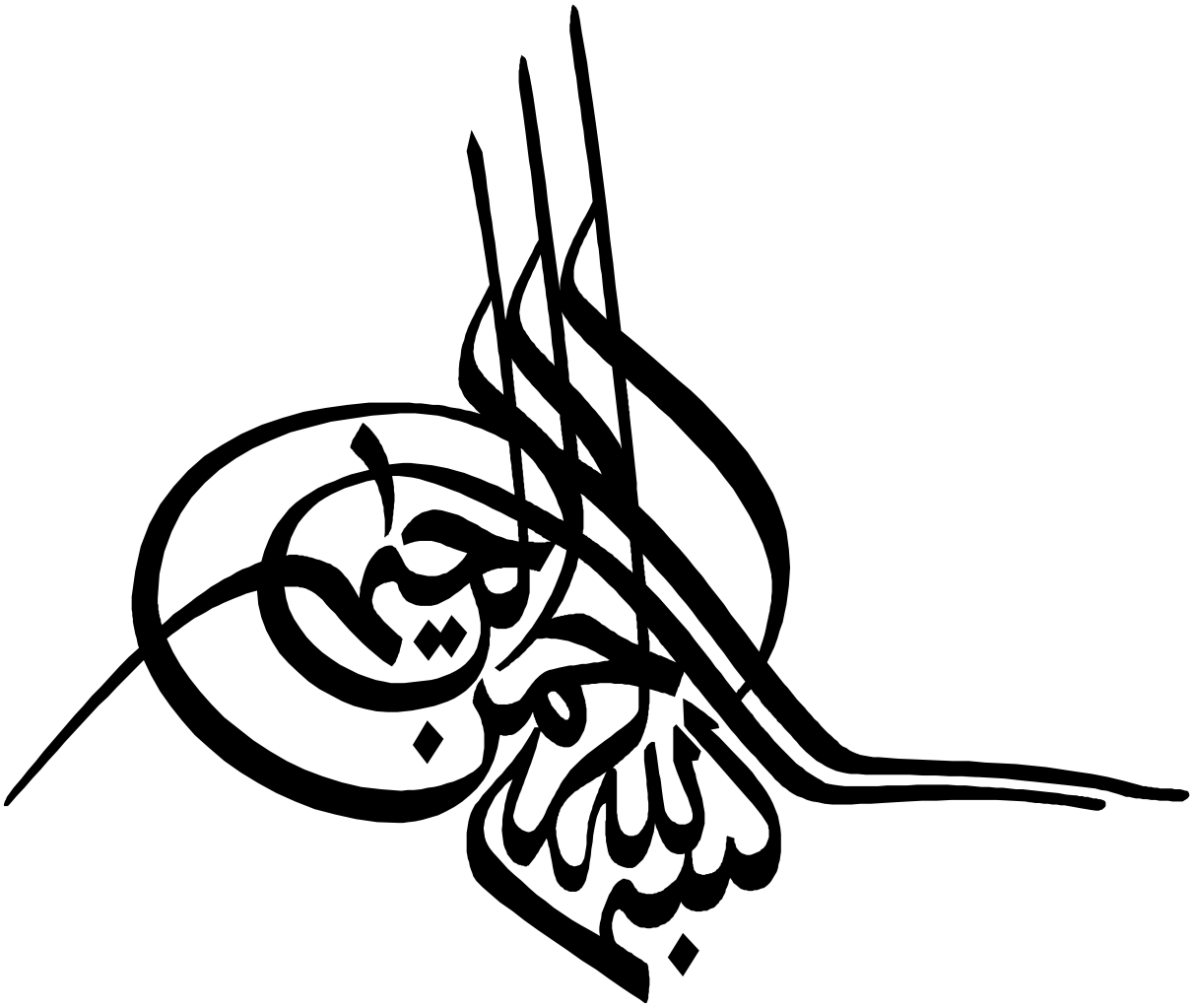
بسم الله الرحمن الرحيم

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی میکروبیولوژی

عنوان:

تولید آنتی بادی زنجیره سنگین شتری علیه آنزیم اوره آز هلیکوباکترپیلوری

اساتید راهنما:

دکتر سید لطیف موسوی گرگری

دکتر معصومه رجبی بذل

استاد مشاور:

دکتر محمد محمدی

دانشجو:

لیلا صفایی اردکانی

شهریور 1390

شکر خدا که هر چه طلب کردم از خدا بر منتهای همت خود کامران شدم

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق » بسی شایسته است از کسانی که مرا در انجام این تحقیق یاری رسانند تشکر نمایم.

با صمیمانه ترین مراتب تشکر از:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر سید لطیف موسوی که از حمایت های بی شائبه ایشان در طول تحصیل وتحقیق برخوردار بودم.

استاد محترم سرکار خانم دکتر معصومه رجبی که از راهنمایی های کار ساز و تشویق های ایشان در طول تحقیق بهره برده ام.

استاد گرامی جناب آقای دکتر محمد محمدی مشاور این تحقیق که از علم و معرفت شان بهره برده ام.

همکاران و دوستان محترم آقایان حمید باخرد، حامد زارع، ولید ابراهیمی زاده و سایر دوستانی که کمک های ارزنده شان راهگشای مشکلات بود.

همچنین از پدر و مادر عزیز ، دلسوز و مهربانم که آرامش روحی و آسایش فکری فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب ، مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه درسی را به نحو احسن به اتمام برسانم .

چکیده

شترسانان در سرمشان نوع خاصی از ایزوتیپ IgG را دارا می‌باشند که به علت نداشتن زنجیره سبک، آنتی بادی زنجیره سنگین HCAb نام‌گذاری شده‌اند. بخش متغیر این نوع آنتی‌بادی(VHH)، دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که منجر به کاربرد وسیع آن در بیوتکنولوژی شده‌است. در این مطالعه هدف انتخاب VHH با اختصاصیت بسیار بالا علیه زیرواحد UreC آنزیم اوره‌آز هلیکوباکترپیلوری می‌باشد. هلیکو باکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی است که درلایه مخاطی معده انسان لانه گزینی و ایجاد عفونت می‌کند. عفونت هلیکوباکترپیلوری با بیماری‌هایی همچون زخم معده یا دوازدهه و برخی سرطان‌ها همراه است. باکتری با تولید آنزیم اوره‌آز ، اوره را به آمونیاک ودی‌اکسیدکربن تبدیل می‌کند. آمونیاک تولید شده اسید گاستریک را خنثی و از این طریق امکان کلونیزاسیون باکتری را در معده فراهم می‌کند. از آنجا که در سرم همه ی بیماران مبتلا به هلیکوباکترپیلوری آنتی‌بادی علیه زیرواحد UreC، آنزیم اوره‌آز دیده شده است بنابراین یکی از گزینه‌های مناسب جهت درمان، تولید آنتی‌بادی بر علیه UreC می‌باشد. بدنبال تزریق UreC نوترکیب به شتر و حصول اطمینان از ایمن شدن آن، کتابخانه فاژمیدی تهیه شد. جهت نمایش فاژی پروتئین VHH، سلولهای حاوی کلون با فاژ کمکی M13K07 آلوده شدند و فاژهای نوترکیب با استفاده از پلی اتیلن گلیکول و کلرید سدیم 0/5 مولار رسوب داده شدند. جهت انتخاب کلونهای صحیح پنج مرحله غربالگری انجام شد. پس از انتخاب بهترین مرحله غربالگری با استفاده از فاژ الیزا، بروی کلونهای مربوط به آن مرحله مجددا فاژ الیزا گذاشته شد و کلونهایی با بیشترین میزان جذب جهت بیان پروتئین در فاز محلول انتخاب شدند. این اولین گزارش از انتخاب، تولید و بیان نانو بادی علیه آنتی ژن UreC می باشد. شباهت بسیار زیاد VHH با VH های انسانی، امکان استفاده در ایمنی درمانی را فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: آنتی بادی زنجیره سنگین، هلیکوباکتر پیلوری، زیر واحد UreC ،نمایش فاژی

عنوان صفحه

فصل اول : مقدمه..... 1

فصل دوم : تاریخچه و مروری بر مطالعات پیشین 4

2-1-تاریخچه..... 5

2-2- میکروب شناسی هلیکوباکترپیلوری..... 5

2-3- فاکتورهای ویرولانس..... 6

2-3-1- آنزیم اوره آز..... 6

2-3-1-1- واکنش آنزیمی..... 6

2-3-1-2- ویژگی های جایگاه فعال..... 6

2-3-1-3- ساختار پروتئینی آنزیم اوره آز..... 7

2-3-1-4- تاثیر pH برآنزیم اوره آز..... 7

2-3-1-5- ویژگی های ژنتیکی آنزیم اوره آز..... 7

2-3-1-5-1- ژنهای ساختاری..... 8

2-3-1-5-2- ژنهای کمکی..... 8

2-3-1-5-3- همولوژی با سایر آنزیم های اوره آز..... 9

2-3-1-5-4- تنظیم بیان ژن اوره آز..... 9

2-3-1-6- فیزیولوژی آنزیم اوره آز..... 10

2-3-1-6-1- تهیه سوبسترا..... 10

2-3-1-6-2- موقعیت و فعالیت آنزیم اوره آز..... 10

2-3-1-6-3- NixA و انتقال یون نیکل..... 11

2-3-1-7- نقش آنزیم اوره آز در بیماریزایی..... 11

2-3-1-7-1- نیاز برای لانه گزینی..... 11

2-3-1-7-2- نقش اوره آز در ایجاد سمیت برای میزبان..... 12

2-3-1-7-3- سایر فعالیتهای آنزیم اوره آز..... 12

2-3-2- موسیناز..... 13

2-3-3- فسفولیپاز..... 13

2-3-4- کاتالازو سوپراکسیددیسموتاز.....13
2-3-5- پروتئین های شوک حرارتی.....13
2-3-6- جزیره بیماریزایی cag 13
2-3-7- سیتوتوکسین واکوئله کننده (VacA) 14
2-4- بیماری های ایجاد شده توسط هلیکوباکترپیلوری.....14
2-4-1- التهاب معده حاد و مزمن.....15
2-4-1-1- التهاب حاد معده.....15
2-4-1-2- التهاب مزمن معده.....16
2-4-2- زخم گوارشی.....16
2-4-2-1- زخم معده.....16
2-4-2-2- زخم دوازدهه.....17
2-4-3- سرطان معده.....17
2-5- روش های درمان هلیکوباکترپیلوری.....17
2-5-1- استفاده از آنتی بیوتیک.....17
2-5-2- استفاده از واکسن.....18
2-5-3- استفاده از آنتی بادی.....19
2-6- ساختمان آنتی بادی.....20
2-6-1- آنتی بادی های نوترکیب.....21
2-6-1-1- آنتی بادی های کایمریک.....21
2-6-1-2- قطعات آنتی بادی.....22
2-6-1-3- آنتی بادی نوترکیب چند ظرفیتی.....23
2-6-1-4- اینترابادی.....23
2-6-2- آنتی بادی زنجیره سنگین شتری.....24
2-6-2-1- ویژگی های ساختمانی VHH.....26
2-6-2-2- برتری VHH نسبت به سایر آنتی بادی های نوترکیب.....28
2-6-2-3- تولید VHH.....29
2-6-2-4- دستکاری ژنتیکی VHH جهت بهبود ویژگی های درمانی.....30

2-6-2-5- کاربرد درمانی و تشخیصی.....31
2-6-2-5-1- استفاده از VHH جهت تصویر برداری in vivo.....31
2-6-2-5-2- تولید اشکال چند ظرفیتی VHH.....31
2-6-2-5-3- اینترابادی.....32
2-7- انواع سیستم های نمایش آنتی بادی.....32
2-7-1- نمایش فاژی.....32
2-7-1-1- غربالگری.....34
2-7-2- نمایش ریبوزومی.....35
2-7-3- نمایش سطحی به روی سلول میکروبی.....36
2-8- انواع کتابخانه ها.....36
2-8-1- کتابخانه ی ایمن.....36
2-8-2- کتابخانه ی غیر ایمن یا naive.....37
2-8-3- کتابخانه سنتتیک.....37
2-8-4- کتابخانه نیمه سنتتیک.....37
فصل سوم : مواد و روش ها 38
3-1- مواد و محلول های مورد استفاده.....39
3-2- وسایل و دستگاه های استفاده شده.....43
3-3- روش ها.....44
3-3-1- تهیه ی ایمنوژن.....44
3-3-1-1- بررسی پروتئین بیان شده روی ژل SDS-PAGE 44
3-3-1-2- رنگ آمیزی ژل بوسیلهٔ کوماسی بلو.....46
3-3-1-3- بیان پروتئین نوترکیب UreC در مقیاس بالا، جهت تزریق به شتر.....46
3-3-1-4- تخلیص پروتئین نوترکیب UreC به کمک ستون IMAC به روش دناتوره.....47
3-3-1- 5- دیالیز محلول حاوی پروتئین تخلیص شده.....48
3-3-1-6- تعیین غلظت پروتئین.....49
3-3-2- تهیه کتابخانهٔ ژنی از منبع ژنهای ایمونوگلوبولین شتر یک کوهانه.....50
3-3-2-1- ایمن سازی شتر با پروتئین نوترکیب Ure C.....50
3-3-2-2- خون گیری و تهیه سرم.....50

3-2-3-3 - بررسی تولید آنتی بادی در شتر به وسیله تست الایزا..... 51
3-2-3-4 - جدا کردن لنفوسیت از خون محیطی..... 52
3-2-3-5 - استخراج RNA..... 53
3-2-3-5-1- الکتروفورز RNA..... 54
3-2-3-6- ساختcDNA با استفاده از کیت فرمنتاز..... 55
3-2-3-7-PCR ژن VHH..... 55
3-2-3-7-1- طراحی پرایمرها..... 56
3-2-3-7-2- PCR اولیه..... 56
3-2-3-7-2-1- استخراج قطعات تکثیر یافته ژن آنتی‌بادی از ژل..... 57
3-2-3-7-3- PCR ثانویه..... 58
3-2-3-7-3-1- ارزیابی محصول PCR ثانویه..... 59
3-2-3-8- استخراج پلاسمید(فاژمید)..... 60
3-2-3-9- هضم آنزیمی ناقل pComb3x و ژن VHH (محصول PCR ثانویه)..... 62
3-2-3-10- لیگاسیون قطعه هدف با ناقل برش خورده..... 63
3-2-3-11- انتقال الکتریکی محصول لیگاسیون به باکتری مستعد..... 65
3-2-3-11-1- مراحل تهیه باکتری مستعد از نظر واکنش الکتریکی..... 65
3-2-3-11-2- مراحل انتقال الکتریکی وکتور فاژ میدی به سلولهای مستعد..... 66
3-2-3-11-3- تأیید اتصال قطعات ژن VHH و DNA فاژمیدی..... 67
3-2-3-12-تهیه فاژ کمکی..... 68
3-2-3-13- رهاسازی و تخلیص فاژ نوترکیب و تعیین تیتر آن..... 69
3-2-3-13-1-تهیه ذخیره سلولی..... 70
3-2-3-14- غنی سازی..... 71
3-2-3-14-1- مراحل غنی سازی با استفاده از آنتی ژن پوشیده شده بر سطوح چاهک پلیت الایزا..... 71
3-2-3-14-2- آلوده سازی مجدد باکتری با فاژ نوترکیب..... 71
3-2-3-14-3- بررسی پیشرفت مراحل غنی سازی با استفاده از روش الایزا..... 72
3-2-3-15-انتخاب کلونهای مناسب..... 73
3-2-3-15-1- بررسی کلون انتخاب شده (کلون C5)..... 74

3-3-2-15-2- تعیین توالی نانوبادی ساخته شده..... 74
3-3-2-16- بیان آنتی بادی در فاز محلول..... 74
3-3-2-16-1- ترشح قطعات تک دومنی نانوبادی به صورت محلول از باکتری TOP10 F´..... 75
3-3-2-16-2- استخراج قطعات نانوبادی از فضای پری پلاسمی..... 75
3-3-2-17- بیان VHH در ناقل pET-28a..... 75
3-3-2-17-1- طراحی پرایمر..... 75
3-3-2-17-2- واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR)..... 76
3-3-2-17-3- آنالیز محصول واکنش زنجیره ایی پلیمراز..... 77
3-3-2-17-4- تخلیص پلاسمید pET-28a..... 77
3-3-2-17-5- هضم آنزیمی ناقل pET-28a و قطعه VHH..... 77
3-3-2-17-6- تخلیص قطعه ژنی VHH و pET-28a هضم شده، با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR..... 79
3-3-2-17-7- لیگاسیون قطعه هدف با ناقل برش خورده..... 79
3-3-2-17-8- تهیه سلولهای مستعد E.coli Bl21-DE3..... 81
3-3-2-17-9- انتقال VHH نوترکیب به داخل سلولهای میزبان اشرشیاکلی به روش شوک گرما – سرما..... 82
3-3-2-17-10- بررسی و آنالیز کلون های حاوی VHH نوترکیب..... 83
3-3-2-17-11- القاء بیان نانوبادی کلون شده در ناقل pET-28a..... 84
3-3-2-17-11-1- بررسی نانوبادی بیان شده روی ژل اکریل آمید..... 85
3-3-2-17-11-2- بیان نانو بادی در مقیاس آزمایشگاهی..... 85
3-3-2-17-11- 3- تخلیص نانو بادی به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA..... 85
3-3-2-18- انجام لکه گذاری وسترن به منظور تأیید نانوبادی بیان شده..... 85
3-3-2-19- تعیین میزان افینیتی نانوبادی علیه UreC ، با روش الایزا..... 86
3-3-2-20- سنجش میزان پایداری نانوبادی تولیدی علیه UreC ، در دماهای مختلف..... 88
3-3-2-21- تعیین ویژگی نانوبادی علیه UreC..... 88
3-3-2-22- بررسی اثر مهاری نانو بادی تولید شده، به روی آنزیم اوره آز..... 89
فصل چهارم : نتایج 91
4-1- بیان پروتئین نوترکیب UreC..... 92
4-2- تخلیص پروتئین نوترکیب UreC با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA به روش دناتوره..... 92
4-3- سنجش غلظت پروتئین..... 93

4-4- بررسی تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین نوترکیب UreC در سرم شتر ایمن..... 95
4-5 – استخراج RNA از لنفوسیت های خون محیطی شتر ایمن..... 95
4-6- ساخت cDNA..... 96
4-7- PCR ژن VHH..... 97
4-7-1- PCR اولیه..... 97
4-7-2- PCR ثانویه..... 98
4-8- نتایج ساخت کتابخانه فاژمیدی..... 99
4-8-1- تخلیص فاژمید..... 99
4-8-2- هضم آنزیمی وکتور pComb3x و ژن VHH با آنزیم sfiI..... 100
4-9- تائید اتصال ژن VHH و DNA فاژمیدی..... 102
4-9-1- تایید کلون حاوی VHH نوترکیب از کتابخانه فاژمیدی با روش واکنش زنجیره ایی پلیمراز..... 102
4-9-2- هضم آنزیمی فاژمیدهای نوترکیب کتابخانه فاژمیدی..... 102
4-10- تعیین تیتر فاژ کمکی..... 103
4-11- ارزیابی پیشرفت مراحل غنی سازی با استفاده از روش الایزا..... 103
4-12- بررسی کلون C5 به روش هضم آنزیمی..... 105
4-13- تعیین توالی کلون C5..... 105
4-14- بیان نانوبادی در فاز محلول..... 106
4-15- تخلیص پلاسمید pET-28a..... 107
4-16- هضم آنزیمی پلاسمید pET-28a و ژن VHH تکثیر شده..... 108
4-17- تائید اتصال VHH به ناقل pET-28a 109
4-17-1- تایید کلون های نوترکیب حاوی VHH به روش PCR..... 109
4-17-2- هضم آنزیمی کلونهای نوترکیب حاوی VHH..... 110
4-18- بیان نانوبادی..... 111
4-19- تخلیص نانوبادی با استفاده از ستون IMAC با روش دناتوره..... 112
4-20- آنالیز نانوبادی تولیدی با روش وسترن بلات با کمک آنتی بادی بر علیه His-tag..... 113
4-21- تعیین میزان تمایل نانوبادی تولید شده نسبت به آنتی ژن(UreC) با آزمایش الایزا..... 114
4-22- بررسی ویژگی نانوبادی..... 115
4-23- سنجش میزان پایداری نانوبادی تولید شده علیه UreC در دماهای مختلف..... 116

4-24- بررسی قابلیت نانوبادی در مهار فعالیت آنزیم اوره آز 118
فصل پنجم : بحث و پیشنهادات 120
5-1- دلیل انتخاب و تولید آنتی ژن 123
5-2- ایمن سازی شتر با پروتئین نوترکیب 124
5-3- ساخت کتابخانه VHH 124
5-4- غنی سازی کتابخانه فاژی علیه UreC 125
5-5- بیان VHH در فاز محلول 126
5-6- میزان افینیتی آنتی بادی به آنتی ژن UreC 127
5-7- ارزیابی اختصاصیت نانوبادی 128
5-8- بررسی اثر مهاری نانو بادی به روی فعالیت آنزیم اوره آز 128
نتیجه گیری 129
پیشنهادات 129
فصل ششم : منابع 131
فصل هفتم : پیوست 140

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل 2-1: نمایش ژنهای ساختاری و کمکی آنزیم اوره آز هلیکوباکترپیلوری..... 10
شکل 2-2 : ساختار کلی آنتی‌بادی..... 22
شکل 2-3 : ساختمان آنتی‌بادی کامل و قطعات آنتی‌بادی مهندسی شده..... 25
شکل 2-4 : تفاوت آنتی‌بادی معمولی و آنتی‌بادی زنجیره سنگین..... 26
شکل 2-5 : تفاوت ساختمانی VH و VHH..... 28
شکل 2-6 : نمایش مراحل مختلف غربالگری..... 36
شکل 3-1 : نقشه فاژمید pComb3x 63
شکل 3-2: نقشه ناقل بیانی pET-28a..... 82
شکل 4-1: بررسی بیان پروتئین نوترکیب UreC به‌کمک SDS-PAGE..... 93
شکل 4-2: بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب UreC با ستون میل ترکیبی Ni-NTA 94
شکل 4-3: تخلیص RNA..... 97
شکل 4-4: تخلیص cDNA..... 98
شکل 4-5: تصویر ژل الکتروفورز PCR اولیه 99
شکل 4-6: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR ثانویه..... 100
شکل 4-7: تصویر ژل الکتروفورز فاژمید pComb3x تخلیص شده..... 101
شکل 4-8: تصویر ژل الکتروفورز فاژمید pComb3x پس از برش با آنزیم sfiI 102
شکل 4-9: فاژمید و قطعه VHH پس از هضم آنزیمی با آنزیم sfiI..... 102
شکل 4-10: نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به روی کلونهای حاصل از لیگاسیون..... 103
شکل 4-11: وکتور pComb3x حاوی ژن VHH پس از هضم آنزیمی با sfiI..... 104
شکل 4-12 : هضم آنزیمی پلاسمید کلون C5 با آنزیم sfiI..... 106
شکل 4-13 : نتیجه تعیین توالی VHH مربوط به کلون C5..... 107
شکل 4-14: نتایج حاصل از BLAST توالی نانوبادی تولیدی در پایگاه های داده NCBI..... 108
شکل 4-15: بیان نانوبادی در میزبان Top 10F..... 109
شکل 4-16: تصویر ژل الکتروفورز پلاسمید pET-28a تخلیص شده..... 110
شکل 4-17: هضم آنزیمی پلاسمید pET-28a و ژن VHH..... 111

شکل4-18: تایید کلون‌های نوترکیب حاوی VHH با استفاده از واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز 112
شکل 4-19: هضم آنزیمی کلون نوترکیب حاوی VHH 113
شکل 4-20: بررسی بیان نانوبادی کلون شده در ناقل pET-28a به‌کمک SDS-PAGE 114
شکل 4-21: بررسی تخلیص نانوبادی نوترکیب با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE 14 درصد 115
شکل4-22: وسترن بلاتینگ نانوبادی تولیدی علیه UreC 116
شکل 4-23 : تایج مربوط به بررسی میزان پایداری نانوبادی تولیدی در دماهای مختلف 119

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول 2-1: نمونه‌هایی از کاربردهای درمانی VHH 33
جدول 3-1: روش تهیه ژل جداکننده 46
جدول 3-2: روش تهیه ژل متراکم کننده 47
جدول 3-3 : روش تهیه محلول‌های استاندارد 50
جدول 3-4: زمان بندی تزریق 51
جدول 3-5: مواد استفاده شده در واکنش PCR اولیه 57
جدول 3-6 : شرایط واکنش PCR اولیه 58
جدول 3-7 : مواد موجود در واکنش PCR ثانویه 60
جدول 3-8 : زمان بندی PCR ثانویه 60
جدول 3-9: شرایط واکنش هضم آنزیمی فاژمید pcomb3x 64
جدول 3-10: شرایط واکنش هضم آنزیمی قطعه VHH 64
جدول 3-11: شرایط واکنش لیگاسیون 65
جدول 3-12: شرایط واکنش هضم آنزیمی فاژمید نوترکیب مربوط به کتابخانه فاژمیدی 68
جدول 3-13 : شرایط واکنش هضم آنزیمی کلون C5 75
جدول 3-14: مواد موجود در واکنش PCR 77
جدول 3-15: شرایط و چگونگی انجام واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز در ترموسیکلر 78
جدول3-16: مخلوط واکنش هضم آنزیمی برای ناقل pET- 28a 79

جدول3-17: مخلوط واکنش هضم آنزیمی برای محصول واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز ژن..... 79
جدول 3-18: اجزای واکنش لیگاسیون تست.....81
جدول3-19: مخلوط واکنش هضم آنزیمی کلون های نوترکیب.....85
جدول 3-20: مقدار و اجزاء واکنش تست سنجش فعالیت اوره آز.....91

جدول 4-1 : محاسبه غلظت پروتئین تخلیص شده.....95
جدول 4-2: نتایج حاصل از الایزای رقت های مختلف نانوبادی در مقابل رقت های مختلف آنتی ژن.....117
جدول 5-1: مقایسه اندازه کتابخانه با سایر پژوهش‌ها.....127
جدول 5-2: مقایسه مراحل غربالگری با سایر پژوهش‌ها.....128
جدول 5-3 : مقایسه افینیتی VHH و سایر آنتی‌بادی‌های تولیدی علیه UreC.....129
جدول 5-4 : مقایسه افینیتی نانوبادی تولیدی با سایر نانوبادی‌ها.....130
جدول 5-5 : مقایسه اثر مهاری نانو بادی تولیدی با سایر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به روی آنزیم اوره‌آز.....131

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار 4-1: نمودار استاندارد برادفورد 95
نمودار 4-2: اطلاعات الایزای سرم شترهای کنترل و ایمن.....96
نمودار 4-3 : نتایج فاژ-الایزا پلی‌کلونال.....105
نمودار 4-4 : نتایج فاژ الایزا به روی 18 کلون از تک کلونهای مرحله سوم غربالگری.....106
نمودار 4-5: نتایج الایزای تعیین افینیتی نانوبادی.....117
نمودار 4-6 : نتایج حاصل از میزان اتصال نانوبادی تولیدی با آنتی ژنهای مختلف با استفاده از الایزا.....118
نمودار4-7: نتایج واکنش الایزای آنتی بادی‌های انکوبه شده در شرایط مختلف دمایی علیه UreC.....120
نمودار 4-8 : مهار فعالیت آنزیم اوره‌آز بوسیله نانوبادی تولید شده علیه آنتی‌ژن UreC.....121

فصل اول

مقدمه

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری گرم منفی، خارج سلولی، میکروآئروفیل است که درلایه موکوسی معده لانه گزینی می کند. در صد کمی از آنها به سلولهای اپی‌تلیال می‌چسبند و نیز به ندرت به بافت تهاجم می‌کنند. از آنجایی که تحت شرایط طبیعی، آنتروم معده نسبت به سایر قسمت‌ها اسیدیته کمتری دارد، لذا هلیکوباکترپیلوری غالبا در این مکان کلونی تشکیل می‌دهد. هلیکوباکتر پیلوری از طرق مختلف با سیستم ایمنی مقابله می کند. به عنوان مثال، ماکروفاژها اغلب علیه باکتری اسید نیتریک تولید می‌کنند که برای ساخت آن به L-آرژنین نیاز است. هلیکوباکترپیلوری از طریق تولید آرژیناز، L-آرژنین را هضم می‌کند و مانع عمل ماکروفاژ می‌شود. همچنین هلیکوباکترپیلوری به روشهای مختلفی، خود را ازسیستم ایمنی پنهان می‌کند. برخی سوش-های هلیکوباکترپیلوری وقتی توسط ماکروفاژ بلعیده می‌شوند، پروتئینی را تولید می‌کنند که منجر به اتصال واکوئل‌ها به همدیگر و ایجاد واکوئلی بزرگتر می‌شود، و از آنجا که کارایی واکوئل بزرگ درانهدام باکتری نسبت به واکوئل کوچک کمتر است، باکتری مدت بیشتری زنده می ماند. هلیکوباکتر پیلوری، مابین سلول‌های اپی-تلیوم نیز مخفی می‌شود. علی رغم پاسخ ایمنی هومورال و سلولی علیه هلیکوباکترپیلوری، سیستم ایمنی بدن در برابر این بیماری فاقد کارایی لازم بوده و حتی طی مکانیزم‌های ویژه‌ای در خدمت بیماری زایی باکتری قرار گرفته و سبب تسهیل اتصال باکتری و تخریب بافت اپی تلیال می‌شود به عنوان مثال حضور گلبولهای سفید و ترشح ترکیباتی چون اسید نیتریک، هیدروژن پراکسید و... علاوه بر تاثیر به روی باکتری منجر به تخریب بافت نرمال شده که این امر منجر به التهاب بافت می شود. تکرار سیکل کلونیزاسیون - التهاب منجر به تغییر ساختار بافت و کاهش ضخامت دیواره‌ی معده و در نهایت منجر به ایجاد زخم‌های اثنی عشر، بیماری‌های خودایمنی، تنفسی و سرطان معده می‌گردد (1).

هلیکوباکترپیلوری به عنوان شایع‌ترین باکتری بیماری‌زا در انسان شناخته شده است(2). حدود نیمی از جمعیت جهان مبتلا به عفونت *H.pylori* می‌باشند. در کشورهای در حال توسعه 90٪ از بزرگسالان به عفونت *H.pylori* آلوده هستند که غالبا در دوران کودکی مبتلا شده‌اند. در حالیکه در کشورهای صنعتی حدود 50٪ از بزرگسالان مبتلا به عفونت می‌باشند (3) .

هلیکوباکترپیلوری به تنهایی قادر به ایجاد عفونت در انسان نیست و فاکتورهای دیگری همچون پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی میزبان، پلی‌مورفیسم ژنتیکی باکتری و میزبان، آسیب‌های DNA ناشی از عفونت و عوامل

محیطی همچون رژیم غذایی در ایجاد بیماری نقش دارند. به همین دلیل مبارزه با این عفونت همواره با مشکلاتی همراه بوده است (4).

شناسایی یک روش درمان مناسب برای عفونت *H.pylori* آسان نیست، چرا که

1 -میکروارگانیزم در محیطی زندگی می‌کند که دسترسی به آن آسان نیست.

2 -گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نیز مشاهده شده است، به طوری که پروسه درمان در حدود 20٪ از بیماران با مشکل مقاومت آنتی‌بیوتیکی مواجه است.

3 - تجویز رژیم‌های سخت درمانی که شامل تعداد زیادی قرص می‌باشد، کار درمان را برای بیماران سخت می‌نماید (5).

لذا توجه محققین در سالهای اخیر به استفاده از آنتی‌بادی‌ها در پروسه درمان در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. در حال حاضر کاربرد استفاده از آنتی‌بادی‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها در حال افزایش است (6). آنزیم اوره‌آز به عنوان مهمترین ایمنوژن برای این ارگانیزم شناخته می‌شود (7). بنابراین یکی از گزینه‌های مناسب جهت درمان، تولید آنتی‌بادی علیه آنزیم اوره‌آز می‌باشد.

تاکنون علیه UreC (زیرواحد کاتالیتیک آنزیم اوره‌آز) آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی، آنتی‌بادی مونوکلونال scFv و IgY ساخته شده است. ولی استفاده از آنتی‌بادی‌های موشی دارای مشکلاتی چون: وقت گیر و هزینه بر بودن تولید، ایمنوژن بودن در انسان و قدرت نفوذ پایین به بافت می‌باشد. تولید scFv با مشکلاتی چون تشکیل توده مولکولی و احتمال تخریب پروتئولیتیکی همراه می‌باشد و از طرفی چون رشته های VH و VL از دو آنتی بادی متفاوت باید با هم تجمع یابند مشکل تولید کم نیز وجود دارد. کشف آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری (HCAb) که فاقد زنجیره سبک و دومن C_H1 است، فرصت جدیدی را برای گسترش آنتی‌بادی-های تک دومنی با ویژگی بهینه در حلالیت و پایداری فراهم می‌کند. بخش متغیر آنتی‌بادی زنجیره سنگین شتری (VHH)، دارای ویژگی‌هایی چون اندازه کوچک، قدرت نفوذ بالا به بافت، شباهت با اعضای خانواده VH3 انسانی و در نتیجه کارایی در مقاصد ایمونوتراپی را دارد. از طرفی به علت تک دومینی بودن، مشکلات ناشی از حضور لینکر پپتیدی در scFv را ندارد (8). لذا در تحقیق پیش رو بر آن شدیم که با تولید VHH علیه UreC بتوانیم بر مشکلات فائق آییم.

بر اساس داده‌های موجود، VHH علیه انواع آنتی‌ژنهای پروتئینی و هاپتن‌ها، ساخته شده است اما تاکنون گزارشی دال بر تولید VHH علیه آنتی‌ژن UreC ارائه نشده است. هدف از انجام این طرح تولید VHH یا نانوبادی علیه UreC می باشد. بنابراین در این تحقیق با تزریق آنتی‌ژن نوترکیب UreC شتر و اطمینان از ایمن شدن حیوان، از لنفوسیت‌های خون محیطی RNA تام استخراج گردید و بلافاصله به cDNA تبدیل شد.

کتابخانه فاژمیدی با دو مرحله PCR متوالی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تهیه شد. سپس با استفاده از فاژ کمکی M13k07 ، پروتئین نوترکیب به روی سطح فاژ به نمایش گذاشته شد. در مرحله بعد علیه پروتئین UreC پنج مرحله غربالگری انجام شد وکلونهایی که بیشترین میزان جذب را داشتند جهت بیان پروتئین در فاز محلول استفاده شدند.

فصل دوم

تاریخچه و مروری بر مطالعات پیشین

2-1- تاریخچه

در سال 1893 محقق ایتالیایی به نام Bizzozero برای نخستین بار وجود ارگانیزم‌های مارپیچی را در معده پستانداران گزارش کرد. در سال 1899 پروفسور Walery Jaworski باکتری فنری شکلی را در پسماند شستشوی معده انسان مشاهده کرد. وی این باکتری را Vibrio rugula نامید. وی اولین شخصی بود که ارتباط احتمالی بین نقش این ارگانیزم و بیماری‌های معده را متوجه شد. چندین مطالعه در اوایل دهه‌ی 1900 به حضور باکتری میله‌ای شکل در معده بیماران مبتلا به زخم معده و سرطان معده اشاره کردند. اما مطالعاتی که درسال 1954، جهت مشاهده باکتری در بیوپسی معده 1180 بیمار صورت گرفته بود با شکست مواجه شد که منجر به کاهش مطالعات در این زمینه شد. در آن سال‌ها توجه کمی به این ارگانیزم معطوف بود تا اینکه در سال 1983، Marshall و Warren این باکتری را در سطح سلول‌های اپی‌تلیالی معده بیماران مبتلا به زخم معده مشاهده کردند. Marshall جهت تائید ادعای خود، شربت حاوی *H.pylori* را خورد. وی پس از چند روز بیمار گشت. نتایج اندوسکوپی معده وی نشان‌دهنده التهاب و حضور باکتری در معده بود. بدین ترتیب شناسایی و بررسی باکتری امکان‌پذیر شد (9).

2-2- میکروب شناسی هلیکوباکترپیلوری

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری مارپیچی شکل، گرم منفی، خارج سلولی، میکروآئروفیل، با طول 3 میکرومتر و قطر 0/5 میکرومتر است. این باکتری قادر به تشکیل بیوفیلم می‌باشد و به دو فرم فنری[1] و کوکوئید (زیستا اما غیر قابل کشت) وجود دارد. همچون سایر باکتری‌های گرم منفی، غشا خارجی هلیکوباکترپیلوری دارای فسفولیپید و لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد. این باکتری بواسطه 6-4 فلاژلی که دارد، متحرک می‌باشد. این باکتری متعلق به شاخه[2] proteobacteria ، رده[3] Epsilon proteobacteria ، راسته[4] Campylobacteraceae ، تیره[5] Helicobacteraceae ، سرده[6] *Helicobacter* ، گونه[7] *H.pylori* است (1).

عفونت هلیکوباکترپیلوری با بیماری‌هایی همچون زخم معده یا دوازدهه و برخی سرطان ها همراه است. بررسی-های اپیدمیولوژیک و آماری، عفونت مزمن هلیکوباکترپیلوری را با سرطان بدخیم معده مرتبط دانسته و این امر موجب گشته که سازمان بهداشت جهانی این باکتری را در زمره عوامل سرطان‌زای کلاس I قرار دهد (10).

---

[1] Spiral
[2] Phylum
[3] Class
[4] Order
[5] Family
[6] Genus
[7] Species