بسم الله
الرحمن الرحیم

تأییدیه‌اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع

بعد از دفاع از حوزه پژوهشی دانشکده دریافت و بعد اسکن نمایید.

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 ٥- این آیین‌نامه در ٥ 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 ۸۷/۷/۱٥ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **کامی حسینیان خسروشاهی** دانشجوی رشته **انگل‌شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸٤** مقطع **دکتری تخصصی** 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

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به‌اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه‌است. 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" دانشگاه‌اطلاع 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 **۱۳۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر فاطمه غفاری فر**، مشاوره **دکتر زهره شریفی و دکتر عبدالحسین دلیمی اصل** از آن دفاع شده‌است.

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 ٥ : 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 **کامی حسینیان خسروشاهی** دانشجوی رشته **انگل‌شناسی پزشکی** مقطع **دکتری تخصصی** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به‌ان ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته‌انگل‌شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کدکننده آنتی‌ژن راپتری ۲ و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کدکننده آنتی‌ژن اصلی سطحی ۱ و آنتی‌ژن راپتری ۲ توکسوپلاسما گوندهای در موش BALB/c

نگارش

کامی حسینیان خسروشاهی

استاد راهنما

دکتر فاطمه غفاری فر

اساتید مشاور

دکتر زهره شریفی

دکر عبدالحسین دلیمی اصل

۱۳۸۹

پروردگارا :

یاریم کن ، تا دستی بگیرم و قلبی شاد کنم
تا مرهمی گذارم و زخمی شفا دهم
مرا به حال خویش مگذار
که زین پس ، به رحمت تو محتاج ترم
یاریم کن، تا آنچه را از دیده ها و شنیده ها آموخته ام،
عاشقانه به کار بندم
تا هرگز، صدای ناله دردمندی
خواب شیرین زندگیم را نیاشوبد.

آمین

تقدیم به پربهانه ترین گنجهای عالم

تقدیم به پدر بزرگوارم

اسطوره پایمردی و از خودگذشتگی، به او که در چشمان پرغرورش صداقت چهره زیباتر می یابد و وجود پرمهرش پشتوانه زندگی ام، روشنایی دانش او فروغ راهم و دریای بی کران صبرش آرامش وجودم است.

به پاس شکیبایی اش که لحظه لحظه موفقیتهایم را مدیون او هستم.

تقدیم به مادر مهربانم

یگانه ای که بزرگوارانه و بی دریغ جان نهاد تا جان گیریم، او که مهربانیش مثل باران سخاوت، دستانش همچون خورشید و لبخندش آرام بخش وجودم در طوفان حوادث زندگیم است. به پاس سیمای مهربان و پرگذشتش که در این راه قوتم بخشید و بیانم برای سپاس از تمام خوبیها، دلسوزیها و محبتهای صادقانه اش قاصر است.

تقدیم به خواهر عزیزم و همسر گرامی اش

که نمونه صفا، صمیمیت و گذشت و فداکاری هستند. خواهر مهربانم که در تمامی عرصه های زندگی از وجود پرمهرش بسیار بهره برده ام و راهنماییهایش همواره راهگشای زندگی من بوده و خود را همواره مدیون تلاشهای صادقانه اش می دانم.

تقدیم به یگانه برادر عزیزم

که دلش دریای محبت است و تا پای جان دوستش دارم و همیشه تکیه گاهی مطمئن برای من بوده و خواهد بود.

تقدیم به خواهرزاده عزیزتر از جانم

که تولدش به وجودم گرما بخشید و هر روز که بزرگتر می شود، معنای واقعی فداکاری و دوست داشتن برای من پررنگ تر می شود. او که لبخندش، بهترین شادی و اشکهایش دردناک ترین دردها می باشد.

کسی که عشق من به او بزرگ ترین و گرم ترین عشق ها و دوست داشتن ها می باشد و وجود کوچک او نمادی از پاکی، صداقت، صفا و صمیمیت می باشد.

کیا جان دوست دارم و امیدوارم روزی که بتوانی این رساله را بخوانی به وجود من افتخار کنی.

و در آخر تقدیم به همه دوستان عزیزم

که در این سالهای طولانی همیشه در کنار من بوده اند و به طرق مختلف مرا یاری دادند، خصوصاً دوست عزیزم **علی سهیل میرصادقی** که مشاوره و رهنمودهایش سهل کننده بسیاری از سختی ها و مشکلات بوده و خواهد بود.

تشکر و قدردانی

اکنون که به لطف پروردگار متعال رساله اینجانب به اتمام رسیده است، لآزم 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 سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر که راهنمایی اینجانب را در این تحقیق به عهده گرفته و با راهنمائی های خردمندانه خویش مرا در هر چه پر بارتر کردن این پایان نامه یاری نمودند.

استاد مشاور گرامی سرکار خانم دکتر زهره شریفی که در طول تحصیل همواره از تجربیات علمی و عملی ایشان برخوردار بوده و در طول این تحقیق مشاور و مشوق اینجانب بودند.

استاد مشاور گرانقدر جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل که صادقانه تجربیات ارزنده خود را در اختیار اینجانب قرار داده و در طول این تحقیق از مشاوره گرانبهای ایشان بهره مند شدم و این تحقیق بدون راهنمایی و مساعدت ایشان انجام پذیر نبود.

استاد محترم سرکار خانم ساشیلا دسوزا که مدیون زحمات ایشان بوده و در طول این تحقیق از مشاوره بی دریغ ایشان برخوردار گردیدم.

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

کارشناسان محترم گروه انگل شناسی سرکار خانم قاسمی نیکو و سر کار خانم باغخانی که از مساعدتهای بی دریغ ایشان بر خوردار گردیدم. کارکنان و کارشناسان محترم گروههای میکروب شناسی ، قارچ شناسی ، بیوشیمی و بیوتکنولوژی ، ایمنی شناسی و انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خانمها صمیمی، رزاقی ، افشار، اعتمادی، بنی صادق، محسنی، فدایی، اسکافی، تقی پور و آقای کربندیان که درکلیه مراحل تحقیق مرا یاری نموده و از هیچ کمکی به اینجانب دریغ نکردند.

دوستان و همکاران عزیزم خانم دکتر اسلامی، خانم دکتر پاکروان، آقای دکتر سید طبائی ، آقای دکتر خرم آبادی و خانم دکتر شیربازو و بالاخره کارکنان و مسئولین بخش اداری ، آموزشی و پژوهشی دانشکده پزشکی تربیت مدرس، خانم دکتر موحدین، آقای دکتر فیروزآبادی، آقای موسویان، خانم دباغی، خانم سراج، آقای دکتر احمدی، آقای سرمدی، زنده یاد میرشفیعی، خانم گیلانی و آقای کاظمی 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 خصوصاً مراحل اجرای پایان نامه از هیچ کمکی دریغ نکرده و چون برادری بزرگوار مرا همراهی نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

به امید روزی که این بنده حقیر با لطف و عنایت الهی برای کشورم ایران افتخارآفرین باشم و ذره ای از دین خود را نسبت به خاک پاک ایران ادا نمایم.

چکیده

توکسوپلاسما گوندی یک انگل تک یاخته ای داخل سلولی است که موجب بیماری توکسوپلاسموزیس در انسان و حیوان می شود. توکسوپلاسموزیس یکی از بیماریهای مهم در زمینه پزشکی و دامپزشکی می باشد. در سالهای اخیر پیشرفت چشمگیری در زمینه شناخت کاندیدهای مناسب واکسن که باعث القای پاسخهای ایمنی موثر می شوند صورت گرفته است.

مانند دیگر ارگانیسم های تک سلولی ,انگل توکسوپلاسما متشکل از آنتی ژنهای ایمونوژنیک فراوانی است.آنتی ژنهای دفعی-ترشحی و آنتی ژنهای سطحی توکسوپلاسما گوندی از بهترین فرم های آنتی ژنی برای تحریک پاسخ های ایمنی سلولی می باشند و همین مساله این آنتی ژنها را بعنوان کاندیدهای مناسب واکسن بر علیه توکسوپلاسموزیس مطرح می نماید.

در این مطالعه از ژن کامل راپتری دو (ROP2) و آنتی 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 از انگل به روش فنل-کلروفرم و جداسازی و تکثیر ژن کد کننده ROP2 با روش PCR ، محصول PCR در pTZ57R/T کلون گردیده و سپس تعیین توالی شد.

نتایج تعیین توالی نشان داد که قطعه ۱۶۸۶ جفت بازی در پلاسمید مذکور کلون شده و قطعه کلون شده ژن ROP2 توکسوپلاسما گوندی است.همچنین نتایج بلاست درNCBI حاکی از آن است که ژن کلون شده از نظر توالی نوکلئوتیدی با شماره Z36906.1 استرین RH ۹۹٪ وبا شماره S54994.1 همین استرین ۹۸٪ شباهت دارد.سپس این ژن در pcDNA3 ساب کلون گردیده و بعد از ترانسفکت کردن این پلاسمید نوترکیب (pcROP2) در سلول یوکاریوتیک (CHO) بیان این ژن به روش SDS-PAGE, Western blot تائید شد. ودرنهایت کارایی pcROP2 ,pcSAG1, pcROP2+pcSAG1 همراه و بدون ادجوانت آلوم 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 (pcROP2+pcSAG1) و pcROP2 وpcSAG1 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 IgG اختلاف معنی دار را بین گروههای مورد و کنترل تائید کرد ($P<0.05$) پس پاسخ ایمنی هومرال در گروههای مورد در مقایسه با گروههای کنترل به شدت تحریک شده است .

و در نهایت نتایج حاصل از اندازه گیری سایتوکاین ها (IFN-γ وIL-4) نشان دهنده مقادیر بالای IFN-γ و مقادیر پایین IL-4 در گروههای واکسینه شده با pcROP2 وpcSAG1 وpcROP2+pcSAG1 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 pc-DNA3 و فسفات بافر سالین (PBS) واکسینه شده اند به شدت تحریک شده است .

این مطالعه نشان می دهد که استفاده توام از pcROP2 وpcSAG1 بصورت DNA کوکتل در تحریک پاسخ های ایمنی، موثرتر و کارآمدتر از هر کدام از انها به تنهایی می باشد و همچنین استفاده از ادجوانت آلومینیومی (آلوم) همراه با DNA واکسن های مذبور تغییر معنی داری در پاسخ های ایمنی ایجاد نمی کند.

واژه‌های کلیدی : توکسوپلاسما گوندی ، DNA واکسن ، ادجوانت آلوم ، ژن کامل راپتری ۲ (ROP2) ، آنتی ژن سطحی اصلی ۱ (SAG1)

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

مقدمه ۲

۱-۱- کلیات ۸

۱-۲- تاریخچه ۸

۱-۳- طبقه بندی توکسوپلاسما گونده‌ای ۱۰

۱-٤- مروفولوژی انگل ۱۰

۱-٤-۱- تاکی‌زوئیت ۱۱

۱-۴-۲- کیست نسجی ۱۲

۱-٤-۳- اووسیست ۱۵

۱-۵- بیولوژی ۱٦

۱-۵-۱- مرحله روده‌ای ۲۰

۱-۵-۲- مرحله خارج روده‌ای ۲۲

۱-۶- اپیدمیولوژی ۲۵

۱-۶-۱- اپیدمیولوژی در جهان ۲٦

۱-۶-۲- اپیدمیولوژی در ایران ۲٦

۱-۷- راههای انتقال انگل ۲۷

۱-۸- مقاومت انگل توکسوپلاسما ۲۹

۱-۸-۱- تاکی‌زوئیت ۲۹

۱-۸-۲- کیست نسجی ۳۰

۱-۸-۳- اووسیست ۳۱

۱-۹- پاتوژنز و بیماریزائی ۳۱

۱-۹-۱- توکسوپلاسموز چشمی ۳٤

۱-۹-۲- توکسوپلاسموز مادرزادی ۳۵

۱-۹-۳- توکسوپلاسموز در افراد مبتلا به‌اختلالات ایمنی ۳۶
۱-۹-۴- ضایعات کلیوی ۳۷
۱-۱۰- مقاومت میزبان نسبت به توکسوپلاسما گونه‌ای ۳۸
۱-۱۰-۱- مقاومت طبیعی ۳۸
۱-۱۰-۲- گونه‌های میزبان ۳۸
۱-۱۰-۳- سن میزبان ۳۹
۱-۱۰-۴- تنوع سویه‌های توکسوپلاسما ۳۹
۱-۱۰-۵- مقاومت اکتسابی ٤۰
۱-۱۱- پاسخ‌های ایمنی در توکسوپلاسموز ٤۰
۱-۱۱-۱- پاسخهای هومورال ٤۱
۱-۱۱-۲- پاسخهای ایمنی سلولی ٤۲
۱-۱۲- روش‌های تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز ٤٤
۱-۱۲-۱- تشخیص‌های بافت‌شناسی ٤٤
۱-۱۲-۱-۱- آسپیره ٤٥
۱-۱۲-۱-۲- بیوپسی ٤٥
۱-۱۲-۱-۳- هیستوپاتولوژی ٤۷
۱-۱۲-۲- تلقیح به حیوان آزمایشگاهی ٤۸
۱-۱۲-۳- تلقیح به جنین جوجه ٥۰
۱-۱۲-٤- تلقیح به کشت نسجی ٥۰
۱-۱۲-٥- خوراندن بافت به گربه‌های سالم ٥۱
۱-۱۲-۶- تکنیک PCR ٥۲
۱-۱۲-۷- پاسخ‌های ایمنی هومورال ٥۳
۱-۱۲-۸- پاسخ‌های ایمنی سلولی ٥۳
۱-۱۳- درمان توکسوپلاسموز ٥٤
۱-۱۳-۱- درمان‌های دارویی ٥٤

۱-۱۳-۱-۱- سولفانامیدها ٥٤
۱-۱۳-۱-۲- پیریمتامین ٥٥
۱-۱۳-۱-۳- اسپیرامایسین ٥٥
۱-۱۳-۱-۴- کوتریموکسازول ٥٦
۱-۱۳-۱-۵- تتراسایکیلین ها ٥٦
۱-۱۳-۱-۶- کلاریترومایسین ٥٦
۱-۱۳-۱-۷- آزیترومایسین ٥٦
۱-۱۳-۱-۸- آتوواکوئن ٥٧
۱-۱۳-۲- درمان‌های غیرداروئی ٥٧
۱-۱۳-۳- ایمنی درمانی ٥٧
۱-۱٤- کنترل و پیشگیری ٥٨
۱-۱٥- ژنو م توکسو پلاسما گوندی ٥٩
۱-۱٦- اندامکهای ترشحی رأسی توکسوپلاسما ٦٠
۱-۱٦-۱- میکرونم ٦٠
۱-۱٦-۲- راپتری ٦١
۱-۱٦-۲-۱- پروتئین‌های راپتری (ROPs) ٦٣
۱-۱٦-۲-۱-۱- راپتری پروتئین ۲ (ROP2) ٦٥
۱-۱٦-۳- گرانولهای متراکم ٦٦
۱-۱۷- آنتی‌ژنهای توکسوپلاسما گوندی ٦٦
۱-۱۷-۱- آنتی‌ژن سطحی اصلی توکسوپلاسما گونده‌ای (SAG1) ٦٨
۱-۱۷-۲- آنتی‌ژن راپتری ۲ (ROP۲) ٦٨
۱-۱۷-۲-۱- اطلاعات بانک ژنی در مورد ژن ROP2 ..... ۷۰

فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته ۷۱
۲-۱- واکسیناسیون در بیماری توکسوپلاسموزیس ۷۲

۲-۲- واکسیناسیون DNA ۷٤
۲-۳- مروری بر تولید و ارزیابی ایمنولوژیکی واکسنهای ضد توکسوپلاسما گوندی در ایران و جهان ۸۰
۲-۴- ادجوانت‌ها ۹۰
۲-۴-۱- خواص ادجوانت‌ها ۹۱
۲-۴-۲- ادجوانت‌های آلومینیومی ۹۲
۲-۴-۲-۱- مکانیسم تاثیر ادجوانت آلومینیومی در پاسخ ایمنی ۹۲
۲-۴-۲-۲- مزایای ادجوانت‌های آلومینیومی ۹۲
۲-۴-۲-۳- معایب ادجوانت‌های آلومینیومی ۹۲
۲-۴-۳- ادجوانت‌های بسیار رایج ۹۳

فصل سوم: مواد و روشها ۹۷
۳-۱- تکثیر و نگهداری انگل توکسوپلاسما استرین RH ۹۸
۳-۲- استخراج DNA ۹۹
۳-۲-۱- استخراج به روش فنل - کلروفرم ۹۹
۳-۲-۲- اندازه‌گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن ۱۰۰
۳-۲-۳- الکتروفورز DNA ۱۰۱
۳-۲-۳-۱- طرز تهیه محلول Tris Acetate EDTA(TAE) ۱۰۱
۳-۲-۳-۲- طرز تهیه ژل آگاروز ۰/۸ درصد برای الکتروفورزDNA ۱۰۱
۳-۳- تکثیر DNA با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۱۰۲
۳-۳-۱- طراحی پرایمرها ۱۰۳
۳-۳-۲- بررسی محصول PCR ۱۰٦
۳-۴- خالص سازی محصول PCR ۱۰٦
۳-۴-۱- استخراج DNA توسط کیت شرکت Fermentas ۱۰٦
۳-۵- کلونینگ ژن ROP2 در پلاسمید pTZ57R/T ۱۰۸
۳-۵-۱- اتصال قطعات DNA (DNA ligation) ۱۰۸

۳-۵-۲- انتقال DNA به باکتری (Transformation) ۱۰۹
۳-۵-۲-۱- تهیه محیط کشت باکتری ۱۰۹
۳-۵-۲-۲- محیط نگهداری باکتری‌ها ۱۱۰
۳-۵-۲-۳- طرز تهیه باکتری مستعد (Competent Cell) به روش کلرید کلسیم ۱۱۱
۳-۵-۲-۴- انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری (ترانسفورماسیون باکتری) ۱۱۲
۳-۶- استخراج پلاسمید نوترکیب به روش دستی ۱۱٤
۳-۶-۱- استخراج پلاسمید به روش Mini-Prep Plasmid DNA extraction ۱۱۵
۳-۶-۲- استخراج پلاسمید با استفاده‌از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer ۱۱۷
۳-۷- روش‌های تاییدکننده کلونینگ قطعه ROP2 در ناقل پلاسمیدی ۱۱۸
۳-۷-۱- مقایسه پلاسمید های استخراج شده‌از کلنی‌های آبی و سفید ۱۱۸
۳-۷-۲- برش آنزیمی DNA پلاسمیدی (Restriction mapping) ۱۱۸
۳-۷-۳- روش PCR ۱۱۹
۳-۷-۴- تعیین توالی مولکول (DNA Sequencing) ۱۱۹
۳-۸- ساب کلونینگ قطعه ROP2 در پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۱۱۹
۳-۸-۱- برش پلاسمید نوترکیب pT- ROP2 توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII و جداسازی قطعه ROP2 ..... ۱۲۱
۳-۸-۲- برش پلاسمید یوکاریوتیک pcDNA3 توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII ۱۲۱
۳-۸-۳- اتصال قطعه ROP2 به پلاسمید pcDNA3 ..... ۱۲۲
۳-۸-۴- انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری E.coli (ترانسفورم کردن باکتری) ۱۲۲
۳-۹- روش‌های تاییدکننده کلونینگ قطعه ROP2 در پلاسمید بیانیpcDNA3 ..... ۱۲۳
۳-۹-۱- مقایسه پلاسمیدهای pcDNA3 وpcROP2 با الکتروفورز ۱۲۳
۳-۹-۲- روش PCR ۱۲۳
۳-۹-۳- مقایسه پلاسمید نوترکیب pcROP2 و پلاسمید pcDNA3 بعد از برش آنزیمی ۱۲٤
۳-۹-۳-۱- برش پلاسمید نوترکیب pcROP2 با آنزیم‌های EcoRI و HindIII ۱۲٤
۳-۹-۴- تعیین توالی مولکول (DNA Sequencing) ۱۲٤
۳-۱۰- بیان ژن ROP2 در سلول یوکاریوتیک ۱۲٤

۳-۱۰-۱- انتقال پلاسمید نوترکیب pcROP2 به درون سلول یوکاریوتیک (Transfection) ۱۲۵
۳-۱۱- تایید بیان ژن ROP2 در سلول یوکاریوتیک ۱۲۷
۳-۱۱-۱- استخراج پروتئین ۱۲۷
۳-۱۱-۱-۱- تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی با استفاده‌از روش برادفورد ۱۲۸
۳-۱۱-۱-۲- تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۱۲۹
۳-۱۱-۱-۳- وسترن بلات ۱۳۵
۳-۱۲- استخراج انبوه پلاسمید pcSAG1 و pcROP2 به روش دستی ۱۳۸
۳-۱۳- ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید نوترکیب کد کنندهٔ آنتی‌ژن کامل راپتری دو (pcROP2) و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کدکننده آنتی ژن کامل راپتری۲ و آنتی ژن اصلی سطحی ۱ درموش کوچک آزمایشگاهی ۱۴۱
۳-۱۳-۱- انتخاب حیوان آزمایشگاهی مناسب ۱۴۲
۳-۱۳-۲- گروه بندی موشها ۱۴۲
۳-۱۳-۳- ایمن سازی ۱۴۳
۳-۱۳-۳-۱- نحوه تزریق داخل عضلانی ۱۴۴
۳-۱۳-۳-۲- نحوه مخلوط کردن پلاسمید با ادجوانت‌ها (آلوم) ۱۴۴
۳-۱۳-۴- چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۱۴۵
۳-۱۳-۵- بررسی ایمنی هومورال ۱۴۵
۳-۱۳-۵-۱- آماده سازی آنتی‌ژن (ST-Ag) ۱۴۵
۳-۱۳-۵-۲- آماده سازی و استفاده‌از کیسه دیالیز ۱۴۶
۳-۱۳-۵-۳- نحوه جمع آوری سرم موشها ۱۴۷
۳-۱۳-۵-۴- چیکر بورد ۱۴۷
۳-۱۳-۵-۵- آزمایش الایزا غیرمستقیم ۱۴۹
۳-۱۳-۶- بررسی ایمنی سلولی ۱۴۹
۳-۱۳-۶-۱- روش استخراج لنفوسیت‌ها از طحال موش‌ها ۱۵۰
۳-۱۳-۶-۲- روش کشت سلول‌های لنفوسیت طحال موش برای سنجش سایتوکائین‌ها ۱۵۲

۳-۱۳-۶-۲-۱- سنجش سایتوکائین ۱۵۲
۳-۱۳-۷- ارزیابی آماری نتایج حاصل از آزمایش چالش با سویه RH و ایمنی هومورال و سلولی ۱۵۵

فصل چهارم: نتایج و یافته‌ها ۱۵۶
۴-۱- نتیجه‌استخراج DNA ۱۵۷
۴-۲- نتیجه‌انجام PCR با استفاده‌از DNA استخراج شده‌از انگل ۱۵۷
۴-۳- نتیجه ترانسفورماسیون باکتریها با محصول واکنش اتصال ۱۵۸
۴-۴- نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pT-ROP2 ..... ۱۵۹
۴-۵- نتایج PCR قطعه ROP2 با استفاده‌از پلاسمید نوترکیب pT-ROP2 ..... ۱۶۰
۴-۶- نتایج تعیین توالی ۱۶۲
۴-۷- ساب کلونینگ ژن ROP2در پلاسمید بیانی pcDNA3 ..... ۱۶۳
۴-۸- نتیجه ترانسفورماسیون با محصول واکنش اتصال برای ساب کلونینگ ژن ROP2 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ..... ۱۶۴
۴-۹- نتایج PCR قطعه ROP2 با استفاده‌از پلاسمید نوترکیب pc-ROP2 ..... ۱۶۵
۴-۱۰- نتایج برش آنزیمی پلاسمید بیانی pcDNA3 و پلاسمید نوترکیب pcROP2 ..... ۱۶۶
۴-۱۱- نتایج ترانسفکت پلاسمید نوترکیب pcROP2 درسلول یوکاریوت ۱۶۷
۴-۱۱-۱- نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۱۶۷
۴-۱۱-۲- نتایج وسترن بلات ۱۶۸
۴-۱۲- نتایج چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۱۶۹
۴-۱۳- نتایج بررسی ایمنی هومورال ۱۷۳
۴-۱۳-۱- نتایج اندازه گیری IgG (Total IgG) ۱۷۳
۴-۱۴- نتایج بررسی ایمنی سلولی ۱۷۸
۴-۱۴-۱- نتایج سنجش سایتوکائین‌ها ۱۷۸

فصل پنجم : بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۸۳
۵-۱- بحث ۱۸٤
۵-۲- نتیجه‌گیری ۱۹۹
۵-۳- پیشنهادها ۲۰۰

فهرست منابع ۲۰۱
چکیده انگلیسی ۲۲۱

فهرست جداول

جدول ۲-۱. سیتوکین‌هایی که به عنوان ادجونت ژنتیکی همراه با واکسنهای DNA استفاده می‌شوند ۹۳

جدول ۲-۲. ادجونتهای ژنتیکی غیر از سیتوکین‌ها و ادجونتهای رایج ۹٤

جدول ۳-۱. مقادیر استاندارد در روش برادفورد ۱۲۹

جدول ۳-۲. نحوه گروه بندی موشها بر اساس نوع ماده تزریقی و تعداد موشها در هر گروه ۱٤۳

جدول ۴-۱. درصد بقاء و تعداد روزهای زندگی موشهای گروههای مختلف پس از چالش با ۱×۱۰^{۴} تاکی زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH ۱۷۱

جدول۴-۲. مقایسه میانگین OD آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG توتال در سرم موشهای گروههای کنترل و ایمنی‌زایی شده در نوبت اول خونگیری (قبل تزریق سوم) ۱۷٤

جدول۴-۳. مقایسه میانگین OD آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG توتال در سرم موشهای گروههای کنترل و ایمنی زایی شده در نوبت دوم خونگیری (۳ هفته پس از تزریق سوم) ۱۷۵

جدول ۴-۴. مقایسه میانگین مقدارIFN-γ در گروههای مختلف ۱۷۹

جدول ۴-۵. مقایسه میانگین مقدار IL-4 در گروههای مختلف ۱۷۹

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. منحنی استاندار IFN-γ ۱۵۳

نمودار ۳-۲. منحنی استاندارد IL-4 ..... ۱۵۳

نمودار ۴-۱. درصد بقاء موشهای گروه‌های مختلف بعد از چالش بـا ۱×۱۰^{۴} تـاکی زوئیـت زنـده توکـسوپلاسما گوندی سویه RH ۱۷۲

نمودار ۴-۲. نمودار ستونی میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت‌مطالعه در ۲ نوبت‌خونگیری ... ۱۷۶

نمودار ۴-۳. نمودار ستونی میانگین IFN-γ و IL-4 در گروه‌های مختلف ۱۸۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. چرخه زندگی انگل توکسوپلاسما گونده‌ایی در میزبانهای واسط و نهایی ۱۹

شکل ۱-۲. شماتیک انگل توکسوپلاسما ۲۱

شکل ۱-۳. تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گونده‌ای ۲۲

شکل ۱-۴. کیست توکسوپلاسما گونده‌ای در میزبان واسط ۲٤

شکل ۱-۵. تاکی‌زوئیتهای توکسوپلاسما گونده‌ای در ماکروفاژ ۲٤

شکل ۱-۶. آنتی‌ژنهای توکسوپلاسما گوندی ، موقعیت آنها و ژنهایی که آنها را کد می کنند ٦۷

شکل ۲-۱. مراحل واکسیناسیون DNA ۷٦

شکل ۲-۲. مکانیسم عمل واکسیناسیون DNA در تحریک سیستم ایمنی سلولی و هومورال و تولید سلول‌های خاطره‌ای ۷۷

شکل ۳-۱. نقشه ژنتیکی پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T ۱۰۸

شکل ۳-۲. مراحل کلونینگ و غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده ۱۱۳

شکل ۳-۳. نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۱۲۰

شکل ۳-۴. آناتومی ماهیچه‌های Quadricepsو Tibialis پای موش ۱٤٤

شکل ۴-۱. الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۰/۸٪ ۱۵۷

شکل ۴-۲. الکتروفورز محصول PCR ژن ROP2 توکسوپلاسماگوندی با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد ۱۵۸

شکل ۴-۳. مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده‌از کلنی‌های سفید و کلنی‌های آبی ۱۵۹

شکل ۴-۴. الگوی الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-ROP2 روی ژل آگاروز ۱٦۰

شکل ۴-۵. الکتروفورز محصول PCR با استفاده‌از پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-ROP2 روی ژل آگاروز ۱ درصد ۱٦۱

شکل ۴-۶. نمائی از آنالیز تعیین توالی ۷۳۳ جفت باز از ابتدای ژن ۱٦۲

شکل ۴-۷. کروماتوگرام مربوط به ژن ROP2 بعد از توالی یابی ۱٦۳

شکل ۴-۸. الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pcDNA3 وpT-ROP2 ..... ۱٦٤