بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محمد جعفری مدرک رشته انگل شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان: « ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید کدکننده پروتئین میکرونم (MIC3) توکسوپلاسما گوندی در موش BALB/c » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۱/۹ 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 فاطمه غفاری فر	
استاد مشاور	دکتر زهره شریفی	
استاد مشاور	دکتر عبدالحسین دلیمی اصل	
استاد ناظر	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر بهرام کاظمی	
استاد ناظر	دکتر نایبعلی احمدی	
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 می‌باشد 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 می‌باشد.

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 یاآثار 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 یافته‌ها 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 ۸۷/۷/۱۵شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب محمد جعفری مدرک دانشجوی رشته انگل شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی۱۳۸۶مقطع دکتری دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم 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 محمد جعفری مدرک

تاریخ

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 علمیپژوهشی 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 ۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به **راهنمایی دکتر فاطمه غفاری‌فر، مشاوره دکتر زهره شریفی ودکتر عبدالحسین دلیمی اصل**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 دانشگاهتربیت 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 محمد جعفری مدرک دانشجوی رشته انگل شناسی پزشکی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی محمد جعفری مدرک

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

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

عنوان

ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید کدکننده پروتئین میکرونم (MIC3) توکسوپلاسما گوندی درموش BALB/c

نگارش

محمد جعفری مدرک

استاد راهنما

دکتر فاطمه غفاری فر

اساتید مشاور

دکتر زهره شریفی- دکترعبدالحسین دلیمی اصل

بهمن ۱۳۹۰

تقدیم به:

مرحوم پدر عزیز و مادر بزرگوارم، که هرچه دارم از دعای خیرشان است.

مرحوم برادر گرانقدرم، نخست آموزگار زندگی‌ام

همسر مهربان وفرزندان دلبندم: مهدی و هانیه، امیدهای زندگی‌ام

آموزگاران دوران ابتدایی و راهنمایی: خانم عالمشاهی، خانم نجاتی، خانم زاغی، آقای اصغر عرب، آقای ابوالفضل مهدوی، آقای افراسیاب رحمتی و مرحوم غلامرضایی که زیر بنای فرهنگی زندگی ام رانهادند.

مردم سخت کوش خطه‌ی سیستان و بلوچستان.

کارکنان و ریاست محترم دانشگاه علوم پزشکی زاهدان.

سپاسگزاری:

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

استاد گرانقدر سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر که راهنمایی اینجانب را در این تحقیق به عهده گرفته و با راهنمائی‌های خردمندانه خویش مرا در هر چه پر بارتر کردن این پایان نامه یاری نمودند.

❖ استاد دانشمند جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل که در طول تحصیل همواره از تجربیات علمی و عملی ایشان برخوردار بوده و در طول این تحقیق مشاور و مشوق اینجانب بودند.

❖ استاد محترم و فرزانه سرکار خانم دکتر زهره شریفی که در مراحل مختلف پایان نامه از مشاوره‌های ارزشمند شان بر خوردار گردیدم.

❖ استاد محترم جناب آقای دکتر جاوید صدرائی که از راهنمائی‌های ایشان استفاده نمودم.

❖ استاد محترم سرکار خانم دکتر شجاعی و خانم سلیمی، اعضای محترم هیئت علمی دانشگاه تهران که صمیمانه همکاری نمود ند.

❖ معاونت محترم آموزشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان که امکانات تحصیل را فراهم آوردند.

❖ کارشناسان محترم گروه انگل شناسی سرکار خانم قاسمی نیکو و سر کار خانم باغخانی که از مساعدتهای بی دریغ ایشان بر خوردار گردیدم.

❖ دوستان و همکلاسی‌های عزیز: دکتر شهاب الدین سروی، دکتر مجید پیرستانی، دکتر نیما خرم آبادی، راضی ناصری فر، حسین ثباتی، یحیی معروفی، حسین وزینی، محسن اربابی و محمود محامی که از همکاری‌های علمی شان استفاده نمودم.

❖ دوستان دانشکده فنی و علوم پایه: دکتر علی نعیمی صدیق، دکتر علی عسکری، دکتر مهدی کریمی، دکتر کریم خوشگرد، دکتر مهدی حسانی، دکتر جواد باقر نژاد، دکتر کورش ویسی و محسن آهی که صمیمانه همکاری نمودند.

چکیده:

توکسوپلاسما گوندی یک انگل تک یاخته‌ای داخل سلولی است که موجب بیماری توکسوپلاسموز در انسان و حیوان میشود. انگل انتشارجهانی داشته و حدودیک سوم از انسانها سرم مثبت هستند. عفونتهای توکسوپلاسمایی در اکثر افراد سالم فاقد علامت بوده ولی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف علائم شدیدتری ایجاد می‌کند.

انگل توکسوپلاسما همانند سایر ارگانیسم‌های تک سلولی متشکل از آنتی ژنهای ایمنوژنیک فراوانی است. با وجود اینکه ممکنست آنتی ژنهای دفعی – ترشحی بهترین نوع آنتی ژن برای تحریک پاسخهای ایمنی سلولی و در نتیجه کاندید مناسبی برای تهیه واکسن بر علیه توکسوپلاسموز باشند ولی مطالعات اندکی بر روی آنها انجام شده است. در این مطالعه ما پروتئین میکرونم۳(MIC3) توکسوپلاسما گوندی را بصورت DNA واکسن تهیه نموده و مورد ارزیابی قرار دادیم.

در این تحقیق پس از استخراج DNA ژنومی از انگل به روش فنل-کلروفرم و جداسازی و تکثیر ژن کد کننده MIC3 با روش PCR، محصول PCR در pTZ57R/T کلون گردیده و سپس تعیین توالی شد. نتایج نشان داد که که قطعه ۱۰۵۲bp در پلاسمید مذکور کلون شده و قطعه کلون شده ژن MIC3 توکسوپلاسما گوندی است. ژن کلون شده ازنظر توالی نوکلئوتیدی با شماره JF330835.1 استرین RH 100٪ و با شماره AJ132530.1 همین استرین 98٪ شباهت دارد. سپس این ژن در pcDNA3 ساب کلون گردیده و بعد از ترانسفکت کردن این پلاسمید نو ترکیب در سلول یوکاریوتیک(CHO) بیان این ژن به روشSDS-PAGE وWestern blotting تایید شد. در این مطالعه به منظور بررسی پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی ۷۰ موش Balb/c ماده Inbred با پلاسمید حاوی این ژن ایمن‌سازی شدند. ایمونیزاسیون ۳ بار به فواصل ۳ هفته‌ای انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان بقاء موش‌ها یی که با پلاسمید ریکامبینانت ایمن‌سازی شدند با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار دارند. اندازه‌گیری IgG و اندازه‌گیری ایزوتایپ IgG_{2a} نیز اختلاف معنی‌دار را بین گروههای مورد و کنترل تایید کرد($P\leq0.05$). اندازه‌گیری IFN-γ نشان دهنده مقادیر بالایی از این سایتوکائین بوده ولی اندازه‌گیری IL4 نشان دهنده مقدار پایین این سایتوکائین است.

با توجه به نتایج، DNA واکسن حاوی ژن MIC3 قادر به ایجاد مقاومت بر علیه توکسوپلاسما می‌باشد. همچنین یافته‌های این مطالعه نشان داد که استفاده از آدجوانت ژنتیکی IL- 12همراه با DNA واکسن حاوی MIC3 تغییر معنی‌دار در پاسخهای ایمنی در بعضی گروه‌ها ایجاد می‌کند.

واژگان‌کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، DNA واکسن، MIC3، IL-12

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. سؤالات اصلی تحقیق ۵

۱-۳. کلیات ۵

۱-۴. تاریخچه ۶

۱-۵. طبقه‌بندی توکسوپلاسما گوندی ۷

۱-۶. مرفولوژی انگل ۷

۱-۶-۱. تاکی‌زوئیت ۸

۱-۶-۲. کیست نسجی ۹

۱-۶-۳. اووسیست ۱۱

۱-۷. بیولوژی ۱۲

۱-۷-۱. مرحله روده‌ای ۱۵

۱-۷-۲. مرحله خارج روده‌ای ۱۸

۱-۸. اپیدمیولوژی ۱۹

۱-۸-۱. اپیدمیولوژی در جهان ۲۰

۱-۸-۲. اپیدمیولوژی در ایران ۲۱

۱-۹. راه‌های انتقال انگل ۲۱

۱-۹-۱. راه‌های اصلی انتقال ۲۲

۱-۹-۲. راه‌های فرعی انتقال ۲۳

۱-۱۰. مقاومت انگل توکسوپلاسما ۲۴

۱-۱۰-۱. تاکی‌زوئیت ۲۴

۱-۱۰-۲. کیست نسجی ۲۵

۱-۱۰-۳. اووسیست ۲۵
۱-۱۱. پاتوژنز و بیماریزائی ۲۶
۱-۱۱-۱. توکسوپلاسموز چشمی ۲۹
۱-۱۱-۲. توکسوپلاسموز مادرزادی ۲۹
۱-۱۱-۳. توکسوپلاسموز در افراد مبتلا به‌اختلالات ایمنی ۳۰
۱-۱۱-۴. ضایعات کلیوی ۳۱
۱-۱۲. مقاومت میزبان نسبت به توکسوپلاسما گوندی ۳۲
۱-۱۲-۱. مقاومت طبیعی ۳۲
۱-۱۲-۲. گونه‌های میزبان ۳۲
۱-۱۲-۳. سن میزبان ۳۳
۱-۱۲-۴. تنوع سویه‌های توکسوپلاسما ۳۳
۱-۱۲-۵. مقاومت اکتسابی ۳۳
۱-۱۳. پاسخ‌های ایمنی در توکسوپلاسموز ۳۴
۱-۱۳-۱. پاسخ‌های هومورال ۳۴
۱-۱۳-۲. پاسخ‌های ایمنی سلولی ۳۵
۱-۱۴. روش‌های تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز ۳۷
۱-۱۴-۱. تشخیص‌های بافت‌شناسی ۳۷
۱-۱۴-۱-۱. آسپیره ۳۸
۱-۱۴-۱-۲. بیوپسی ۳۸
۱-۱۴-۱-۳. هیستوپاتولوژی ۴۰
۱-۱۴-۲. تلقیح به حیوان آزمایشگاهی ۴۱
۱-۱۴-۳. تلقیح به جنین جوجه ۴۳
۱-۱۴-۴. تلقیح به کشت نسجی ۴۳
۱-۱۴-۵. خوراندن بافت به گربه‌های سالم ۴۳
۱-۱۴-۶. تکنیک PCR ۴۴

۱-۱۵. درمان توکسوپلاسموز ۴۵
۱-۱۵-۱. درمان‌های دارویی ۴۵
۱-۱۵-۱-۱. سولفانامیدها ۴۵
۱-۱۵-۱-۲. پیریمتامین ۴۶
۱-۱۵-۱-۳. اسپیرامایسین ۴۶
۱-۱۵-۱-۴. کوتریموکسازول ۴۶
۱-۱۵-۱-۵. تتراسایکلین‌ها ۴۷
۱-۱۵-۱-۶- کلاریترومایسین ۴۷
۱-۱۵-۱-۷. آزیترومایسین ۴۷
۱-۱۵-۱-۸. آتوواکوئن ۴۷
۱-۱۵-۲. درمان‌های غیرداروئی ۴۷
۱-۱۵-۳. ایمنی درمانی ۴۸
۱-۱۶. کنترل و پیشگیری ۴۸
۱-۱۷. ژنوم توکسوپلاسما گوندی ۴۹
۱-۱۸. اندامکهای ترشحی رأسی توکسوپلاسما ۵۰
۱-۱۸-۱. میکرونم ۵۱
۱-۱۸-۲. راپتری ۵۳
۱-۱۸-۳. گرانولهای متراکم ۵۴
۱-۱۹. آنتی‌ژنهای توکسوپلاسما گوندی ۵۴
۱-۱۹-۱. آنتی‌ژن میکرونم ۳توکسوپلاسما گوندی (MIC3) ۵۶
۱-۱۹-۱-۲. اطلاعات بانک ژنی در مورد ژن MIC3 ..... ۵۶
۱-۲۰. مروری بر مطالعات گذشته ۵۶
۱-۲۰-۱. واکسیناسیون در بیماری توکسوپلاسموز ۵۶
۱-۲۰-۱-۱. واکسیناسیون DNA ۵۸

۱-۲۰-۱-۲. مروری بر تولید و ارزیابی ایمنولوژیکی واکسنهای ضد توکسوپلاسما گوندی در ایران.....۶۲
۱-۲۰-۱-۳. مروری بر تولید و ارزیابی ایمنولوژیکی واکسنهای ضد توکسوپلاسماگوندی در جهان ۶۴

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۷۳

۲-۱. تکثیر و نگهداری انگل توکسوپلاسما استرینRH..... ۷۴
۲-۲. استخراج DNA (DNA Extraction)..... ۷۵
۲-۲-۱. استخراج به روش فنل - کلروفرم..... ۷۵
۲-۲-۲. اندازه‌گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن..... ۷۶
۲-۲-۳. الکتروفورز DNA..... ۷۶
۲-۲-۳-۱. طرز تهیه محلول (TAE)..... ۷۷
۲-۲-۳-۲. طرز تهیه ژل آگاروز ۸/ درصد برای الکتروفورزDNA ۷۷
۲-۳. تکثیر DNA با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۷۸
۲-۳-۱. طراحی پرایمرها..... ۷۸
۲-۳-۲. مواد و وسایل مورد نیاز به منطور انجام واکنش PCR..... ۷۸
۲-۳-۲. بررسی محصولPCR..... ۸۰
۲-۴. خالص‌سازی محصولPCR..... ۸۰
۲-۴-۱. تخلیص DNA از ژل توسط کیت شرکت Bioneer..... ۸۱
۲-۵. کلونینگ ژن MIC3 در پلاسمید pTZ57R/T (T- Vector)..... ۸۲
۲-۵-۱. اتصال قطعات DNA..... ۸۲
۲-۵-۲. انتقال pTMIC3به باکتری..... ۸۳
۲-۵-۲-۱. تهیه محیط کشت باکتری..... ۸۳
۲-۵-۲-۲. محیط نگهداری باکتری‌ها..... ۸۴
۲-۵-۲-۳. طرز تهیه باکتری مستعد به روش کلرید کلسیم ۸۵
۲-۵-۲-۴. انتقال پلاسمید نوترکیبpTMIC3 به درون باکتری(ترانسفورماسیون باکتری).....۸۶
۲-۶. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer..... ۸۷

۲-۷. روش‌های تاییدکننده کلونینگ قطعه MIC3در ناقل پلاسمیدی ۸۸
۲-۷-۱. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های آبی و سفید ۸۸
۲-۷-۲. برش آنزیمی DNA پلاسمیدی ۸۸
۲-۷-۳. روش PCR ۸۹
۲-۷-۴. تعیین توالی مولکول DNA ۸۹
۲-۸. ساب کلونینگ قطعه MIC3 در پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ۹۰
۲-۸-۱. برش پلاسمید نوترکیب pT- MIC3 توسط آنزیم‌های HidIII و EcoRV و جداسازی قطعه MIC3 ۹۱
۲-۸-۲. برش پلاسمید یوکاریوتیک pcDNA3توسط آنزیم‌های HindIII وEcoRV ۹۲
۲-۸-۳. اتصال قطعه MIC3 به پلاسمید pcDNA3 ۹۲
۲-۸-۴. انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری E.coli (ترانسفورم کردن باکتری) ۹۳
۲-۹. روشهای تاییدکننده کلونینگ قطعه MIC3 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ۹۳
۲-۹-۱. مقایسه پلاسمیدهای pcDNA3 وpcMIC3 با الکتروفورز ۹۳
۲-۹-۲. روش PCR ۹۴
۲-۹-۳. مقایسه پلاسمید نوترکیب pcMIC3و پلاسمید pcDNA3 بعد از برش آنزیمی ۹۴
۲-۹-۳-۱. برش پلاسمید نوترکیب pcMIC3 با آنزیم‌های HidIII و EcoRV ۹۴
۲-۹-۴. تعیین توالی مولکول DNA ۹۵
۲-۱۰. بیان ژن MIC3 در سلول یوکاریوتیک ۹۵
۲-۱۰-۱. انتقال پلاسمید نوترکیب pcMIC3 به درون سلول یوکاریوتیک ۹۵
۲-۱۱. تایید بیان ژن MIC3 در سلول یوکاریوتیک ۹۷
۲-۱۱-۱. استخراج پروتئین ۹۷
۲-۱۱-۱-۱. تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی با استفاده از روش برادفورد ۹۸
۲-۱۱-۱-۲. تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۹۹
۲-۱۱-۱-۳. وسترن بلات ۱۰۳
۲-۱۲. ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید نوترکیب pcMIC3 درموش BALB/c ۱۰۶

۲-۱۲-۱. انتخاب حیوان آزمایشگاهی مناسب ۱۰۶
۲-۱۲-۲. گروه بندی موش‌ها ۱۰۶
۲-۱۲-۳. ایمن‌سازی ۱۰۷
۲-۱۲-۳-۱. نحوه تزریق داخل عضلانی ۱۰۷
۲-۱۲-۳-۲. چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۱۰۸
۲-۱۲-۴. بررسی ایمنی هومورال ۱۰۸
۲-۱۲-۴-۱. آماده‌سازی آنتی ژن ۱۰۸
۲-۱۲-۴-۲. آماده‌سازی و استفاده از کیسه دیالیز ۱۰۹
۲-۱۲-۴-۳. نحوه جمع آوری سرم موش‌ها ۱۰۹
۲-۱۲-۴-۴. چیکر بورد ۱۰۹
۲-۱۲-۴-۵. آزمایش الایزا غیر مستقیم ۱۱۱
۲-۱۲-۴-۶. اندازه‌گیری ساب تایپ آنتی بادی (Antibody Isotyping Mouse) ۱۱۱
۲-۱۲-۵. بررسی ایمنی سلولی ۱۱۱
۲-۱۲-۵-۱. روش استخراج لنفوسیت‌ها از طحال موش‌ها ۱۱۱
۲-۱۲-۵-۲. روش کشت سلولهای لنفوسیت طحال موش برای سنجش سایتوکاین ۱۱۳
۲-۱۲-۵-۲-۱. سنجش سایتوکائین ۱۱۳
۲-۱۲-۶. ارزیابی آماری نتایج حاصل از آزمایش چالش با سویه RH و ایمنی هومورال و سلولی ۱۱۵

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۱۱۶

۳-۱. نتیجه استخراج DNA ۱۱۷
۳-۲. نتیجه انجام PCR با استفاده‌از DNA استخراج شده از انگل ۱۱۷
۳-۳. نتیجه ترانسفورماسیون باکتریها با محصول واکنش اتصال ۱۱۸
۳-۵. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pT-MIC3 ۱۱۹
۳-۶. نتایج تعیین توالی ۱۲۰

۳-۷. ساب کلونینگ ژن 3MIC در pcDNA3 ..... ۱۲۱
۳-۸. نتیجه ترانسفورماسیون با محصول واکنش اتصال برای ساب کلونینگ ژن MIC3 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ..... ۱۲۲
۳-۹- نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcMIC3 ..... ۱۲۳
۳-۱۰. نتایج ترانسفکت پلاسمید نوترکیب pcMIC3 درسلول یوکاریوت ۱۲۳
۳-۱۰-۱. نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۱۲۳
۳-۱۰-۲- نتایج وسترن بلات ۱۲۴
۳-۱۱. نتایج چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۱۲۵
۳-۱۲. نتایج بررسی ایمنی هومورال ۱۲۷
۳-۱۲-۱. نتایج بررسی اندازه‌گیری IgG(IgG توتال) ۱۲۷
۳-۱۲-۲. نتایج بررسی اندازه‌گیری ساب تایپ‌های IgG(IgG1،IgG2a) ۱۲۹
۳-۱۳. نتایج بررسی ایمنی سلولی ۱۳۱
۳-۱۳-۱. نتایج سنجش سایتوکائین‌ها ۱۳۱
۳-۱۳-۱-۱. نتایج اندازه‌گیری IFN-γ ۱۳۱
۳-۱۳-۱-۲. نتایج اندازه‌گیری میزان IL-4 ..... ۱۳۳

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۳۷

۴-۱. بحث ۱۳۸
۴-۲. نتیجه‌گیری ۱۴۷
۴-۳. پیشنهادها ۱۴۸

فهرست منابع ۱۴۹

چکیده انگلیسی ۱۶۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۲-۱) مقدار مورد نیاز در واکنش PCR ۸۰

جدول (۲-۲) برنامه PCR جهت تکثیر ژن MIC3 ..... ۸۰

جدول (۲-۳) مواد مورد نیاز برای اتصال قطعات ژن هدف در پلاسمید pTZ57R/T ۸۳

جدول (۲-۴) مواد مورد نیاز جهت برش آنزیمی پلاسمیدpTMIC3 ..... ۸۹

جدول (۲-۵) مقادیر استاندارد در روش برادفورد ۹۸

جدول (۲-۶) نحوه گروه بندی موش‌ها بر اساس نوع ماده تزریقی و تعداد موش‌ها در هر گروه.....۱۰۶

جدول (۳-۱) درصد بقاء و تعداد روزهای زندگی موش‌های گروههای مختلف پس از چالش با $۱۰^{۴}\times ۱$ تاکی زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH.....۱۲۶

جدول (۳-۲) مقایسه میانگین OD آزمایش ELISA برای اندازه‌گیری IgG توتال در سرم موش‌های گروه‌های کنترل و ایمنی زایی شده در نوبت اول خونگیری (قبل از تزریق سوم)..... ۱۲۷

جدول(۳-۳) مقایسه میانگین ODآزمایشELISA برای اندازه گیری IgG توتال در سرم موش های گروه‌های کنترل و ایمنی زایی شده در نوبت دوم خونگیری (۳ هفته پس از تزریق سوم)..... ۱۲۷

جدول (۳-۴) مقایسه میانگین OD آزمایش ELISA ساب تایپ های IgG2a&IgG1 در سرم موش‌های کنترل و موش‌های ایمن زا شده..... ۱۲۹

جدول (۳-۵) مقایسه میانگین مقدار IFN-γ(pg/ml) در گروه‌های مختلف در۴۸ ساعت..... ۱۳۱

جدول (۳-۶) مقایسه میانگین مقدار IFN-γ (pg/ml)در گروه‌های مختلف در۷۲ ساعت..... ۱۳۱

جدول (۳-۷) مقایسه میانگین مقدار IL-4(pg/ml)در گروه‌های مختلف در ۴۸ ساعت..... ۱۳۳

جدول (۳-۸) مقایسه میانگین IL-4(pg/ml) در گروه‌های مختلف در ۷۲ ساعت..... ۱۳۳

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار (۲-۱) منحنی استاندار IFN-γ ۱۱۴

نمودار(۲-۲) منحنی استاندارد IL-4 ..... ۱۱۴

نمودار (۳-۱) نمودار در صد بقاء موش‌های گروه‌های مختلف بعد از چالش ۱×۱۰^{۴} تاکی زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH ۱۲۵

نمودار (۳-۲) نمودار ستونی میانگین OD توتال IgG در نوبت اول و دوم خونگیری در سرم موش‌های مورد مطالعه ۱۲۹

نمودار (۳-۳) نمودار ستونی میانگین ODساب تایپ‌های IgG1 و IgG2a در سرم موش‌های مورد مطالعه ۱۳۰

نمودار (۳-۴) نمودار ستونی میانگین IFN-γ (pg/ml) در گروه‌های مختلف ۱۳۳

نمودار (۳-۵) نمودار ستونی میانگین IL-4 (pg/m l) در گروه‌های مختلف ۱۳۵

نمودار (۳-۶) نمودار ستونی میانگین IFN-γ و IL4(pg/ml) در گروه‌های مختلف ۱۳۵

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) چرخه زندگی انگل توکسوپلاسما گوندی در میزبانهای واسط و نهایی ۱۵

شکل (۱-۲) شماتیک انگل توکسوپلاسما ۱۷

شکل (۱-۳) تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما گوندی ۱۷

شکل (۱-۴) کیست توکسوپلاسما گوندی در میزبان واسط ۱۹

شکل (۱-۵) تاکی‌زوئیتهای توکسوپلاسما گوندی در ماکروفاژ ۱۹

شکل (۱-۶) آنتی‌ژنهای توکسوپلاسما گوندی، موقعیت آنها و ژنهایی که آنها را کد می‌کنند ۵۵

شکل (۱-۷) مراحل واکسیناسیون DNA ۶۰

شکل (۱-۸) مکانیسم عمل واکسیناسیون DNA در تحریک سیستم ایمنی سلولی و هومورال و تولید سلولهای خاطره‌ای ۶۱

شکل (۲-۱) نقشه ژنتیکی پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T ۸۲

شکل (۲-۲) مراحل کلونینگ و غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده ۸۷

شکل (۲-۳) نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ۹۰

شکل (۲-۴) آناتومی ماهیچه‌های Quadricepsو Tibialis پای موش ۱۰۷

شکل (۳-۱) استخراج DNA تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی ۱۱۷

شکل (۳-۲) الکتروفورز محصول PCR ژن MIC3 توکسوپلاسماگوندی با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد ۱۱۸

شکل (۳-۳) کلنی‌های سفید و آبی در محیط LB Agar حاوی IPTGوX-Gal ۱۱۸

شکل (۳-۴) مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده‌از کلنی‌های سفید و کلنی‌های آبی ۱۱۹

شکل (۳-۵) الگوهای الکتروفورزی برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pT-MIC3 روی ژل آگاروز ۱۱۹

شکل (۳-۶) الکتروفورز محصول PCR بکمک پلاسمید نوترکیب pT-MIC3 روی ژل آگاروز ۱٪..... ۱۲۰
شکل (۳-۷) نمائی از آنالیز تعیین توالی ۱۰۵۲ جفت باز..... ۱۲۰
شکل (۳-۸) کروماتوگرام ژن MIC3 بعد از توالی یابی..... ۱۲۱
شکل (۳-۹) برش آنزیم pT-MIC3..... ۱۲۱
شکل (۳-۱۰) الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pcMIC3..... ۱۲۲
شکل (۳-۱۱) مقایسه باندهای پلاسمید نوترکیب pcMIC3 با پلاسمید فاقد قطعه pcDNA3..... ۱۲۲
شکل (۳-۱۲) الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcMIC3 و پلاسمید بیانی pcDNA3..... ۱۲۳
شکل (۳-۱۳) تعیین وزن مولکولی پروتئین MIC3در SDS-PAGE..... ۱۲۴
شکل (۳-۱۴) نوارهای نیتروسلولز بدست آمده‌از روش وسترن بلات با پروتئین سلول‌های CHO... ۱۲۴

فصل اول

مقدمه و

مروری برمطالعات گذشته