بسم الله الرحمن الرحیم

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان

تولید فیوژن پروتئین از قطعات اپی‌توپی توکسین بتا و اپسیلون *Clostridium perfringens*

استادان راهنما:

دکتر معصومه بحرینی

دکتر محسن فتحی نجفی

پژوهشگر:

مینا شعبان

اسفند ۱۳۹۲

تشکر و قدردانی

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

پس از حمد و ثنای پروردگار بر خود لازم می دانم از محضر استاد عزیزم جنای آقای دکتر نجفی به پاس آنچه از علم و اخلاق به من آموختند و به پاس لحظه لحظه محبت های دلسوزانه شان و تمام کمک ها و پشتیبانی هایشان و خاطرات شیرینی که برایم رقم زدند، صمیمانه تشکر کنم . همچنین از استاد گرامی ام خانم دکتر معصومه بحرینی به خاطر تمام محبت ها و کمک هایشان بی نهایت سپاسگزارم.

با قدردانی از یاری های دلسوزانه ی سرکار خانم مجیدی کارشناس محترم بخش تحقیقات موسسه واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق و جناب آقای مهروز ، به خاطر تمام محبت های بی دریغشان ، از درگاه خداوند برای ایشان آروزی سلامت و سعادت و موفقیت روزافزون دارم .

و در پایان از تمام کارکنان محترم موسسه واکسن و سرم سازی رازی ، و تمام دوستان عزیزم ممنون و سپاسگزارم.

مینا شعبان

۱۳۹۲

تقدیم به محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم،

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی، به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است، به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید، و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیم به همسر عزیزم

که مهربانی اش امید زندگیم و پناه خستگیم است، او که از آغاز راه همواره مشوق، پشتیبان و همگام من بوده، و

محیطی سرشار از سلامت، امنیت، آرامش و آسایش برایم فراهم نمود.

تقدیم به خانواده خوبم،

همسفران مهربان زندگیم به خاطر همه ی محبت هایشان.

چکیده

در بعضی موارد پاسخ‌های ایمنی القا شده توسط نواحی اپی‌توپی یک آنتی‌ژن نسبت به کل آن آنتی‌ژن قوی تر عمل می کند زیرا از اتلاف انرژی سیستم ایمنی روی نواحی غیرضروری جلوگیری کرده و عمدتا بر روی نواحی آنتی‌ژنیک آنتی‌ژن متمرکز می‌شود. از این رو تهیه بخشی از پروتئین و یا اپی‌توپ آنتی‌ژن

که بیشترین تحریک کنندگی را در میزبان ایجاد می‌نماید، می تواند در کنار چندین اپی‌توپ دیگر از آنتی‌ژن‌های مختلف بشکل یک پپتید ترکیبی (fusion protein) با کارآئی بالا برای ایجاد ایمنی سریع و چندگانه در میزبان به کار گرفته شود. کلستریدیوم پرفرنژنس عامل بیماری‌های مهلکی از جمله انتریت نکروتیک، انتروتوکسمی، قانقاریا و... در انسان و دام است، از این رو مطالعه‌ی آنتی‌ژن‌های آن از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از این پروژه نیز تهیه‌ی فیوژن پروتئینی متشکل از نواحی با آنتی‌ژنیسیته‌ی بالا از توکسین بتا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنژنس و بررسی خواص آنتی‌ژنیک آن می باشد. برای این منظور ابتدا قطعات اپی‌توپی دو توکسین تکثیر یافته و پس از برش با آنزیم‌های مناسب، توسط لینکری که طراحی شد به یکدیگر متصل شدند. فیوژن ژن حاصل در وکتور pTZ57R و pET21a(+) کلون گردید. وکتور pET21a(+) حاوی قطعه‌ی فیوژن، به سلول بیانی *E.coli BL21(DE3)* منتقل و پروتئین نوترکیب بیان گردید. بیان پپتید نوترکیب و ویژگی‌های آنتی‌ژنیک آن با استفاده از روش‌های ELISA و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که فیوژن پروتئین نوترکیب قادر است به خوبی با آنتی بادی‌های ضد توکسین بتا و اپسیلون واکنش دهد. فیوژن پروتئین توسط کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل بصورت نیمه خالص تهیه و جهت تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه آن، به موش تزریق شد. نتایج نشان داد که آنتی بادی نوترکیب ضد فیوژن پروتئین قادر است واکنش مناسبی با توکسین‌های بتا و اپسیلون برقرار نموده و نسبت به آنتی بادی طبیعی از حساسیت بالاتری برخوردار می باشد. بنابراین آنتی بادی نوترکیب ضد فیوژن پروتئین می تواند جایگزین مناسبی برای آنتی بادی طبیعی ضد دو توکسین باشد و در طراحی کیت‌های تشخیصی برای تشخیص کلینیکی توکسین بتا و اپسیلون به کار گرفته شود. همچنین در صورت بهینه نمودن تولید و واکنش‌های نهائی بعنوان کاندید واکسن نیز پیشنهاد گردد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم پرفرنژنس، اپسیلون توکسین، بتا توکسین، فیوژن پروتئین، نواحی آنتی‌ژنیک، ایمنی‌زایی

فهرست مطالب

فصل اول : کلیات ۱
۱-۱-جنس کلستریدیوم ۱
۱-۱-۱-معرفی کلستریدیوم پرفرنژنس ۲
۱-۱-۲-توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنژنس ۴
۱-۳-اهمیت مطالعه روش‌های تشخیصی و درمانی کلستریدیوم پرفرنژنس ۱۲
۱-۴-آنتی‌ژنیسیته و ایمنی‌زایی ۱۴
۱-۵- اپی‌توپ (شاخص آنتی‌ژنی) ۱۴
۱-۵-۱- انواع اپی‌توپ‌ها :..... ۱۵

۱-۵-۲- پیش بینی اپی‌توپ‌ها ۱۶
۱-۶- آنتی بادی‌ها ۱۷
۱-۷- فناوری DNA نوترکیب ۱۹
۱-۷-۱- کلونینگ ۱۹
۱-۷-۲- انواع وکتورهای پلاسیمدی در *E.coli* ۲۱
۱-۷-۵- عوامل موثر بر میزان بیان پروتئین نوترکیب ۲۳
۱-۷-۶- تولید آنتی‌ژن با استفاده از فناوری DNA نوترکیب ۲۴
۱-۷-۶-۱- کاربرد آنتی‌ژن‌های نوترکیب ۲۵
۱-۸- واکسن‌های کلستریدیوم پرفرنژنس کامل و توکسوئیدی ۲۸
۱-۹- نقش آنتی‌ژن‌های نوترکیب در تولید واکسن‌ها ۲۸
۱-۱۰- قطعات زیرواحد آنتی‌ژنی در تهیه‌ی واکسن ۲۹
۱-۱۱- پروتئین فیوژن ۳۱
۱-۱۱-۱- انواع فیوژن پروتئین‌ها (در یک نگاه کلی) ۳۱
۱-۱۱-۲- طراحی و مهندسی فیوژن پروتئین ۳۳
۱-۱۱-۳- تولید فیوژن پروتئین‌ها ۳۴
۱-۱۱-۴- کاربرد فیوژن پروتئین‌ها ۳۵
۱-۱۱-۶- لینکر ۳۸
۱-۱۱-۶-۱- لینکرهای تجربی در فیوژن پروتئین‌های نوترکیب ۳۸
۱-۱۱-۶-۲- لینکرهای انعطاف پذیر ۳۹
۱-۱۱-۶-۳- لینکرهای سخت ۳۹
۱-۱۱-۶-۴ لینکرهای قابل جداشدن در محیط داخل بدن ۳۹
۱-۱۲- مروری بر تحقیقات گذشته ۴۰
۱-۱۳- اهداف تحقیق ۴۳
فصل دوم : مواد و روش‌ها ۴۴
۲-۱- مطالعات بیوانفوراتیک و طراحی لینکر ۴۴
۲-۲- انتقال ناقل نوترکیب حاوی قطعات ۵ بتا و ۱۴ اپسیلون به سلول مستعد ۴۶
۲-۲-۱- تهیه سلول مستعد ۴۶
۲-۲-۲- انتقال ناقل نوترکیب به سلول مستعد (ترانسفورماسیون) ۴۶
۲-۳- تایید کلنی‌های مثبت با واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۷
۲-۳-۱- استخراج سریع پلاسمید(جوشاندن) ۴۷
۲-۳-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۷
۲-۴- کشت و نگه داری کلون‌های مثبت ۴۹
۲-۵- محیط‌های کشت باکتری ۴۹
۲-۶- استخراج پلاسمیدهای نوترکیب(به روش قلیایی) ۵۰
۲-۷- تعیین کمیت و کیفیت پلاسمیدهای استخراجی ۵۲
۲-۷-۱- الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۵۲
۲-۷-۲- تعیین غلظت با دستگاه نانودراپ ۵۲
۲-۸- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵۲
۲-۸-۱- اطمینان از جهت صحیح قطعات بتا/۵ و اپسیلون/۱۴ در وکتور pTZ57R ۵۲

۲-۸-۲- تکثیر DNA توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵۵
۲-۹- خالص سازی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵۶
۲-۹-۱- استخراج محصول PCR از ژل آگارز ۵۶
۲-۱۰- اتصال(فیوژن) قطعات ۵۷
۲-۱۰-۱- هضم آنزیمی قطعات ۵۷
۲-۱۰-۳- واکنش الحاق(اتصال) ۵۸
۲-۱۱- استخراج قطعه‌ی فیوژن از ژل آگارز ۵۹
۲-۱۲- انتقال قطعه فیوژن به ناقل pTZ57R و(+)pET21a ۶۰
۲-۱۲-۱- هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R و (+)pET21a ۶۱
۲-۱۲-۲- استخراج پلاسمید برش خورده از ژل آگارز ۶۲
۲-۱۲-۳- الحاق قطعه‌ی فیوژن به پلاسمیدهای pTZ57R و (+)Pet21a ۶۲
۲-۱۳- انتقال ناقل نوترکیب به باکتری (DH5α) *E.coli* ۶۳
۲-۱۴- استخراج پلاسمید نوترکیب ۶۳
۲-۱۵- واکنش زنجیره ای پلیمراز برای اطمینان از اتصال قطعات اپسیلون و بتا به یکدیگر در جهت صحیح ۶۳
۲-۱۶- بیان پروتئین نوترکیب ۶۴
۲-۱۶-۱- انتقال ناقل (+)pET21a به سلول بیانی (BL21 DE3) *E.coli* ۶۴
۲-۱۶-۲- القای بیان ۶۴
۲-۱۷- استخراج پروتئین‌های نوترکیب ۶۵
۲-۱۸- ردیابی پروتئین‌ها ۶۶
۲-۱۸-۱- ردیابی پروتئین‌ها به روش الایزا (ELISA) ۶۶
۲-۱۸-۲- ردیابی پروتئین‌ها توسط SDS-PAGE ۶۷
۲-۱۸-۲-۱- تهیه ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۶۸
۲-۱۸-۲-۲- رنگ آمیزی با نیترات نقره ۷۰
۲-۱۸-۳- ردیابی پروتئین‌ها به روش دات بلات ۷۱
۲-۱۸-۴- ردیابی پروتئین‌ها توسط وسترن بلات ۷۲
۲-۱۹- خالص سازی پروتئین نوترکیب ۷۴
۲-۱۹-۱- رسوب دهی با آمونیوم سولفات ۷۴
۲-۱۹-۲- کروماتوگرافی فیلتراسیون توسط ژل ۷۵
۲-۲۰- تولید آنتی بادی پلی کلونال موشی علیه فیوژن پروتئین نوترکیب ۷۹
۲-۲۰-۱- ارزیابی آنتی بادی نوترکیب با استفاده از دات بلات ۸۰
۲-۲۰-۲- مقایسه کمی آنتی‌ژنسیته آنتی‌ژن بتا و اپسیلون توکسین با آنتی‌ژن نوترکیب BF5/EF14 ..... ۸۰
فصل سوم : نتایج ۸۱
۳-۱- مطالعات بیوانفوراتیک و طراحی لینکر ۸۱
۳-۱-۱- مطالعات گذشته ۸۲
۳-۱-۲- طراحی فیوژن پروتئین ۸۹
۳-۱-۲-۱- بررسی قطعه ۵ بتا توکسین و قطعه ۱۴ اپسیلون توکسین ۸۹
۳-۱-۲-۲- طراحی لینکر و اتصال قطعات ۹۲
۳-۲- انتقال ناقل نوترکیب حاوی قطعات ۵ بتا و ۱۴ اپسیلون به سلول مستعد ۱۰۰
۳-۲-۱- تایید کلنی‌های مثبت با واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۰۰

۳-۳- استخراج پلاسمید به روش قلیایی ۱۰۱
۳-۴- تکثیر قطعات اپسیلون و بتا توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۰۲
۳-۵- تایید قرارگیری قطعات در ناقل PTZ57R در جهت صحیح ۱۰۳
۳-۶- خالص سازی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۰۴
۳-۷- فیوژن قطعات ۱۰۵
۳-۷-۱- هضم آنزیمی قطعات ۱۰۵
۳-۷-۲- واکنش الحاق(اتصال) و استخراج فیوژن ژنBF5/EF14 از ژل آگارز ۱۰۶
۳-۸- انتقال قطعه فیوژن به ناقل pTZ57R و Pet21(a^+) ۱۰۶
۳-۸-۱-هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R و Pet21a^+ ۱۰۶
۳-۹- انتقال ناقل‌های نوترکیب به باکتری *E.coli* (DH5α) ۱۰۷
۳-۹-۱- تایید کلنی‌های سفید با واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۰۸
۳-۱۰- استخراج پلاسمیدهای نوترکیب دارای قطعه‌ی فیوژن ۱۰۹
۳-۱۱- تایید حضور قطعه نوترکیب در ناقل pET21a(+) با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۱۱
۳-۱۲- بیان پروتئین نوترکیب ۱۱۳
۳-۱۲-۱- انتقال ناقل نوترکیب pET21(a^+) به سلول بیانی *E.coli* (BL21 DE3) ۱۱۳
۳-۱۲-۲- تایید انتقال ناقل نوترکیب به BL21 ..... ۱۱۴
۳-۱۳-۲-ردیابی پروتئین‌ها به روش دات بلات ۱۱۷
۳-۱۳-۲- ردیابی پروتئین‌ها توسط SDS-PAGE ۱۱۸
۳-۱۴- خالص سازی پروتئین نوترکیب: ۱۲۰
۳-۱۴-۱-رسوب دهی با آمونیوم سولفات: ۱۲۰
۳-۱۴-۲-کروماتوگرافی فیلتراسیون توسط ژل: ۱۲۱
۳-۱۴-۳- بررسی حضور فیوژن پروتئین با استفاده از دات بلات و الایزا ۱۲۲
۳-۱۵-۲- مقایسه کمی آنتی‌ژنسیته آنتی‌ژن بتا و اپسیلون توکسین با آنتی‌ژن نوترکیب BF5/EF14 توسط روش الایزا ۱۲۳
فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری ۱۲۶
۴-۱-بحث و تفسیر نتایج ۱۲۶
منابع ۱۲۶

فهرست شکل‌ها

شکل۱-۱- تشکیل منفذ در دیواره سلول میزبان..... ۹
شکل ۱-۲- ساختار سه بعدی توکسین اپسیلون ۱۰
شکل۱-۳-تاثیر دناتورانت‌ها و هضم آنزیمی بر اپی‌توپ‌های پیوسته و ناپیوسته ۱۶
شکل۴-۱- نمای کلی مولکول آنتی بادی..... ۱۸
شکل۲-۱-کشت باکتری جهت گرفتن تک کلنی..... ۴۹
شکل۲-۲-جهت صحیح قرارگیری قطعه در وکتور pTZ57R..... ۵۳
شکل۲-۳-آغازگرهای قطعه ۵ توکسین بتا ۵۳
شکل۲-۴-آغازگرهای قطعه ۱۴ توکسین اپسیلون ۵۴
شکل۲-۵-جایگاه‌های برشی وکتور PTZ57R و موقعیت آغازگر M13..... ۵۵
شکل۲-۶-نقشه پلاسمید pTZ57R/T و مکان‌های برشی آن..... ۶۰
شکل۲-۷-نقشه‌ی pET-21a(+) (Novagene) و مکان‌های برشی آن ۶۰
شکل۲-۸-شکل صحیح اتصال قطعات اپسیلون و بتا به یکدیگر..... ۶۴
شکل۲-۹-مراحل الایزای غیرمستقیم ۶۶
شکل۲-۱۰-شکل شماتیک از ردیابی پروتئین با وسترن بلات ۷۳
شکل۲-۱۱-مراحل انجام وسترن بلات ۷۴
شکل۲-۱۲-جدول ارتباط نوع ستون کروماتوگرافی با سایز پروتئین مورد نظر ۷۶
شکل۲-۱۳-دستگاه Fraction Collector جهت جمع آوری مجزای پروتئین‌ها ۷۸
شکل۲-۱۴-دستگاه اسپکتروفوتومتر جهت پروتئین سنجی ۷۹
شکل۳-۱-پیش بینی ساختار دوم توکسین بتا به وسیله‌ی نرم افزار آنلاین PSIPRED..... ۸۵
شکل۳-۲-موقعیت‌های پیشنهادی برای ساخت پرایمرهای توکسین اپسیلون ۸۸
شکل۳-۳-قطعات توکسین اپسیلون و اندازه آن‌ها ۸۸
شکل۳-۴-توالی اسیدآمینه‌ای و ساختمان دوم قطعه ۵ توکسین بتا با استفاده از CLC Main Workbench5..... ۹۰
شکل۳-۵-توالی اسیدآمینه ای و ساختمان دوم قطعه ۱۴ توکسین اپسیلون..... ۹۰
شکل۳-۶- آنتی‌ژنیسیته‌ی قطعه ۵ توکسین بتا ۹۰
شکل۳-۷- آنتی‌ژنیسیته‌ی قطعه ۱۴ توکسین اپسیلون ۹۱
شکل۳-۸- هیدروفوبیسیته‌ی قطعه ۵ توکسین بتا ۹۱
شکل۳-۹- هیدروفوبیسیته‌ی قطعه ۱۴ توکسین اپسیلون ۹۲
شکل۳-۱۰-توالی نوکلئوتیدی لینکر پیشنهادی و جایگاه‌های برشی توالی لینکر ۹۳
شکل۳-۱۱-توالی اسیدآمینه ای لینکر ۹۳
شکل۳-۱۲-توالی اسیدآمینه ای و ساختمان دوم فیوژن پروتئین BF5/EF14..... ۹۴
شکل۳-۱۳- آنتی‌ژنیسیته فیوژن پروتئین BF5/EF14 ..... ۹۴
شکل۳-۱۴- هیدروفوبیسیته‌ی فیوژن پروتئین BF5/EF14 ..... ۹۵
شکل۳-۱۵-جایگاه برش قطعه ۵ بتا از ناقل pTZ57R جایگاه برش قطعه ۱۴ اپسیلون توکسین از ناقل pTZ57R ۹۶
شکل۳-۱۶-آنزیم‌هایی که روی لینکر جایگاه برشی دارند ۹۷
شکل۳-۱۷-توالی نوکلئوتیدی فیوژن ژنBF5/EF14 ..... ۹۸
شکل۳-۱۸-توالی اسیدآمینه ای، وزن مولکولی و pH ایزوالکتریک فیوژن پروتئین BF5/EF14..... ۹۹
شکل۳-۱۹-نتایج انتقال ناقلین نوترکیب حاوی قطعات ۵ توکسین بتا و ۱۴ توکسین اپسیلون به سلول مستعد..... ۱۰۰
شکل۳-۲۰-نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز از پلاسمید pTZ57R حاوی قطعات بتا و اپسیلون ۱۰۱

شکل۳-۲۱-تعیین غلظت پلاسمید نوترکیب pTZ57R حاوی قطعه ۱۴ توکسین اپسیلون ۱۰۲
شکل۳-۲۲-تعیین غلظت پلاسمید نوترکیب pTZ57R حاوی قطعه ۵ توکسین بتا ۱۰۲
شکل۳-۲۳-نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز با پرایمرM13 از روی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R دارای قطعات بتا و اپسیلون ۱۰۳
شکل۳-۲۴-واکنش زنجیره ای پلیمراز برای بررسی جهت قرارگیری قطعات در ناقل نوترکیب pTZ57R..... ۱۰۴
شکل۳-۲۵- بررسی کیفیت قطعات برش خورده‌ی اپسیلون، بتا و لینکر روی ژل آگارز۱.۵٪..... ۱۰۵
شکل۳-۲۶- بررسی واکنش اتصال قطعه ۵ بتا و۱۴ اپسیلون ..... ۱۰۶.
شکل۳-۲۷- بررسی واکنش هضم دوگانه در پلاسمیدهای pTZ57R و$PET21a^{+}$ ۱۰۷
شکل۳-۲۸- نتیجه انتقال ناقل نوترکیب به سلول مستعد *E.coli* (DH5α) ۱۰۸
شکل۳-۲۹- تایید انتقال ناقلین نوترکیب به سلول مستعد با واکنش زنجیره ای پلیمراز.....۱۰۹
شکل۳-۳۰-تعیین غلظت پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه فیوژن ۱۱۰
شکل۳-۳۱- تعیین غلظت پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه فیوژن..... ۱۱۰
شکل ۳-۳۲- نتایج استخراج پلاسمیدهای نوترکیب حاوی فیوژن ژن BF5/EF14 .....۱۱۱
شکل۳-۳۳- هضم آنزیمی ناقل (+)pET21a با دو آنزیم محدود کننده..... ۱۱۲
شکل ۳-۳۴- نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تایید اتصال قطعات فیوژن پروتئین در جهت صحیح..... ۱۱۳
شکل۳-۳۵- نتیجه انتقال ناقل نوترکیب (+)pET21a حاوی فیوژن ژن به سلول مستعد *E.coli* (BL21 DE3).....۱۱۳
شکل ۳-۳۶- نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی قطعه ۵ بتا و قطعه ۱۴ اپسیلون جهت تایید انتقال ناقل نوترکیب (+)pET21a به BL21 ..... ۱۱۴
شکل۳-۳۷- بررسی مقدار فیوژن پروتئین در محیط داخل سلول توسط الایزا با آنتی بادی بتا توکسین..... ۱۱۶
شکل۳-۳۸- بررسی مقدار فیوژن پروتئین در محیط داخل سلول توسط الایزا با آنتی بادی اپسیلون توکسین..... ۱۱۷
شکل۳-۳۹-نتیجه دات بلات با آنتی بادی بتا توکسین..... ۱۱۸
شکل۳-۴۰-نتیجه دات بلات با آنتی بادی اپسیلون توکسین..... ۱۱۸
شکل۳-۴۱- ردیابی فیوژن پروتئین BF5/EF14 به روش SDS-PAGE..... ۱۱۹
شکل۳-۴۲- ردیابی فیوژن پروتئین BF5/EF14 با استفاده از وسترن بلات..... ۱۲۰
شکل۳-۴۳- جذب پروتئین‌های خارج شده از ستون کروماتوگرافی ۱۲۱
شکل۳-۴۴- بررسی حضور فیوژن پروتئین در لوله‌های کروماتوگرافی توسط دات بلات..... ۱۲۲
شکل ۳-۴۵- دات بلات جهت بررسی تولید آنتی بادی برعلیه فیوژن پروتئین BF5/EF14..... ۱۲۳
شکل ۳-۴۶- نتایج واکنش متقاطع..... ۱۲۴
شکل۳-۴۷- نتایج واکنش متقاطع..... ؛ ۱۲۵
شکل۴-۱- ساختمان دوم قطعه ۵ توکسین بتا با استفاده از پایگاه اطلاعاتی GOR4.....۱۲۹
شکل۴-۲- ساختمان دوم قطعه ۱۴ توکسین اپسیلون با استفاده از پایگاه GOR4.....۱۳۰
شکل۴-۳- ساختمان دوم فیوژن پروتئین BF5/EF14 با استفاده از پایگاه داده GOR4.....۱۳۰
شکل ۴-۴- مقایسه ساختمان دوم قطعه ۵ بتا و قطعه ۱۴ اپسیلون قبل و بعد از اتصال توسط لینکر ؛..... ۱۳۱
شکل ۴-۵- مقایسه آنتی‌ژنیسیته قطعات ۵ توکسین بتا و ۱۴ توکسین اپسیلون قبل و بعد از اتصال توسط لینکر.....؛ ۱۳۱

فهرست جداول

جدول۱-۱- معرفی توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنژنس و نحوه‌ی اثر آن‌ها..... ۱۲
جدول ۲-۱- مواد و مقادیر لازم جهت تکثیر قطعات اپسیلون و بتا با واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۸
جدول ۲-۲- برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز با آغازگر اختصاصی قطعه ۵ بتا یا آغازگر M13 و آغازگرهای قطعه ۱۴ اپسیلون توکسین ۴۸
جدول۲-۳- مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگرهای داخلی قطعه۵بتا و M13..... ۵۴
جدول۲-۴- مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگرهای اپسیلون و M13..... ۵۴
جدول ۲-۵- مواد و مقادیر مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز با پرایمر M13..... ۵۶
جدول۲-۶-مواد و مقادیر مورد نیاز جهت هضم دوگانه قطعات بتا، اپسیلون و لینکر ۵۸
جدول۲-۷-مواد و مقادیر لازم جهت الحاق قطعات اپسیلون و بتا ۵۹
جدول۲-۸-عناصر ژنتیکی ناقل pET-21a(+)..... ۶۱
جدول۲-۹-مواد و مقادیر مورد نیاز برای هضم آنزیمی ناقلpTZ57R و pET21a(+)..... ۶۲
جدول ۲-۱۰- اجزای واکنش الحاق قطعه فیوژن به پلاسمیدهای pTZ57R و Pet21a(+)..... ۶۲
جدول۲-۱۱-راهنمای انتخاب درصد آکریل آمید برای جداسازی پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی ۶۸
جدول۲-۱۲-مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ژل جدا کننده ۱۵ درصد SDS-PAGE..... ۶۹
جدول۲-۱۳- مواد و مقادیر لازم جهت تهیه ژل متراکم کننده SDS-PAG ۴ درصد ۶۹
جدول۲-۱۴- مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر runnig تانک SDS-PAGE..... ۷۰
جدول ۲-۱۵- مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه محلول فیکساتیو ۷۰
جدول۲-۱۶- مواد مورد نیاز در تهیه محلول نیترات نقره ۷۰
جدول۲-۱۷- مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه محلول رنگ زا رنگ آمیزی نیترات نقره ۷۱
جدول۲-۱۸- مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر تانک وسترن بلات ۷۳
جدول ۳-۱- قطعات قابل انتظار بر اساس پرایمرهای طراحی شده. ۸۶

Abbreviation

PCR: Polymerase Chain Reaction

OPD:O-PHENYLENEDIAMINE

DAB:DIAMININOBENZIDINE

TMB: Tetramethylbenzidine

BF5: Beta Toxin Frangment 5

EF14: Epsilon Toxin Fragment 14

BF5/EF14 Fu. : Beta Toxin Fragment 5/Epsilon Toxin Fragment 14 Fusion Protein

FUSION RP : FUSION RECOMBINANT PROTEIN

BT: Beta Toxin

Rec Ab : recombinant antibody

Beta Ab : Beta toxin antibody

Epsilon Ab: Epsilon toxin antibody

فصل اول : کلیات

۱-۱-جنس کلستریدیوم

کلستریدیوم‌ها باسیل‌های میله ای شکل، گرم مثبت و بی هوازی هستند که قادرند آندوسپور تولید کنند و در بعضی گونه‌ها ممکن است اسپور مشاهده نشود (کلستریدیوم راموزوم). بیشتر گونه‌های کلستریدیوم متحرک با تاژک‌های پیرامونی هستند، به استثنای کلستریدیوم پرفرنژنس که غیر متحرک می‌باشد. برخی از گونه‌ها ساکارولیتیک بوده و از کربوهیدرات، اسید و گاز تولید می‌کنند و بسیاری از آن‌ها پروتئولیتیک می‌باشند. کلستریدیوم‌ها فاقد سیستم سیتوکروم در انتقال الکترون به اکسیژن بوده و با استفاده از آنزیم‌های فلاووپروتئین، اکسیژن را احیا کرده و آب اکسیژنه و سوپراکسید تولید می‌نمایند، همچنین این باکتری‌ها فاقد آنزیم کاتالاز و سیتوکروم پراکسیداز جهت از بین بردن فراورده‌های سمی حاصل از متابولیسم می‌باشند.(Brüggemann and Gottschalk 2009) (Ryan and Ray 2004)

این باکتری‌ها در خاک، آب و فاضلاب وجود دارند و به عنوان بخشی از فلور میکروبی طبیعی در دستگاه گوارش حیوانات و انسان‌ها می‌باشند. تاکنون بیش از ۱۰۰ گونه از کلستریدیوم شناخته شده است که بسیاری از آن‌ها ساپروفیت و بی ضرر بوده، در حالی که بعضی از آن‌ها به عنوان بیماری‌زای انسانی

شناخته شده اند و مدارک مستندی از آن‌ها به عنوان عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری‌های ذیل در دسترس است؛ کزاز (کلستریدیوم تتانی) بوتولیسم (کلستریدیوم بوتولینوم)، قانقاریا یا میونکروز (کلستریدیوم پرفرنژنس) و اسهال مرتبط با آنتی بیوتیک و کولیت (کلستریدیوم دیفیسیل). امروزه کلستریدیوم‌ها با عفونت بافت‌های نرم و پوست، مسمومیت‌های غذایی، کولیت و اسهال در ارتباط می‌باشند.

۱-۱-۱-معرفی کلستریدیوم پرفرنژنس

کلستریدیوم پرفرنژنس یک باکتری گرم مثبت بی هوازی است که قادر به تشکیل اسپور می‌باشد. این باکتری در محیط‌های گسترده ای مثل خاک، آب، فاضلاب و معمولا در روده‌ی حیوانات و انسان‌ها حضور دارد و در شرایط خاصی می‌تواند بیماری زا باشد(Rood and Cole 1991). این باکتری در انسان منجر به قانقاریا و بیماری‌هایی مثل مسمومیت غذایی و انتریت نکروتیک می‌شود در حالی‌که در سایر جانوران بیماری‌های روده ای و انتروتاکسمیک را بیشتر ایجاد می‌کند. کلستریدیوم پرفرنژنس به سلول‌های سالم هجوم نبرده بلکه توکسین‌ها و آنزیم‌های متعددی تولید میکند که مسئول زخم‌ها و علائم بیماری می‌باشند. توکسین‌های تولید شده بستگی به سویه‌ی کلستریدیوم پرفرنژنس دارد و هر نوع توکسین سندروم خاصی را ایجاد میکند. بنابراین، تشخیص صحیح پاتووارهای کلستریدیوم پرفرنژنس در مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین در اجرای اقدامات پیشگیرنده‌ی موثر مثل واکسیناسیون بسیار حیاتی است. سویه‌های این باکتری براساس تولید ۴ توکسین اصلی (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) به ۵ ایزوتایپ (A,B,C,D,E) تقسیم می‌شوند(Cavalcanti, Porto et al. 2004). البته این باکتری می‌تواند تا ۱۶ نوع توکسین با ترکیبات مختلف را تولید کند که از آن جمله می‌توان به توکسین‌های کشنده ای مثل پرفرینگولیزین O (PFO)، انتروتوکسین (CPE) و بتا۲ توکسین (CPB2) اشاره کرد(Uzal, Vidal et al. 2010)

کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ A، گسترده بوده و مسئول ایجاد قانقاریا در انسان می‌باشد که در ابتدا با آلفا توکسین و توکسین تتا ایجاد می‌شود. اساس بیماری زایی سوش‌های غیر انتروتاکسمیایی

کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ A که به وفور از حیوانات مبتلا به انتروتاکسمی و انتریت جدا می‌شوند، معلوم نشده است.

کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ B تولید کننده سه توکسین آلفا (α)، بتا(β) و اپسیلون(ε) می‌باشد اما بیشتر توکسین بتا (β) را تولید می‌کند که باعث بیماری انتروتوکسمی و نکروز بافت‌ها در دام‌هایی مثل گوساله‌ها، بره‌ها و بچه خوک‌ها می‌شوند. در انسان نیز این تیپ از باکتری به همراه سه توکسین تولیدی باعث ایجاد مسمومیت و نکروز بافتی و ورم روده‌ای می‌شود(Niilo 1980).

کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ C دو توکسین α و β را تولید می‌کند که همراهی این دو توکسین با هم باعث بیماری پیگ بل[1] (التهاب نکروزان روده) در کودکان می‌شود که عمده ترین عامل مرگ و میر در کودکان گینه نو می‌باشد(Niilo 1980).

کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ D، بیشتر از سایر تیپ‌ها شناخته شده است. در این تیپ از باکتری توکسین‌های α و ε تولید می‌شود که توکسین اپسیلون بیشترین میزان تولید را دارد. این تیپ باعث بیماری انتروتوکسمی کشنده در حیوانات اهلی به خصوص گوسفندان و بره‌ها می‌شود(Niilo 1980).

کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ E تولید کننده توکسین یوتا (t) و توکسین آلفا است. برخلاف تیپ D این تیپ هنوز به طور کامل شناسایی نشده است و باعث بیماری‌های مشابه از جمله نکروز بافتی و اسهال و ورم روده و انتروتوکسمی در گوساله‌ها و بره‌ها می‌شود(Billington, Wieckowski et al. 1998).

[1] Pig bell

۱-۱-۲-توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنژنس

۱-۱-۲-۱-توکسین آلفا

آلفا توکسین(CPA) توسط همه‌ی سویه‌های کلستریدیوم پرفرنژنس تولید می‌شود، البته سویه‌های تیپ A مقادیر بیشتری از توکسین آلفا را نسبت به سایر تیپ‌های کلستریدیوم تولید می‌کنند. CPA نمونه‌ی کلاسیکی از یک توکسین است که به عنوان یک آنزیم عمل کرده و با تجزیه‌ی فسفاتیدیل کولین و اسفنگومیلین موجود در غشای سلول‌های یوکاریوتی، به غشای اریتروسیت‌ها و سایر سلول‌های جانوران آسیب می‌رسانند. نقش این توکسین در بیماری زایی حیوانات هنوز مورد بحث و گفتگو است. در گوسفندان باعث ایجاد بیماری بره‌ی زرد که فرمی نادر از انتروتاکسمی حاد در بره‌ها است می‌شود. توکسین آلفا به عنوان اصلی ترین توکسین در ایجاد بیماری قانقاریا در انسان دخیل می‌باشد. در این بیماری افراد بیمار به دلیل درگیر شدن بافت‌ها و پیشرفت نکروز مجبور به از دست دادن اعضای بدن خود می‌شوند و در نمونه‌های پیشرفته و وخیم باعث ایجاد شوک و مرگ آن‌ها می‌شود(Uzal, Vidal et al. 2010).

۱-۱-۲-۲-توکسین یوتا (IXT)

نقش توکسین یوتای کلستریدیوم پرفرنژنس(IXT) در بیماری‌های حیوانات زیاد شناسایی نشده است با این حال احتمال می‌رود که عامل بیماری‌های روده ای ایجاد شده توسط کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ E، این توکسین باشد.(Uzal, Vidal et al. 2010)

۱-۱-۲-۳-توکسین بتا (CPB)

توکسین بتا که توسط کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ B و C تولید می‌شود مسئول آنتریت نکروتیک و انتروتاکسمی به ویژه در نوزادان بسیاری از گونه‌های حیوانی است. توکسین CPB2 که کشنده و نکروز دهنده است توسط همه‌ی تیپ‌های کلستریدیوم پرفرنژنس تولید می‌گردد و عامل بسیاری از بیماری‌های

گونه‌های مختلف حیوانات در نظر گرفته می‌شود، اما اطلاعات خیلی کمی برای اثبات این ادعا در دست است..(Uzal, Vidal et al. 2010)

ژن کد کننده توکسین بتا cpb نام دارد و در پلاسمید بزرگی از کلستریدیوم پرفرنژنس قرار دارد. این ژن یک پروتوکسین با ۳۳۶ اسید آمینه را کد می‌کند. ۲۶ اسید آمینه ناحیه N-ترمینال این پروتوکسین به عنوان یک توالی سیگنالی در طول ترشح حذف می‌شود و در نهایت، cpb یک پروتئین با وزن مولکولی ۳۴.۸۶۱ کیلودالتون کد می‌کند. ژن توکسین بتا از تیپ‌های B و C توالی یابی شده است که شباهت زیادی در منطقه OR توکسین بتا این تیپ‌ها مشاهده شده است که حتی منطقه شاین دالگارنو[1] این توکسین در هر دو تیپ ۷bp بالاتر از اولین کدون شروع قرار گرفته است. (Uzal, Vidal et al. 2010)

اسیدآمینه آرژنین در موقعیت ۲۱۲ توکسین بتا مهمترین اثر را در فعالیت کشندگی توکسین دارد. دو اسیدآمینه‌ی لوسین در موقعیت ۲۶۵ و ترئونین در موقعیت ۲۶۶ در اتصال توکسین به رسپتور سلولی نقش دارند(Nagahama, Kihara et al. 1999). ناحیه‌ی N-ترمینال بین آمینواسید ۱۰۲-۸۰، ناحیه‌ی ۱۴۹-۱۴۶ و ناحیه C-ترمینال بین ۲۹۰-۲۸۱ در cpb سطوح در دسترس پروتئین هستند .(Hunter, Brown et al. 1993)

توکسین بتا جزو خانواده لوکوسیدین- همولیزین بوده و با ایجاد کانال‌هایی در غشا باعث لیز سلولی می‌شوند (Hunter, Brown et al. 1993, Nagahama, Hayashi et al. 2003). توکسین بتا یک پروتئین حساس به تریپسین با LD50[2] =۳۱۰ng/kg بوده (Hsieh, Stewart et al. 1998) (Jin et al., 1996) که توسط سویه‌های B و C کلستریدیوم پرفرنژنس تولید می‌شود. توکسین بتا یک پروتئین ناپایدار در مقابل دما است و اگر ۱ ساعت در ۵۰ درجه سانتی گراد نگهداری شود، حدود ۹۰٪ از فعالیت خود را از دست می‌دهد و تقریباً غیرفعال می‌شود. توکسین بتا اولین بار توسط ساکوری[3] و دانکن[4] در

[1] Shine dalgarno sequence
[2] Lethal dose
[3] Sakurai
[4] Duncan

سال ۱۹۷۷ خالص سازی و شناسایی شد(Sakurai and Duncan 1977). به دنبال آن ژن توکسین بتا - کلون و توسط‌هانتر[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۳ توالی یابی شد. آن‌ها با استفاده از پروب الیگونوکلئوتیدی طراحی شده برای توالی پایانه‌ی N توکسین خالص شده، توانستند ژن توکسین بتا را از کلستریدیوم پرفرنژنس تیپ B جدا کنند(Hunter, Brown et al. 1993).

تیمارکردن توکسین بتا با تیول تغییر یافته یا عوامل اکسیدکننده باعث از بین رفتن فعالیت کشندگی توکسین بتا می‌شود. در cbp ناحیه ای غنی از گلاسین در موقعیت ۱۳۸-۱۳۳ حضور دارد که در همه توکسین‌ها حضور داشته و دارای عملکرد مشابه می‌باشند. ناحیه پایانه‌ی C توکسین آلفا هیدوروفیل بوده و این ناحیه باعث اتصال توکسین به سلول می‌شود در حالیکه ناحیه پایانه‌ی N توکسین بتا هیدورفوب بوده و بین غشای سلولی جای می‌گیرد(Bhakdi and Tranum-Jensen 1991). گیبرت[2] و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش کردند که توکسین بتا برای موش مرگ آور بوده و خاصیت سیتوتوکسیسیتی در سلول‌های رده ۴۰۷ روده ای دارد(Gibert, Jolivet-Renaud et al. 1997). توکسین بتا یکی از فاکتورهای ویرولانس[3] کلستریدیوم پرفرنژنس می‌باشد. توالی اسیدآمینه‌ای این توکسین ۲۹-۱۷٪ تشابه با توکسین آلفا استافیلوکوکوس اورئوس و توکسین‌های مشابه دارد. توکسین بتا خالص شده از کلستریدیوم پرفرنژنس هم به اشکال مونومریک[4] و هم مولتی مریک[5] بوده در حالیکه توکسین بتا نوترکیب که در Ecoli تولید می‌شود کاملاً به شکل مولتی مریک می‌باشد(Hunter, Brown et al. 1993).

[1] Hunter
[2] Gibert
[3] virulence factor
[4] monomeric
[5] multimeric