بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای حسین وزینی قیصر رشته انگل شناسی پزشکی رساله دکتری خود را با عنوان «ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کدکننده آنتی‌ژن گرانولی ۷ و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کدکننده آنتی‌ژن گرانولی ۷ و آنتی‌ژن راپتری ۲ توکسوپلاسما گوندیی در موش BALB/c » در تاریخ ۱۳۹۱/۶/۲۱ ارائه کردند.

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

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر فاطمه غفاری فر	
استاد مشاور	دکتر زهره شریفی	
استاد مشاور	دکتر عبدالحسین دلیمی	
استاد ناظر	دکتر سید محمد موذنی	
استاد ناظر	دکتر مهدی محبعلی	
استاد ناظر	دکتر زهرا اسلامی راد	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر جاوید صدرایی	

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 دانشجوی 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 و یا نرم افزار 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 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 ۴- 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 ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۸/۴/۲۸ در شورای پژوهشی دانشکده پزشکی به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **حسین وزینی قیصر** دانشجوی رشته **انگل شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۶** مقطع **دکتری**دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین 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 آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم.»

امضا

تاریخ ۹۱/۶/۲۱

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 **دکتری** نگارنده در رشته **انگل شناسی** پزشکی است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر فاطمه غفاری فر**، مشاوره **دکتر عبدالحسین دلیمی اصل و دکتر زهره شریفی** 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 ۴: 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **حسین وزینی قیصر** دانشجوی رشته **انگل شناسی** پزشکی مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۹۲/۶/۲۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D) در رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان

ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید کد کننده آنتی ژن گرانولی ۷ و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کد کننده آنتی ژن گرانولی۷ و آنتی ژن راپتری ۲ توکسوپلاسما گوندهای در موش BALB/c

نگارش

حسین وزینی قیصر

استاد راهنما

دکتر فاطمه غفاری فر

اساتید مشاور

دکتر زهره شریفی

دکتر عبدالحسین دلیمی اصل

تابستان ۱۳۹۱

تقدیم به:

سیدالشهدا امام حسین (ع) که هرچه دارم از عنایت اوست.

تقدیم به:

پدر جانباز و بزرگوارم که همچون کوهی استوار پشتیبان بنده بوده است.

تقدیم به:

مادر باگذشت و فداکارم که نمونه مهربانی و ایثار است.

تشکر و قدردانی

وظیفه خود می دانم که از زحمات سرکار خانم دکتر غفاری فرکه زحمت راهنمایی این تحقیق را بر عهده داشته اند و در تمامی مراحل آن مشوق من بوده اند، صمیمانه سپاسگزارم. ایشان نمونه یک انسان کامل، متدین و باگذشت است و افتخار می کنم در محضر ایشان شاگردی نموده ام. از سرکار خانم دکتر شریفی که زحمت مشاوره این پژوهش را بعهده داشته اند، متشکرم. ایشان بعنوان فردی دلسوز همواره در مراحل مختلف این تحقیق کمک های شایانی نمودند. از جناب آقای دکتر دلیمی، بعنوان مشاور این پایان نامه و الگوی اخلاق و علم سپاسگزارم. از جناب آقای دکتر صدرایی بخاطر تمام راهنمایی ها و کمک های ایشان سپاسگزارم. از داوران محترم جناب آقای دکتر محبعلی و دکتر موذنی و سرکار خانم دکتر اسلامی که قبول زحمت داوری این تحقیق را تقبل نمودند، تشکر می نمایم. از جناب آقای دکتر حسن که گذشته از جایگاه استادی، شخصیتی مهربان، مومن و دلسوز می باشد، صمیمانه سپاسگزارم.

از تمامی کارشناسان گروه انگل شناسی و کلیه پرسنل و کارکنان دانشکده پزشکی و دانشگاه تربیت مدرس بخاطر زحمات فراوانشان و اخلاق خوب و دلسوزانه آنها تشکر می نمایم.

از همکاری صمیمانه آقای دکتر علیزاده، دکتر دلاوری، دکتر پیرستانی و تمامی افرادی که در این تحقیق به نوبه خود ایجانب را همراهی نمودند، کمال تشکر و امتنان را دارم.

این حدیث را تقدیم می کنم به تمامی زحمت کشان عرصه علم و دانش

امام حسین (ع) می فرماید:

بدانید که دنیا شیرینی و تلخی اش رویایی بیش نیست و آگاهی و بیداری واقعی در آخرت است.

چکیده:

عوارض شدید و کشندهٔ توکسوپلاسموز ضرورت یافتن واکسن مؤثری علیه این بیماری را مطرح می‌سازد. از این رو توسعه واکسن‌های جدید علیه بیماری ضرورت دارد. ایمن‌سازی با پلاسمید حاوی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های محافظت کننده، راه‌کار امید بخشی برای ساخت واکسن به‌شمار می‌آید. از این رو تحقیق حاضر با هدف ارزیابی ایمنی‌زایی پلاسمید کد کننده آنتی‌ژن GRA7 و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کد کننده آنتی‌ژن راپتری۲ ROP و آنتی‌ژن GRA7 توکسوپلاسما گوندی در موش BALB/c صورت گرفت.

این تحقیق به صورت تجربی روی ۵ گروه ۱۰ تائی موش ماده BALB/c صورت گرفت. پس از استخراج DNA از تاکی‌زوئیت انگل، در طی واکنش PCR ژن کد کننده پروتئین GRA7 تکثیر شده و محصول PCR در TOPO وکتور کلون گردیده و سپس تعیین توالی شد. نتایج نشان داد که قطعه‌ای ۷۳۳bp در پلاسمید مذکور کلون شد. سپس این ژن در pcDNA3 ساب کلون گردیده و بعد از ترانسفکت کردن این پلاسمید نوترکیب در سلول یوکاریوتیک(CHO) بیان این ژن با استفاده از روش‌های SDS-PAGE و Western blot تأیید شد. پس از استخراج انبوه پلاسمید، با تزریق عضلانی پلاسمید نوترکیب ۳ بار به فاصله ۳ هفته، ایمونیزاسیون موش‌ها انجام شد.

نتایج سنجش سایتوکاین‌های INF-γ و IL-4نشان‌داد که میزان پرولیفراسیون لنفوسیت‌ها و سطح سایتوکاین INF-γ درDNA کوکتل حاوی پلاسمید نوترکیب pc-GRA7 در مقایسه با گروه‌های کنترل بالاتر بود. حال آن‌که سطوح IL-4 در موش BALB/c ایمن‌سازی شده نسبت به گروه کنترل به میزان قابل توجهی پائین‌تر بود($P \leq ۰/۰۵$). تکثیر سلول‌های طحال با استفاده از روشMTT مؤید القای پاسخ سلولی بود. اندازه‌گیری IgG توتال و ایزوتایپ IgG2a و IgG1 نشان‌داد که گروه پلاسمید نوترکیب pc-GRA7 در مقایسه با گروه‌های کنترل باعث تحریک IgG وIgG2a می‌شود($P \leq ۰/۰۵$). اما در مورد IgG1 بین گروه‌های مورد و کنترل اختلاف معنی‌دار وجود نداشت($P>۰/۰۵$). ضمن آن‌که میزان بقا موش‌ها در گروه پلاسمید نوترکیب pcGRA7 به طور قابل توجهی از گروه‌های کنترل بیشتر بود($P \leq ۰/۰۵$).

تزریق DNA واکسن کوکتل حاوی پلاسمید نوترکیب pcGRA7 باعث تولید مقادیر بیشتری IFN-γ شده و این امر با ترشح IgG2a تأیید و پاسخ ایمنی به سمت Th1 تمایل می‌کند، بر همین اساس ژن کامل GRA7 به صورت کوکتل می‌تواند کاندید مناسبی برای واکسیناسیون علیه توکسوپلاسموز باشد.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، DNA واکسن کوکتل، ایمنی سلولی، ایمنی هومورال، GRA7

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات تحقیق ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۲. تاریخچه ۴

۱-۳. طبقه‌بندی توکسوپلاسما ۵

۱-۳-۱. گونه‌ها و سویه‌های توکسوپلاسما ۵

۱-۴. مورفولوژی توکسوپلاسما ۶

۱-۴-۱. تاکی زوئیت (Tachyzoite) ۶

۱-۴-۲. برادی زوئیت ۷

۱-۴-۳. اسپوروزوئیت ۸

۱-۵. سیر تکاملی ۹

۱-۵-۱. مرحله روده‌ای ۹

۱-۵-۲. مرحله خارج روده‌ای ۱۱

۱-۶. ژنوم توکسوپلاسما گونده ای ۱۲

۱-۷. آنتی ژنهای توکسوپلاسما ۱۲

۱-۷-۱. آنتی ژنهای سطحی و کیست ۱۳

۱-۷-۲. آنتی ژنهای اندامک راسی ۱۳

۱-۷-۳. پروتئینهای شوک حرارتی ۱۴

۱-۷-۴. آنتی ژن سطحی اصلی توکسوپلاسما گونده‌ای ۱۵

۱-۸. اپیدمیولوژی توکسوپلاسموزیس ۱۶

۱-۸-۱. اپیدمیولوژی توکسوپلاسموزیس در جهان ۱۷

۱-۸-۲. اپیدمیولوژی توکسوپلاسموزیس در ایران ۱۸

۱-۹. راههای انتقال ۱۹

۱-۱۰. بیماریزایی و علائم بالینی ۲۱
۱-۱۰-۱. توکسوپلاسموزیس اکتسابی در بیماران با سیستم ایمنی طبیعی ۲۱
۱-۱۰-۲. توکسوپلاسموزیس مادرزادی ۲۱
۱-۱۰-۳. توکسوپلاسموزیس چشمی ۲۲
۱-۱۰-۴. توکسوپلازسموزیس اکتسابی یا مجدد فعال شده در افراد با نقص سیستم ایمنی ۲۲
۱-۱۰-۵. توکسوپلاسموزیس ریوی ۲۳
۱-۱۱. ایمنی در توکسوپلاسموزیس ۲۳
۱-۱۲. تشخیص ۲۶
۱-۱۲-۱. تشخیص هیستولوژیکی ۲۶
۱-۱۲-۲. تستهای سرولوژیکی ۲۶
۱-۱۲-۳. تلقیح به حیوان آزمایشگاهی یا کشت سلولی ۲۷
۱-۱۲-۴. روشهای بیولوژی مولکولی ۲۷
۱-۱۳. درمان و انواع روشهای درمانی توکسوپلاسموزیس ۲۷
۱-۱۳-۱. درمان دارویی ۲۷
۱-۱۳-۲. ایمنی درمانی ۲۸
۱-۱۳-۳. درمانهای غیر دارویی ۲۸
۱-۱۴. پیشگیری و کنترل ۲۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۱

۲-۱. تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلاسما گونده‌ای ۳۲
۲-۲. استخراج DNA ۳۲
۲-۲-۲. اندازه‌گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن ۳۳
۲-۲-۳. الکتروفورز DNA ۳۴
۲-۲-۳-۱. طرز تهیه محلول Tris Acetate EDT(TAE) ۳۴
۲-۲-۳-۲. طرز تهیه ژل آگاروز ۰/۸ درصد برای الکتروفورزDNA ۳۴

۲-۳. تکثیر DNA با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۵
۲-۳-۱. طراحی پرایمرها ۳۶
۲-۴-۱. استخراج DNA توسط کیت شرکت Fermentas ۴۰
۲-۵. کلونینگ ژن GRA ۷ در پلاسمید TOPO ۴۱
۲-۵-۱. اتصال قطعات DNA ۴۲
۲-۵-۲. انتقال DNA به باکتری ۴۲
۲-۵-۲-۱. طرز تهیه محیط‌های کشت باکتری ۴۲
۲-۵-۲-۲. محیط نگهداری باکتری ها ۴۳
۲-۵-۲-۳. طرز تهیه باکتری مستعد به روش کلرید کلسیم ۴۳
۲-۵-۲-۴. سلول مستعد منجمد شده ۴۴
۲-۵-۲-۵. انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری ۴۴
۲-۵-۳. غربال کردن کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب ۴۵
۲-۵-۳-۱. مقاومت کلون به آنتی بیوتیک ۴۵
۲-۵-۳-۲. کامل کردن ۴۵
۲-۶. استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتریهای ترانسفورم شده ۴۷
۲-۶-۱-۱. طرز تهیه محلول‌های لازم جهت استخراج پلاسمید ۴۷
۲-۶-۱-۲. استخراج پلاسمید به روش Mini-Prep Plasmid DNA extraction ۴۸
۲-۶-۱-۳. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer آلمان ..۴۹
۲-۶-۱-۴. استخراج پلاسمید با کیت شرکت Promega ۵۰
۲-۷. روش‌های تاییدکننده کلون شدن قطعه GRA ۷ در ناقل پلاسمیدی ۵۱
۲-۷-۱. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های آبی و سفید ۵۱
۲-۷-۲. برش آنزیمی DNA پلاسمیدی ۵۱
۲-۷-۳. روش PCR ۵۲
۲-۸. ساب کلونینگ قطعه GRA7 در پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۵۳
۲-۸-۱. برش پلاسمید نوترکیب pT- GRA7 توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII و جداسازی

قطعه GRA7 ..... ۵۴
۲-۸-۲. برش پلاسمید یوکاریوتیک pcDNA3 توسط آنزیم‌های EcoRI و HindIII ۵۴
۲-۸-۳. اتصال قطعه GRA7 به پلاسمید pcDNA3 ..... ۵۵
۲-۸-۴. انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری E.coli (ترانسفورم کردن باکتری) ۵۵
۲-۹. روش‌های تاییدکننده کلونینگ قطعه GRA7 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ..... ۵۶
۲-۹-۱. مقایسه پلاسمیدهای pcDNA3 و pc GRA7 با الکتروفورز ۵۶
۲-۹-۲. روش PCR ۵۶
۲-۹-۳. مقایسه پلاسمید نوترکیب pc GRA7 و پلاسمید pcDNA3 بعد از برش آنزیمی ۵۷
۲-۹-۳-۱. برش پلاسمید نوترکیب pcROP2 با آنزیم‌های EcoRI و HindIII ۵۷
۲-۹-۴. تعیین توالی مولکول ۵۷
۲-۱۰. بیان ژن GRA7 در سلول یوکاریوتیک ۵۷
۲-۱۰-۱. انتقال پلاسمید نوترکیب pc GRA7 به درون سلول یوکاریوتیک ۵۸
۲-۱۱. تایید بیان ژن GRA7 در سلول یوکاریوتیک ۶۰
۲-۱۱-۱. استخراج پروتئین ۶۰
۲-۱۱-۱-۱. تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی با استفاده‌از روش برادفورد ۶۱
۲-۱۱-۱-۲. تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۶۲
۲-۱۱-۱-۳. وسترن بلات ۶۶
۲-۱۲. استخراج انبوه پلاسمید pcGRA7 و pcROP2 به روش دستی ۶۹
۲-۱۳. ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید نوترکیب کد کنندهٔ آنتی ژن گرانولی ۷ (pcGRA7) و DNA کوکتل حاوی پلاسمیدهای کدکننده آنتی ژن کامل راپتری ۲ و آنتی‌ژن گرانولی ۷(pcGRA7) درموش کوچک آزمایشگاهی ۷۲
۲-۱۳-۱. انتخاب حیوان آزمایشگاهی مناسب ۷۳
۲-۱۳-۲. گروه‌بندی موش‌ها ۷۳
۲-۱۳-۳. ایمن‌سازی ۷۳
۲-۱۳-۳-۱. نحوه تزریق داخل عضلانی [۱۸۵] ۷۴

۲-۱۳-۴. چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۷۴
۲-۱۳-۵. بررسی ایمنی هومورال ۷۵
۲-۱۳-۵-۱. آماده سازی آنتی‌ژن (ST-Ag) ۷۵
۲-۱۳-۵-۲. آماده سازی و استفاده از کیسه دیالیز ۷۶
۲-۱۳-۵-۳. نحوه جمع آوری سرم موش‌ها ۷۶
۲-۱۳-۵-۴. چیکر بورد ۷۶
۲-۱۳-۵-۵. آزمایش الایزا غیرمستقیم ۷۸
۲-۱۳-۶. بررسی ایمنی سلولی ۸۰
۲-۱۳-۶-۱. روش استخراج لنفوسیت‌ها از طحال موش‌ها ۸۰
۲-۱۳-۶-۲. روش کشت سلول‌های لنفوسیت طحال موش برای سنجش سایتوکائین‌ها ۸۲
۲-۱۳-۶-۲-۱. سنجش سایتوکائین ۸۳
۲-۱۳-۷. طرز تهیهٔ محلول MTT ۸۶
۲-۱۳-۸. روش کشت سلول‌های لنفوسیت طحال موش در آزمایش MTT ۸۶
۳-۱۳-۷. ارزیابی آماری نتایج حاصل از آزمایش چالش با سویه RH و ایمنی هومورال و سلولی ۸۸

فصل سوم: نتایج ۸۹

۳-۱. نتیجه استخراج DNA ۹۰
۳-۲. نتایج PCR بکمک DNA ژنومی استخراج شده از انگل ۹۰
۳-۳. اتصال ژن GRA7 به وکتورکلونینگ TOPO ۹۱
۳-۴. نتایج ترانسفورماسیون باکتریها با محصول واکنش اتصال ۹۱
۳-۵. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب TOPO - GRA7 ۹۲
۳-۶. نتایج PCR قطعه GRA7 با استفاده از پلاسمید نوترکیب TOPO - GRA7 بعنوان الگو ۹۳
۳-۷. نتایج تعیین توالی ۹۳
۳-۷. ساب کلونینگ ژن GRA7در پلاسمید بیانی pcDNA3 ۹۴

۳-۸. نتیجه ترانسفورماسیون با محصول واکنش اتصال برای ساب کلونینگ ژن GRA7 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ..... ۹۵
۳-۹. نتایج PCR قطعه GRA7 با استفاده از پلاسمید نوترکیب pc- GRA7 ..... ۹۵
۳-۱۰. نتایج ترانسفکت پلاسمید نوترکیب pc GRA7 درسلول یوکاریوت ۹۶
۳-۱۰-۱. نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE ۹۶
۳-۱۰-۲. نتایج وسترن بلات ۹۷
۳-۱۰-۳. نتایج چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش‌ها ۹۷
۳-۱۱. نتایج بررسی ایمنی هومورال ۹۸
۳-۱۲. نتایج MTT: ۹۹
۳-۱۳. نتایج سنجش سایتوکاینIFN-γ ۱۰۰

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۰۱

۴-۱. بحث و نتیجه‌گیری ۱۰۲
۴-۲. پیشنهادها ۱۰۷

فهرست منابع ۱۰۸
چکیده انگلیسی ۱۱۳

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۲-۱) مقادیر استاندارد در روش برادفورد ۶۱

جدول (۲-۲) نحوه گروه بندی موش‌ها بر اساس نوع ماده تزریقی و تعداد موش‌ها در هر گروه ۷۳

جدول (۳-۱) درصد بقاء و تعداد روزهای زندگی موش‌های گروه‌های مختلف پس از چالش با ۵×۱۰^{۴} تاکی زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH ۹۸

جدول (۳-۲) مقایسه میانگین OD آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG توتال در سرم موش های گروه‌های کنترل و ایمنی زایی شده ۳ هفته پس از تزریق سوم ۹۸

جدول (۳-۳) مقایسه میانگین OD سطح IgG1 با استفاده از تست الایزا در سرم موش های مورد مطالعه ۳ هفته پس از تزریق سوم ۹۹

جدول (۳-۴) مقایسه میانگین OD سطح IgG2a با استفاده از تست الایزا در سرم موش های مورد مطالعه ۳ هفته پس از تزریق سوم ۹۹

جدول (۳-۵) مقایسه میانگین و انحراف معیار OD مربوط به MTT ۹۹

جدول (۳-۶) مقایسه مقدار میانگین سایتوکاینIFN-γ با استفاده از تست الایزا در سرم موش‌های مورد مطالعه درطی ۷۲ ساعت بعد از کشت لنفوسیتی ۱۰۰

جدول (۳-۷) مقایسه مقدار میانگین سایتوکاینIL-4 با استفاده از تست الایزا در سرم موش‌های مورد مطالعه در طی ۷۲ ساعت بعد از کشت لنفوسیتی ۱۰۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) اشکال مختلف توکسوپلاسما گونده ای: اسپوروزوئیت (بالا)، کیست بافتی حاوی برادی زوئیت (وسط)، اووسیست حاوی دو اسپوروسیست و هشت اسپوروزوئیت (پایین) ۹

شکل (۱-۲) چرخه زندگی توکسوپلاسما گونده‌ای ۱۰

شکل (۱-۳) آنتی ژنهای توکسوپلاسما گونده‌ای، موقعیت آنها و ژنهایی که آنها را کد می‌کنند ۱۴

شکل (۱-۴) راههای انتقال توکسوپلاسما گونده‌ای ۲۰

شکل(۲-۱) مراحل کلونینگ و غربالگری کلون‌های ترانسفورم شده ۴۶

شکل (۲-۲) نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ..... ۵۳

شکل (۲-۳) آناتومی ماهیچه‌های Quadricepsو Tibialis پای موش ۷۴

شکل (۲-۴) پلیت آزمایش MTT قبل از اضافه کردن DMSO ۸۷

شکل (۲-۵) پلیت آزمایش MTT بعد از اضافه کردن DMSO ۸۷

شکل (۳-۱) الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۰/۸٪ ۹۰

شکل (۳-۲) نتایج PCR بکمک DNA ژنومی استخراج شده از انگل ۹۱

شکل (۳-۳) نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب TOPO - GRA7 ..... ۹۲

شکل (۳-۴) نتایج PCR قطعه GRA7 با استفاده از پلاسمید نوترکیب TOPO - GRA7 بعنوان الگو.. ۹۳

شکل (۳-۵) توالی بدست آمده از ژن GRA7 جدا شده از توکسوپلاسما گونده‌ای با نمایش محل پرایمرهای رفت و برگشت که این توالی در یک باز با توالی موجود در بانک ژنی تفاوت دارد ۹۴

شکل (۳-۶) نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب PTZ-GRA7 روی ژل آگاروز ۰/۸٪ درصد، ستون ۱ و ۳مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۲ پلاسمید pcGRA7 آنزیم نخورده، ستون ۴ پلاسمید PT-GRA7 آنزیم خورده و قطعه ۷۳۳ جفت بازی از قطعه ۲۸۸۶ bp جدا شده است. ۹۴

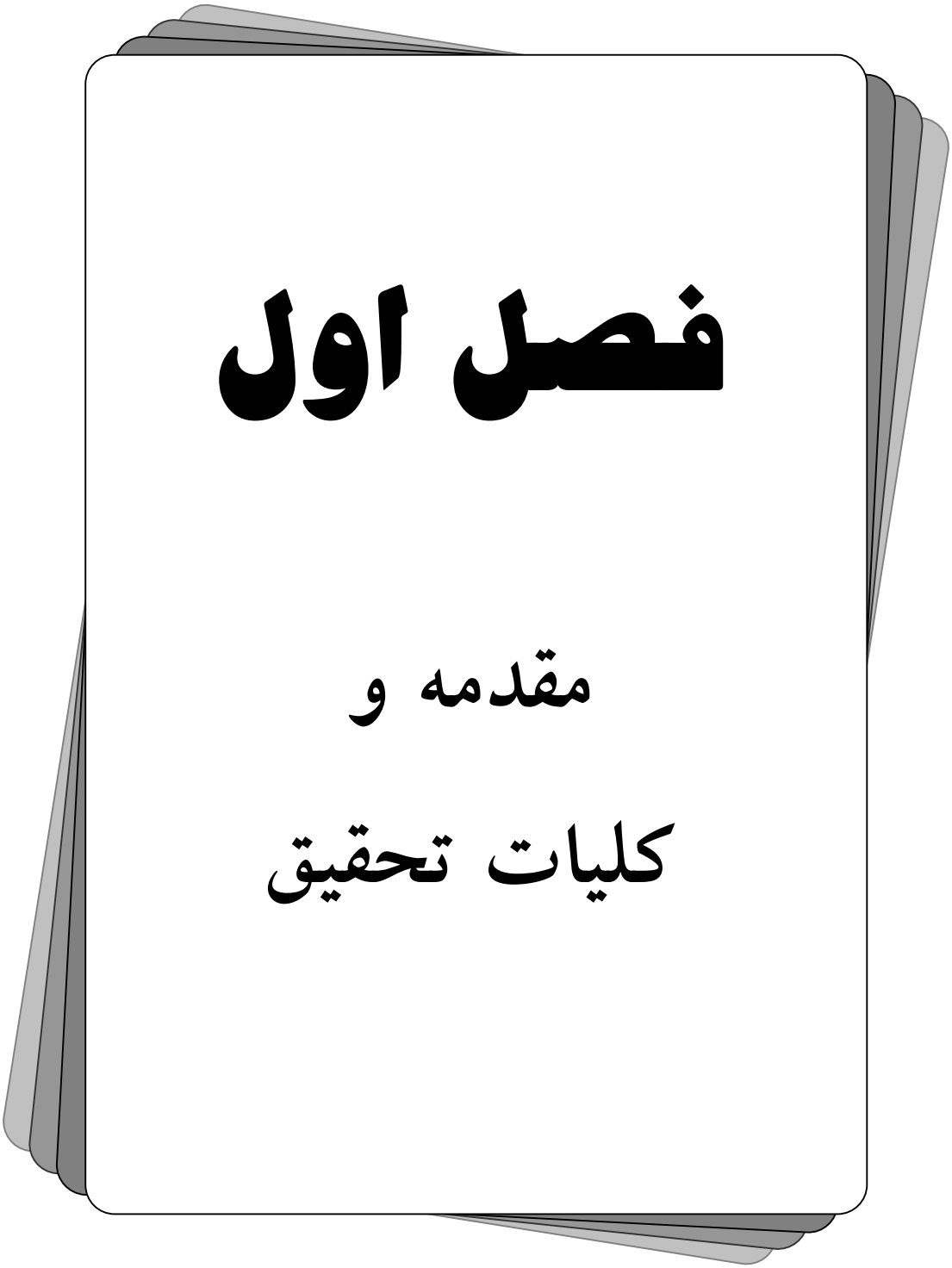
شکل (۳-۷) مقایسه باندهای پلاسمید نوترکیب pc GRA7 با پلاسمید فاقد قطعه pcDNA3 ستون

۱ مارکرKbp ۱، ستون ۲ پلاسمید pcDNA3، ستون ۳ پلاسمید نوترکیب pc GRA7.....۹۵

شکل (۴-۸) الکتروفورز محصول PCR بکمک پلاسمید نوترکیب pc GRA7 روی ژل آگاروز ۱٪. ستون۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲و۳و۴ محصول PCR بکمک پلاسمید نوترکیب pc GRA7 و پرایمرهای یونیورسال.....۹۶

شکل (۳-۹) نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE.....۹۶

شکل (۳-۱۰) کاغذ نیتروسلولزی که پروتئین های تفکیک شده در مرحله SDS-PAGE به آن منتقل شده نشان داده شده‌است.....۹۷



فصل اول

مقدمه و

کلیات تحقیق

۱-۱. مقدمه

توکسوپلاسموزیس توسط تک یاخته‌ای انگلی به نام توکسوپلاسما گونده‌ای[1] ایجاد می‌شود و گسترش جهانی دارد[۱]. این بیماری به علت عفونت مادرزادی و سقط جنین در انسان و حیوانات اهلی دارای اهمیت پزشکی و دامپزشکی است[۱]. توکسوپلاسموزیس اثرات متفاوتی در میزبان ایجاد می‌کند. در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز، گیرنده‌های پیوند عضو و بیماران سرطانی باعث بیماری‌های شدید و مرگ و میر می‌شود[۲]. بیماری با کوریورتینیت، کوری، تورم غدد لنفاوی، آنسفالیت و یا مرگ همراه است[۳]. توکسوپلاسموزیس مادرزادی که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگی اولیه مادری است، می‌تواند باعث سقط جنین خودبخودی، مرگ جنین در رحم یا نقص‌های شدید مادرزادی مثل هیدروسفالی، عقب‌ماندگی ذهنی یا کوریورتینیت گردد[۴].

شاید آلودگی به توکسوپلاسما از شایع‌ترین عفونت‌های انگلی بشر در جهان باشد [۵] و تخمین زده می‌شود که توکسوپلاسموزیس بشکل بدون علامت مزمن در ۵۰۰ میلیون تا یک بیلیون نفر از جمعیت انسانی در جهان وجود داشته باشد [۶].

درمان این بیماری بخاطر اثرات سمی داروهای در دسترس مشکل است و عفونت مجدد بسرعت اتفاق می‌افتد. تحت شرایط حاضر ایجاد و گسترش داروهای جدید ضد توکسوپلاسما یا یک واکسن، جایگزین بسیار مناسبی خواهد بود [۱]. ایمنی که در اثر آلودگی مادر قبل از حاملگی ایجاد می‌شود مانع از عبور انگل از راه جفت می‌شود و جنین را بطور کامل محافظت می‌کند. این موضوع پیشنهاد می‌کند که احتمال توقف انتقال انگل از راه جفت با واکسیناسیون مناسب قبل از حاملگی، امکان‌پذیر است[۴].

1- Toxoplasma gondii

مطالعات و تجربیات مختلف نشان داده است که احتمال تهیه واکسنی مناسب علیه توکسوپلاسموزیس انسانی وجود دارد[۱]. در سالهای گذشته، پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در جهت ایجاد و گسترش واکسنی موثر برای بیماری توکسوپلاسموزیس بوجود آمده است و واکسنی با استرین زنده ضعیف شده S48 برای مصارف دامپزشکی تهیه شده است. در عین حال این واکسن ممکن است به حالت بیماریزا برگردد و ازاینرو برای مصرف انسانی مناسب نیست[۱]. واکسن‌هایی که بطور تجاری در دسترس هستند، عمدتاً بر پایه مراحل عفونت‌زای ضعیف شده و یا آنتی‌ژن‌های نوترکیب انگل تهیه شده‌اند [۷].

در سال‌های اخیر، تکنولوژی پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه و ایجاد واکسن‌های چندظرفیتی ارائه کرده است[۷]. واکسیناسیون DNA بحث کاملاً جدیدی است[۷] و روش قدرتمندی برای القا پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کد شده را بیان می‌کنند[۱]. واکسیناسیون ژنی پاسخ‌های ایمنی موثر وطولانی مدتی القا می‌کنند. چون آنتی‌ژنی ایمونولوژیک مهیا می‌کنند که از طریق سیستم MHC-I و MHC-II فرآوری می‌شوند و خاطره ایمونولوژیکی را تحریک می‌کنند[۸]. هم‌اکنون واکسیناسیون DNA علیه بیماری‌های انگلی مثل مالاریا، لیشمانیوز، توکسوپلاسموزیس، کریپتوسپوریدیوزیس، شیستوزومیازیس و فاسیولیوزیس فرصت‌های جدیدی را بوجود آورده است [۷].

در دهه گذشته، پیشرفت چشمگیری در زمینه شناسایی کاندیدهای واکسن که می‌تواند پاسخ ایمنی محافظتی القا کنند، صورت گرفته است. بیشتر این کارها بر روی آنتی‌ژنهای سطحی تاکی زوئیت متمرکز شده است که در این میان SAG1 یکی از کاندیدهای اصلی واکسن می‌باشد. آنتی‌ژنهای دفعی-ترشحی انگل نیز نقش مهمی در تحریک سیستم ایمنی محافظتی دارند. این آنتی‌ژنها بوسیله تاکی زوئیت‌ها و برادی‌زوئیت‌ها بیان می‌شوند. از اعضای اصلی آنتی‌ژنهای دفعی-ترشحی مولکول‌های GRA[1] می‌باشند. GRA1 ($23KD_a$), GRA4 ($40KD_a$), GRA7 ($29KD_a$) بعنوان گزینه‌های واکسن شناسایی شده‌اند. اخیراً آنتی‌ژن ROP2 ($56KD_a$) که بوسیله تاکی زوئیت، برادی زوئیت و اسپوروزوئیت بیان می‌شود نیز بعنوان گزینه واکسن علیه توکسوپلاسموزیس پیشنهاد شده است[۱].

1- Granule antigen