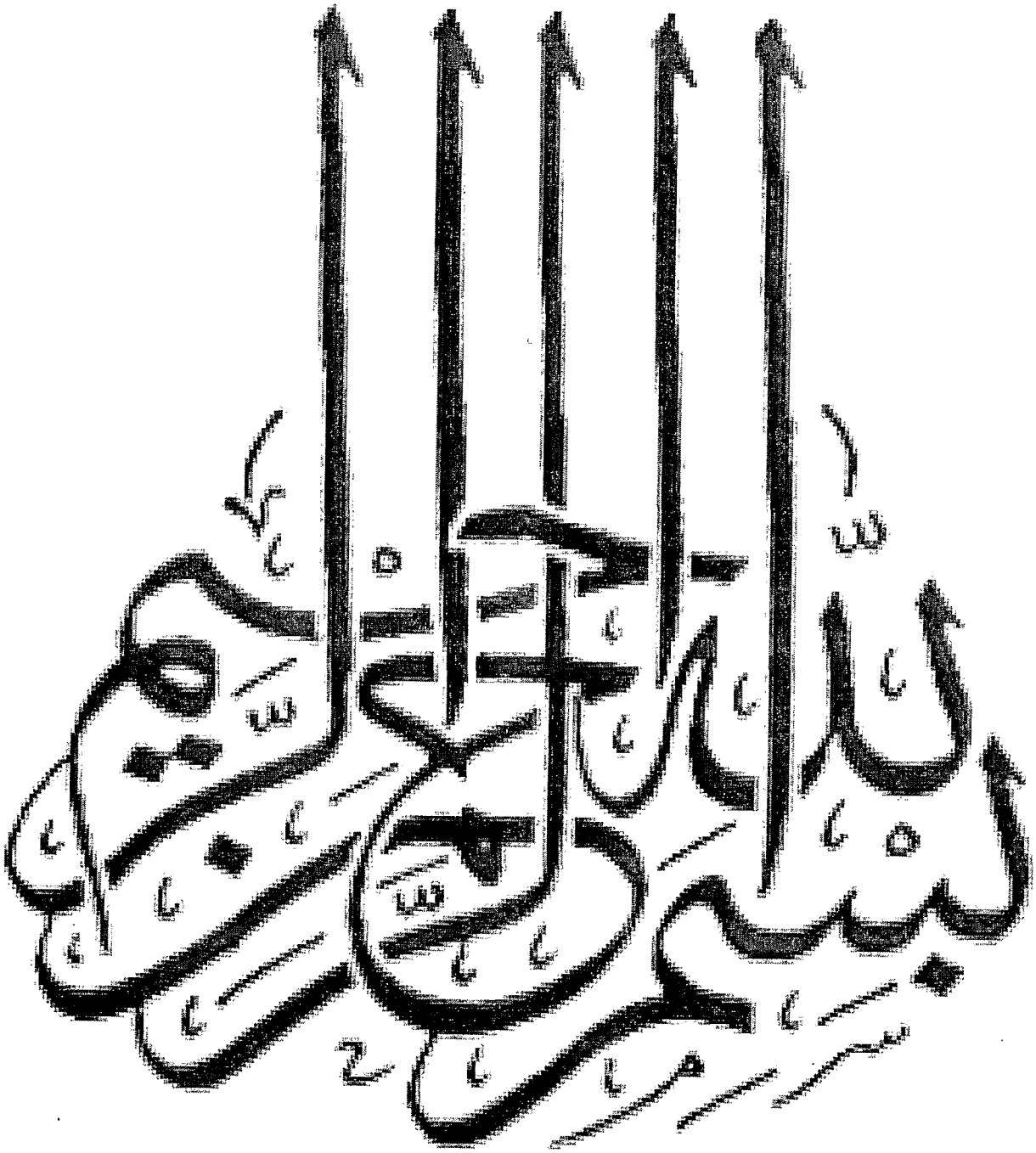


١١٤٢٥٣

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

رشته باکتری شناسی پزشکی

کلونینگ و بیان قطعه کد کننده پروتئین PorA نایسریا منتجایتیدیس سروگروه B در E.coli

نگارش:

مهران منتجبی نیت

استاد راهنما:

خانم دکتر شهین نجار پیرایه

استاد مشاور:

خانم دکتر حوریه سلیمان جاهی

مرکز اطلاعات و مدارک علمی
تهیه مدارک
۱۳۸۸/۴/ ۱

پائیز ۸۷

۱۱۴۶۵۳

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای مهران منتجبی نیت رشته: باکتری شناسی گرایش: تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر شهین نجار پیرایه (استاد راهنما)

دکتر حوریه سلیمانجاهی (استاد مشاور)

دکتر قربان بهزادیان نژاد (استاد ناظر)

دکتر محمد فیض آبادی (استاد ناظر)

دکتر اشرف محبتی مبارز (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آئین نامه پایان نامه (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 ـ پژوهشی دانشگاه است .بنابراین به منظورآگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود ،مراتب را قبلا به طور 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 پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده دررشته باکتری شناسی است که در سال ۱۳۸۱ دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی خانم دکتر آهنین نگاره پیرایه مشاوره خانم دکتر خورشید سلیماناقایی از آن دفاع شده است."

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ،تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قراردهد .

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

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت ،دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه ووصول کند ،به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، ازطریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ رااز محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش ،تامین نماید .

ماده ۶: اینجانب ایران منیژه دانشجوی رشته باکتری شناسی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی ایران منیژه

تاریخ و امضاء

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی 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 هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگی: ایران منتجب نیا
تاریخ و امضاء

با نام و یاد خدا

تقدیم به پدر بزرگوارم و با تشکر از مادرم، که مهربانانه مرا پرورش داده و همواره مورد لطف خویش قرار دادند و با سپاس از کمک های یگانه خواهرم و صبر و شکیبایی و یاریهای همسرم که در زندگی همیشه مرا همراهی نموده است.

برای این پایان نامه برخود لازم می دانم از اساتید بزرگوارم سرکار خانم دکتر شهین نجار پیرایه، خانم دکتر حوریه سلیمان جاهی، جناب آقای دکتر سیادت که اساتید راهنما و مشاور اینجانب بوده‌اند کمال تشکر را داشته باشم. هم چنین از خانم دکتر اشرف محبتی مبارز و قربان بهزادیان نژاد که صمیمانه در مقطع کارشنارسی ارشد از محضرشان سود برده ام و نیز کارشناسان گروه باکتری شناسی خانم‌ها صمیمی و رازقی سپاسگزاری می‌کنم.

از کلیه دوستان گروه باکتری شناسی ورودی ۱۳۸٤ آقایان عباس عبدالهی، نیما خرم آبادی، امیر عظیمیان و خانم راحله شایان که لحظات خوبی را با آنها در آزمایشگاه سپری کردم، تشکر می‌کنم.

هم چنین از مدیریت محترم شرکت تولیدی تحقیقاتی سیناژن خانم دکتر هاله حامدی فر و دکتر فریدون مهبودی که در طول تحصیل اینجانب همکاری هم جانبه با من داشتند کمال تشکر را دارم .

در پایان لازم می دانم از دوست بسیار خوبم دکتر جلیل فلاح مهرآبادی که در طول پایان نامه اینجانب کمک های شایانی به من کردند تشکر کنم.

چکیده:

نایسریا منجایتیدیس سرو گروه B عامل ایجاد کننده منتژیت اپیدمیک می‌باشد که آن را منتژیت مغزی – نخاعی می‌گویند. بعلاوه این باکتری عامل سببی منگوکوکسمی برق آسا و سپتی‌سمی است که با درصد بالای مرگ و میر مبتلایان همراه می‌باشد. بنابراین تهیه یک واکسن پیشگیری کننده بسیار ضروری به نظر می‌رسد. پروتئین PorA که نقش بسیار مهمی در بیماری زایی باکتری ایفا می‌کند، یک پروتئین کاتیونی داخل غشایی بوده که تشکیل منافذ تری مریک را در غشاء خارجی منگوکوک می‌دهد. این پروتئین واجد ۸ لوپ خارج سلولی می‌باشد که دو لوپ آن ایمونوژنیسیته بسیار زیادی داشته و باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی و القاء سنتز آنتی بادی می‌گردد. از عملکردهای دیگر این پروتئین می‌توان به القاء پاسخ‌های التهابی در موش، القاء تکثیر سلول‌های B و رهایی سایتوکاین‌ها از سلول‌های انسانی اشاره کرذد.

در این تحقیق طول کامل ژن از سویه CSBPI, G250 منگوکوک تهیه شده از انستیتو پاستور ایران به وسیله تکنیک PCR تکثیر شد. این قطعه یک پروتئین به وزن حدوداً ٤٥ کیلو دالتون را کد می‌کند. این ژن در وکتور بیانی پروکاریوتی pET-32a کلون شده و وکتور نوترکیب pET-32a-porA ساخته شد. این ژن پس از کلونینگ تعیین توالی شد و پس از اطمینان از صحت سکانس، وکتور نوترکیب به باکتری E.coli origami(DE3) ترنسفرم شد تا بیان پروتئین صورت پذیرد. بیان پروتئین نوترکیب بوسیله القاء با IPTG در غلظت‌ها و دماهای مختلف صورت گرفت و آنالیز بیان با SDS-PAGE انجام پذیرفت و سپس با آنتی بادی بر ضد PorA تهیه شده در خرگوش و در آزمون وسترن بلاتینگ صحت تولید پروتئین مورد نظر تأئید گردید.

کلمات کلیدی: نایسریا منجایتیدیس، پروتئین نوترکیب، بیان

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه..... ۱

۱-۲. نایسریا مننجایتیدیس..... ۲

۱-۲-۱. ساختمان آنتی ژنیک..... ۳

۱-۲-۱-۱. پیلی..... ۳

۱-۲-۱-۲. کپسول..... ۵

۱-۲-۱-۳. لیپوپلی ساکارید..... ۷

۱-۲-۱-٤. پورین ها..... ۸

۱-۲-۱-۵. سایر پروتئین های غشاء خارجی..... ۱۰

۱-۳. بیماری زایی عفونت های ایجاد شده توسط منگوکوک ها..... ۱۲

۱-٤. پاتوفیزیولوژی منژیت..... ۱۷

۱-۵. تظاهرات بالینی..... ۱۹

۱-۵-۱. عفونت های مجاری تنفسی فوقانی ۱۹

۱-۵-۲. منگوکوکسمی..... ۱۹

۱-۵-۳. منژیت..... ۲۰

۱-۵-٤. سایر تظاهرات و عوارض..... ۲۱

۱-٦. ایمونولوژی عفونت های منگوکوکی..... ۲۱

۱-٦-۱. ایمنی ذاتی..... ۲۱

۱-٦-۲. ایمنی اکتسابی..... ۲٤

۱-۷. تشخیص آزمایشگاهی..... ۲۵

۱-۸-۱. آزمایش های مستقیم..... ۲٦

۱-۸-۲. کشت..... ۲٦

۱-۸-۳ . روش های مولکولی وایمونولوژیکی..... ۲۷

۱-۹. تشخیص افتراقی..... ۲۸

۱-۱۰. مدل های حیوانی..... ۲۹
۱-۱۱. اپیدمیولوژی..... ۲۹
۱-۱۲ . شیمی درمانی و درمان..... ۳۳
۱-۱۲-۱. پیشگیری ضد میکروبی ۳۳
۱-۱۳. کنترل اپیدمیولوژی..... ۳٤
۱-۱٤. پیشگیری و ساخت واکسن ۳۵
۱-۱٤-۱. واکسن های کپسولی منگوکوک..... ۳۵
۱-۱٤-۲. واکسن های غیر کپسولی منگوکوک..... ۳۷
۱-۱٤-۲-۱. لیپوالیگوساکارید (LOS) ۳۷
۱-۱٤-۲-۲. واکسن هایی بر پایه پروتئین غشاء خارجی..... ۳۸
۱-۱٤-۳. واکسن های کونژوگه..... ٤۰

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱. کشت نایسریا منجایتیدیس..... ٤۳
۲-۲. استخراج DNA ژنومی از نایسریا منجایتیدیس..... ٤٤
۲-۲-۱.مواد و محلول ها..... ٤٤
۲-۲-۲. روش فنل-کلروفرم..... ٤۵
۲-۲-۳ بررسی کمی و کیفی DNA کروموزومی..... ٤٦
۲-۲-۲-۱. روش انجام الکتروفورز DNA ٤٦
۲-۳. طراحی پرایمرها..... ٤۷
۲-۳-۱. PCR قطعه ژنی porA..... ٤۸
۲-۳-۲. محلول های کاری..... ٤۸
۲-۳-۳. مطالعه ژن porA..... ٤۹
۲-۳-٤. توالی قطعه porA..... ۵۰
۲-۳-۵. روش انجام PCR..... ۵۱
۲-٤. وکتور pET-32..... ۵۱
۲-٤-۱. نقشه و مشخصات وکتور pET-32a..... ۵۱

۲-۵. استخراج پلاسمید pET-32 در مقیاس .Mini Prep ۵۳
۲-۵-۱. مواد و محلول های استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی..... ۵۳
۲-۵-۲. روش لیز قلیایی..... ۵٤
۲-٦. برش آنزیمی محصول PCR و خالص سازی آن..... ۵٦
۲-٦-۱. **مواد و محلول ها**..... ۵٦
۲-٦-۲. هضم آنزیمی محصول PCR..... ۵٦
۲-٦-۳. استخراج محصول هضم آنزیمی از روی ژل آگارز LMP..... ۵٦
۲-٦-٤. برش آنزیمی وکتور pET-32a..... ۵۷
۲-٦-۵. خالص سازی محصول برش آنزیمی..... ۵۷
۲-۷. لیگیشن(Ligation) محصول PCR و وکتور..... ۵۸
۲-۸. مستعد سازی (Competence) سلول های E.coli Top10F با روش کلرید کلسیم..... ۵۸
۲-۸-۱. مواد و محلول ها..... ۵۸
۲-۸-۲. روش کار..... ۵۸
۲-۹. ترانس فورماسیون محصول لیگیشن به سلول های مستعد Top10F..... ٦۰
۲-۹-۱. روش کار..... ٦۰
۲-۱۰. ارزیابی کلونی ها برای پیدا کردن کلون مورد نظر..... ٦۱
۲-۱۰-۱. روش کار..... ٦۲
۲-۱۱. تائید کلون مورد نظر تعیین توالی ژن..... ٦۲
۲-۱۲. مستعد سازی سلول های E.coli Origami(DE3) ٦۲
۲-۱۲-۱. مشخصات سویه بیانی..... ٦۲
۲-۱۲-۲. روش کار..... ٦٦
۲-۱۳. ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب به درون سلول های Origami..... ٦٦
۲-۱٤. کشت و القای سلولهای Origami حاوی وکتور نوترکیب..... ٦۷
۲-۱٤-۱. مواد و محلول های لازم..... ٦۷
۲-۱٤-۲. روش کار..... ٦۷

۲-۱۵. SDS-PAGE نمونه های باکتریایی پس از القاء به منظور بررسی بیان..... ٦٨
۲-۱۵-۱. مواد و وسایل لازم..... ٦٨
۲-۱۵-۲. روش ساخت محلول ها..... ٦٩
۲-۱۵-۳. تهیه ژل SDS-PAGE..... ۷۰
۲-۱۵-٤. آماده سازی نمونه ها و الکتروفورز آنها..... ۷۲
۲-۱٦. رنگ آمیزی ژل SDS-PAGE به روش کوماسی G250 کلوئیدی..... ۷۲
۲-۱٦-۱. مواد و محلول ها..... ۷۲
۲-۱٦-۲. روش رنگ آمیزی..... ۷۳
۲-۱۷. آنالیز بیان..... ۷۳
۲-۱۸. تولیدآنتی بادی پلی کلونال بر علیه OMV-PorA منینگوکوک در خرگوش..... ۷٤
۲-۱۸-۱. حیوانات و مواد مورد نیاز..... ۷٤
۲-۱۸-۲. روش کار..... ۷٤
۲-۱۹. حذف آنتی ژنی از آنتی بادی تهیه شده خرگوشی..... ۷۵
۲-۱۹-۱. مواد ومحلول های لازم..... ۷٦
۲-۱۹-۲. روش کار..... ۷٦
۲-۲۰. وسترن بلاتینگ..... ۷۷
۲-۲۰-۱. مواد و محلول های مورد نیاز..... ۷۷
۲-۲۰-۲. روش کار..... ۷۸

فصل سوم: نتایج

۳-۱. کشت سویه و استخراج DNA ژنومی..... ۸۰
۳-۲. تکثیر ژن porA با PCR..... ۸۱
۳-۳. تکثیر و تخلیص وکتور pET-32a..... ۸۲
۳-٤. هضم آنزیمی دوگانه محصول PCR و وکتور pET-32a..... ۸۳
۳-۵. تعیین توالی قطعه کلون شده porA..... ۸٤
۳-٦. انتقال وکتور نوترکیب به سویه بیانی..... ۸۷
۳-۷. بیان پروتئین نوترکیب PorA..... ۸۷

۳-۹. وسترن بلاتینگ.....۸۹

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها.....۹۰

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱. مقدمه:

التهاب مننژ در غشاهای مغزی و طناب پشتی به واسطه انواع میکروب ها به صورت اولیه یا ثانویه به وجود می آید . شکلی از مننژیت را که مشخصه آن انتشار اپیدمیک می باشد مننژیت مغزی – نخاعی اپیدمیک نامیده می شود. این مننژیت به وسیله باکتری اختصاصی به نام منگوکوکوس و یا نایسریا منجایتیدیس[1] ایجاد می شود .

این باکتری در ترشحات مننژی در سال ۱۸۸٤ شرح داده شد اما برای اولین بار در سال ۱۸۸۷ توسط ویشلبوم[2] در کشت خالص جداسازی و گزارش گردید[۱] . این دانشمند باکتری را از بیماران مبتلا به مننژیت مغزی – نخاعی حاد به دست آورد . تحقیقات بعدی نشان داد که مننژیت منگوکوکی نه تنها به صورت اپیدمیک مشاهده می گردد ، بلکه به صورت اندمیک نیز وجود دارد .

در کودکان مهم ترین باکتری های ایجاد کننده مننژیت[3] ، استرپتوکوکوس پنومونیه[4] ، اشریشیا کولی و استرپتوکوک آگالاکتیا[5] می باشند ولی با افزایش سن نایسریا منجایتیدیس عامل شایع می باشد[۱و۲و۳] . مننژیت ایجاد شده توسط این باکتری عموماً در فصول سرد سال اتفاق می افتد .

از زمان های بسیار دور مننژیت یکی از مهم ترین معضلات بهداشتی جامعه بشری بوده است . در دهه اخیر شایع ترین عامل سببی مننژیت باکتریایی ، نایسریا منجایتیدیس گزارش شده که با عوارض متعدد و میزان مرگ و میر بالا در مبتلایان همراه بوده است .

---

[1] Neisseria meningitidis
[2] Weichselbaum
[3] Meningitidis
[4] Streptococcus pneumonia
[5] Streptococcus agalactia

نایسریا منتجایتیدیس عامل سببی منتگوکوکسمی برق آسا و سپتی سمی نیز بوده که با در صد بالای مرگ و میر مبتلایان همراه است . منتگوکوک هم چنین پنومونی ، آرتریت سپتیک ، اورتریت و پریکاردیت نیز ایجاد می کند که در اغلب موارد با ضایعات خاصی همراه می باشد .

در سال های اخیر بررسی ها حاکی از وقوع ۱/۲ میلیون مورد منتژیت باکتریایی با ۱۷۵ هزار مرگ در سال بوده که افزایش چشمگیری را در مقایسه با گزارش سال ۱۹۹٦ (۳۰۰ هزار مورد ابتلا و ۳۰ هزار مرگ) نشان می دهد[٤و٥] .

۱-۲. نایسریا منتجایتیدیس

منتگوکوکوس نماینده گروه کوچکی از دیپلوکوکوس های گرم منفی می باشند که در جنس نایسریا قرار می گیرند . در این جنس باکتری دیگری به نام نایسریا گونوره آ[1] وجود دارد که عامل سببی سوزاک در انسان می باشد و با ۷۰ درصد تجانس DNA قرابت نزدیکی با منتگوکوکوس دارد و از روی صفات بیوشیمیایی و ویژگی های بیماریزایی از یکدیگر متمایز می شوند .

منتگوکوکوس دیپلوکوک گرم منفی به اشکال گرد یا بیضی بوده و در لام رنگ شده ترشحات منتژیت به حالت دو تایی یا چهار تایی در درون لوکوسیت ها و یا به صورت آزاد دیده می شوند . اندازه سلول ها در لام رنگ شده بسیار متفاوت می باشد . بر روی آگار خوندار کلونی منتگوکوکوس مرطوب ، بر آمده ، صاف و به رنگ خاکستری متمایل به آبی می باشد . آلفا یا بتا همولیز ایجاد نمی شود و از روی این خاصیت می توان آن ها را از استرپتوکوک های ویریدانس و پنو موکوک ها متمایز ساخت[٦و٧و٨] .

[1] Neisseria gonnorhoeae

این باکتری مالتوز و گلوکوز را در تست CTA[1] تخمیر می کند ولی توانایی تخمیر لاکتوز و ساکاروز را ندارد . نیاز مندی غذایی منگوکوک ها شبیه گونوکوک ها بوده ولی اغلب سویه ها در محیط های ژلوز ساده به آسانی رشد نمی کنند . این باکتری هوازی مطلق می باشد ولی در جداسازی اولیه رشد در جو دارای ۱۰-۳ در صد دی اکسید کربن بهتر صورت می گیرد[۶-۷-۸-۹] . این باکتری در گرمای ۴۵-۲۵ درجه با میانگین ۳۷ درجه رشد می کند. کشت مداوم آزمایشگاهی این باکتری به پیدایش رشد زیادی منجر می شود ولی نگهداری کشت آن ها دشوار است زیرا باکتری اتولیز حاصل می کند .

منگوکوس باکتری بسیار حساسی می باشد و در مدت کوتاهی در خشکی و به وسیله مواد ضد عفونی کننده به راحتی کشته می شود . در برابر گرما و سرما فوق العاده حساس بوده و حتی در سرمای یخچال نیز به راحتی از بین می رود . منگوکوک ها مشابه سایر اعضا خانواده نایسریاسه ، اکسید از مثبت می باشند .

این باکتری فعالیت بیوشیمیایی بسیار محدودی دارد و تخمیر قند مالتوز صفت متمایز کننده بیوشیمیایی آن از گونوکوکوس می باشد .

۱-۲-۱. ساختمان آنتی ژنیک

۱-۲-۱-۱. پیلی

پیلی ها زواید مو مانندی می باشند که از سطح سلول به درازای چندین میکرون بیرون می آیند و حاوی هزاران زیر واحد تکراری پپتیدی به نام پیلین[۲] می باشند . این ساختمان های رشته ای در تمامی باکتری

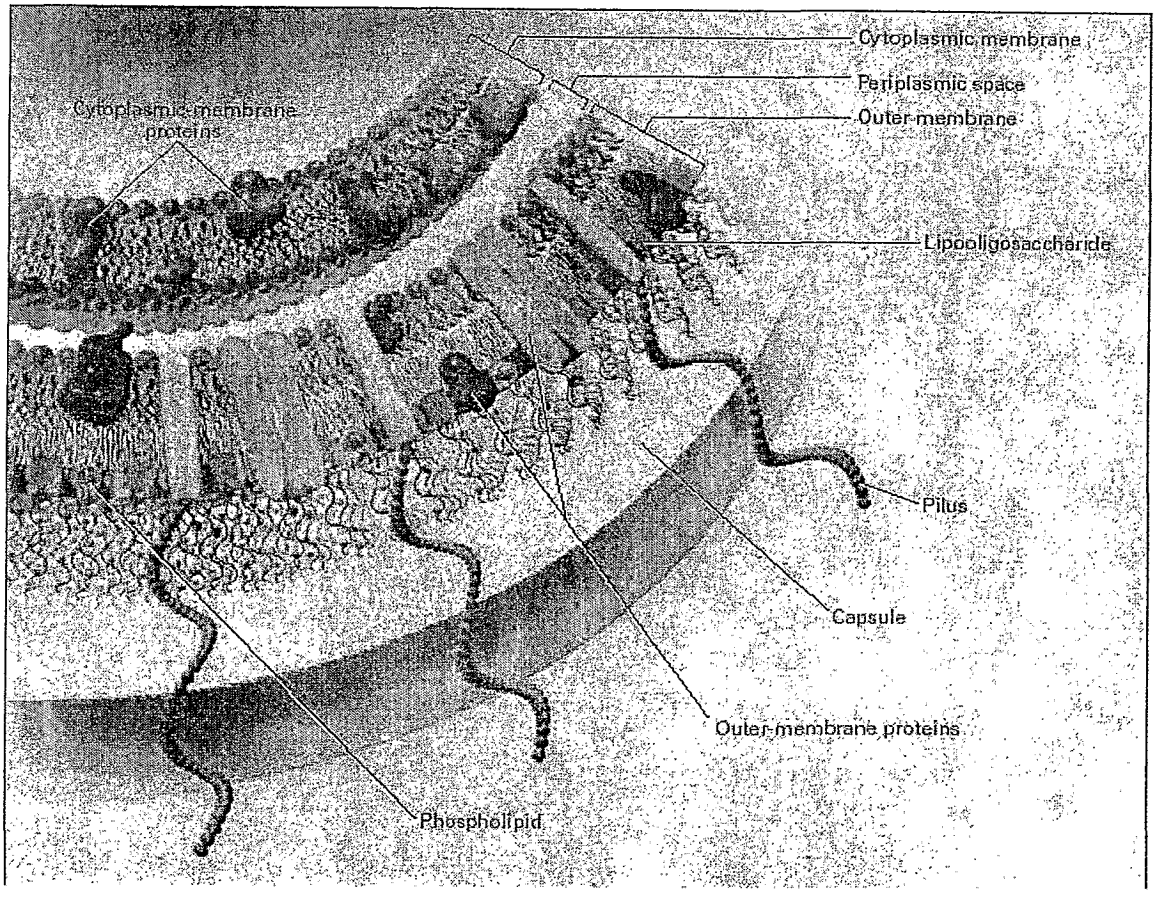
[1] Cystine Trypticase Agar
[2] Pilin

های خانواده نایسریا وجود دارند . انتهای آمینو[1] مولکول پیلین که واجد درصد بالایی از اسید آمینه های آب گریز است حفاظت شده می باشد . ترتیب اسید آمینه ای نزدیک به انتهای کربوکسیل[2] نیز بسیار متغیر می باشد[۱۰،۱۱و۱۲] . این ناحیه از مولکول در ایجاد پاسخ ایمنی نقش زیادی دارد .

این زوائد سطحی باکتری ها نقش های متعددی از جمله اتصال به سلول میزبان ، جلوگیری از فاگوسیتوز ، تغییرات آنتی ژنی[3] و حرکت توئیچینگ[4] را سبب می شوند .

پیلی به شدت تحت تاثیر تغییرات آنتی ژنیک قرار می گیرد که این تغییرات شامل تغییرات فازی[5] و آنتی ژنی متعدد در باکتری می شود . پیلی ها در این باکتری در واقع از خانواده ادهزین ها[6] و تیپ IV پیلی بوده که به وسیله سیستم ترشحی تیپ II ساخته و ترشح می شود . رسپتور پیلی در سلول های انسانی مولکول CD46 می باشد[۹، ۱۱، ۱۳و۱٤] .

[1] N-Terminal
[2] C-Terminal
[3] Antigenic shift
[4] Twitching motility
[5] Phase variation
[6] Adhesin



شکل۱-۱. نمای مقطع عرضی دیواره منتگوکوک

۱-۲-۱-۲. کپسول پلی ساکاریدی

در درون گونه ، گروه های سرولوژیک بر اساس واکنشگری پلی ساکاریدهای کپسول تشخیص داده می شود .در واقع تفاوت های آنتی ژنیک در کپسول اساس طبقه بندی سرولوژیکی گروه (سروگروه)[1] در منتگوکوکوس می باشد . امروزه ۱۳ گروه سرمی شناخته شده است که سویه های مهم از نظر ایجاد بیماری در انسان W135, Y, C, B, A می باشد که همگی انتشار جهانی دارند[٦، ۱۱، ۱۲و۱۵] .

[1] Serogroup

طبقه بندی آنها به واسطه خصوصیات ساختمانی و شیمیایی صورت می گیرد . برخی از کپسول ها به مانند آن چه در سرو گروه های C, B, A دیده می شود ، به صورت هموپلیمر[1] میباشد ولی در سرو گروه W135, Y به صورت واحد های تکراری دی ساکاریدی یافت می شود .

آنتی کور ضد پلی ساکارید کپسول W135, Y, C, A باکتریساید[2] بوده و بدین نحو علیه عفونت ناشی از گروه منتگوکوکی همگن حفاظت ایجاد می کند در حالی که پلی ساکارید کپسولی گروه B در انسان به طور ضعیف ایمنی زا می باشد و حفاظت علیه آن احتمالاً با آنتی ژن های سروتیپی ارتباط دارد .

سویه های بالینی منتگوکوک ها را می توان با آگلوتیناسیون[3] به کمک سرم های سرو گروه ها تقسیم بندی کرد . پلی ساکارید گروه A پلیمری از ان- استیل مانوز آمین فسفات و پلی ساکارید C پلیمری از ان- استیل- اُ – استیل نورامینیک اسید می باشد . در واقع وجه تمایز کپسول پلی ساکاریدی سرو گروه A با سایر سروگروه ها فقدان سیالیک اسید[4] در آن می باشد[۱۶، ۱۷،و۱۸] .

پلی ساکارید کپسول نایسریا به عنوان یک فاکتور ضد فاگوسیتوزی[5] بسیار قوی عمل می کند . کپسول سروگروه های W135, Y, C, A منتگوکوک خاصیت آنتی فاگوسیتوزی داشته در حالی که در سرو گروه B نقش حفاظت از لیز باکتری توسط سیستم کمپلمان را دارد .

در تمام گروه های سرولوژیکی ، به جز سرو گروه B ، کپسول پلی ساکاریدی در انسان ایمونوژن[6] بوده و نخستین انتخاب ساخت و تولید واکسن می باشد[۳، ۱۱، ۱۵و۱۹] .

---

[1] Homopolymer
[2] Bacteriocide
[3] Agglutination
[4] Sialic acid
[5] Anti-phagocytosis
[6] Immunogen

۱-۲-۱-۳. لیپوپلی ساکارید[1]

لیپوپلی ساکارید بیشترین محتویات گلیکولیپیدی غشاء خارجی باکتری های گرم منفی را تشکیل می دهد و شامل لیپید A ، یک هسته الیگو ساکاریدی و واحد های تکراری پلی ساکارید آنتی ژن O می باشد . اما این ساختار در منینگوکوک فاقد واحد های تکراری آنتی ژن O بوده و بنابراین مولکول کوچکتری می باشد[۳، ۱۱و۱۲] . این تفاوت در ساختمان و اندازه LPS باعث شده که آن را لیپو الیگوساکارید (LOS) بنامند .

این باکتری مقادیر زیادی از LOS را تولید می کند و در هنگام تقسیم باکتری تعداد زیادی از این مولکول ها به صورت خارج سلولی و در اندام هایی به نام وزیکول[2] در محیط رها می شوند .

LOS منینگوکوک ها هم چنین در ایجاد واکنش شوراتزمن[3] نیز نقش دارد . LOS دارای فعالیت های بیولوژیکی متعددی بوده و نقش مهمی را در بیماری زایی باکتری ایفا می کند . LOS هم چنین سبب حفاظت باکتری از پاسخ های ایمنی میزبان نیز می گردد . از دیدگاه ارزیابی ایمونولوژیکی LOS در منینگوکوک ها هتروژینیسیته بالا و در انسان ایمونوژنیسیته بسیار پایین داشته و پاسخ های غیر وابسته به سلول های T، را ایجاد می کند[۲۰، ۲۱و۲۲] .با توجه به خواص ذکر شده برای این مولکول ، دانشمندان در حال دستکاری متعدد این ساختار برای ایجاد یک ایمونوژن مفید می باشند .

[1] Lipopolysaccharide
[2] Vesicle
[3] Schwartzman reaction