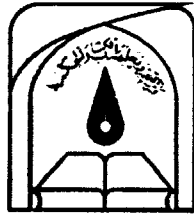


2.9

۳۵۳۵.

روزنامه‌های دکتران علمی ایران  
تیرماه ۱۳۸۰

۱۳۸۰ / ۳ / ۲۰



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده پزشکی

بررسی اثر یون های  $Mg^{++}$  و  $CU^{++}$  بر تولید و سمیت

توکسین A بوتولینوم و پایداری آن

پایان نامه دوره :

دکترای تخصصی (Ph.D) میکروب شناسی پزشکی

نگارش:

012188

رمضانعلی عطائی کچوئی

استاد راهنما

جناب آقای دکتر قربان بهزادیان نژاد

اساتید مشاور

جناب آقای دکتر مرتضی ستاری

جناب آقای دکتر غلامحسین ریاضی

۳۵۳۵۰

فروردین ۱۳۸۰

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

اعضای هیئت علمی داوران نسخه نهائی رساله خانم / آقای رمضانعلی عطایی کچویی دانشجوی رشته : میکروبیولوژی  
تحت عنوان عنوان رساله: بررسی اثر یون های  $Mg^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  بر تولید و سمیت توکسین A بوتولینوم و پایداری آن

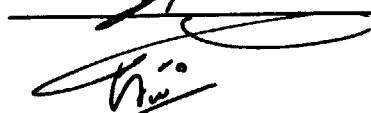
را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

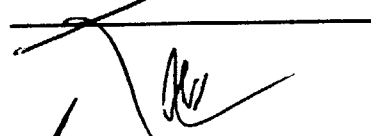
آقای دکتر قربان بهزادپان نژاد - استاد راهنما



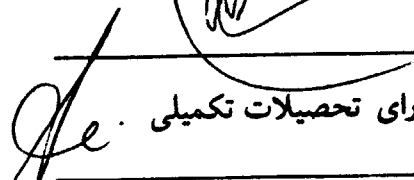
آقای دکتر مرتضی ستاری - استاد مشاور



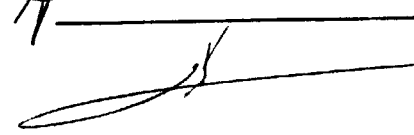
آقای دکتر غلامحسین ریاضی - استاد مشاور



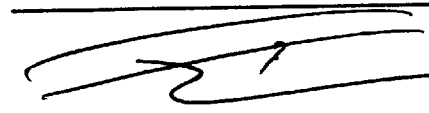
سرکارخانم دکتر سلمه سلطان درانی - نماینده شورای تحصیلات تکمیلی



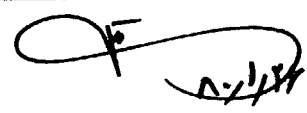
آقای دکتر کیومرث قاضی سعیدی - استادنظر



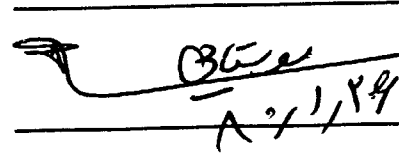
آقای دکتر علی اکبر محمدی - استادنظر



آقای دکتر محمد تقی خانی - استاد ناظر



آقای دکتر محمد حسن روستایی - استاد ناظر





بسمه تعالی

## آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبنای بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانشمویختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «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 در رشته میکروبیولوژی است که در سال ۱۳۸۰ در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر قربان بهزادبان نژاد مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر مرتضی ستاری و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر غلامحسین ریاضی از آن دفاع شده است.»

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر بوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند 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 به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجوی تمهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور اسیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب **رمضانعلی عطائی** دانشجوی رشته **میکروبیولوژی** مقطع دکتری (Ph.D) تمهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: رمضانعلی عطائی

تاریخ و امضا: فروردین ۱۳۸۰

## با تشکر و سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر قربان بهزادیان نژاد ، استاد محترم راهنما  
جناب آقای دکتر مرتضی ستاری ، استاد محترم مشاور  
جناب آقای دکتر غلامحسین ریاضی ، استاد محترم مشاور  
جناب آقای پروفسور کیومرث قاضی سعیدی ، استاد محترم ناظر  
جناب آقای دکتر محمد حسن روستایی ، استاد محترم ناظر  
جناب آقای دکتر محمد تقی خانی ، استاد محترم ناظر  
جناب آقای دکتر علی اکبر محمدی ، استاد محترم ناظر  
سر کار خانم دکتر، سلمه درانی ، نماینده محترم تحصیلات تکمیلی  
جناب آقای دکتر محمد جواد رسایی ، رئیس محترم دانشکده پزشکی  
جناب آقای دکتر حسین نادری منش ، رئیس محترم دانشکده علوم  
سر کار خانم دکتر فاطمه صغرا کرمی ، مدیر محترم گروه بیوشیمی  
جناب آقای دکتر انوشیروان کاظم نژاد ، مدیر محترم گروه آمار  
جناب آقای دکتر علی خوانین ، استاد یار گروه بهداشت حرفه ای  
جناب آقای دکتر غلامرضا بابایی ، استاد یار گروه آمار  
جناب آقای اردلان سلمانیان ، کارشناس آزمایشگاه بهداشت حرفه ای  
سرکار خانم صمیمی ، مربی گروه میکروبیولوژی  
سرکار خانم رازقی ، کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی  
سرکار خانم طوبی منصوری ، کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی  
سر کار خانم افشار ، کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی

تقدیم :

به روح بلند رادمرد تاریخ ایران ، امام خمینی (ره)  
که عزت و سربلندی ایران اسلامی و اعتماد به نفس جوانان آن  
مدیون همت و تلاش اوست.

به روح پدر بزرگوار و مادر مهربانم سر کار خانم سکینه  
آقاجانی که حاصل سال ها تلاش و زحمت آنها به زندگیم معنا  
بخشید.

به همسر فداکار و مهربانم، سر کار خانم شهلا طاهریان که  
موفقیت خود را مدیون او می دانم.

به فرزندان عزیزم : محمد علی ، محمد حسین ، محمد حسن ،  
محمد رضا و زینب که معصومانه سختی ها را تحمل کردند.

## خلاصه

یکی از عوامل بیماری مهلک بوتولیسم کنتستریدیوم بوتولینوم تیپ A است که در سال های اخیر بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. اخیراً از توکسین این باکتری به عنوان داروی مؤثر برای درمان بسیاری از بیماری ها استفاده شده است. لذا، تولید توکسین و پایداری آن اهمیت زیادی دارد. به علاوه، دست یابی به روش های کنترل رشد باکتری، تولید توکسین و یا غیر فعال کردن آن، نگرانی از آلودگی مواد غذایی و بروز بوتولیسم را از بین می برد.

در این تحقیق، اثر غلظت های مختلف سولفات مس و منیزیم بر رویش اسپور، رشد باکتری و تولید توکسین از کلتستریدیوم بوتولینوم تیپ A بررسی شد. رویش اسپور با تیمار حرارتی اندازه گیری شد و رشد آن با شمارش پرگنه ها تعیین گردید. ارزیابی تولید توکسین با ایجاد اثرات فلج کنندگی از طریق تزریق داخل صفاقی در موش سوری و مهار آن با آنتی توکسین اختصاصی انجام شد. با کمک روش های ژل دیفیوژن، الکتروفورز و نیز آنالیز با HPLC وجود توکسین تأیید شد و نتایج با توکسین استاندارد مقایسه گردید. سپس توکسین تولید شده استخراج گردید و اثر پایدار ساز های فیزیکی و شیمیایی بر بقای فعالیت توکسین مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد، ۶ میلی گرم در میلی لیتر سولفات منیزیم باعث افزایش سرعت رویش اسپور کلتستریدیوم بوتولینوم تیپ A به میزان دو برابر می گردد. و غلظت ۸ میلی گرم در میلی لیتر سولفات منیزیم باعث افزایش رشد به میزان چهار برابر، افزایش پروتئین به ۲ برابر و نیز افزایش توکسیسیته آن به میزان ۱۰۰ برابر می شود. با آن که غلظت ۵ - ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر سولفات مس افزایش دهنده سرعت رویش اسپور و رشد باکتری شد، اما بر تولید پروتئین تأثیری نداشت. به علاوه در محیط های حاوی سولفات مس فعالیت نورو توکسینی مشاهده نشد. اثر پایدار ساز های فیزیکی و شیمیایی بر بقای فعالیت توکسین نشان داد، غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر سرم آلبومین انسانی در شرایط  $pH=7 \pm 0.1$  و  $4^{\circ}C$  باعث حفظ فعالیت توکسین به مدت ۷۰ روز می گردد.

کل واژه ها: کلتستریدیوم بوتولینوم، توکسین تیپ A، نورو توکسیسیته، سولفات منیزیم و سولفات مس

# فهرست مطالب

عنوان

صفحه

## مقدمه

۱ : مقدمه ..... ۱

## بررسی منابع

۲ : بررسی منابع ..... ۶

۲-۱ : تاریخچه کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A و نورو توکسین آن ..... ۶

۲-۲ : مطالعات مربوط به تولید و خالص سازی توکسین ..... ۶

۲-۲-۱ : مکا نیسم تولیدسم در کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۶

۲-۲-۲ : خالص سازی توکسین با استفاده از خاصیت جذبی هیدروکسید آلومینیوم ..... ۶

۲-۲-۳ : تحقیق برای دست یابی به روش های مناسب خالص سازی ..... ۷

۲-۲-۴ : خالص سازی توکسین تیپ A با استفاده از کلروفورم ..... ۸

۲-۲-۵ : اثر مواد تشکیل دهنده محیط کشت بر تولید و خالص سازی توکسین ..... ۹

۲-۲-۶ : انتخاب محیط کشت مناسب برای تولید و خالص سازی توکسین ..... ۱۰

۲-۲-۷ : خالص سازی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم با کروماتوگرافی تعویض یونی ..... ۱۱

۲-۲-۸ : خالص سازی توکسین تیپ A بوتولینوم و تعیین سمیت آن ..... ۱۲

۲-۲-۹ : خالص سازی توکسین تیپ A بوتولینوم و تعیین ترکیب اسیدهای آمینه آن ..... ۱۴

۲-۲-۱۰ : خالص سازی توکسین تیپ A بوتولینوم با کروماتوگرافی سریع فاز مایع ..... ۱۶

۲-۲-۱۱ : خالص سازی توکسین تیپ A بوتولینوم با حفظ ویژگی های آن ..... ۱۶

۲-۲-۱۲ : خالص سازی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم و بررسی

خصوصیت هم‌آگلوتیناسیون آن ..... ۱۷

۲-۲-۱۳ : خالص سازی توکسین بوتولینوم با حفظ ساختار توکسین ..... ۱۸

۲-۲-۱۴ : خالص سازی توکسین تیپ A بوتولینوم به منظور استفاده در درمان ..... ۱۹

۲-۲-۱۵ : خالص سازی دومین چسبنده نو ترکیب توکسین تیپ A بوتولینوم ..... ۲۰

۲-۲-۱۶ : خالص سازی توکسین تیپ A بوتولینوم با وزن ۹۰۰ kDa ..... ۲۱

۲-۲-۱۷ : خالص سازی زنجیره سنگین توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۲۱

۲-۲-۱۸ : خالص سازی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم در ایران ..... ۲۲

۲-۳ : مطالعات مربوط به بررسی اثر مواد مختلف بر رشد و تولید توکسین از

کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ..... ۲۳

۲-۳-۱ : مکانسیم تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۲۳



- ۲-۳-۲ : جایگزینی پتاسیم با سایر یون های فلزی در محیط های کشت مشخص..... ۲۳
- ۲-۳-۳ : اثر گلوکز بر آنزیم های ستر کننده توکسین کلستریدیوم بوتولینوم..... ۲۴
- ۲-۳-۴ : اثر کربوهیدرات ها بر هاگ زایی باکتری ها..... ۲۴
- ۲-۳-۵ : فیزیولوژی تشکیل اسپور کلستریدیوم بوتولینوم..... ۲۵
- ۲-۳-۶ : بررسی نیاز های غذایی برخی باکتری های هاگ زای بی هوازی..... ۲۵
- ۲-۳-۷ : تولید اسپور از باکتر های بی هوازی تعفن زا..... ۲۶
- ۲-۳-۸ : اثر عصاره محیط کشت بر هاگ زایی سویه های کلستریدیوم..... ۲۶
- ۲-۳-۹ : فیزیولوژی تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۲۷
- ۲-۳-۱۰ : شرایط مؤثر بر رویش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ ۶۲A..... ۳۱
- ۲-۳-۱۱ : اثر سوربات پتاسیم بر استاقیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم پرفرنجنس و کلستریدیوم بوتولینوم در سوسیس..... ۳۲
- ۲-۳-۱۲ : اثر اسکوریات سدیم و نیتريت سدیم بر تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم..... ۳۳
- ۲-۳-۱۳ : افزودن ترکیبات آهن به محیط و تولید مهارکننده های کلستریدیوم ها..... ۳۴
- ۲-۳-۱۴ : تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم در رب گوجه فرنگی کپک زده..... ۳۵
- ۲-۳-۱۵ : اثر حرارت بر بقای اسپور کلستریدیوم بوتولینوم در محیط اسیدی..... ۳۶
- ۲-۳-۱۶ : تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم در شرایط مختلف تخمیری..... ۳۶
- ۲-۳-۱۷ : اثر نیتريت سدیم و اسید سوزیک بر کلستریدیوم بوتولینوم..... ۳۸
- ۲-۳-۱۸ : بررسی تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم در محیط کشت ودر پنیر..... ۳۸
- ۲-۳-۱۹ : اثر فعالیت آبی بر بازگشت فعالیت و پایداری آنزیم..... ۳۹
- ۲-۳-۲۰ : نقش لاکتات در رویش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیمار شده با هیپوکلریت سدیم..... ۳۹
- ۲-۳-۲۱ : رشد و تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم در شرایط اسیدی..... ۳۹
- ۲-۳-۲۲ : اثر پرتوتابی بر رشد و تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A و B..... ۴۰
- ۲-۳-۲۳ : اثر pH، کلراید سدیم، حرارت و اتمسفر بر رشد سالمونلا تیفی موریوم..... ۴۱
- ۲-۳-۲۴ : اثر pH کمتر از ۴/۶ بر رویش اسپور، رشد و تولید توکسین..... ۴۱
- ۲-۳-۲۵ : اثر pH و حرارت کمتر از ایده آل بر رشد و تولید توکسین از اسپور کلستریدیوم بوتولینوم..... ۴۱
- ۲-۳-۲۶ : عوامل مؤثر بر رویش اسپور، رشد و تولید توکسین از اسپور کلستریدیوم بوتولینوم در محیط اسیدی..... ۴۲
- ۲-۳-۲۷ : اثر ترکیب pH و فعالیت آبی بر مهار تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم در سیب زمینی پخته و بسته بندی شده..... ۴۳
- ۲-۳-۲۸ : غیر فعال شدن توکسین بوتولسم و کراز با کلاتور ها..... ۴۳
- ۲-۳-۲۹ : نقش آرژنین بر رشد کلستریدیوم بوتولینوم..... ۴۵
- ۲-۳-۳۰ : اثر TPEN بر فعالیت توکسین تیپ A و B کلستریدیوم بوتولینوم..... ۴۶

- ۳۱- ۲- ۳: بررسی ۳ روش برای تعیین اثر عوامل محیطی بر زمان ظهور توکسین از  
 ۴۶ ..... کلستریدیوم بوتولینوم.....
- ۳۲- ۲- ۳: استفاده از نرم افزار های کاربردی برای پیشگویی آلودگی میکروبی و آنالیز  
 ۴۷ ..... معیار های کنترل آن در مستوره غذایی .....
- ۳۳- ۲- ۳: عوامل بیوفیزیکی مؤثر بر پایداری توکسین های ۱۵۰ KDa و ۹۰۰ KDa بوتولینوم  
 ۴۸ ..... و نیز ترکیب غیر سمی آن.....
- ۳۴- ۲- ۳: مقایسه ترکیب اسید های چرب ، رویش اسپور و مقاومت حرارتی سویه وحشی  
 ۴۹ ..... و مقاوم به نایسین کلستریدیوم بوتولینوم.....
- ۳- ۲- ۳: ساختمان و مکانیسم عمل نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم.....  
 ۴۹ ..... ۱- ۲- ۳: ساختمان توکسین بوتولینوم.....
- ۲- ۲- ۳: مکانیسم عمل نوروتوکسین های کلستریدیوم بوتولینوم.....  
 ۵۰.....
- ۳- ۲- ۳: فعالیت پیش سیناپسی نوروتوکسین های کلستریدیوم بوتولینوم.....  
 ۵۳.....
- ۴- ۲- ۳: فعالیت اندوپیتیدازی وابسته به روی نوروتوکسین های کلستریدیومی.....  
 ۵۴.....
- ۵- ۲- ۳: SNAP - 25 ، VAMP و Syntaxin .....  
 ۵۵.....
- ۶- ۲- ۳: نوروتوکسین های تیپ A و E بوتولینوم SNAP - 25 را می شکنند.....  
 ۵۶.....
- ۴- ۲: نوروتوکسیسیتی سم کلستریدیوم بوتولینوم.....  
 ۵۸.....
- ۱- ۲- ۴: روش تعیین مقدار مؤثر سم کلستریدیوم بوتولینوم.....  
 ۵۸.....
- ۲- ۲- ۴: روش تخمین نقطه پایانی ۵۰ درصد .....  
 ۵۹.....
- ۳- ۲- ۴: محاسبه آماری در روش سریع تعیین عیار توکسین کلستریدیوم بوتولینوم.....  
 ۶۰.....
- ۴- ۲- ۴: تعیین ارتباط زمان مرگ با اندازه مولکولی توکسین بوتولینوم.....  
 ۶۱.....
- ۵- ۲- ۴: اثر غذا های خورده شده بر سمیت نوروتوکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۱.....
- ۶- ۲- ۴: رابطه قدرت سمی و اندازه مولکولی نوروتوکسین های کلستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۲.....
- ۷- ۲- ۴: سمیت دهانی نوروتوکسین های تیپ A و B حاصل از سویه های مختلف  
 کلستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۳.....
- ۵- ۲: پایداری توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۴.....
- ۱- ۲- ۵: کریستالیزاسیون توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۴.....
- ۲- ۲- ۵: رابطه بین سمیت از ره گوارش و پایداری توکسین تیپ A و B  
 کلستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۶.....
- ۳- ۲- ۵: بهبود روش کریستالیزاسیون توکسین تیپ A کستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۷.....
- ۴- ۲- ۵: کریستالیزاسیون توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم .....  
 ۶۸.....
- ویررسی اولیه آن با اشعه X .....

- ۵-۵-۲: اثر لیوفلیزاسیون بر پایداری توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۶۹
- ۵-۵-۶: عوامل مؤثر بر قدرت توکسین تیپ A بوتولینوم و قابلیت کاربرد درمانی آن ..... ۷۰
- ۵-۵-۷: ساختار کریستالی و فعالیت سمی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۷۱

## مواد و روش ها

- ۳- مواد و روش ها ..... ۷۳
- ۳-۱: سویه باکتری و آنتی توکسین اختصاصی ..... ۷۳
- ۳-۲: انتخاب حیوان آزمایشگاهی ..... ۷۳
- ۳-۳: کشت باکتریولوژیک ..... ۷۳
- ۳-۴: انتخاب محیط کشت ..... ۷۳
- ۳-۵: تهیه ذخیره اسپور ..... ۷۵
- ۳-۶: اندازه گیری غلظت یون های مس، منیزیم و روی در محیط کشت ..... ۷۶
- ۳-۷: انتخاب آب مناسب ..... ۷۶
- ۳-۸: کشت، تعیین روند رشد و تولید توکسین ..... ۷۷
- ۸-۱-۳: اندازه گیری رشد با شمارش تعداد پرگنه ها ..... ۷۷
- ۸-۲-۳: تعیین روند رشد با اندازه گیری جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر ..... ۷۷
- ۸-۳-۳: اندازه گیری مقدار پروتئین کل ..... ۷۸
- ۸-۴-۳: نورو توکسیسیتی ..... ۷۹
- ۳-۹: استخراج توکسین ..... ۷۹
- ۳-۱۰: ژل دیفیوژن ..... ۸۰
- ۳-۱۱: الکتروفورز ..... ۸۰
- ۳-۱۲: بررسی اثرات نورو توکسیسیته و تعیین واحد فعالیت سم ..... ۸۱
- ۳-۱۳: اثر غلظت های مختلف محیط کشت تربیتیکیز سوی براث بر رشد، تولید پروتئین و توکسیسیتی ..... ۸۱
- ۳-۱۳-۱: تعیین وزن خشک ..... ۸۲
- ۳-۱۳-۲: اندازه گیری مقدار پروتئین کل ..... ۸۲
- ۳-۱۳-۳: اندازه گیری توکسیسیتی ..... ۸۲
- ۳-۱۳-۴: تعیین نسبت جذب و ضریب جذب مولی ..... ۸۲
- ۳-۱۳-۵: کریستالیزاسیون توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ..... ۸۳
- ۳-۱۴: مقایسه توکسین استخراج شده با توکسین استاندارد ..... ۸۳
- ۳-۱۵: اثر غلظت های سولفات منیزیم بر رویش (تندش) اسپور، رشد و تولید توکسین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ..... ۸۵
- ۳-۱۵-۱: تهیه محلول ذخیره سولفات منیزیم ..... ۸۵

- ۲ - ۱۵ - ۳: اثر سولفات منیزیم بر تندش (رویش) اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ..... ۸۵
- ۳ - ۱۵ - ۳: تلقیح، گرمخانه گذاری و تعیین روند تندش اسپور ..... ۸۵
- ۴ - ۱۵ - ۳: اثر سولفات منیزیم بر رشد و تولید توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۸۶
- ۵ - ۱۵ - ۳: تلقیح، گرمخانه گذاری و تعیین روند رشد و تولید توکسین ..... ۸۷
- ۶ - ۱۵ - ۳: اندازه گیری رشد، پروتئین کل و توکسیسیتی ..... ۸۷
- ۱۶ - ۲: بررسی اثر غلظت های سولفات مس بر رویش اسپور، رشد و تولید پروتئین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ..... ۸۸
- ۱ - ۱۶ - ۳: تهیه محلول ذخیره سولفات مس ..... ۸۸
- ۲ - ۱۶ - ۳: بررسی اثر سولفات مس بر رویش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ..... ۸۹
- ۳ - ۱۶ - ۳: تلقیح، گرمخانه گذاری و تعیین روند تندش اسپور ..... ۹۰
- ۴ - ۱۶ - ۳: بررسی اثر سولفات مس بر رشد و تولید پروتئین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A ..... ۹۱
- ۵ - ۱۶ - ۳: تلقیح، گرمخانه گذاری و تعیین روند رشد و تولید توکسین ..... ۹۱
- ۶ - ۱۶ - ۳: اندازه گیری رشد، پروتئین کل و توکسیسیتی ..... ۹۱
- ۱۷ - ۳: بررسی اثر ترکیب غلظت های سولفات مس و منیزیم بر رشد، تولید پروتئین و توکسیسیتی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A در زمان های مختلف گرمخانه گذاری ..... ۹۲
- ۱۸ - ۳: انتخاب بهترین غلظت به کار برده شده از سولفات مس سولفات منیزیم و ترکیب آنها ..... ۹۲
- ۱ - ۱۸ - ۳: استخراج توکسین ..... ۹۳
- ۱۹ - ۳: بررسی اثر عوامل فیزیکی شیمیایی بر پایداری فعالیت توکسین تیپ A
- کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۹۴
- ۱ - ۱۹ - ۳: عوامل فیزیکی ..... ۹۴
- ۲ - ۱۹ - ۳: عوامل شیمیایی ..... ۹۴
- ۳ - ۱۹ - ۳: بررسی اثر پایدار سازها بر بقای فعالیت بیولوژیک توکسین تیپ A
- کلستریدیوم بوتولینوم ..... ۹۴

## نتایج

- ۴: نتایج ..... ۹۵
- ۱ - ۴ - ۱: رشد باکتری ..... ۹۵
- ۲ - ۴ - ۱: انتخاب محیط کشت مناسب برای رشد و تولید توکسین ..... ۹۵
- ۳ - ۴ - ۱: انتخاب آب مناسب برای ساخت محیط کشت جهت ایجاد شرایط ایده آل رشد و تولید توکسین ..... ۹۶
- ۴ - ۴ - ۱: نتایج تعیین روند رشد و تولید توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A در محیط تریپتیکیز ..... ۱۰۱
- ۵ - ۴ - ۱: تهیه ذخیره اسپور ..... ۱۰۳
- ۶ - ۴ - ۱: نتایج اثر غلظت های محیط کشت بر رشد، غلظت پروتئین کل، نسبت جذب و توکسیسیتی ..... ۱۰۴

- ۷-۴ - تشخیص نورو توکسین..... ۱۰۵
- ۷-۴-۱ - اثرات نورو توکسینی در موش ۱۸ - ۲۰ گرمی و مهار آن با پاتن اختصاصی..... ۱۰۵
- ۷-۴-۲ - واکنش رسوبی توکسین و آنتی توکسین در ژل آگاروز..... ۱۰۶
- ۷-۴-۳ - SDS - PAGE و مشاهده باندها ۱۵۰ کیلودالتونی در ژل ۷/۵ درصد..... ۱۰۶
- ۷-۴-۴ - استفاده از HPLC برای تأیید تولید توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم..... ۱۰۸
- ۷-۴-۵ - کریسالیزاسیون محلول سمی استخراج شده..... ۱۰۹
- ۷-۴-۸ - نتایج بررسی اثر غلظت های سولفات منیزیم بر کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۱۰
- ۷-۴-۸-۱ - نتایج اثر غلظت های سولفات منیزیم بر رویش (تندش) اسپور..... ۱۱۰
- ۷-۴-۸-۲ - نتایج اثر غلظت های سولفات منیزیم بر رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۱۱
- ۷-۴-۸-۳ - نتایج اثر غلظت های سولفات منیزیم بر تولید پروتئین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۱۲
- ۷-۴-۸-۴ - مقایسه اثر غلظت های سولفات منیزیم بر رشد، تولید پروتئین و نورو توکسیسیتی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۱۳
- ۷-۴-۹ - نتایج اثر سولفات مس بر کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۱۷
- ۷-۴-۹-۱ - اثر غلظت های سولفات مس بر رویش اسپور کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۱۷
- ۷-۴-۹-۲ - اثر غلظت های سولفات مس بر رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۱۸
- ۷-۴-۹-۳ - اثر غلظت های سولفات مس بر تولید پروتئین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۲۰
- ۷-۴-۱۰ - اثر ترکیب غلظت های سولفات مس و منیزیم بر کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۲۱
- ۷-۴-۱۰-۱ - اثر ترکیب غلظت های سولفات مس و منیزیم بر رشد کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۲۱
- ۷-۴-۱۰-۲ - اثر ترکیب غلظت های سولفات مس و منیزیم بر تولید پروتئین از کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A..... ۱۲۲
- ۷-۴-۱۰-۳ - اثر غلظت های سولفات مس و منیزیم بر فعالیت سمی (MLD100) عصاره کشت کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A در دوره های مختلف گرمخانه گذاری..... ۱۲۳
- ۷-۴-۱۱ - اثر غلظت های انتخابی سولفات مس و منیزیم و نیز ترکیب آنها بر رشد، تولید پروتئین و فعالیت سمی (MLD100) کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A پس از ۹۶ ساعت گرمخانه گذاری..... ۱۲۵
- ۷-۴-۱۲ - اندازه گیری غلظت یون های مس، منیزیم و روی در محلول پروتئینی استخراج شده از محیط های چهار گانه قبل از دیالیز و بعد از دیالیز شدن..... ۱۲۸
- ۷-۴-۱۳ - اثر عوامل فیزیکی و شیمیایی پایدار ساز بر بقای فعالیت بیولوژیک توکسی تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم..... ۱۳۲
- ۷-۴-۱۳-۱ - اثر پایدار سازها بر بقای فعالیت بیولوژیک توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم استخراج شده در این تحقیق..... ۱۳۲

## بحث و پیشنهادات

۵ : بحث ..... ۱۳۷

۵ - ۱ : پیشنهادات ..... ۱۵۴a

## منابع مورد استفاده

۷ : منابع مورد استفاده ..... ۱۵۵

# فهرست جداول

صفحه

عنوان

- جدول ۱-۲: نتایج خالص سازی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم توسط  
بیب هوتی. آر. داسگوپتا و همکاران..... ۱۳
- جدول ۲-۲: فعالیت توکسین تیپ A بوتولینوم که به مدت ۳۰ دقیقه با کلاتورها  
تیمار شده است..... ۴۵
- جدول ۲-۳: جایگاه هدف اختصاصی نوروتوکسین ها و نیز پیوندی که شکسته می شود..... ۵۵
- جدول ۲-۴: تعیین عیار سرم ایمنی بخش نشان داده شده توسط رید و مانچ..... ۵۹
- جدول ۲-۵: مقایسه سمیت سویه های مختلف کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A و B..... ۶۴
- جدول ۱-۳: روش خلاصه شده براد فورد برای اندازه گیری پروتئین..... ۷۸
- جدول ۲-۳: روش تهیه محلول های لازم برای ساخت ژل پلی اکریلامید..... ۸۱
- جدول ۱-۴: نتایج اندازه گیری قدرت هدایت جریان الکتریکی (WC) و غلظت یون روی ( $Zn^{++}$ )  
در سه آب و نیز محیط ساخته شده با هریک از آن هادر pH های مختلف..... ۹۷
- جدول ۲-۴: تغییرات غلظت یون روی در محیط تولید توکسین ساخته شده با آب دی یونیزه  
و آب دوبار تقطیر، با pH های مختلف و نیز اثر ظروف مختلف بر غلظت این یون..... ۹۷
- جدول ۳-۴: نتایج اثر رقت های مختلف محیط کشت بر رشد، تولید پروتئین، توکسیسیتی و نیز  
تغییرات جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۷۸ نانومتر در کشت ۹۶ ساعته..... ۱۰۵
- جدول ۴-۴: اثر غلظت های سولفات منیزیم بر رشد، تولید پروتئین و فعالیت توکسین  
تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم در کشت ۹۶ ساعته..... ۱۱۵
- جدول ۴-۵: نتایج حاصل از مقایسه محیط های چهار گانه پس از ۹۶ ساعت گرمخانه گذاری..... ۱۲۵
- جدول ۴-۶: نتایج اندازه گیری غلظت پروتئین از محیط های کشت چهار گانه پس  
از ۹۶ ساعت گرمخانه گذاری و مقایسه آنها..... ۱۲۶