بسم الله
الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله دوره دکتری (Ph.D) رشته ایمنی شناسی پزشکی

عنوان

تولید فیوژن پروتئین HSP70-ESAT6 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ارزیابی پاسخهای ایمنی متعاقب تجویز آن از طریق بینی

نگارش

مجید تبیانیان

استاد راهنما

دکتر احمد زواران حسینی

استاد مشاور

دکتر علی رضائی مکرم

تابستان ۱۳۸۸

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 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 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 ۵- این آیین‌نامه در ۵ 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.

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 **ایمنی شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۸۸** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر احمد زواران حسینی** ، مشاوره **دکتر علی رضائی مکرم** 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 ٤ : 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 ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **مجید تبیانیان** دانشجوی رشته **ایمنی شناسی پزشکی** مقطع **دکترا** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به او

او که پنهان است ونهان است وپیداست.پنهان در برابر دیدگان بصری من،نهان در عمق روح الهی من وپیدا در ذره ذره آفریده هایش که بی وقفه ویکصدا عظمت وقدرت وجودیش را برایم فریاد می زنند.اما افسوس که ذهن ناتوان من عاجز از درک همه آنهاست وفقط گاهی ولحظه ای یک بانگ روشن ونورانی از عمق جانم می گذرد،بر قلبم می نشیند واو را برایم ترسیم می کند.آری شاید هرگز نتوانم وجود نازنینش را بی واسطه برای خودم معنی کنم ،شاید هرگز نتوانم وسعت وقدرت لایزالش را برای خودم بی اشتباه تعریف کنم ،شاید هرگز نتوانم آنچه را که او برایم صلاح دانسته و برمن مقدر ساخته است بی شکایت واعتراض پذیرا باشم ،اما یک چیز را خوب می دانم:

اینکه دوستش دارم ،حتی در لحظه هایی که می دانم دوستم ندارد ومی پرستمش حتی در لحظه هایی که دانسته وندانسته دستانم را به آنچه او دوست نمی دارد می آلایم وروحم را آزرده خاطر سرگردان جاده هایی می کنم که همیشه انتهایشان به در خانه اوختم می شود.آنجا که با امید بسیار در می زنم وپشت در می ایستم تا شاید یکبار دیگر در خانه اش را به رویم بگشاید.

به پروردگارم

و به وجود نازنین مولای زمان (عج)

جای جای زندگی من جای ردپای پدرومادر است

و این پایان نامه پایان این نامه نیست.....

در این سال های زندگی چنان آرام وبی ریا عشق ورزیدند که چون شمع بی صدا سوختند. تلاطم زندگی و پستی وبلندی هایش چنان مرا مجذوب کرده بود که هرگز فرصت قدردانی نداشتم. اینجا واکنون که لحظه ای درنگ می کنم. اینجا وامروز که زندگی فردایم آغاز می شود، لحظه ای می ایستم و گذشته رابه خاطر می آورم: هیچ ندارم که لایق باشد.

و باز چون همیشه از سرِ خودپسندی دعایشان می کنم که خدایا دعای خیرشان را بدرقه راهم گردان.

تقدیم به پدرومادر عزیزم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی و به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

تقدیم به همراه و همسر عزیزم

که همواره یار ومددکار بنده بوده و خواهد بود.

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودش که بهترین پشتیبان است و به پاس محبت های بی دریغش که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیم به نوگل باغ زندگیم : سارا

شکوفه نازینی که نگاه شیرین و پرمهرش زندگی ام را زیبا و عطرآگین ساخته است و به پاس تمام لحظاتی که بواسطه تحصیل، آغوش گرم پدری را از وی دریغ نموده.

تقدیم به برادر وخواهر عزیزم

قلب های تپنده ای که شیرینی لحظات زندگی ام از وجود آنها نشأت می گیرد و به پاس یاری وهمراهی شان در تمام مراحل زندگی ام

تقدیم به دوست عزیزم حسین

که معنای ناب دوستی در وجود گرانمایه اش خلاصه شده است و همواره مشوق و تکیه گاه من بوده است

امید که با پیشرفت های روزافزون خود همواره جوابگوی مهربانی ها وفداکاری های عزیزانم باشم

تقدر وتشکر

خداوند بزرگ را سپاس می گذارم که توفیق عطا کردتا کار خویش را به سرانجام برسانم و حاصل این تحقیق وپژوهش را محضر عالمان تقدیم دارم.

با تشکر از:

- **جناب آقای دکتر احمد زواران حسینی**

که بار عضیم راهنمائی این پایان نامه را صمیمانه بر دوش کشیدند و بی شک بدون مساعدت های ایشان موفقیتی حاصل نمی شد.بی شک اخلاق و فروتنی خالصانه در کنار علم ای‌شان بزرگتری‌ن درسی بوده است که در محضر ای‌شان آموخته ام.

- **جناب آقای دکتر علی رضائی مکرم**

که به عنوان یک دوست وبرادر ومعلم و راهنما در مراحل مختلف تحصیل مرا تنها نگذاشته و همواره راهنمائی های راهگشای ایشان روشن کننده این مشیر بوده است.

- اساتید گرامی **دکتر زهیر صراف، دکتر ابتکار، دکتر موذنی ، دکتر پورفتح اله** و **دکتر وجگانی** که در لحظه لحظه و جای جای تحصی‌ل ای‌نجانب و انجام این رساله از کمک و راهنمائی دریغ ننمودند و ضمن داوری این رساله ، بر هرچه پربارتر شدن آن افزودند
- با تشکر از دوستان عزیزم دکتر **آرش رضا معمارنژادیان**، دکتر **سید محمود ابراهیمی، مرتضی تقی زاده** و **مهدی مهدوی** که چون فرشتگانی مهربان در تمام مراحل انجام این تحقیق بر من منت نهاده و یاریم نمودند و سختی طی این مسیر را بر من هموار نمودند.
- با تشکر از جناب آقای **مهدی حجازی** به دلی‌ل همکاری در مراحل ای‌من سازی می‌وانانت آزمای‌شگاهی

- با تشکر از سرکارخانم **دکتر پری‌سا فرنیا** در مرکز تحقیقات مای‌کوباکتری‌وم بی‌مارستان مسیح دانشور به خاطر همکاری در انجام مراحل تحقیق و تهیه سوش های مای‌کوباکتری‌وم توبرکلوزی‌س
- در پای‌ان از کلیه پرسنل زحمت کش گروه ای‌منی شناسی، بخصوص سرکار خانم اسکافی وسرکار خانم محسنی و کلیه دوستان و دانشجوی‌ان گروه ، بخصوص دوستان خوبم آقای‌ان مهدی افتخاری‌ان ، بهزاد برادران، مهدی سلی‌می‌ان و عباس آزادمهر وسرکار خانم شاهرخی کمال تشکر را دارم که با صفا و خلوص نی‌تشان همواره باعث دلگرمی ای‌نجانب بوده اند.
- از کلیه پرسنل بخش بی‌وتکنولوژی موسسه واکسن وسرم سازی رازی بخصوص سرکار خانم صفویه، خانم قربانی، هاشمی، کری‌می، گلچی‌ن فر وامامی وآقای‌ان باقری ، تجلی‌ان ،نظری، ای‌زدی‌ار ، منتظری و جناب آقای‌ان دکتر می‌رجلی‌لی و مدنی و گودرزی، کمال تشکر و سپاس گذاری را بجا می آورم.

چکیده

با توجه به اینکه بیماری سل نوعی عفونت حاد یا مزمن دستگاه تنفسی می باشد لذا به نظر می رسد که واکسیناسیون از طریق بینی (Intranasal)می تواند راهکار مفیدی در ایمن سازی و واکسیناسیون بر علیه این بیماری محسوب شود. در این مطالعه با انتخاب ۲ آنتی ژن ایمنی زای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (ESAT-6 وHSP70) ، یک پروتئین ترکیبی جدید (E6H70) برای اولین بار در سیستم پروکاریوتی با موفقیت بیان گردید. سپس پروتئین فوق دردرون ترکیب پلیمری تری متیل‌کایتوزان (TMC) انکپسوله گردید. درنتیجه مجاورت محلول ۳۰µg/ml از این پروتئین با محلول ۱mg/ml از TMC، نانوپارتیکل هائی با میانگین اندازه ذرات ۳۰۸ نانومتر و پتانسیل زتای ۱۲ mV ایجاد شد.

متعاقب ایمن سازی موش های آزمایشگاهی، نتایج بدست آمده نشان داد که میزان تکثیر لنفوسیتی و تولید سایتوکاین های IFN-γ و IL-4 و IL-12 در آن دسته از حیواناتی که با نانوپارتیکل های پروتئینی ایمن شده بودند،نسبت به گروه های کنترل آنتی ژن افزایش نشان میدهد($P<0.05$). هرچند اختلافی در میزان تولیدIL-10 بین گروه های مختلف دیده نشد($P>0.05$). البته گروهی که فرم محلول E6H70 را دریافت کرده بودند نیز میزان بیشتری از IL-12 را نسبت به گروه های ESAT-6 وHSP70 القا نمودند($P<0.05$). پاسخ سایتوتوکسیسیتی (CTL) در گروه ایمن شده با نانوپارتیکل های حاوی E6H70 از همه گروه ها ، حتی گروه BCG نیز بیشتر بود($P<0.01$). لذا می توان نتیجه گرفت که تجویز ترکیب پروتئین E6H70 و کایتوزان، از طریق بینی باعث القای پاسخ های محافظت کننده ایمنی از نوع Th1/Th2 بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مدل موشی می گردد که البته غلبه آن بیشتر به سمت Th1 و سلول هایCTL می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده، پروتئین E6H70 را می توان به عنوان کاندیدی برای واکسن های زیر واحدی نوین بر علیه سل معرفی نمود.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس- ESAT-6- HSP70- کایتوزان- سایتوکاین-CTL

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه

۱-۱ بخش اول : بیماری سل ۱

۱-۱-۱ تاریخچه بیماری سل ۱

۱-۱-۲ بیماری سل در سال های اخیر ۲

۱-۱-۳ خصوصیات مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۳

۱-۲ بخش دوم : پاسخ های ایمنی در بیماری سل ۴

۱-۲-۱ پاسخ های ایمنی ذاتی ۶

۱-۲-۲ پاسخ های ایمنی اکتسابی ۷

۱-۲-۲-۱ پاسخ های ایمنی سلولی ۷

۱-۲-۲-۲ نقش پاسخ های ایمنی هومورال در عفونت توبرکلوزیس ۱۱

۱-۲-۳ ایمنی مخاطی ۱۱

۱-۳ بخش سوم: واکسیناسیون بر علیه توبرکلوزیس ۱۴

۱-۳-۱ مروری برانواع واکسن های موجود یا درحال تکوین بر علیه توبرکلوزیس ۱۵

۱-۳-۱-۱ عصاره توبرکولین ۱۵

۱-۳-۱-۲ BCG ۱۶

۱-۳-۱-۳ واکسن های وکتوری ۱۷

۱-۳-۱-۴ واکسن های DNA ۱۸

۱-۳-۱-۵ باکتری کشته شده BCG و *M. bovis* ۱۹

۱-۳-۱-۶ واکسن های زیر واحدی ۱۹

۱-۳-۲ ESAT-6 ..... ۲۱

۱-۳-۲-۱ خصوصیات ژنومیکس و پروتئومیکس ESAT-6 ۲۲
۱-۳-۲-۲ خصوصیات ایمونولوژیک ESAT-6 ۲۳
۱-۳-۲-۳ اهمیت ESAT-6 در مطالعات تشخیصی و طراحی واکسن ۲۴
۱-۳-۳ ادجوان ها ۲۴
۱-۳-۴ پروتئین های شوک حرارتی (HSPs) ۲۵
۱-۳-۴-۱ HSP70 در نقش یک حامل و ادجوان ۲۶
۱-۳-۴-۲ گیرنده های HSP70 ومکانیسم ادجوانی آن ۲۷
۱-۳-۵ روش های انتقال و نحوه تجویز واکسن توبرکلوزیس ۳۰
۱-۳-۶ استفاده از نانوپارتیکل ها در واکسیناسیون ۳۱
۱-۳-۶-۱ کایتوزان ۳۲
۱-۴ بخش چهارم: مروری بر مطالعات گذشته ۳۴

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ سوش های باکتریائی ۴۰
۲-۲ تهیه محلول های مورد نیاز ۴۱
۲-۳ محیط های کشت ۴۷
۲-۴ پلاسمیدpQE30 ۴۸
۲-۵ الیگونوکلئوتیدهای آغازگر (پرایمر) ۴۸
۲-۶: کشت و نگهداری باکتریها ۴۹
۲-۷: تهیه سلولهای مستعد از باکتری *E.coli* ۴۹
۲-۸: ترانسفورم کردن (تراریختی) باکتری *E.coli* با DNA پلاسمیدی ۵۱
۲-۹: غربال کردن کلنی های باکتریایی ۵۲
۲-۹-۱: گزینش با آنتی بیوتیک ۵۲

۲-۹-۲: غربال کردن با روش α-complementation یا blue/white screening ۵۲
۲-۹-۳: آنالیز آنزیمی ۵۳
۲-۱۰: استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی ۵۳
۲-۱۱: اندازه گیری غلظت DNA ۵۵
۲-۱۲: الکتروفورز DNA در ژل آگارز ۵۵
۲-۱۳: هضم و برش DNA توسط آنزیمهای محدود کننده داخلی ۵۶
۲-۱۴: اتصال قطعات DNA ۵۷
۲-۱۵: واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۵۷
۲-۱۶: تخلیص محصول PCR ۵۸
۲-۱۷: نگاهی کلی بر استراتژی کلونینگ و تولید فیوژن پروتئین ۵۹
۲-۱۸: القاء ساختارهای بیانی توسط IPTG به منظور تولید پروتئین های نوترکیب دارای برچسب هیستیدین ۶۱
۲-۱۹ ارزیابی بیان پروتئین های نوترکیب به وسیله الکتروفورز در ژل SDS-PAGE ۶۳
۲-۲۰ یکسان سازی غلظت کلی پروتئینها جهت انجام SDS-PAGE ۶۵
۲-۲۱: تخلیص پروتئین نوترکیب دارای برچسب هیستیدینی به روش کروماتوگرافی تمایلی ۶۵
۲-۲۲: تخلیص به شیوه Denaturing ۶۵
۲-۲۳: شناسائی وتائید پروتئین های نوترکیب دارای برچسب هیستیدینی با وسترن بلات ۶۷
۲-۲۴: تعیین مقدار پروتئین به کمک کیت BCA ۶۹
۲-۲۴-۱: رسم نمودار استاندارد ۶۹
۲-۲۴-۲: تعیین مقدار پروتئین ۷۰
۲-۲۵: تهیه نانوپارتیکلهای کایتوزان حاوی پروتئین E6H70 ..... ۷۰

۲-۲۶: بررسی نانوپارتیکل های ایجاد شده ۷۱
۲-۲۶-۱: بررسی خصوصیات ظاهری نانوپارتیکل ها ۷۱
۲۲-۲۶-۲: بررسی توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوپارتیکل ها ۷۱
۲-۲۷: بررسی مقدار پروتئین محبوس شده و تعیین مقدار کارایی احتباس در نانوپارتیکل ها..... ۷۲
۲-۲۸: مطالعه آزاد سازی پروتئین از نانوپارتیکل های کایتوزان in-vitro ۷۳
۲-۲۹: آماده سازی نمونه جهت تجویز ۷۳
۲-۳۰: تعداد حیوانات تحت آزمایش و برنامه ایمن سازی ۷۴
۲-۳۱: جداسازی و کشت سلول های طحال ۷۴
۲-۳۲: بررسی قدرت تکثیر سلول های طحالی با روش MTT ۷۵
۲-۳۳: ارزیابی میزان سایتوکاین‌های تولید شده توسط سلول‌های طحالی ۷۷
۲-۳۴: انجام آزمون بررسی پاسخ سلول های T سایتوتوکسیسک (CTL) در in vivo ۷۸
۲-۳۵: روش های آماری ۸۰

فصل سوم: نتایج

۳-۱ ارزیابی محصولات PCR بوسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۸۱
۳-۲ تهیه قطعه فیوژن ۸۲
۳-۳ کلون نمودن قطعات ژنی تکثیر یافته در درون وکتور بیانی ۸۲
۳-۴ غربال کردن کلنی های حاوی pQE30 دارای قطعه ۸۳
۳-۵ ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب توسط SDS-PAGE ۸۴
۳-۶: تخلیص پروتئین نوترکیب بوسیله ژل آگارز Ni-NTA ۸۶
۳-۷: شناسائی و تائید پروتئین های نوترکیب با روش وسترن بلات ۸۷
۳-۸: بررسی خصوصیات ظاهری نانوپارتیکل ها ۸۸
۳-۸-۱- تهیه نانوپارتیکل های کایتوزان ۸۸

۳-۸-۲- بررسی توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوپارتیکل های ایجاد شده ۹۱
۳-۹: تعیین مقدارپروتئین محبوس شده درنانوپارتیکل‌ها ۹۳
۳-۱۰: بررسی روند آزادسازی پروتئین E6H70 از نانوپارتیکل های کایتوزان ۹۴
۳-۱۱: نتایج حاصل از بررسی میزان سایتوکاین ها ۹۵
۳-۱۱-۱: تولید اینترفرون گاما ۹۵
۳-۱۱-۲- تولید اینتر لوکین ۱۰ ..... ۹۶
۳-۱۱-۳: تولید اینتر لوکین ۴ ..... ۹۹
۳-۱۱-۴: تولید اینتر لوکین ۱۲ ..... ۹۹
۳-۱۲: نتایج حاصل از بررسی تکثیر سلول های طحالی در مجاورت آنتی ژن (MTT) ۱۰۲
۳-۱۲: نتایج حاصل از بررسی سلول های سایتوتوکسیسیتی اختصاصی علیه آنتی ژن ۱۰۳
فصل چهارم: بحث، پیشنهادها و نتیجه گیری
۴-۱: کلون سازی و بیان آنتی ژن های نوترکیب ESAT-6 و HSP70 و E6H70 ..... ۱۰۶
۴-۲: ایجاد نانوپارتیکل های کایتوزان و فیوژن پروتئین ۱۰۸
۴-۳: بررسی پاسخ های ایمنی متعاقب تجویز آنتی ژن و نانوپارتیکل های حاوی پروتئین از طریق بینی ۱۱۰
۴-۴: مطالعات سایتوتوکسیسیتی ۱۱۶
۴-۵: نتیجه گیری ۱۱۸
۴-۶: پیشنهادها ۱۱۸
فهرست منابع ۱۱۹

فهرست جداول

جدول ۲-۱. سویه های مورد استفاده باکتری *E.coli* و ژنوتیپ آنها ۴۰

جدول ۲-۲. الیگونوکلئوتید (پرایمر) های طراحی شده برای تحقیق ۴۹

جدول ۲-۳ : مواد مورد استفاده در آزمون PCR ۵۸

جدول ۲-۴ : چرخه زمانی و برنامه مورد استفاده جهت انجام PCR ۵۸

جدول ۳-۱. خصوصیات نانوپارتیکل‌های حاصل ازغلظت‌های مختلف TMC کراس لینک شده با NaTpp ۹۱

جدول۳-۲. بررسی احتباس مقادیر مختلف پروتئین BSA در نانوپارتیکل های کایتوزان ۹۴

جدول ۳-۳. میزان تولید سایتوکاین IFN-γ از سلول های طحال در گروه های مختلف موشی متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط ۹۷

جدول ۳-۴. میزان تولید سایتوکاین IL-10 از سلول های طحال در گروه های مختلف موشی متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط ۹۸

جدول ۳-۵. میانگین میزان تولید سایتوکاینIL-4 از سلول های طحال در گروه های مختلف موشی متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط ۱۰۰

جدول۳-۶. میانگین میزان تولید سایتوکاینIL-12 از سلول های طحال در گروه های مختلف موشی متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط ۱۰۱

جدول ۳-۷: میانگین ضریب تکثیر لنفوسیتی± SD سلول های طحال در گروه های مختلف موشی متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط ۱۰۲

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. نمای میکروسکوپی باسیل اسید فاست مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۴

شکل۱-۲. نمای شماتیکی از پاسخ های ایمنی دخیل بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۶

شکل ۱-۳. نمائی شماتیک از پاسخ های ایمنی در بافت تنفسی، متعاقب تجویز واکسن ازطریق بینی ۱۳

شکل ۱-۴. دیاگرامی از مجموعه مطالعات انجام شده در مورد واکسیناسیون سل تاکنون ۱۶

شکل۱-۵. ساختمان شیمیایی پلیمر زیست تخریب پذیرکایتوزان و کتین ۳۲

شکل ۲-۱. طرح شماتیک و ساختار پلاسمید pQE30 ..... ۴۸

شکل ۲-۲. استراتژی کلونیگ قطعات ESAT-6 و HSP70 و فیوژن پروتئین E6H70 ..... ۶۱

شکل ۲-۳. رابطه تعداد سلول با میزان جذب در آزمون MTT ۷۶

شکل ۲-۴. منحنی استاندارد غلظت سایتوکاینی موشی بر مبنای جذب نمونه های استاندارد ۷۸

شکل ۲-۵. اساس آزمایش اندازه گیری سایتوتوکسیسیتی اختصاصی بوسیله رنگ CFSE ۷۹

شکل ۳-۱. ارزیابی محصولات واکنش PCR برروی ژن های ESAT-6 و HSP70 ..... ۸۱

شکل۳-۲. ارزیابی محصول PCR ناشی از اتصال ژن های ESAT-6 و HSP70 ..... ۸۲

شکل۳-۳. الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های ترانسفورم شده با pQE30 دارای قطعه ۸۳

شکل۳-۴. طرح شماتیک پلاسمیدهای نوترکیب ۸۴

شکل۳-۵. بررسی رسوب باکتری های حاوی پلاسمیدهای pQE30-HSP70 و pQE30-ESAT6 برروی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE ۸۵

شکل۳-۶. بررسی رسوب باکتری های حاوی پلاسمیدهای pQE30-HSP70 و pQE30-ESAT6 برروی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE ۸۶

شکل۳-۷. بررسی تخلیص پروتئین E6H70 بروشNative وDenaturing توسطSDS-PAGE ۸۷

شکل۳-۸: بررسی الگوی پروتئین های بیان شده با روش وسترن بلات ۸۸

شکل۳-۹. تصاویر میکروسکپ الکترونی نانوپارتیکل های کایتوزان در مجاورت NaTpp ۹۰

شکل ۳-۱۰. نمای میکروسکوپ الکترونی نانوپارتیکل های کایتوزانی حاوی پروتئین E6H70 ..... ۹۰

شکل ۳-۱۱. نمودار توزیع ذرات نانوپارتیکل های کایتوزان خالی و حاوی پروتئین E6H70..... ۹۲
شکل ۳-۱۲. نمودار پتانسیل زتای نانوپارتیکل های کایتوزان خالی و حاوی پروتئین E6H70..... ۹۳
شکل ۳-۱۳. میزان رهایش پروتئین از درون نانوپارتیکل‌های کایتوزان حاوی پروتئین E6H70..... ۹۵
شکل ۳-۱۴. نمودار میانگین IFN-γ تولید شده توسط سلول های طحالی درگروه های مختلف متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط..... ۹۷
شکل ۳-۱۵. نمودار میانگین IL-10 تولید شده توسط سلول های طحالی در گروه های مختلف متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط..... ۹۸
شکل ۳-۱۶. نمودار میانگین IL-4 تولید شده توسط سلول های طحالی در گروه های مختلف متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط..... ۱۰۰
شکل ۳-۱۷. نمودار میانگین IL-12 تولید شده توسط سلول های طحالی در گروه های مختلف متعاقب سه نوبت ایمن سازی با آنتی ژن های مربوط..... ۱۰۱
شکل ۳-۱۸. نتایج حاصل از بررسی تکثیر سلول های طحالی در مجاورت آنتی ژن (MTT)..... ۱۰۳
شکل ۳-۱۹. بررسی میزان لیز سلول های دارای آنتی ژن و CFSE درگروه های مختلف..... ۱۰۴
شکل ۳-۲۰. نمودارهای فلوسایتومتری مربوط به نتایج آزمون سایتوتوکسیسیتی..... ۱۰۴

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات انجام

۱-۱: بخش اول : بیماری سل

۱-۱-۱: تاریخچه

بیماری سل یا توبرکلوزیس[1] یکی از مهمترین بیماری هایی است که بشر ازدیرباز با آن مواجـه بـوده است. قدیمی ترین موارد این بیماری را در فسیل های استخوانی که متعلق بـه ۸۰۰۰ سـال قبـل از میلاد مسیح بوده است گزارش نموده اند [۱].

در قرن نهم میلادی ،ابوبکر محمدبن زکریای رازی به عنوان اولین پزشکی است که در رابطه با سل استخوان واندام ها بحث کرده است ، در کتاب الحاوی به طور کامل به تشریح بیماری سل پرداخته است.در قرن دهم میلادی، شیخ الرئیس ابوعلی سینا (۹۸۰-۱۰۳۷م) در کتاب قانون اطلاعات ارزشمند بالینی و آسیب شناسی در رابطه با بیماری سل ارائه نموده است. در قرن یازدهم میلادی سیداسماعیل جرجانی (۱۱۳۵م) درکتاب ذخیره خوارزمشاهی مطالب جالبی را در مورد این بیماری ذکر کرده است. درسال۱۸۷۰ تئوری میکروبی بودن بیماری سل توسط آنتوان ویلمن (۱۸۹۲-۱۸۲۷م) جراح دامپزشک فرانسوی که انتقال سل را از طریق تلقیح بیان کرد ، ارائه شد. سرانجام در ۲۴ مارس ۱۸۸۲ میلادی، پزشک آلمانی ، روبرت کخ[2] (۱۹۱۰-۱۸۴۳م)، عامل بیماری سل را کشف نمود[۲]. در سال ۱۹۸۲ و در مجتمع بوئنس آیرس ، بر اساس سیر نزولی منحی ابتلاء و مرگ و میر ناشی از سل ،سازمان جهانی بهداشت (WHO)[3] ، نظریه خوشبینانه کنترل بیماری سل تا سال ۲۰۰۰ را ارائه نمود [۳]. اما در طی سال های بعد, با صعود منحنی مرگ ومیر ناشی از سل

1-Tuberculosis
2- Robert Koch
3 -World Health Organisation