بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دورهٔ دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشتهٔ انگل شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید کد کننده آنتی ژن GRA5 و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کد کننده آنتی‌ژن اصلی سطحی ۱ و آنتی‌ژن راپتری ۲ و ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی در موش BALB/c

نگارش

راضی ناصری فر

استاد راهنما

دکتر فاطمه غفاری فر

اساتید مشاور

دکترعبدالحسین دلیمی اصل

دکتر زهره شریفی

بهار ۱۳۹۱

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای راضی ناصری فر رشته انگل شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان « ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید کدکننده آنتی ژن GRA5 و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کدکننده آنتی ژن اصلی سطحی ۱ و آنتی ژن راپتری ۲ و ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای در موش BALB/c » در تاریخ ۱۳۹۱/۲/۲۴ 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 فاطمه غفاری فر	
استاد مشاور	دکتر عبدالحسین دلیمی اصل	
استاد مشاور	دکتر زهره شریفی	
استاد ناظر	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر بهرام کاظمی	
استاد ناظر	دکتر سید جواد طبائی	
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 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 تاریخ۸۷/۴/۱ 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 راضی ناصری فر دانشجوی رشته انگل شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ 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

۱۳۹۱/۰۲/۲۲

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 انگل شناسی پزشکی است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر فاطمه غفاری فر ، مشاوره دکترعبدالحسین دلیمی اصل و دکتر زهره شریفی 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 راضی ناصری فر دانشجوی رشته انگل شناسی پزشکی مقطع دکتری تخصصی تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی
تاریخ و امضا

۱۳۹۱/۱۰/۲۷

تقدیم به :

- **همسر گرامی و فرزندان عزیزم علی، سوزان و سوران**

به پاس همهٔ سخت‌هایی که در دوران تحصیل من تحمل کردند .

- **روح بلند برادر شهیدم که همواره سرمشق زندگی من هست .**

- **روح بزرگ پدر مهربانم و خالهٔ عزیزم که همواره راهنمای زندگی من بودند .**

- **مادر گرامی و برادران وخواهران خوبم که دعای خیرشان همیشه مددکار من بود .**

تشکر و قدردانی

- برخود لازم می‌دانم از استاد راهنمای محترم، سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر، استاد محترم گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که با صبر و سعهٔ صدر، در طول این مدت از هیچ کوششی برای من دریغ نفرمودند، قدردانی و تشکر نمایم.
- از اساتید مشاور محترم، جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل که در طول این دوره افتخار شاگردی در محضرشان را داشتم، و سرکار خانم دکتر شریفی نهایت امتنان را دارم، از خداوند متعال خواهانم که توفیق جبران شمه‌ای از زحمات این دو استاد بزرگوار و ارجمند را به من عنایت فرماید.
- از استاد محترم، مدیر سابق گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس، جناب آقای دکتر جاوید صدرایی به خاطر همهٔ محبت‌ها تقدیر و تشکر می‌کنم.
- از کارشناسان گروه انگل‌شناسی سرکارخانم قاسمی نیکو و سرکارخانم باغخانی و آقای رجبعلی‌ها به‌خاطر همکاری صادقانه در طی انجام پایان-نامه سپاسگزارم.
- انجام شدن بخش مهمی از این پایان‌نامه مدیون زحمات و لطف دوستان عزیز آقایان دکترمجید پیرستانی، دکترشهاب الدین سروی، دکتر محسن اربابی، دکتر نیما خرم آبادی ، دکتر یحیی معروفی و دکتر مهدی دلاوری بوده، که از آنان کمال امتنان دارم.
- از سرکار خانم دکتر شجاعی و خانم سلیمی همکاران گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران، به خاطر مساعدت صمیمانه تشکر می‌نمایم.
- در انتها از سایر عزیزانی که در انجام این پایان‌نامه مرا یاری داده‌اند، آرزوی موفقیت روز افزون را دارم.

چکیده

عوارض شدید و کشندهٔ توکسوپلاسموز ضرورت یافتن واکسن مؤثری علیه این بیماری را مطرح می‌سازد. از این رو توسعه واکسن‌های جدید علیه بیماری ضرورت دارد. ایمن‌سازی با پلاسمید حاوی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های محافظت کننده، راه‌کار امید بخشی برای ساخت واکسن به‌شمار می‌آید. از این رو تحقیق حاضر با هدف ارزیابی ایمنی-زایی پلاسمید کد کننده آنتی‌ژن GRA5 و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کد کننده آنتی‌ژن اصلی سطحی۱ SAG1و آنتی‌ژن راپتری۲ ROP و آنتی‌ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی در موش BALB/c صورت گرفت.

این تحقیق به صورت تجربی روی ۱۲ گروه ۱۰ تائی موش ماده BALB/c صورت گرفت. پس از استخراج DNA از تاکی‌زوئیت انگل، در طی واکنش PCR ژن کد کننده پروتئین GRA5 تکثیر شده و محصول PCR در pTZ57R/T کلون گردیده و سپس تعیین توالی شد. نتایج نشان داد که که قطعه‌ای ۳۶۳ bp در پلاسمید مذکور کلون شد. سپس این ژن در pcDNA3 ساب کلون گردیده و بعد از ترانسفکت کردن این پلاسمید نوترکیب در سلول یوکاریوتیک(CHO) بیان این ژن با استفاده از روش‌های SDS-PAGE و Western blot تأیید شد. پس از استخراج انبوه پلاسمید، با تزریق عضلانی پلاسمید نوترکیب ۳ بار به فاصله ۳ هفته، ایمونیزاسیون موش‌ها انجام شد.

نتایج سنجش سایتوکاین‌های INF-γ و IL-4 نشان‌داد کـه میزان پرولیفراسیون لنفوسیت‌هـا و سطح سایتوکاین INF-γ درDNA کوکتل حاوی پلاسمید نوترکیب pcGRA5 در مقایسه با گروه‌هـای کنترل بالاتـر بود. حـال آن‌کـه سطوح IL-4 در موش BALB/c ایمن‌سازی شده نسبت بـه گروه کنتـرل بـه میـزان قابـل توجهـی پائین‌تر بود($P\leq0.05$). تکثیر سلول‌های طحال با استفاده از روشMTT مؤید القای پاسخ سلولی بود. اندازه‌گیری IgG توتال و ایزوتایپ IgG2a و IgG1 نشان‌داد که گروه پلاسمید نوترکیب pcGRA5 در مقایسه با گروه‌های کنترل باعث تحریک IgG و IgG2a می‌شود($P\leq0.05$). اما در مورد IgG1 بین گروه‌های مورد و کنترل اختلاف معنی‌دار وجود نداشت($P>0.05$). ضمن آن‌که میزان بقا موش‌ها در گروه پلاسمید نوترکیب pcGRA5 به طور قابل توجهی از گروه‌های کنترل بیشتر بود($P\leq0.05$).

تزریق DNA واکسن کوکتل حاوی پلاسمید نوترکیب pcGRA5 باعث تولید مقادیر بیشتری IFN-γ شده و این امر با ترشح IgG2a تأیید و پاسخ ایمنی به سمت Th1 تمایل می‌کند، بر همین اساس ژن کامل GRA5 به صورت کوکتل می‌تواند کاندید مناسبی برای واکسیناسیون علیه توکسوپلاسموز باشد.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، DNA واکسن کوکتل ، ایمنی سلولی، ایمنی هومورال، ژنGRA5.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
مقدمه ۲
۱-۱. بیولوژی ۲
۱-۲. بیماری زایی ۶
۱-۳. تشخیص ۱۰
۱-۴. درمان ۱۰
۱-۵. اپیدمیولوژی ۱۱
۱-۶. فرضیه‌ها ۱۳
۱-۷. هدف ها ۱۳
۱-۸. طبقه بندی ۱۴
۱-۸-۱. خصوصیات ساختمانی انگل توکسوپلاسما گوندی ۱۴
۱-۸-۲. ژنوم توکسوپلاسما گوندی ۱۶
۱-۸-۳. رفتار بیولوژیک مراحل مختلف انگل توکسوپلاسما ۱۶
۱-۹. ایمونولوژی ۱۸
۱-۹-۱. ایمنی ذاتی در عفونت توکسوپلاسما گوندی ۱۹
۱-۹-۱-۲. نوتروفیل ها ۲۲
۱-۹-۱-۳. ماکروفاژها ۲۳
۱-۹-۲. تهاجم در محیط داخل سلول انگل ۲۴
۱-۱۰. ترشح سلولی در اپی کمپلکس ۲۵
۱-۱۰-۱. میکرونم ۲۵
۱-۱۰-۲. روپتریس ۲۷
۱-۱۰-۳. گرانول‌های فشرده (اجسام فشرده) ۲۸
۱-۱۱. وضعیت کنونی واکسیناسیون توکسوپلاسموز و دورنمای آینده ۲۹
۱-۱۱-۱. منافع بالقوه واکسیناسیون توکسوپلاسموز در حیوانات ۲۹
۱-۱۱-۱-۱. توکسوپلاسموز در گوسفند و بز ۲۹
۱-۱۱-۱-۲. توکسوپلاسما در خوک ۳۰
۱-۱۱-۱-۳. توکسوپلاسما در گاو ۳۱
۱-۱۱-۱-۴. توکسوپلاسما در ماکیان ۳۱
۱-۱۱-۱-۵. توکسوپلاسما در گربه ۳۱
۱-۱۱-۲. منافع واکسیناسیون ضد توکسوپلاسموز ۳۱
۱-۱۱-۲-۱. منافع واکسیناسیون حیوانات ۳۱
۱-۱۱-۲-۲. اهمیت بالقوه واکسیناسیون برای انسان ۳۲
۱-۱۱-۳. وضعیت کنونی واکسن‌های مورد استفاده میزبان واسط ۳۴
۱-۱۱-۳-۱. واکسیناسیون با استفاده از عصاره یا کشته شده انگل ۳۴
۱-۱۱-۳-۲. واکسیناسیون با استفاده از انگل زنده ضعیف شده ۳۵
۱-۱۱-۳-۳. واکسیناسیون با استفاده از حذف ژنی انگل‌های ضعیف شده ۳۶

۱-۱۱-۳-۴. واکسیناسیون با استفاده از وکتورهای ویرال ۳۷
۱-۱۱-۳-۵. واکسیناسیون با استفاده از وکتورهای باکتریال ۳۷
۱-۱۱-۳-۶. واکسن DNA ۳۸
۱-۱۱-۳-۷. واکسن‌های زیر واحدیSubunit ۴۰
۱-۱۲. ادجوانت ۴۲
۱-۱۲-۱. تعریف ادجوانت ۴۲
۱-۱۲-۲. اهمیت ادجوانت ۴۲
۱-۱۲-۳. طبقه‌بندی ادجوانت‌ها ۴۲
۱-۱۲-۴. منافع ادجوانت ۴۳
۱-۱۲-۵. مهمترین انواع ادجوانت ۴۴
۱-۱۲-۵-۱. آلوم ۴۴
۱-۱۲-۵-۲. ساپونین ۴۴
۱-۱۲-۵-۳. ساپونین تخلیص شده و Quil A ۴۵
۱-۱۲-۵-۴. ادجوانت نانو ۴۷
۱-۱۳. مروری بر تولید و ارزیابی ایمنولوژیکی واکسنهای ضد توکسوپلاسما گوندی در ایران و جهان ۴۸
۱-۱۳-۱. مطالعات مهم ارزیابی واکسن ضد توکسوپلاسما در ایران ۴۸
۱-۱۳-۲ مطالعات مهم ارزیابی واکسن ضد توکسوپلاسما در جهان ۵۰
فصل دوم: مواد و روش ها ۶۵
۲-۱. تکثیر و نگهداری انگل توکسوپلاسما استرینRH ۶۶
۲-۲. استخراج DNA (DNA Extraction) ۶۷
۲-۲-۱. استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم ۶۷
۲-۲-۲. استخراج DNA توسط کیت شرکتBioneer ۶۸
۲-۳. اندازه گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن ۶۹
۲-۴. الکتروفورز DNA ۶۹
۲-۴-۱. طرز تهیه محلول (TAE) ۷۰
۲-۴-۲. طرز تهیهٔ ژل آگاروز ۱/۵ درصد برای الکتروفورزDNA ۷۰
۲-۵. تکثیر DNA با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز ۷۱
۲-۵-۱. طراحی پرایمرها ۷۱
۲-۵-۲. مواد و وسایل مورد نیاز به منظور انجام واکنش PCR ۷۲
۲-۵-۲-۱. دمای اتصال پرایمر ۷۳
۲-۵-۳. مراحل واکنش PCR ۷۳
۲-۵-۴. بررسی محصول PCR ۷۵
۲-۵-۵. خالص سازی محصولPCR ۷۵
۲-۵-۵-۱. استخراج DNA از ژل توسط کیت شرکت Bioneer ۷۵
۲-۶. کلونینگ ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R/T (T-Vector) ۷۶
۲-۶-۱. اتصال قطعات DNA (DNA ligation) ۷۶
۲-۶-۲. انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری (Transformation) ۷۸
۲-۶-۳. طرز تهیهٔ محیط کشت باکتری ۷۸

۲-۶-۳-۱. محیط کشت مایع LB broth (Luria-Bertani) ۷۸
۲-۶-۳-۲. محیط کشت جامد LB Agar ۷۸
۲-۶-۳-۳. محیط نگهداری باکتری ها ۷۹
۲-۶-۳-۴. طرز تهیهٔ باکتری مستعد (Competent Cell) به روش کلرید کلسیم ۷۹
۲-۶-۴. انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری(ترانسفورماسیون باکتری) ۸۰
۲-۶-۴-۱. محلول ذخیره IPTG ۸۰
۲-۶-۴-۲. محلول ذخیره X-Gal ۸۱
۲-۶-۴-۳. تهیهٔ پلیت حاوی X-Gal و IPTG ۸۱
۲-۶-۵. روش های تأییدکننده کلونینگ قطعه GRA5 در ناقل پلاسمیدی ۸۲
۲-۶-۵-۱. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های آبی و سفید ۸۲
۲-۶-۵-۲. انجام Colony PCR با استفاده از کلنی های آبی و سفید به عنوان الگو ۸۲
۲-۶-۵-۳. برش آنزیمی DNA پلاسمیدی(Restriction mapping) ۸۳
۲-۶-۵-۴. تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing) ۸۶
۲-۷. ساب کلونینگ قطعه GRA5 در پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ۸۶
۲-۷-۱. آمادهٔ سازی و استخراج پلاسمید pcDNA3 برای کلونینگ ژن هدف ۸۷
۲-۷-۲. برش پلاسمید pTZ-GRA5و پلاسمید pcDNA3 فاقد ژن هدف توسط آنزیم هایHindIII و EcoRI و جداسازی قطعه GRA5 ۸۸
۲-۷-۳. اتصال قطعه GRA5 به پلاسمید pcDNA3 ۹۰
۲-۷-۴. انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری E.coli (ترانسفورم کردن باکتری) ۹۰
۲-۷-۵. روش های تأییدکننده کلونینگ قطعه GRA5 در پلاسمید بیانیpcDNA3 ۹۱
۲-۷-۵-۱. روش Colony-PCR ۹۱
۲-۷-۵-۲. مقایسه پلاسمید نوترکیب pcGRA5 و پلاسمید pcDNA3 بعد از برش آنزیمی ۹۱
۲-۷-۵-۳. تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing): ۹۱
۲-۸. بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوتیک ۹۲
۲-۸-۱. انتقال پلاسمید نوترکیب pcGRA5 به درون سلول یوکاریوتیک (Transfection) ۹۲
۲-۸-۲. تأیید بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوتیک ۹۴
۲-۸-۲-۱. استخراج پروتئین ۹۴
۲-۸-۲-۲. تعیین غلظت نمونه های پروتئینی با استفاده از روش برادفورد ۹۵
۲-۸-۲-۳. معرف برادفورد ۹۵
۲-۸-۲-۴. محلول استاندارد ۹۵
۲-۸-۳. تعیین وزن ملکولی پروتئینها با روش SDS-PAGE ۹۶
۲-۸-۳-۱. مواد، محلول ها و وسایل مورد نیاز برای SDS-PAGE ۹۶
۲-۸-۳-۲. محلول آکریل آمید- بیس آکریل آمید ۳۰ درصد ۹۷
۲-۸-۳-۳. محلول SDS ۱۰درصد ۹۷
۲-۸-۳-۴. بافر ژل متراکم کننده ۹۷
۲-۸-۳-۵. بافر ژل جدا کننده ۹۷
۲-۸-۳-۶. محلول پرسولفات آمونیوم۱۰درصد ۹۸
۲-۸-۳-۷. ایزوبوتانل اشباع از آب ۹۸

۲-۸-۳-۸. بافر نمونه 5X ۹۸
۲-۸-۳-۹. بافر تانک ۹۸
۲-۸-۳-۱۰. محلول رنگآمیزی ۹۸
۲-۸-۳-۱۱. محلول رنگ بر ۹۹
۲-۸-۴. وسترن بلات (Western blot) ۱۰۰
۲-۸-۴-۱. مواد، محلول های و وسایل لازم برای وسترن بلات ۱۰۱
۲-۸-۵. روش RT-PCR ۱۰۳
۲-۸-۵-۱. استخراج RNA ۱۰۳
۲-۸-۵-۲. تهیۀ cDNA از روی RNA ۱۰۴
۲-۸-۵-۳. PCR قطعه GRA5 با استفاده از cDNA تهیۀ شده از مرحله قبل (RT-PCR) ۱۰۵
۲-۸-۵-۴. الکتروفورز محصول RT-PCR ۱۰۶
۲-۹. استخراج انبوه پلاسمید pcGRA5، pcSAG1 و pcROP2 توسط کیت Mega Plasmid Endo Free ۱۰۶
۲-۱۰. ارزیابی ایمنی زایی pcGRA5 و DNA کوکتل GRA 5، ROP2 و SAG1 در موش BALB /c ۱۰۷
۲-۱۰-۱. انتخاب حیوان آزمایشگاهی مناسب ۱۰۷
۲-۱۰-۲. گروه بندی موشها ۱۰۸
۲-۱۰-۳. ایمن سازیImmunization ۱۰۸
۲-۱۰-۳-۱. نحوه تزریق داخل عضلانی ۱۰۹
۲-۱۰-۳-۲. نحوه آماده سازی نانو ادجوانت MMT ۱۰۹
۲-۱۰-۴. چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش ها ۱۱۰
۲-۱۱-۱. آماده سازی آنتی ژن(ST-Ag) ۱۱۱
۲-۱۱-۲. آماده سازی و استفاده از کیسه دیالیز ۱۱۱
۲-۱۱-۳. نحوه جمع آوری سرم موش ها ۱۱۲
۲-۱۱-۴. چیکر بورد ۱۱۲
۲-۱۱-۵. آزمایش الایزا غیر مستقیمIndirect ELISA ۱۱۴
۲-۱۱-۶. اندازه گیری ساب تایپ آنتی بادی Antibody Isotyping ۱۱۴
۲-۱۲. بررسی ایمنی سلولی ۱۱۵
۲-۱۲-۱. روش استخراج لنفوسیت‌ها از طحال موش‌ها ۱۱۵
۲-۱۲-۱-۱. طرز تهیه بافر لیز ۱۱۵
۲-۱۲-۲. روش کشت سلول های لنفوسیت طحال موش برای سنجش سایتوکاین ها ۱۱۷
۲-۱۲-۳. سنجش سایتوکاینCytokine assay ۱۱۷
۲-۱۲-۳-۱. کوت کردن آنتی بادی (Coating Antibodies) ۱۱۸
۲-۱۲-۳-۲. بلوکه کردن (Blocking) ۱۱۹
۲-۱۲-۳-۳. نمونه تست و استانداردها ۱۱۹
۲-۱۲-۳-۴. آنتی بادی های شناساگر بیوتینیله ۱۱۹
۲-۱۲-۳-۵. SPP Conjugate ۱۱۹
۲-۱۲-۳-۶. سوبسترا ۱۲۰
۲-۱۳. اندازه‌گیری تکثیر لنفوسیت ها به وسیله آزمایشMTT ۱۲۰
۲-۱۳-۱. طرز تهیۀ محلول MTT ۱۲۱

۲-۱۳-۲. روش کشت سلول های لنفوسیت طحال موش در آزمایش MTT ۱۲۲
۲-۱۴. ارزیابی آماری نتایج حاصل از بقا پس از چالش با سویه RH و ایمنی هومورال و سلولی ۱۲۴
فصل سوم :نتایج و یافته ها ۱۲۵
۳. نتایج ۱۲۶
۳-۱. نتیجه استخراج DNA ۱۲۶
۳-۲. نتایج حاصل از تهیهٔ باکتری مستعد ۱۲۷
۳-۳. نتایج حاصل از ترانسفورم کردن ۱۲۷
۳-۴. نتایج حاصل از غربالگری باکتریهای حاوی پلاسمید نوترکیب ۱۲۸
۳-۵. نتایج حاصل از تأیید وجود قطعه GRA5 در پلاسمید نوترکیب ۱۲۹
۳-۵-۱. روش Colony PCR پلاسمید نوترکیب ۱۲۹
۳-۵-۲. برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ-GRA5 ۱۳۰
۳-۵-۳. تعیین توالی ۱۳۱
۳-۶. ساب کلونینگ ژن GRA5 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ۱۳۱
۳-۷. نتیجه ترانسفورماسیون محصول واکنش اتصال برای ساب کلونینگ ژن GRA5 در pcDNA3 ۱۳۲
۳-۸. نتایج Colony PCR قطعه GRA5 با استفاده از پلاسمید نوترکیب pcGRA5 ۱۳۳
۳-۹. نتایج برش آنزیمی پلاسمید بیانی pcDNA3 و پلاسمید نوترکیب pcGRA5 ۱۳۳
۳-۱۰. نتایج ترانسفکت پلاسمید نوترکیب pcGRA5 درسلول یوکاریوت ۱۳۴
۳-۱۰-۱. نتایج RT-PCR با RNA استخراج شده از سلول های ترانسفکت شده با pcGRA5 ۱۳۴
۳-۱۰-۲. نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۱۳۵
۳-۱۰-۳. نتایج وسترن بلات ۱۳۶
۳-۱۱. نتایج چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۱۳۷
۳-۱۲. نتایج بررسی ایمنی هومورال ۱۴۰
۳-۱۲-۱. نتایج اندازه گیریIgG (Total IgG) ۱۴۰
۳-۱۲-۲. نتایج اندازه گیری ایزوتایپ IgG1 ۱۴۴
۳-۱۲-۳. نتایج اندازه گیری ایزوتایپ IgG2a ۱۴۸
۳-۱۳. نتایج بررسی ایمنی سلولی ۱۵۲
۳-۱۳-۱. نتایج سنجش سایتوکاینIFN-γ ۱۵۲
۳-۱۳-۲. نتایج سنجش سایتوکاینIL-4 ۱۵۶
۳-۱۴. نتیجه سنجش MTT : ۱۶۰
فصل چهارم: بحث ،نتیجه گیری و پیشنهادها ۱۶۲
۴-۱. بحث ۱۶۳
۴-۲. نتیجه گیری کلی ۱۷۶
۴-۳. پیشنهادها ۱۷۷
فهرست منابع ۱۸۰
چکیده انگلیسی ۱۹۰

فهرست جدول‌ها

جدول۱-۱: تفاوت‌های مورفولوژیک انگل توکسوپلاسما در مراحل مختلف زندگی انگل. ۱۵
جدول۲-۱: مواد مورد نیاز برای انجام PCR ۷۴
جدول۲-۲: برنامه مراحل مختلف PCR..... ۷۴
جدول۲-۳: مواد مورد نیاز برای انجام ligation..... ۷۷
جدول۲-۴: مواد مورد نیاز برای انجام Colony PCR..... ۸۳
جدول۲-۵ : مواد موردنیاز برای برش آنزیمی DNA پلاسمیدی ۸۵
جدول۲-۶: مواد مورد نیاز برای برش پلاسمید نوترکیب pTZ-GRA5 و پلاسمید بیانی pcDNA3 فاقد ژن..... ۸۹
جدول۲-۷: مقادیر استاندارد در روش برادفورد..... ۹۶
جدول ۲-۸: مواد مورد نیاز برای تهیه cDNA..... ۱۰۵
جدول۲-۹: نحوه گروه‌بندی موش‌ها بر اساس نوع ماده تزریقی و تعداد موش‌ها در هر گروه ۱۰۸
جدول۳-۱: درصد بقاء و تعداد روزهای زندگی موش‌های گروه‌های کنترل پس از چالش ۱۳۸
جدول۳-۲: درصد بقاء و تعداد روزهای زندگی موش‌های گروه‌های مورد ۱۳۹
جدول۳-۳: مقایسه میانگین OD توتال IgG با استفاده از تست الایزا در سرم موش‌های مورد مطالعه..... ۱۴۱
جدول۳-۴: مقایسه میانگین IgG1 OD با استفاده از تست الایزا در سرم موش‌های مورد مطالعه ۱۴۵
جدول۳-۵: مقایسه میانگین IgG2a OD با استفاده از تست الایزا در سرم موش‌های مورد مطالعه ۱۴۸
جدول۳-۶: مقایسه مقدار میانگین سایتوکاینIFN-γ با استفاده از تست الایزا در سرم موش‌های مورد مطالعه ۱۵۲
جدول۳-۷: مقایسه مقدار میانگین سایتوکاین IL-4 با استفاده از تست الایزا در سرم موش‌های مورد مطالعه..... ۱۵۷
جدول۳-۸: سنجش MTT در گروه‌های تحریک آنتی‌ژنی و بدون تحریک آنتی‌ژنی ۱۶۱

فهرست نمودارها

نمودار۳-۱: درصد بقای موش‌های گروه‌های کنترل پس از چالش با توکسوپلاسما گوندی سویه RH..... ۱۳۸
نمودار۳-۲: درصد بقای موش‌های گروه‌های مورد پس از چالش با توکسوپلاسما گوندی سویه RH..... ۱۳۹
نمودار۳-۳: میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موش‌های تحت مطالعه..... ۱۴۱
نمودار۳-۴: میانگین OD سطح IgG1 در سرم موش‌های مورد مطالعه..... ۱۴۵
نمودار۳-۵: میانگین OD سطح IgG_2a در سرم موش‌های مورد مطالعه..... ۱۴۹
نمودار۳-۶: مقدار میانگین سایتوکاینγ-IFN در سرم موش‌های مورد مطالعه..... ۱۵۳
نمودار۳-۷: مقدار میانگین سایتوکاین IL-4 در سرم موش‌های مورد مطالعه..... ۱۵۷
نمودار۳-۸: سنجشMTT در گروه‌های مورد وشاهد..... ۱۶۱

فهرست شکل‌ها

شکل۱-۱: تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندی ۳
شکل۱-۲: زوئیتوسیست توکسوپلاسما گوندی در مغز یک موش ۴
شکل۱-۳: چرخه زندگی انگل توکسوپلاسما گوندی در میزبان‌های واسط و نهایی ۶
شکل۱-۴: تاکی‌زوئیت انگل توکسوپلاسما گوندی ۱۵
شکل۲-۱: نقشه ژنتیکی پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T ۷۷
شکل۲-۲: مراحل کلونینگ و غربالگری کلون‌های ترانسفورم‌شده ۸۲
شکل۲-۳: نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۸۷
شکل۲-۴: محل تزریق عضلانی در ماهیچه‌های Quadriceps و Tibialis پای موش ۱۰۹
شکل۲-۵: پلیت آزمایش MTT قبل از اضافه کردن DMSO ۱۲۳
شکل۲-۶: پلیت آزمایش MTT بعد از اضافه کردن DMSO ۱۲۴
شکل۳-۱: الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۱٪ ۱۲۶
شکل۳-۲:الکتروفورز محصول PCR ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی روی ژل آگارز۱٪ ۱۲۷
شکل۳-۳ : پلیت حاوی کلنی‌های آبی وسفید باکتری TOP 10 ..... ۱۲۸
شکل ۳-۴: الکتروفورزPCR کلون‌های نوترکیب بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ ۱۲۹
شکل ۳-۵: الکتروفورزPCR کلون‌های نوترکیب مثبت بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ ۱۳۰
شکل۳-۶: برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ-GRA5 روی ژل آگاروز ۱ ٪ ۱۳۰
شکل۳-۷: آنالیز تعیین توالی bp ۳۶۳ ژن GRA5 ..... ۱۳۱
شکل۳-۸: کروماتوگرام مربوط به ژن GRA5 بعد از توالی‌یابی ۱۳۱
شکل۳-۹: الکتروفورز استخراج پلاسمید pcDNA3 و pTZ-GRA5 روی ژل آگاروز ۱٪ ۱۳۲
شکل۳-۱۰: باندهای پلاسمید نوترکیب pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱/۵٪ ۱۳۲
شکل۳-۱۱: الکتروفورز محصول PCR Colony پلاسمید نوترکیب pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱/۵٪ ۱۳۳
شکل۳-۱۲: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱٪ ۱۳۴
شکل۳-۱۳: الکتروفورز محصول RT-PCR ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱۳۵
شکل۳-۱۴: تعیین وزن مولکولی پروتئین GRA5 در SDS-PAGE ۱۳۶
شکل۳-۱۵: نوارهای نیترو سلولز به‌دست آمده از روش وسترن بلات ۱۳۷

فصل اول

مقدمه و

مروری برمطالعات گذشته

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی برای اولین بار در سال ۱۹۰۸ درکلونی جونده صحرائی، گوندی، که در انیستیتو پاستور تونس نگهداری می‌شد، شناسایی گردید. از آن پس این انگل تقریباً در تمام کشورهای جهان در گونه‌های زیادی از گوشت‌خواران، حشره‌خواران، جوندگان، خوک‌ها، علف‌خواران، پریمات‌ها و دیگر پستانداران و پرندگان یافت شد.

توکسوپلاسما در جمعیت انسانی به صورت جهانی است و می‌تواند سبب بیماری باشد. اهمیت این ارگانیسم به عنوان عامل بیماریزای انسانی، تحقیقات زیادی را در سال‌های اخیر بر انگیخت. از اواسط دهه ۱۹۸۰ توکسوپلاسما از جمله انگل‌های مشکل‌ساز برای بیماران مبتلا به سرکوب ایمنی شناخته شد، همین موضوع باعث شد که تک یاخته انگلی گمنامی از یک جونده آفریقایی گمنام به یکی از موضوعات هیجان آوری تبدیل گردد، که بعدها اهمیت آن به وسیله پژوهش‌ها آشکار شد.

۱-۱. بیولوژی

توکسوپلاسما گوندی انگل داخل سلولی برای بسیاری از بافت‌ها از قبیل ماهیچه‌ها و اپی‌تلیوم روده است. در عفونت‌های فوق حاد، ارگانیسم را می‌توان به صورت آزاد در خون و ترشحات محوطهٔ صفاقی یافت نمود. توکسوپلاسما ممکن است در هسته سلول میزبان ساکن شود ولی معمولاً در سیتوپلاسم زندگی می‌کند. چرخه زندگی در گربه‌های اهلی و دیگر گربه‌سانان شامل مرحله اپی‌تلیوم روده‌ای[1] ومرحله خارج روده‌ای[2] می‌باشد، اما در دیگر میزبان‌ها تنها مرحله خارج روده‌ای دیده می‌شود. مرحله

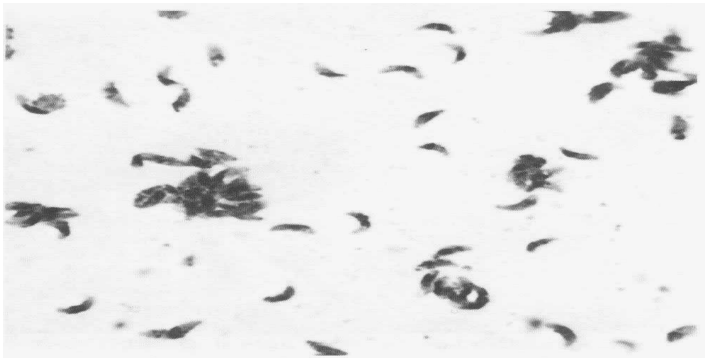
1 . Entroepithelial
2. Extraintestinal

خارج روده‌ای هنگامی آغاز می‌شود که گربه یا دیگر میزبان‌ها برادی‌زوئیت را ببلعنـــد. تاکی‌زوئیت‌ها یا اسپروسیست‌های خورده‌شده هم، برخی مواقع عفونت‌زا بوده و امکان عفونت را فراهم می‌سازد.

اووسیست‌ها، ۱۳-۱۰ در۱۱-۹ میکرومتر طول داشته و به نظر می‌رسد شبیه دیگـر جـنس‌هـای ایزوسپورایی است. در اووسیست، باقیماندهٔ اووسیستی یا گرانول قطبی وجود نداشته و اسپوروسیست‌ها دارای یـک باقیمانـدهٔ اسپوروسیسـتی بـوده ولـی فاقـد جسـم اسـتیدا[1] مـی‌باشـند. در روده کوچـک، اسپروزوئیت‌ها از اسپوروسیست‌ها و اووسیست‌ها رها می‌شوند.

در گربه‌ها، برخی از اسپروزوئیت‌ها وارد سلول‌های اپی‌تلیوم شده و در آنجا باقی مانـده تـا سـیکل انترواپی‌تلیال را شروع کنند. درحالیکه دیگر اسپروزوئیت‌ها از میـان مخـاط نفـوذ کـرده تـا در لامینـا پروپریا، گره‌های لنفاوی، مزانتر و دیگر اندام‌ها و گلبول‌های سفید خون شروع به رشد یابند.

در دیگر میزبان‌ها به جز گربه، رشد انترواپی‌تلیالی وجود ندارد. اسپروزوئیت‌ها وارد سلول میزبـان شده و تحت فرایند اندودیوژنی شروع به تکثیر می‌کنند. به آن‌ها در مراحل تقسیم سـریع، درعفونـت-های حاد، تاکی‌زوئیت[2] گفته می‌شوند (شکل۱-۱).



شکل۱-۱: تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندی (در حدود ۷ تا ۱۲ میکرومتر)

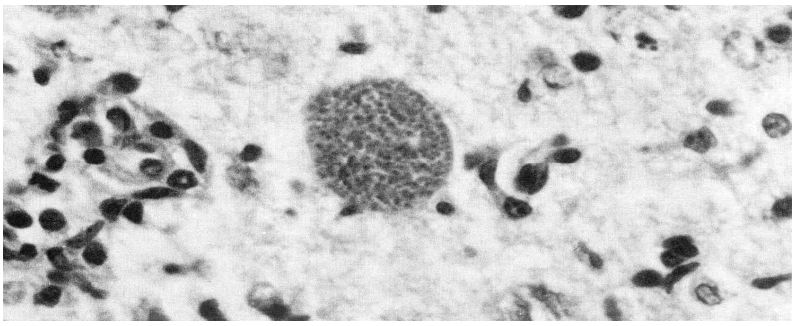
در داخل واکوئل‌های پارازیتوفوروس سلول میزبان، قبل از متلاشی شدن سلول، ۸ تـا ۳۲ تـاکی زوئیت انباشته شده و انگل‌هائی که آزاد می‌شوند، سـلول‌هـای جدیـد را آلـوده مـی‌سـازند. انباشـتگی

1. Stieda body
2. Tachyzoite

تاکی‌زوئیت‌ها در یک سلول، گروه[1] نامیده می‌شود. ظاهراً تاکی‌زوئیت‌ها نسبت به ترشحات معده حساس بوده بنابر این نسبت به مراحل دیگر، منبع بی اهمیتی برای عفونت محسوب می‌شوند.

وقتی‌که عفونت مزمن می‌شود زوئیت‌ها، مغز، قلب و ماهیچه‌های اسکلتی را آلوده ساخته و نسبت به مرحله حاد، بسیار کندتر تکثیر می‌یابند. در این مرحله به آن‌ها برادی‌زوئیت[2] می‌گویند که در سلول میزبان در دسته‌های بزرگ، تجمع یافته و توسط یک دیواره ضخیم احاطه و در این حالت به آن‌ها، زوئیتوسیست[3] یا کیست‌های بافتی[4] گفته می‌شوند (شکل ۱-۲).

کیست‌ها ممکن است ماه‌ها یا حتی سال‌ها بعد از عفونت مخصوصاً در بافت عصبی ماندگار باشند. تشکیل کیست‌ها، هم‌زمان با توسعه ایمنی در عفونت جدید بوده که معمولاً دائمی هستند. هنگامی که ایمنی تضعیف می‌شود، برادی‌زوئیت‌های آزاد شده می‌توانند تا سطح قبلی، ایمنی را تقویت کنند. این حفاظت در برابر سوپراینفکشن به وسیله حضور عامل بیماریزا در بدن را پریمونیشن[5] می‌نامند. ایمنی در توکسوپلاسموز شامل هر دو نوع Th2 و Th1 شده که نوع آخری از اهمیت بیشتری برخوردار است[۱] .



شکل ۱-۲: زوئیتوسیست توکسوپلاسما گوندی در مغز یک موش.

دیوارهٔ سخت و نازک کیست به طور موثر انگل را از میزبان جدا کرده و به غیر از زمان متلاشی شدن کیست ، باعث بر انگیختن واکنش التهابی نمی‌شود. دیوارهٔ کیست و برادی‌زوئیت‌های آن به

1. Group
2. Bradizoite
3. Zoitocyst
4. Tissue cyst
5. Premonition