بسم الله
الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای حسین ثباتی رشته انگل‌شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان «ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمیدکدکننده آنتی ژن SAG3 و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کد کننده SAG1 و SAG3 توکسوپلاسما گونده ای در موش BALB/c» در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۱۶ ارائه کردند.

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 عبدالحسین دلیمی اصل	
استاد مشاور	دکتر بهرام کاظمی	
استاد مشاور	دکتر فاطمه غفاری فر	
استاد ناظر	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر زهره شریفی	
استاد ناظر	دکتر فریبا خوش زبان	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر جاوید صدرایی	

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 آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- 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 ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ 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 **حسین ثباتی** دانشجوی رشته **انگل‌شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی**۱۳۸٦**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 ۹۰/۱۱/۱۷

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 **انگل‌شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر عبدالحسین دلیمی اصل** ، مشاوره **دکتر بهرام کاظمی دمنه و دکتر فاطمه غفاری فر** 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 ٤ : 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 ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **حسین ثباتی** دانشجوی رشته **انگل‌شناسی پزشکی** مقطع **دکتری تخصصی** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی حسین ثباتی

تاریخ و امضا ۹۰/۱۱/۱۷

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته انگل‌شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کدکننده آنتی‌ژن SAG3 وDNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کدکننده SAG1 وSAG3 توکسوپلاسما گونده ای درموش BALB/c

تهیه وتنظیم

حسین ثباتی

استاد راهنما

دکتر عبدالحسین دلیمی

اساتید مشاور

دکتر بهرام کاظمی

دکتر فاطمه غفاری فر

۱۳۹۰

تقدیم به :

پربهانه ترین گنجهای عالم:

پدرو مادرعزیزو بزرگوارم که قلب پاکشان منبع دعای خیردرزندگیم و وجودشان برایم سرمایه جاودانی است.

همسرصبور ومهربانم که دریای بیکران محبت است وبا صبروشکیبایی درکلیه مراحل کاروتحصیل یار ویاورمن بوده وفرزندان عزیزم شایان وشیوا که گرمی بخش زندگیمان هستند وروزهای زیادی راازآنها دریغ کرده ام.

تشکر و قدردانی

اکنون که به لطف پروردگار متعال رساله اینجانب به اتمام رسیده است، لازم می دانم از کلیه اساتید و همکاران بزرگوار که در اجرای این تحقیق مرا یاری نمودند قدردانی و تشکر نمایم. با تشکر بسیار از

استاد محترم وگرانقدرجناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی که راهنمایی اینجانب را در این تحقیق به عهده گرفته و با راهنمائی های دلسوزانه وخردمندانه خویش مرا در هر چه پر بارتر کردن این پایان نامه یاری نمودند.

استاد مشاور گرانقدر وگرامی جناب آقای دکتر بهرام کاظمی که در طول تحصیل با اخلاق نیکوهمواره از تجربیات علمی و عملی ایشان برخوردار بوده و در طول این تحقیق مشاور و مشوق اینجانب بودند.

استاد مشاور گرانقدر سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر که صادقانه تجربیات ارزنده خود را در اختیار اینجانب قرار داده و در طول این تحقیق از مشاوره گرانبهای ایشان بهره مند شدم .

جناب آقای دکتر صدرائی، مدیر محترم گروه انگل شناسی و حشره شناسی پزشکی که با اخلاق خوب خود در انجام این تحقیق همکاری و مساعدت فراوانی داشتند.

اساتید محترم جناب آقای دکترفروزنده وسرکارخانم دکترشریفی که صادقانه تجربیات ارزنده خودرا درزمینه های علمی وعملی در طول تحقیق دراختیار اینجانب قرار دادند.

دوستان و همکاران عزیزم خانمها دکتراسلامی ودکتربنده پور، آقایان دکتر سید طبائی،دکترفلاح ،دکترسروی ،دکترپیرستانی،دکترخرم آبادی،دکترمحامی،دکترجعفری،دکتروزینی،دکترناصریفر،کارشناسان محترم گروه انگل شناسی سرکار خانم قاسمی نیکو و سرکار خانم باغخانی که از مساعدتهای بی دریغشان بر خوردار گردیدم.

کارکنان و کارشناسان محترم گروههای باکتری شناسی، قارچ شناسی، بیوشیمی و بیوتکنولوژی،ایمنی شناسی و انگل شناسی ومرکزتحقیقات بیولوی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خانمها کوچکی،ماغن تقی پور که درکلیه مراحل تحقیق مرا یاری نموده واز هیچ کمکی به اینجانب دریغ نکردند. کارکنان و مسئولین بخش اداری، آموزشی و پژوهشی دانشکده پزشکی تربیت مدرس، خانم دکتر صباحی، آقای دکتر احمدی، آقای موسویان، خانم دباغ، خانم سراج، آقای سرمدی، که در طول تحصیل و اجرای این تحقیق نهایت مساعدت و همکاری را نمودند. همچنین از تکنسین محترم گروه انگل شناسی آقای اصغر رجبعلیها که در طول تحصیل ازهیچ کمکی دریغ نکردندتشکر و قدردانی می نمایم.

چکیده

توکسوپلاسما گونده ای یک انگل داخل سلولی اجباری است که مسئول توکسوپلاسموزیس درانسان وحیوانات بوده ودارای انتشارجهانی است. SAG3 یک آنتی ژن سطحی بزرگ انگل است که در اتصال وحمله به سلولهای میزبان نقش مهمی را ایفاء می نماید. آنتی ژن SAG3 در مراحل مختلف سیکل زندگی انگل ازجمله تاکی زوییت ، برادی زوییت و اسپوروزوییت بیان می شود . در این مطالعه از ژن کامل سطحی۳(SAG3) وآنتی ژن سطحی اصلی یک (SAG1) توکسوپلاسما گوندی برای ساخت DNA واکسن بصورت single و همچنین بصورت کوکتل استفاده گردید ودر نهایت پاسخ های ایمنی ناشی از انها در مقایسه با گروههای کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این تحقیق پس از استخراج DNA ژنومی انگل به روش فنل- کلروفرم و جداسازی و تکثیر ژن کد کننده SAG3 با روش PCR ، محصول PCR درPBluscript کلون گردیده و سپس تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی نشان داد که قطعه ۱۱۵۸ جفت باز در پلاسمید مذکور کلون شده و ژن کلون شده ژن SAG3 توکسوپلاسما گوندی است. همچنین نتایج بلاست درNCBI حاکی از آن است که ژن کلون شده از نظر توالی نوکلئوتیدی با شماره AF340227 وHM585285 استرین RH ۹۹٪ وسویه CEP با شماره دسترسی AF340229 ،۹۹٪ وسویه P-Br با شماره AY187280 ۹۸٪ درصد شباهت دارد . سپس این ژن در pcDNA3 ساب کلون گردیده و بعد از ترانسفکت کردن این پلاسمید نوترکیب (pcSAG3) در سلول یوکاریوتیک (CHO) بیان این ژن به روش SDS-PAGE, RT-PCR و Western blot تائید شد. ودرنهایت کارایی pcSAG1, pcSAG3 و pcSAG3 + pcSAG همراه و بدون ادجوانت آلوم وMMT در تحریک پاسخ های ایمنی بر علیه توکسوپلاسموزیس در موش های ماده BALB/c مورد ارزیابی قرار گرفت. ایمونیزاسیون سه بار به فواصل سه هفته ای (بصورت داخل عضلانی) انجام شد.

نتایج بدست آمده نشان داد که بعد از چالش موش ها با سویه کشنده RH انگل توکسو پلاسما گوندی، میزان بقای موشهایی که با DNA کوکتل (pcSAG3+pcSAG1) و pcSAG3 همراه و بدون ادجوانت آلوم وMMT ایمن سازی شدند با گروههای کنترل اختلاف معنی دار دارند($P<0.05$) یعنی اینکه DNA واکسن های مورد نظر یک حمایت نسبی در موش ها ایجاد کرده است. همچنین اندازه گیری آنتی بادی توتال IgGوساب تایپهایIgG1وIgG2a اختلاف معنی دار را بین گروههای مورد و کنترل بخصوص درمرحله دوم خونگیری نشان داد($P<0.05$). یعنی پاسخ ایمنی همورال در گروههای مورد در مقایسه با گروههای کنترل به خوبی تحریک شده است. و در نهایت نتایج حاصل از اندازه گیری سایتوکاین ها (IFNγ وIL4) نشان دهنده مقادیر بالای IFNγ و مقادیر پایین IL4 در گروههای واکسینه شده با pcSAG3 وpcSAG1 وpcSAG3+pcSAG1 همراه و بدون ادجوانت آلوم و MMT در مقایسه با گروههای کنترل بود و این خود حاکی از آن می باشد که پاسخ ایمنی سلولی Th1 در موش های گروههای مورد در مقایسه با موش های گروههای کنترل که با پلاسمید خالی pcDNA3 و فسفات بافر سالین (PBS)واکسینه شده اند به شدت تحریک شده است.

این مطالعه نشان می دهد که استفاده انفرادی از pcSAG3 و بصورت DNA کوکتل با pcSAG1 در تحریک پاسخ های ایمنی، موثرتر و کارآمدتر از pcSAG1 به تنهایی می باشد. همچنین استفاده از ادجوانت آلومینیومی(آلوم)ونانوادجوانتMMT همراه با DNA واکسن های مذبور موجب افزایش مقدارآنتی بادیها وسیتوکین ها شده وبعضی ازآنها باگروه کنترل یا بایکدیگر اختلاف معنی داری را نشان می دهند.

واژه‌های کلیدی : توکسوپلاسما گوندی ، DNA واکسن ، ادجوانت آلوم وMMT ، آنتی ژن کامل سطحی ۳ (SAG3) ، آنتی ژن سطحی اصلی ۱ (SAG1)

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

۱-۱.مقدمه ۲

۱-۲.کلیات ۱٤

۱-۳.تاریخچه ۱٤

۱-٤.طبقه بندی توکسوپلاسما گوندی ۱٥

۱-٥.مورفولوژی انگل ۱٦

۱-٥-۱.تاکی زوئیت ۱۷

۱-٥-۲.کیست کاذب ۱۸

۱-٥-۳.کیست نسجی ۱۹

۱-٥-٤.تروفوزوئیت ۲۰

۱-٥-٥.گامتوسیت ۲۰

۱-٥-٦.زیگوت ۲۰

۱-٥-۷.اووسیست ۲۰

۱-٦.چرخه زندگی ۲۲

۱-٦-۱.سیرجنسی ۲۲

۱-٦-۲.سیرغیرجنسی ۲٤

۱-۷.راههای انتقال انگل ۲٦

۱-۸.پاتوژنزوبیماریزایی ۲٦

۱-۸-۱.فرم اکتسابی ۲٦

۱-۸-۲.توکسوپلاسموزچشمی ۲۸

۱-۸-۳.توکسوپلاسموزمادرزادی ۲۸

۱-۹.مکانیسم تهاجم توکسوپلاسما به سلول میزبان ۲۹

۱-۱۰.پاسخهای ایمنی درتوکسوپلاسموز ۳۲
۱-۱۱.ژنوم توکسوپلاسما گوندی ۳۷
۱-۱۲.آنتی ژنهای توکسوپلاسما گوندی ۳۸
۱-۱۲-۱.آنتی ژنهای سطحی انگل ۳۹
۱-۱۲-۲.آنتی ژنهای اندامک راسی ٤۱
۱-۱۲-۳.آنتی ژنهای دفعی ترشحی ٤٤
۱-۱۲-٤.پروتئینهای شوک حرارتی ٤٤
۱-۱۳.واکسیناسیون درتوکسوپلاسموزیس ٤٥
۱-۱۳-۱.مزایای واکسیناسیون حیوانات وانسان برعلیه توکسوپلاسما ٤۷
۱-۱۳-۲.واکسیناسیونDNA ٤۹

فصل دوم: مروری برمطالعات گذشته ٥٤
۲-۱.سابقه وانجام ضرورت تحقیق ٥٥
۲-۲.تحقیقات انجام شده درزمینه ایمنی زایی درایران ودنیا ٥٦
۲-۳.خواص ادجوانتها ۷۰
۲-۳-۱.ادجوانتهای آلومینیومی ۷۱
۲-۳-۲.نانوادجوانتها ۷۲

فصل سوم: مواد وروشها ۷۳
۳-۱.فرایند تحقیق ۷٤
۳-۲.تکثیرونگهداری انگل توکسوپلاسما استرینRH ۷٥

۳-۳. استخراج DNA ۷٦
۳-۳-۱. استخراج به روش فنل – کلروفرم ۷٦
۳-۳-۲. اندازه‌گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن..... ۷۷
۳-۳-۳. الکتروفورز DNA ۷۷
۳-۳-۳-۱. طرز تهیه محلول Tris Acetate EDTA(TAE)..... ۷۸
۳-۳-۳-۲. طرز تهیه ژل آگاروز ۰/۸ درصد برای الکتروفورزDNA ۷۸
۳-٤. تکثیر DNA با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۷۹
۳-٤-۱. طراحی پرایمرها ۷۹
۳-٤-۲. بررسی محصول PCR ۸۲
۳-۵- خالص سازی محصول PCR..... ۸۳
۳-۵-۱. استخراج DNA توسط کیت شرکت Fermentas..... ۸۳
۳-٦. کلونینگ ژن SAG3 در پلاسمید pBluescript ۸٤
۳-٦-۱. اتصال قطعات DNA (DNA ligation) ۸٤
۳-٦-۲- انتقال DNA به باکتری (Transformation) ۸۵
۳-٦-۲-۱. تهیه محیط کشت باکتری..... ۸٦
۳-٦-۲-۲. محیط نگهداری باکتری‌ها..... ۸٦
۳-٦-۲-۳. طرز تهیه باکتری مستعد (Competent Cell) به روش کلرید کلسیم ۸۷
۳-٦-۲-٤. انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری (ترانسفورماسیون باکتری) ۸۸
۳-٦-۲-۵. غربالگری اولیه کلونیها ۹۰
۳-٦-۲-٦. تست Rusconis ۹۱
۳-٦-۲-۷. PCR ازکلنی ها ۹۱
۳-۷. استخراج پلاسمید نوترکیب به روش دستی..... ۹۲

۳-۷-۱. استخراج پلاسمید به روش Mini-Prep Plasmid DNA extraction ۹۳
۳-۷-۲. استخراج پلاسمید با استفاده‌از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer ۹۵
۳-۸. روش‌های تاییدکننده کلونینگ قطعه SAG3 در ناقل پلاسمیدی..... ۹۶
۳-۸-۱. مقایسه پلاسمید های استخراج شده‌از کلنی‌های آبی و سفید..... ۹۶
۳-۸-۲. برش آنزیمی DNA پلاسمیدی (Restriction mapping) ۹۶
۳-۸-۳. روش PCR ۹۷
۳-۸-٤. تعیین توالی مولکول (DNA Sequencing) ۹۷
۳-۹. ساب کلونینگ قطعه SAG3 در پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۹۷
۳-۹-۱. برش پلاسمید نوترکیب pBSAG3 توسط آنزیم‌های BamHI و HindIII..... ۹۸
۳-۹-۲. برش پلاسمید یوکاریوتیک pcDNA3 توسط آنزیم‌های BamHI و HindIII..... ۹۹
۳-۹-۳. اتصال قطعه SAG3به پلاسمید pcDNA3 ..... ۱۰۰
۳-۹-٤. انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری E.coli (ترانسفورم کردن باکتری) ۱۰۰
۳-۱۰. روش‌های تاییدکننده کلونینگ قطعه SAG3در پلاسمید بیانیpcDNA3 ..... ۱۰۱
۳-۱۰-۱. مقایسه پلاسمیدهای pcDNA3 و pcSAG3 با الکتروفورز ۱۰۱
۳-۱۰-۲. روش PCR ۱۰۱
۳-۱۰-۳. مقایسه پلاسمید نوترکیب pcSAG3 و پلاسمید pcDNA3 بعد از برش ۱۰۲
۳-۱۰-۳-۱. برش پلاسمید نوترکیب pcSAG3 با آنزیم‌های BamHI و HindIII..... ۱۰۲
۳-۱۰-٤. تعیین توالی مولکول (DNA Sequencing) ۱۰۲
۳-۱۱. بیان ژن SAG3 در سلول یوکاریوتیک..... ۱۰۲
۳-۱۱-۱. انتقال پلاسمید نوترکیب pcSAG3 به درون سلول یوکاریوتیک..... ۱۰۳
۳-۱۲- تایید بیان ژن SAG3 در سلول یوکاریوتیک..... ۱۰۵
۳-۱۲-۱. RT-PCR ۱۰۵

۳-۱۲-۱-۱. استخراج RNA ۱۰۵
۳-۱۲-۱-۲. تهیه cDNA ازروی RNA ۱۰۶
۳-۱۲-۱-۳. PCR قطعه SAG3 بااستفاده از cDNA تهیه شده ۱۰۷
۳-۱۲-۱-٤. الکتروفورز محصول RT-PCR ۱۰۷
۳-۱۲-۲.تهیه پروتئین ۱۰۷
۳-۱۲-۲-۱. تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی با استفاده‌از روش برادفورد ۱۰۸
۳-۱۲-۲-۲. تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۱۱۰
۳-۱۲-۲-۳. وسترن بلات ۱۱۵
۳-۱۳. استخراج انبوه پلاسمید pcSAG1 و pcSAG3 باکیت کیاژن ۱۱۹
۳-۱٤.ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید کد کنندهٔ آنتی‌ژن SAG3 و DNA کوکتل
حاوی پلاسمیدهای کدکننده SAG1و SAG3 درموش BALB/c ۱۱۹
۳-۱٤-۱. انتخاب حیوان آزمایشگاهی مناسب ۱۱۹
۳-۱٤-۲. تعیین جامعه آماری ۱۱۹
۳-۱٤-۳. گروه بندی موشها ۱۲۰
۳-۱٤-٤. ایمن سازی ۱۲۰
۳-۱٤-٤-۱. نحوه تزریق داخل عضلانی ۱۲۱
۳-۱٤-٤-۲. نحوه مخلوط کردن پلاسمید با ادجوانت‌ها ۱۲۱
۳-۱٤-٥. چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۱۲۲
۳-۱٤-٦. بررسی ایمنی هومورال ۱۲۲
۳-۱٤-٦-۱. آماده سازی آنتی‌ژن (ST-Ag) ۱۲۲
۳-۱٤-٦-۲. آماده سازی و استفاده‌از کیسه دیالیز ۱۲۳
۳-۱٤-٦-۳. نحوه جمع آوری سرم موشها ۱۲٤

۳-۱٤-٦-٤. چیکر بورد ۱۲٤
۳-۱٤-٦-٥. آزمایش الایزا غیرمستقیم ۱۲٦
۳-۱٤-٦-٦. اندازه گیری ساب تایپهای آنتی بادی ۱۲٦
۳-۱٤-۷. بررسی ایمنی سلولی ۱۲٦
۳-۱٤-۷-۱. روش استخراج لنفوسیت‌ها از طحال موش‌ها..... ۱۲٦
۳-۱٤-۷-۲. روش کشت سلول‌های لنفوسیت طحال برای سنجش سایتوکائین‌ها ۱۲۸
۳-۱٤-۷-۲-۱. سنجش سایتوکائین..... ۱۲۹
۳-۱٤-۸ . ارزیابی آماری نتایج چالش با سویه RH و ایمنی هومورال و سلولی ۱۳۱

فصل چهارم: نتایج..... ۱۳۲
٤-۱. نتیجه‌استخراج DNA ۱۳۳
٤-۲.نتیجه PCR با استفاده‌از DNA استخراج شده‌از انگل ۱۳۳
٤-۳. نتیجه ترانسفورماسیون باکتریها با محصول واکنش اتصال..... ۱۳٤
٤-٤. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBSAG3..... ۱۳٥
٤-٥. نتایج PCR ژن SAG3 با استفاده‌از پلاسمید نوترکیبpBSAG3 ..... ۱۳٦
٤-٦. نتایج تعیین توالی..... ۱۳٦
٤-۷. ساب کلونینگ ژن SAG3در پلاسمید بیانی pcDNA3..... ۱۳۷
٤-۸ . نتایج برش آنزیمی پلاسمید بیانی pcDNA3 و پلاسمید نوترکیب pcSAG3..... ۱۳۸
٤-۹. نتایج تعیین توالی پلاسمید نوترکیب pcSAG3..... ۱۳۹
٤-۱۰. نتایج PCR ژن SAG3 با استفاده‌از پلاسمید نوترکیبpcSAG3 ..... ۱۳۹
٤-۱۱. نتایج ترانسفکت پلاسمید نوترکیب pcSAG3 درسلول یوکاریوت..... ۱٤۰
٤-۱۱-۱. نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE..... ۱٤۰

٤-١١-٢. نتایج وسترن بلات ١٤١
٤-١١-٣. نتایج RT-PCR با RNA استخراج شده ١٤٢
٤-١٢. نتایج چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ١٤٣
٤-١٣. نتایج بررسی ایمنی هومورال ١٤٦
٤-١٣-١. نتایج اندازه گیری IgG (Total IgG) ١٤٦
٤-١٣-٢. نتایج اندازه گیری IgG1 ..... ١٤٩
٤-١٣-٣. نتایج اندازه گیری IgG2a ١٥٢
٤-١٤. نتایج بررسی ایمنی سلولی ١٥٦
٤-١٤-١. نتایج سنجش سایتوکائین‌ها ١٥٦

فصل پنجم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ١٦٣
٥-١. بحث ١٦٤
٥-٢. نتیجه‌گیری ١٧٨
٥-٣. پیشنهادها ١٧٩

فهرست منابع ١٨٠
چکیده انگلیسی ١٩١

فهرست جداول

جدول ۳-۱. مقادیر استاندارد در روش برادفورد ۱۰۹

جدول ۳-۲. نحوه گروه بندی موشها بر اساس نوع ماده تزریقی ۱۲۰

جدول ٤-۱.درصد بقاء و تعداد روزهای زندگی موشهای گروه‌های مختلف ١٤٤

جدول٤-۲.مقایسه میانگین آنتی بادی IgG توتال در نوبت اول خونگیری ١٤٦

جدول٤-۳. مقایسه میانگین آنتی بادی IgG توتال در نوبت دوم خونگیری ١٤٧

جدول٤-٤. مقایسه میانگین آنتی بادی IgG1 در نوبت اول خونگیری ١٥٠

جدول٤-٥. مقایسه میانگین آنتی بادی IgG1 در نوبت دوم خونگیری ١٥١

جدول٤-٦. مقایسه میانگین آنتی بادی IgG2a در نوبت اول خونگیری ١٥٣

جدول٤-۷. مقایسه میانگین آنتی بادی IgG2a در نوبت دوم خونگیری ١٥٣

جدول ٤-۸.. مقایسه میانگین مقدار IL-4 در گروه‌های مختلف درکشت ٤٨ساعته ١٥٧

جدول ٤-۹.. مقایسه میانگین مقدار IL-4 در گروه‌های مختلف درکشت ۷۲ساعته ١٥٨

جدول ٤-۱۰. مقایسه میانگین مقدارIFN-γ در گروه‌های مختلف درکشت ٤٨ ساعته ١٥٩

جدول ٤-۱۱. مقایسه میانگین مقدارIFN-γ در گروه‌های مختلف درکشت ۷۲ ساعته ١٦٠

فهرست نمودارها

نمودار ٤-١. درصد بقاء موشهای گروه‌های مختلف بعد از چالش..... ١٤٤

نمودار ٤-٢.نمودار ستونی میانگین OD سطح آنتی بادی توتال IgG در ٢ نوبت‌خونگیری..... ١٤٧

نمودار ٤-٣. نمودار ستونی میانگین OD سطح آنتی بادی IgG1 در ٢ نوبت‌خونگیری..... ١٥٢

نمودار ٤-٤. نمودار ستونی میانگین OD سطح آنتی بادی IgG2a در ٢ نوبت‌خونگیری..... ١٥٥

نمودار ٤-٥. نمودار ستونی میانگین OD سطح IgG1 وIgG2a در ٢ نوبت‌خونگیری..... ١٥٦

نمودار ٤-٦. نمودار ستونی میانگین IL-4 کشت ٤٨و٧٢ساعته در گروه‌های مختلف..... ١٥٩

نمودار ٤-٧. نمودار ستونی میانگین IFN-γ کشت ٤٨و٧٢ساعته در گروه‌های مختلف..... ١٦٢

نمودار ٤-٨ .نمودار ستونی مقایسه میانگین IFN-γ و IL-4 کشت ٤٨و٧٢ساعته..... ١٦٢

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. چرخه زندگی انگل توکسوپلاسما گوندی در میزبانهای واسط و نهایی ۲۲

شکل ۱-۲. شماتیک انگل توکسوپلاسما ۲۳

شکل ۱-۳. تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندی..... ۲٤

شکل ۱-٤. کیست توکسوپلاسما گوندی در میزبان واسط ۲۵

شکل ۱-۵. تاکی‌زوئیتهای توکسوپلاسما گوندی در ماکروفاژ ۲۵

شکل ۱-٦. مدل نفوذانگل بااستفاده ازموتوراکتین ومیوزین..... ۳۱

شکل ۱-۷. مراحل مختلف تهاجم انگل به سلول ونفوذدرآن ۳۱

شکل ۱-۸. عرضه آنتی ژن به سلولهای ایمنی وفعالیت وترشح سیتوکینهای مختلف..... ۳۵

شکل ۱-۹.نحوه واکنش سیستم ایمنی به سوشهای مختلف انگل توکسوپلاسما..... ۳٦

شکل ۱-۱۰. آنتی‌ژنهای توکسوپلاسما گوندی ، موقعیت و ژنهایی که آنها را کد می کنند..... ۳۹

شکل ۱-۱۱.مقایسه واکنش سلولهای عفونت یافته باتوکسوپلاسما گوندی وواکسیناسیون..... ٤۸

شکل ۱-۱۲. روش تهیه وتزریق DNA واکسن وواکنشهای سیستم ایمنی..... ۵۰

شکل ۱-۱۳. انواع مکانیسمهای تحریک وفعال سازی باDNAواکسنها..... ۵۲

شکل ۳-۱. نقشه ژنتیکی پلاسمید کلونینگ pBluescript ۸۵

شکل ۳-۲. مراحل کلونینگ و غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده ۹۰

شکل ۳-۳. نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3..... ۹۸

شکل ۳-٤. آناتومی ماهیچه‌های Quadricepsو Tibialis پای موش ۱۲۱

شکل ٤-۱. الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۰/۸٪..... ۱۳۳

شکل ٤-۲.الکتروفورز محصولPCR باآغازگرهای اختصاصی..... ۱۳٤

شکل ٤-۳. مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده‌از کلنی‌های سفید و آبی..... ۱۳۵

شکل ٤-٤. الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBSAG3 روی ژل آگاروز ۱۳۵

شکل ٤-٥. الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب pBSAG3روی ژل آگاروز ١٣٦
شکل ٤-٦. کروماتوگرام مربوط به ژن SAG3 بعد از توالی یابیpcSAG3 ..... ١٣٧
شکل ٤-٧. الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pcDNA3 وpcSAG3 ..... ١٣٨
شکل ٤-٨. الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب pcSAG3..... ١٤٠
شکل ٤-٩. تعیین وزن مولکولی پروتئین SAG3 در SDS-PAGE..... ١٤١
شکل ٤-١٠. روش وسترن بلات ١٤٢
شکل ٤-١١. الکتروفورزمحصولRT-PCR..... ١٤٣

فصل اول

مقدمه و کلیات