دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری رشته بیوشیمی

عنوان رساله:

کلونینگ و بیان scFv از یک آنتی‌بادی منوکلونال ضد پلاسمینوژن انسانی

نگارنده:

محمدرضا قرائتی

استاد راهنما(اصلی):

آقای دکتر منوچهر میرشاهی

استاد راهنما(دوم):

آقای دکتر حجت‌اله ربانی

استاد مشاور:

آقای دکتر مهرداد بهمنش

بهمن ماه ۱۳۸۹

به آنان که آموختند مرا
آنچه نمی‌دانستم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محمدرضاقرائتی رساله واحدی خود را باعنوان: «**کلونینگ و بیان scFv آنتی بادی منوکلونـال ضـد پلاسمینوژن انسانی** » در تاریخ ۸۹/۱۱/۱۶ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما ی اول	آقای دکتر منوچهر میرشاهی	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	آقای دکتر حجت الله ربانی	دانشیار	
۳- استاد مشاور	آقای دکتر مهرداد بهمنش	استادیار	
٤- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر مجیدعرفانی مقدم	استادیار	
٥- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر سامان حسینخانی	دانشیار	
٦- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر قاسم آهنگری	دانشیار	
۷- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر داریوش مینایی تهرانی	استادیار	
۸- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر سامان حسینخانی	دانشیار	

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 دانشجو 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، نرم‌افزار 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 دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ٤- 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 ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ 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 **محمدرضا قرائتی** دانشجوی رشته **بیوشیمی** ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۴ مقطع **دکتری** دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلِیه نکات مندرج در آئین 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 آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: محمدرضا قرائتی

تاریخ: ۱۴ تیرماه ۱۳۹۰

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (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 پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» 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 **بیوشیمی** است که در سال **۱۳۸۹** در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر منوچهر میرشاهی و دکتر حجت اله ربانی** و مشاوره جناب **آقای دکتر مهرداد بهمنش** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 محمدرضا قرائتی دانشجوی رشته بیوشیی مقطع دکتری تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: محمدرضا قرائتی

تاریخ و امضا: ۱۴ تیرماه ۱۳۹۰

اول دفتر به نام ایزد دانا

منت خدای را عزوجل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت

در انجام این پایان‌نامه از راهنمایی‌های علمی و صمیمانه استاد ارجمندم جناب آقای دکتر منوچهر میرشاهی و جناب آقای دکتر حجت‌اله ربانی و مشاوره‌های ارزنده جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش بهره‌مند شدم؛ از ایشان سپاسگزارم و برایشان بهروزی، سلامتی و موفقیت آرزومندم. همچنین از تلاش استادان گرانقدر گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس، جناب آقای دکتر خواجه، جناب آقای دکتر حسینخانی و جناب آقای دکتر نادری‌منش که طی دوره دکتری از آموزش‌های این عزیزان استفاده نمودم، کمال تشکر را دارم. از جناب آقای دکتر عرفانی، جناب آقای دکتر حسینخانی، جناب آقای دکتر مینایی و جناب آقای دکتر آهنگری که مسوولیت داوری و نظارت این پایان‌نامه را برعهده گرفتند بسیار سپاسگزارم.

بخشی از پژوهش‌های این پایان‌نامه در پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا و با حمایت‌های صمیمانه جناب آقای دکتر جدی تهرانی و جناب آقای دکتر آخوندی و سایر استادان محترم پژوهشگاه انجام شده است، از تمامی این بزرگواران سپاسگزارم.

همچنین از محبت و یاری دوستان خوب و همکاران گرامی و کارشناسان محترم در آزمایشگاه‌های دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه ابن‌سینا، خانم زرندی، آقای ساریخانی، خانم دکتر سیفی، خانم دکتر شمسی‌پور، آقای دکتر پاژنگ، آقای دکتر بدویی، آقای دکتر یعقوبی و آقای دکتر ریاحی و خانم دکتر یوسفی‌نژاد، خانم رحیم زاده، خانم محمدی، آقای فتحی، آقای عینی‌زاده، آقای شعبانی، آقای هادوی، خانم امامی، خانم پورثانی، خانم سریال، آقای قاسمی، آقای خسروی، خانم احمدوند، خانم همتی، خانم قصابان و بسیاری از دوستان دیگر که دانسته‌های خود را بی‌دریغ در اختیار من قرار دادند صمیمانه متشکرم و برای این عزیزان روزهای شاد و سرشار از کامیابی آرزومندم.

از کادر اداری و خدماتی دانشگاه و پژوهشگاه ابن‌سینا، که در فراهم آمدن محیط مناسبی برای آموزش و تحقیق تلاش می‌کنند، متشکرم.

از همه افراد خانواده، به ویژه از همسر گرانقدر، صبور و مهربانم، مادر مهربان و پدر بزرگوارم و مادر و پدر با محبت همسرم که همواره از حمایت‌ها و محبت‌هایشان برخوردار بوده‌ام، سپاسگزارم و برایشان سلامت و کامیابی آرزومندم. امیدوارم بتوانم قدردان مهربانی‌ها و مهرورزی‌هایشان باشم.

چکیده:

رگزایی فرایند ایجاد رگ‌های جدید از رگ‌های موجود است. رگ‌های جدید نیازهای متابولیک سلول‌ها را تامین می‌نمایند. رگزایی در بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک اهمیت دارد. طی فرایند رگزایی پروتئینازها به ویژه پلاسمین، ماتریکس خارج سلولی را تخریب می‌کند و سبب فعال شدن و آزاد سازی فاکتورهای رشد موجود در آن می‌شود. این فرایندها با فعال شدن موضعی پلاسمینوژن در سطح سلول‌ها آغاز می‌شوند. بررسی‌های پیشین ما نشانگر توانایی یک آنتی‌بادی مونوکلونال ضد پلاسمینوژن در مهار فرایند رگزایی در یک مدل رگزایی است. به دلیل اهمیت این آنتی‌بادی ساخت scFv از آن در دستور کار قرار گرفت. ابتدا mRNA از سلول‌های هیبریدومای تولیدکننده آنتی‌بادی جدا شد و از آن cDNA تهیه شد. پس از اطمینان از صحت cDNA، قطعات ژنی مربوط به زنجیرهای سبک و سنگین آنتی‌بادی موردنظر به وسیلهٔ پرایمرهای ویژه‌ای از cDNA تکثیر گردید. این قطعات به طور جداگانه در محل مناسب وارد وکتوری دارای ترادف لینکر در بین قطعات بیان‌کننده زنجیره سبک و سنگین گردید. ساختار ایجاد شده شامل زنجیره سبک -لینکر- زنجیره سنگین به وکتور بیانی منتقل شد و این وکتور به باکتری *Escherichia coli* منتقل گردید و تحت شرایط مناسب scFv موردنظر تولید شد که پس از بازسرشتگی، توانایی شناسایی پلاسمینوژن به وسیله این scFv توسط روش ELISA رقابتی بررسی شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE و ایمونوبلات نشانگر بیان scFv می‌باشد. این scFv به صورت انباشت پروتئینی تولید می‌شود، اما طی مراحل بازسرشتگی محلول می‌گردد. آزمایش ELISA نشان می‌دهد که این scFv می‌تواند با آنتی‌بادی اصلی در اتصال به پلاسمینوژن به صورت وابسته به غلظت رقابت کند و آن را شناسایی نمایند. یافته‌ها نشانگر صحت تولید scFv، قابلیت اتصال آن به پلاسمینوژن و توانایی آن در مهار پلاسمینوژن است. با تولید این scFv میزان ایمنی‌زایی آنتی‌بادی کاهش می‌یابد و امکان بررسی خاصیت ضد رگزایی آن به منظور کاربرد درمانی به‌وجودآمده است.

واژگان کلیدی: مهندسی آنتی‌بادی، آنتی پلاسمینوژن، پلاسمینوژن، رگزایی

فهرست مطالب

۱- فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- سیستم ایمنی و آنتی‌بادی‌ها ۱

۱-۲- بیوشیمی و ژنتیک آنتی‌بادی‌ها ۲

۱-۳- تولید آنتی‌بادی در پاسخ ایمنی ۶

۱-۴- کاربرد درمانی آنتی‌بادی‌ها ۷

۱-۵- مهندسی آنتی‌بادی‌ها ۹

۱-۶- scFv ۱۲

۱-۶-۱- ساختار scFv ۱۲

۱-۶-۲- مزایای scFv ۱۳

۱-۷- سامانه پلاسمینوژن و کارکردهای گوناگون آن ۱۴

۱-۷-۱- پلاسمینوژن ۱۶

۱-۷-۲- فعال کننده‌های پلاسمینوژن ۱۸

۱-۷-۲-۱- فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (tPA): ۱۸

۱-۷-۲-۲- فعال کننده نوع ادراری پلاسمینوژن (uPA) ۱۹
۱-۷-۳- مهار کننده‌های فیزیولوژیک سامانه پلاسمینوژن ۲۰
۱-۷-۳-۱- مهار کننده‌های پلاسمین ۲۱
۱-۷-۳-۲- مهار کننده‌های فعال کننده‌های پلاسمینوژن ۲۲
۱-۷-۴- مکانیسم عملکرد سامانه پلاسمینوژن در فیبرینولیز درون رگی ۲۳
۱-۷-۵- مکانیسم عملکرد سامانه پلاسمینوژن در فیبرینولیز پیرامون سلولی ۲۴
۱-۸- مقدمه‌ای بر رگزایی ۲۷
۱-۸-۱- تاریخچه بررسی رگزایی ۲۹
۱-۸-۲- فاکتورهای فعال کننده رگزایی ۳۰
۱-۹- سامانه پلاسمینوژن و رگزایی ۳۱
۱-۱۰- راهکارهای درمانی از طریق هدف گیری سامانه پلاسمینوژن ۳۵
۱-۱۱- اهداف و دورنمای مطالعه حاضر ۳۷
۲- فصل دوم: مواد و روش‌ها ۴۰
۲-۱- کلوناژ و تهیه تک کلون از سلول‌های هیبریدوما ۴۰
۲-۱-۱- کشت سلول‌های هیبریدوما ۴۱
۲-۱-۲-انجام کلوناژ ۴۱
۲-۱-۳- انجام آزمون ELISA برای تک کلونی‌ها ۴۲
۲-۲-تعیین ایزوتایپ آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۴۴
۲-۳- استخراج و بررسی کیفیت RNA ۴۴

۲-۳-۱- آماده سازی سلول‌ها برای استخراج RNA ۴۴
۲-۳-۲- استخراج RNA ۴۵
۲-۳-۳- بررسی کیفیت RNA استخراج شده ۴۶
۲-۴- تولید cDNA از سلول MC2B8 ..... ۴۷
۲-۴-۱- بررسی کیفیت cDNA تولید شده ۴۸
۲-۵- تکثیر زنجیرهای سبک و سنگین آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۵۰
۲-۵-۱- استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی برای طراحی پرایمر ۵۰
۲-۵-۲- طراحی پرایمر برای تکثیر زنجیره سبک آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۵۰
۲-۵-۳- طراحی پرایمر برای تکثیر زنجیره سنگین آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۵۳
۲-۶- تکثیر و همسانه‌سازی ژن زنجیره سبک آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۵۵
۲-۶-۱- تکثیر ژن زنجیره سبک آنتی‌بادی MC2B8 به وسیله PCR ۵۵
۲-۶-۲- همسانه‌سازی ژن زنجیره سبک آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۵۶
۲-۶-۳- وارد کردن پلاسمید MC2B8-pGEM-FT-VL به باکتری *Eschericia coli* ۵۷
۲-۶-۴- بررسی ورود پلاسمید MC2B8-pGEM-FT-VL به باکتری با آزمون Colony PCR ۵۹
۲-۶-۵- تهیه پلاسمید به منظور ترادف‌یابی ۶۰
۲-۷- تکثیر و همسانه‌سازی ژن زنجیره سنگین آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۶۱
۲-۷-۱- تکثیر ژن زنجیره سنگین آنتی‌بادی MC2B8 به وسیله PCR ۶۱
۲-۷-۲- همسانه‌سازی ژن زنجیره سنگین آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۶۲

۲-۷-۳- وارد کردن پلاسمید MC2B8-pGEM-FT-VH به باکتری *E. coli* ۶۳
۲-۷-۴- بررسی ورود پلاسمید MC2B8-pGEM-FT-VH به باکتری با آزمون Colony PCR ۶۳
۲-۷-۵- تهیه پلاسمید به منظور ترادف‌یابی ۶۴
۲-۸- ترادف یابی و تجزیه و تحلیل نتایج ترادف‌ها ۶۴
۲-۹- وارد کردن قطعه ژنی ناحیه متغیر زنجیره سبک و سنگین در حامل pGEMT-polyG ۶۴
۲-۹-۱- جداسازی ژن ناحیه متغیر زنجیره سبک از حامل MC2B8-pGEM-FT-L6 ..... ۶۵
۲-۹-۲- وارد کردن ناحیه متغیر زنجیر سبک در حامل pGEMT-polyG ۶۶
۲-۹-۳- جداسازی ژن ناحیه متغیر زنجیره سنگین از حامل MC2B8-pGEM-FT-H3 ..... ۶۶
۲-۹-۴- وارد کردن ناحیه متغیر زنجیر سنگین در حامل pGEMT-L6-polyG ۶۷
۲-۱۰- وارد کردن L6H3-scFv در حامل‌های بیانی و انتقال آن به باکتری *E. coli* سویه BL21 ..... ۶۷
۲-۱۱- طراحی و تولید شکل VH-VL از L6H3-scFv ۷۰
۲-۱۱-۱- طراحی پرایمر برای تولید شکل VH-VL ۷۰
۲-۱۱-۲- واکنش SOE-PCR برای تولید شکل VH-VL ۷۱
۲-۱۱-۳- همسانه‌سازی محصولات SOE-PCR در وکتور pGEM-FT ۷۳
۲-۱۱-۴- همسانه‌سازی ژن H3L6 در وکتورهای pET-22b(+) و pET-32a(+) ۷۴
۲-۱۲- بررسی بیان scFvها در باکتری *E. coli* ۷۶
۲-۱۲-۱- بیان L6H3 ..... ۷۶
۲-۱۲-۲- بیان H3L6 ..... ۷۷

۲-۱۲-۳- SDS-PAGE پروتئین‌های بیان شده ۷۷
۲-۱۲-۴- ایمونوبلاتینگ ۷۸
۲-۱۳- تولید و تخلیص scFvها ۷۹
۲-۱۳-۱- تولید و تخلیص پروتئین با شوک اسمزی از باکتری حامل پلاسمید pET-22b(+)-L6H3 ..... ۷۹
۲-۱۳-۲- تولید پروتئین از باکتری دارای پلاسمید pET-32a(+)-L6H3 ..... ۸۱
۲-۱۳-۲-۱- بازسرشتگی ۸۱
۲-۱۳-۲-۲-تخلیص پروتئین از باکتری دارای وکتور pET-32a(+)-L6H3 ..... ۸۲
۲-۱۴- بررسی فعالیت ایمونولوژیک L6H3 ..... ۸۳
۲-۱۵- بررسی اثر L6H3-scFv بر روی فعالیت هضم فیبرین در مجاورت پلاسمین ۸۴
۳- فصل سوم: نتایج ۸۶
۳-۱- کلوناژ، انتخاب تک کلونی و ایزوتایپینگ آنتی‌بادی ۸۶
۳-۱-۱- نتایج آزمون ELISA اولیه ۸۶
۳-۱-۲- تعیین ایزوتایپ آنتی‌بادی MC2B8 ..... ۸۸
۳-۲- بررسی RNA استخراج شده ۸۸
۳-۳- تولید cDNA از سلول‌های هیبریدومای MC2B8 ..... ۸۹
۳-۴- تکثیر ناحیه متغیر زنجیرهای سبک و سنگین آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 ..... ۹۰
۳-۵- نتایج Colony PCR برای بررسی ورود ژن‌های ناحیه متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین به پلاسمیدها ۹۰
۳-۵-۱- نتایج Colony PCR با هدف بررسی ورود پلاسمیدهای دارای قطعه VL به باکتری ۹۱

۳-۵-۲- نتایج Colony PCR با هدف بررسی ورود پلاسمیدهای دارای قطعه VH به باکتری.....۹۲
۳-۶- نتایج ترادف‌یابی ناحیه متغیر زنجیرهای سبک و سنگین آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8.....۹۳
۳-۶-۱- ترادف ناحیه متغیر زنجیره سبک آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 .....۹۳
۳-۶-۲- بررسی ترادف ناحیه متغیر زنجیره سبک آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 .....۹۳
۳-۶-۳- ترادف ناحیه متغیر زنجیره سنگین آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 .....۹۵
۳-۶-۴- ترادف ناحیه متغیر زنجیره سنگین آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8 .....۹۵
۳-۷- ایجاد حامل pGEMT-L6-polyG-H3 .....۹۷
۳-۷-۱- آزمون Colony PCR برای شناسایی باکتری‌های واجد پلاسمید pGEMT-L6-polyG-H3 ...۹۷
۳-۷-۲- ترادف کامل ژن scFv حاصل از آنتی‌بادی منوکلونال MC2B8.....۹۸
۳-۸- همسانه‌سازی ژن L6H3 در وکتورهای pET-22b(+) و pET-32a(+).....۹۸
۳-۹- ایجاد و همسانه‌سازی ساختارH3L6 .....۹۹
۳-۹-۱- انجام SOE-PCR ۹۹
۳-۹-۲- ترادف‌یابی H3L6 ..... ۱۰۰
۳-۹-۳- آزمون Colony PCR برای ژن H3L6 ورودی در وکتورهای pET-22b(+) و pET-32a(+) .. ۱۰۰
۳-۱۰- بیان و تخلیص پروتئین L6H3 تولیدی از وکتور pET22b(+) ۱۰۲
۳-۱۱- ایمونوبلاتینگ پروتئین L6H3 تولید شده توسط وکتور pET22b(+) ۱۰۳
۳-۱۲- بیان پروتئین L6H3 تولید شده به وسیله وکتور pET32a(+) ۱۰۳
۳-۱۳- ایمونوبلاتینگ پروتئین L6H3 بیان شده به وسیله وکتور pET32a(+) ۱۰۴

۳-۱۴- تخلیص L6H3 از وکتور pET32a(+) ۱۰۵
۳-۱۵- بیان پروتئین H3L6 از وکتور pET22b(+) ۱۰۶
۳-۱۶- ایمونوبلاتینگ پروتئین H3L6 از وکتور pET22b(+) ۱۰۷
۳-۱۷- آزمون ELISA رقابتی ۱۰۸
۳-۱۷-۱-آزمون ELISA رقابتی برای L6H3-scFv بیان شده در pET22b(+) ۱۰۸
۳-۱۷-۲- آزمون ELISA رقابتی برای L6H3-scFv بیان شده در pET32a(+) ۱۰۹
۳-۱۸- تاثیر L6H3-scFv بر روی فعالیت هضم فیبرین در مجاورت پلاسمین ۱۰۹
۴-فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری ۱۱۱
۴-۱- مهار رگزایی با تداخل در سامانه پلاسمینوژن ۱۱۱
۴-۲- دستاوردهای این پژوهش ۱۱۶
۵- فصل پنجم: مراجع ۱۲۱

مقدمه

۱- فصل اول: مقدمه

۱-۱- سیستم ایمنی و آنتی‌بادی‌ها

دفاع در برابر پاتوژن‌های مهاجم در مهره‌داران به وسیله سیستم ایمنی انجام می‌شود. این سیستم مجموعه‌ای از سلول‌های تخصصی و پروتئین‌ها می‌باشد. پاسخ ایمنی را می‌توان به دو فعالیت مرتبط شامل شناسایی و پاسخ‌دهی تقسیم کرد. شناسایی ایمنی برای پاسخ اختصاصی آن ضروریست. بخشی از سیستم ایمنی که سیستم ایمنی ذاتی نامیده می‌شود، به عنوان نخستین سیستم دفاعی در برابر میکروارگانیسم‌های بیگانه و بر اساس پاسخ‌های غیر اختصاصی به واسطه تأثیر عواملی مانند ماکروفاژها و گرانولوسیت‌ها عمل می‌کند. در مقابل ایمنی آداپتیو به طور اختصاصی و ویژه برای هر عوامل خارجی از بدن محافظت می‌کند. تولید آنتی‌بادی علیه یک مولکول ویژه بیگانه که توانایی القای پاسخ ایمنی را دارد و آنتی‌ژن نامیده می‌شود، یکی از بارزترین انواع ایمنی آداپتیو است.

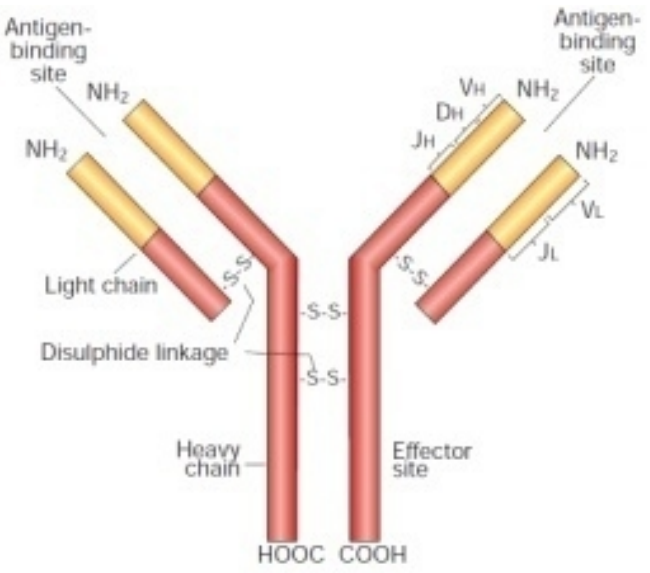
آنتی‌بادی‌ها مولکول‌های طبیعی هستند که بدن مهره‌داران آرواره‌دار آن را برای محافظت از خود در برابر عوامل عفونت‌زا و مواد سمی تولید می‌کنند. ایمنی آداپتیو موجب ایجاد پاسخ دارای حافظه می‌شود که در مواجهه بعدی با آنتی‌ژن موجب تسریع ایجاد پاسخ و پاسخ‌دهی با شدت بالاتر می‌گردد. در بدن انسان پنج نوع

ایمونوگلوبولین مختلف وجود دارد. ایمونوگلوبولین‌های G یا IgG بخش عمده آنتی‌بادی‌های سرمی را تشکیل می‌دهند و توسط لنفوسیت‌های B تولید می‌شوند. اتصال آنتی‌بادی‌ها به آنتی‌ژن‌ها، پیام‌هایی را به سایر بخش‌های سیستم ایمنی ارسال می‌کند که به وسیله آن‌ها آبشارهایی آغاز می‌شود که منجر به حمله و خنثی‌سازی پاتوژن بیگانه می‌گردد.

۱-۲- بیوشیمی و ژنتیک آنتی‌بادی‌ها

آنتی‌بادی‌ها گلیکوپروتئین‌هایی هترودیمر هستند که از چهار زنجیرهٔ پلی پپتیدی مجزا، شامل دو زنجیره سنگین[۱] مشابه (H) و دو زنجیره سبک[۲] (L) تشکیل مشابه شده‌اند[۱]. این پلی‌پپتیدها به وسیله نیروهای غیر کووالانسی و پیوندهای دی‌سولفیدی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. هر زنجیره سبک در کنار یک زنجیره سنگین قرار دارد و ناحیه ثابت زنجیرهای سنگین با یکدیگر در ارتباط هستند. زنجیره‌های سبک و سنگین را می‌توان به دو ناحیه متغیر و ثابت تقسیم کرد(شکل ۱-۱). زنجیره سنگین از چندین دمین مجزا به‌وجود آمده است که متشکل از دو جفت صفحه β غیر همسو می‌باشد. چهار دمین با ویژگی ذکر شده، نواحی ثابت زنجیره سنگین (CH) را تشکیل می‌دهند و دمین باقی مانده به عنوان ناحیه متغیر (VH) زنجیره سنگین شناخته می‌شود. بخش‌های ثابت و متغیر زنجیره سبک به ترتیب CL و VL نامیده می‌شوند. ناحیه اتصال به آنتی‌ژن در دمین‌های متغیر زنجیرهای سبک و سنگین قرار گرفته است. پیش از دسترسی به روش‌های مهندسی آنتی‌بادی‌ها، ناحیه اتصال به آنتی‌ژن وسیله برش پروتئولیتیک جدا می‌شد. با روش‌های پروتئولیتیک قطعات Fab و $F(ab')_2$ به دست می‌آیند که دارای دمین‌هایی متغیر و نخستین دمین ثابت است.

[1] Heavy chains
[2] Light chains

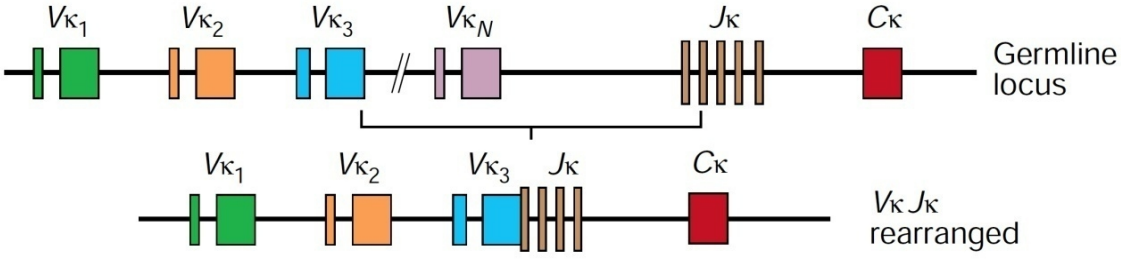


شکل ۱-۱. ساختار یک آنتی‌بادی از نوع IgG. دو زنجیره مشابه سنگین به وسیله پیوندهای دی سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند. جایگاه شناسایی آنتی‌ژن از نواحی متغیر (زرد) زنجیره‌های سبک و سنگین تشکیل شده است. ناحیه ثابت زنجیره سنگین آنتی‌بادی (قرمز) در تعیین عملکرد زیستی آن نقش دارد.

سیستم ایمنی برای مقابله با آنتی‌ژن‌های بی‌شمار موجود در طبیعت باید توانایی تولید تعداد بسیار زیادی آنتی‌بادی را داشته باشد. برای تولید این دامنه گسترده از آنتی‌بادی‌ها با ترادف‌های آمینواسیدی مختلف، لازمست تا ترادف‌های نوکلئوتیدی رمزدهنده آن‌ها در ژنوم وجود داشته باشد. اما ژن‌های رمزدهنده آنتی‌بادی‌ها به طور کامل در ژنوم سلول‌های جنسی وجود ندارد؛ بلکه به صورت قطعات ژنی با قابلیت بازآرایی در ژنوم قرار گرفته‌اند. طی تکوین لنفوسیت‌ها، آرایه‌ای از این قطعات ژنی کوچک در سطح DNA بازآرایی پیدا می‌کنند و به یکدیگر متصل می‌شوند تا ژن‌های آنتی‌بادی‌ها را ایجاد کنند. خوشه‌های ژنی مربوط به آنتی‌بادی‌ها روی سه کروموزوم مختلف قرار گرفته‌اند و زنجیره‌های سبک κ و λ و زنجیره‌های سنگین را رمزدهی می‌کنند. در اینجا برای نمونه بازآرایی ناحیه متغیر زنجیره سبک κ را بررسی می‌کنیم. زنجیره سبک κ در انسان از دو قطعه ژنی شامل یک V_κ (برگرفته از واژه Variable به‌معنای متغیر) بزرگ و یک J_κ (برگرفته از واژه Joining به‌معنای اتصال دهنده) کوچک تشکیل شده است و یک ژن C (برگرفته از واژه Constant به معنای ثابت) ناحیه ثابت را

رمزدهی می‌کند. خوشه‌ای شامل حدود ۴۰ قطعه V_κ مختلف و پنج J_κ متفاوت در ژنوم وجود دارد. در سلول‌های B نابالغ فرایند جابجا شدن و بازآرایی منجر به اتصال یک قطعه ژنی V_κ به یک قطعه J_κ می‌گردد. هر قطعه V_κ در بالادست خود دارای ترادف پروموتر و ترادف رهبر مربوط به خود می‌باشد. هنگامی که ژن ایمونوگلوبولین رونویسی می‌شود، اسپلایسینگ RNA اولیه، ترادف‌های $V_\kappa J_\kappa$ را در مجاورت ترادف C مربوط به ناحیه ثابت قرار می‌دهد و mRNA بالغ تولید می‌شود (شکل ۱-۲). بدین ترتیب ترادف حاصل به عنوان یک زنجیره سبک κ کامل در شبکه اندوپلاسمی به یک پلی‌پپتید ترجمه می‌شود. در مورد زنجیره سبک λ نیز فرایند مشابهی رخ می‌دهد.

در مورد زنجیره سنگین، ژن‌های مختلف ناحیه ثابت یک خوشه ژنی را تشکیل می‌دهند و مجموعه‌ای متشکل از حدود ۲۵ قطعه بسیار متغیر D در بین نواحی V و J قرار گرفته است. سامان‌دهی زنجیره سنگین طی دو مرحله رخ می‌دهد. ابتدا یکی از ژن‌های قطعه D به یک ژن قطعه J متصل می‌شود و سپس یکی از ژن‌های قطعه V به مجموعهٔ DJ می‌پیوندد. قطعه D به همراه قطعات V و J متصل به آن تقریباً به طور کامل سومین ناحیه بسیار متغیر را رمزدهی می‌کند(شکل ۱-۳). دو ناحیه بسیار متغیر اول به طور کامل توسط ترادف V رمزدهی می‌شود[۲]. از کنار هم قرار گیری نواحی $V_\kappa J_\kappa$ مربوط به زنجیره سبک و $V_H D_H J_H$ زنجیره سنگین



شکل ۱-۲. اتصال ژن‌های زنجیره سبک (κ) به وسیله نوترکیبی سوماتیک طی تکوین لنفوسیت‌های B. زنجیره سبک به وسیله قطعات ژنی V، J و C رمزدهی می‌شود. بدین ترتیب که یکی از حدود ۴۰ ژن V به یکی از پنج ژن J با متصل می‌شود و در کنار یک ژن C قرار می‌گیرد. فرایند نوترکیبی شامل حذف DNA مابین ژن‌های انتخاب شده است.