی..... ۱۲۰
۴-۱۵-۱. سنجش سطح IgG سرمی علیه $Flagellin_{(1\text{-}161)}$..... ۱۲۱
۴-۱۵-۲. سنجش سطح IgG سرمی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا*..... ۱۲۳
۴-۱۶. آزمون اپسونوفاگوسیتوز..... ۱۲۵
فصل پنجم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۲۷
۵-۱. چرا برای مبارزه با عفونت های *پسودوموناس آئروژینوزا* نیاز به واکسن داریم؟..... ۱۲۸
۵-۲. فلاژلین به عنوان عامل افزایش دهنده پاسخ های ایمنی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا*..... ۱۲۹

۵-۳. انتهای آمینی فلاژلین ۱۳۰
۵-۴. نیاز به پژوهش روی ادجوانت های ایمنی نوین ۱۳۱
۵-۵. تولید پروتئین ها با تکنولوژی DNA نوترکیب ۱۳۳
۵-۶. اهمیت اتصال دهنده برای اتصال پروتئین ها به CTB ۱۳۴
۵-۷. بیان و خالص سازی پروتئین های نوترکیب ۱۳۶
۵-۸. ارزیابی خواص آنتی ژنیک و بیولوژیک پروتئین های نوترکیب ۱۳۷
۵-۹. ارزیابی پاسخ IgG علیه $Flagellin_{(1-161)}$ در گروه های ایمن ۱۳۹
۵-۱۰. ارزیابی پاسخ IgG علیه پسودوموناس *آئروژینوزا* در گروه های ایمن ۱۴۵
۵-۱۱. ارزیابی مرگ اپسونیک سرم های گروه های ایمن ۱۴۶
۵-۱۲. نتیجه گیری ۱۴۸
۵-۱۳. پیشنهادها ۱۴۸
فهرست منابع ۱۵۰
پیوست ها ۱۶۶
پیوست الف ۱۶۷
پیوست ب ۱۷۷
چکیده انگلیسی ۱۸۱

فهرست جداول

جدول ۱-۱. فاکتورهای بیماری زایی پسودوموناس *آئروژینوزا* ۵

جدول ۱-۲. خلاصه ای از اطلاعات جمع آوری شده از سمیت سلولی نانوذرات طلا..... ۲۹

جدول ۳-۱. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای هضم آنزیمی دو قطعه ژنی با آنزیم *HindIII*..... ۶۹

جدول ۳-۲. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای اتصال *ctxB* و $Flagellin_{(1-161)}$..... ۷۰

جدول ۳-۳. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای هضم آنزیمی ژن ها..... ۷۲

جدول ۳-۴. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای هضم آنزیمی پلاسمید ها..... ۷۳

جدول ۳-۵. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای اتصال ژن ها به پلاسمید های مناسب..... ۷۴

جدول ۳-۶. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای هضم آنزیمی ژن $ctxB\text{-}flagellin_{(1-161)}$ و وکتور pQE30..... ۷۴

جدول ۳-۷. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای اتصال ژن $ctxB\text{-}flagellin_{(1-161)}$ به وکتور pQE30..... ۷۵

جدول ۳-۸. مواد، مقادیر و شرایط لازم برای برای هضم دو آنزیمی وکتور های نوترکیب..... ۷۸

جدول ۳-۹. میزبان بیانی و مقدار آنتی بیوتیک استفاده شده برای هر وکتور نوترکیب..... ۷۸

جدول ۳-۱۰. گروه های مختلف موشی، مقدار ماده تزریقی و ادجوانت استفاده شده برای هر گروه..... ۹۲

جدول۴-۱۱. میانگین نتایج بدست آمده از پاسخ IgG تولید شده علیه $Flagellin_{(1-161)}$ در گروه های مختلف..... ۱۲۳

جدول۴-۱۲. میانگین نتایج بدست آمده از پاسخ IgG تولید شده علیه پسودوموناس *آئروژینوزا* سویه های ۸۸۲۱M و PaO1 در گروه های مختلف..... ۱۲۴

جدول ب-۱. مقایسه بین گروهی معنی داری اختلاف میانگین log_{10} عکس آخرین رقت مثبت IgG علیه $Flagellin_{(1-161)}$ با استفاده از آزمون آماری ANOVA (LSD)..... ۱۷۷

جدول ب-۲. مقایسه بین گروهی معنی داری اختلاف میانگین log_{10} عکس آخرین رقت مثبت IgG علیه پسودوموناس *آئروژینوزا* سویه ۸۸۲۱M ۱۷۸

جدول ب-۳. مقایسه بین گروهی معنی داری درصد مرگ اپسونیک پسودوموناس *آئروژینوزا* ۸۸۲۱M ۱۷۹

فهرست نمودارها

نمودار۴-۱. آزمون اتصال GM1 پروتئین های نوترکیب CTB و $CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ تولید شده در *اشریشیا کلی* M15 با استفاده از آنتی بادی خرگوشی ضد CTB ۱۱۶

نمودار۴-۲. آزمون اتصال GM1 پروتئین های نوترکیب CTB، $CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ و نانوذرات کونژوگه با $CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ با استفاده از آنتی بادی موشی ضد CTB ۱۱۷

نمودار ۴-۳. ارزیابی اسپکتروسکوپی UV-vis نانوذرات طلا ۱۱۸

نمودار ۴-۴. میانگین log_{10} عکس آخرین رقت مثبت IgG علیه $Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۲۲

نمودار ۴-۵. میانگین log_{10} عکس آخرین رقت مثبت IgG علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* ۱۲۴

نمودار ۴-۶. درصد مرگ اپسونیک *پسودوموناس آئروژینوزا* M۸۸۲۱ ..... ۱۲۶

نمودار الف-۱. طیف FTIR نانوذرات طلا ۱۶۷

نمودار الف-۲. طیف FTIR فیوژن پروتئین $CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۶۸

نمودار الف-۳. طیف FTIR $AuNP\text{-}CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۶۹

نمودار الف-۴. طیف FTIR $Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۷۰

نمودار الف-۵. طیف FTIR $AuNP\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۷۱

نمودار الف-۶. طیف FTIR کیتوزان ۱۷۲

نمودار الف-۷. طیف FTIR نانوهیدروژل ۱۷۳

نمودار الف-۸. طیف FTIR $CNHG\text{-}CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۷۴

نمودار الف-۹. طیف FTIR نانوارگانوژل ۱۷۵

نمودار الف-۱۰. طیف FTIR $CNOG\text{-}CTB\text{-}Flagellin_{(1\text{-}161)}$ ۱۷۶