٦٢٣٢

تعا

١١٤٦٠٢

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکـــده علوم پزشکی

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

عنوان :

ارزیابی ایمنولوژیکی پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین ۱ راپتری (ROP1) توکسوپلاسما گوندی در موش کوچک آزمایشگاهی

نگارش:

زهرا اسلامی راد

استاد راهنما:

آقای دکتر عبدالحسین دلیمی اصل

اساتید مشاور:

خانم دکتر فاطمه غفاری فر

خانم دکترزهره شریفی

دکتر احمد زواران حسینی

زمستان ۱۳۸۷

۱۳۸۸/۴/۱

مرکز اطلاعات مدارک علمی

۱۱۴۶۰۲

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم زهرا اسلامی راد رشته انگل شناسی رساله دکتری واحدی خود را با عنوان: " ارزیابی ایمنو لوژیکی پلاسمیدحاوی ژن کد کننده پروتئین اراپتری (ROP 1) توکسوپلاسماگوندی در موش کوچک آزمایشگاهی " درتاریخ ۸۷/۱۲/۱۳ 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 می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر عبدالحسین دلیمی اصل	
۲- استاد مشاور	دکتر فاطمه غفاری فر	
۳-استاد مشاور	دکتر زهره شریفی	
٤-استاد ناظر	دکتربهرام کاظمی دمنه	
٥-استاد ناظر	دکتر فاطمه ملکی	
٦-استاد ناظر	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
۷-استاد ناظر	دکتر محمد حسین یادگاری	
۸-نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر جاوید صدرایی	

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 ...ایمنی شناسی پزشکی... است که در سال ...۱۳۸۷... دردانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر عبدالحسین دلیمی ، مشاوره دکتر جلال غفاری ... از آن دفاع شده است."

دکتر زهره شریفی

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 .

۱۳۸۸/۴/۱

ماده ۶: اینجانب ...زهرا اسدی راد... دانشجوی رشته ...ایمنی شناسی پزشکی... مقطع ...دکتری... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی زهرا اسدی راد

تاریخ و امضاء ۸۷/۱۲/۱۰

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.

ماده۱- 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.

ماده۲- 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 . زهرا اسدی راد
تاریخ و امضاء ۸۷/۱۲/۱۰

الحمدلله رب العالمین والصلاه والسلام علی سیدناو نبینامحمدو آله الطاهرین ولعنته الله علی اعدائهم الجمعین الی یوم الدین

تقدیر و تقدیم:

اکنون که به لطف پروردگار متعال رساله اینجانب به اتمام رسیده است، لآزم می دانم از کلیه اساتید و همکاران بزرگوار که در اجرای این تحقیق مرا یاری نمودند قدردانی و تشکر نمایم. **با تشکر بسیار از:**

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر عبدالحسین دلیمی که راهنمایی اینجانب را در این تحقیق به عهده گرفته و با راهنمائی های خردمندانه خویش مرا در هر چه پر بارتر کردن این پایان نامه یاری نمودند.

استاد و دوست عزیزم سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر که در طول تحصیل همواره از تجربیات علمی و عملی ایشان برخوردار بوده و در طول این تحقیق مشاور و مشوق اینجانب بودند.

استاد عزیزم سرکار خانم دکتر زهره شریفی که صادقانه تجربیات ارزنده خود را در اختیار اینجانب قرار داده و در طول این تحقیق از مشاوره گرانبهای ایشان بهره مند شدم و این تحقیق بدون راهنمایی و مساعدت ایشان انجام پذیر نبود.

استاد ارجمند جناب آقای دکتر احمد زواران حسینی که مدیون زحمات ایشان بوده و در طول این تحقیق از مشاوره بی دریغ ایشان برخوردار گردیدم.

استادان محترم و گرانقدر آقای دکتر صدرائی ، آقای دکتر نیکبخت زاده، خانم دکتر سلیمانجاهی ، خانم دکتر محمدی ، آقای دکتر یادگاری ، خانم دکتر پیرایه ، خانم دکتر مبارز ،آقای دکتر ستاری، خانم دکتر رهبری زاده ،آقای دکتر رسایی ، آقای دکتر فروزنده ، آقای دکتر کاظمی ، آقای دکتر حقیقی، آقای دکتر پورفتح اله، آقای دکتر مؤذنی ،آقای دکتر حسن، آقای دکتر علامه ، آقای دکتر مصباح ، خانم دکتر بطحایی که در مراحل مختلف پایان نامه از کمک های ایشان بر خوردار گردیدم.

کارشناسان محترم گروه انگل شناسی سرکار خانم قاسمی نیکو و سر کار خانم باغخانی که از مساعدتهای بی دریغ ایشان بر خوردار گردیدم. کارکنان و کارشناسان محترم گروههای میکروب شناسی ، قارچ شناسی ، بیوشیمی و بیوتکنولوژی ، ایمنی شناسی و انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خانمها صمیمی، رزاقی ، افشار، اعتمادی، بنی صادق، محسنی، فدایی، اسکافی ، تقی پور و آقای کربندیان که درکلیه مراحل تحقیق مرا یاری نموده و از هیچ کمکی به اینجانب دریغ نکردند.

دوستان و همکاران عزیزم خانم دکتر جالوسیان،خانم دکتر طباطبایی ، خانم دکتر رجبی، خانم دکتر شجاعی، خانم دکتر پاکروان، خانم دکتر هارطونیان، خانم ماسبی، خانم جرجانی، آقای دکتر سید طبائی ، آقای دکتر صلح جو وآقای دکتر مهدوی ،آقای دکتر فلاح ، آقای معروفی ، آقای خسروشاهی، آقای حسن زاده وآقای خوانساری ،آقای خرم آبادی ، آقای منتجب بیا، آقای فرشچیان و بالاخره کارکنان و مسئولین بخش اداری ، آموزشی و پژوهشی دانشکده پزشکی تربیت

مدرس خانمها دکتر موحدین، گیلانی ، عزیزی ، زرشکن ، خرمی ، سراج ، دباغ و آقایان سرمدی، سلطانی، موسوی، کاظمی و زنده یاد میر شفیعی ، که در طول تحصیل و اجرای این تحقیق نهایت مساعدت و همکاری را نمودند.
همچنین از تکنسین محترم گروه انگل شناسی آقای اصغر رجبعلیها که در طول تحصیل خصوصاً مراحل اجرای پایان نامه از هیچ کمکی دریغ نکرده و چون برادری بزرگوار مرا همراهی نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.
در نهایت این پایان نامه را تقدیم می کنم :

به پدرم که امکان تحصیل را برایم فراهم نمود.

به مادرم که در طول زندگی مشوق و دلسوز من بوده است.

به همسر و پسرم که با فداکاری و بردباری آرامش را برایم به ارمغان آوردند.

خلاصه:
توکسوپلاسما گوندی یک انگل تک یاخته ای داخل سلولی است که موجب بیماری توکسوپلاسموزیز در انسان و حیوان میشود . انگل انتشارجهانی داشته و حدود $\frac{1}{3}$ از انسانها سرم مثبت هستند. عفونتهای توکسوپلاسمایی در اکثر افراد سالم فاقد علامت بوده ولی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف علائم شدیدتری ایجاد می کند.
انگل توکسوپلاسما همانند سایر ارگانیسم های تک سلولی متشکل از آنتی ژنهای ایمنوژنیک فراوانی است . با وجود اینکه ممکنست آنتی ژنهای دفعی – ترشحی بهترین نوع آنتی ژن برای تحریک پاسخهای ایمنی سلولی و در نتیجه کاندید مناسبی برای تهیه واکسن بر علیه توکسوپلاسموزیز باشند ولی مطالعات اندکی بر روی آنها انجام شده است . در این مطالعه ما راپتری پروتئین ۱ (ROP1) توکسوپلاسما گوندی را بصورت DNA واکسن تهیه نموده و مورد ارزیابی قرار دادیم.
در این تحقیق پس از استخراج DNA ژنومی از انگل به روش فنل-کلروفرم و جداسازی و تکثیر ژن کد کننده ROP1 با روش PCR ، محصول PCR در pTZ57R/T کلون گردیده و سپس تعیین توالی شد. نتایج نشان داد که که قطعه ای ۷۶۰bp در پلاسمید مذکور کلون شده و قطعه کلون شده ژن ROP1 توکسوپلاسما گوندی است. ژن کلون شده ازنظر توالی نوکلئوتیدی با شماره M71274 استرین RH ۹۷٪ و با شماره AF350261 همین استرین ۹۶٪ شباهت دارد .سپس این ژن در pcDNA3 ساب کلون گردیده و بعد از ترانسفکت کردن این پلاسمید نویرکیب در سلول یوکاریوتیک(CHO و COS7) بیان این ژن به روش SDS-PAGE وWestern blot تایید شد. در این مطالعه به منظور بررسی پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی ۷۰ موش Balb/c ماده In bred با پلاسمید حاوی این ژن ایمن سازی شدند . ایمونیزاسیون ۳ بار به فواصل ۳ هفته ای انجام شد . نتایج بدست آمده نشان داد که میزان بقاء موشها یی که با پلاسمید ریکامبینانت ایمن سازی شدند با گروه کنترل اختلاف معنی دار دارند. اندازه گیری IgG و اندازه گیری ایزوتایپ IgG_{2a} نیز اختلاف معنی دار را بین گروههای مورد و کنترل تایید کرد($P\leq0.05$). اندازه گیری IFN-γ نشان دهنده مقادیر بالایی از این سایتوکائین بوده ولی اندازه گیری IL4 نشان دهنده مقدار پایین این سایتوکائین است.
با توجه به نتایج، DNA واکسن حاوی ژن ROP1 قادر به ایجاد مقاومت بر علیه توکسوپلاسما می باشد. همچنین یافته های این مطالعه نشان داد که استفاده از آدجوانت های آلومینیومی همراه با DNA واکسن حاوی ROP1 تغییر معنی داری در پاسخهای ایمنی ایجاد نمی کند.
واژه کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، DNA واکسن، ROP1 ، آدجوانتهای آلومینیومی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و کلیات	
۱-۱ مقدمه	۲-۶
۱-۲ تاریخچه	۶
۱-۳ طبقه بندی	۶-۷
۱-۴ خصوصیات انگل	۷
۱-۴-۱ ساختمان توکسو پلاسما گوندی	۷-۸
۱-۴-۲ ژنوم توکسو پلاسما گوندی	۸-۹
۱-۴-۳ اندامکهای ترشحی رأسی توکسوپلاسما	۹
۱-۴-۳-۱ میکرونم(Micronemes)	۹
۱-۴-۳-۲ راپتری (Rhoptry)	۱۰-۱۱
۱-۴-۳-۲-۱ پروتئین های راپتری(ROPs)	۱۱-۱۳
۱-۴-۳-۲-۱-۱ راپتری پروتئین ۱(ROP1)	۱۳
۱-۴-۳-۳ گرانولهای متراکم(Dense granules)	۱۳
۱-۴-۴ اطلاعات بانک ژنی در مورد ژن ROP1	۱۳
۱-۵ آنتی ژنهای توکسوپلاسما	۱۳-۱۵
۱-۶ سیرتکاملی	۱۵-۱۸
۱-۶-۱ مرحله داخل روده ای	۱۸-۱۹
۱-۶-۲ مرحله خارج روده ای	۱۹
۱-۷ مکانیسم تهاجم توکسو پلاسما به سلول میزبان	۱۹-۲۰
۱-۸ ایمنی در توکسوپلاسموز	۲۰-۲۴
فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته	
۲-۱ مقدمه	۲۶-۲۷
۲-۲ واکسنهای ژنتیکی بر علیه انگل	۲۷-۲۹
۲-۳ مکانیسم عمل واکسن ژنتیکی	۳۰-۳۱
۲-۴ استراتژی های مختلف تولید واکسن های ژنتیکی	۳۱-۳۳

۲-۵ چشم انداز تهیه واکسنهای ژنتیکی ضد ۳۳
۲-۶ واکسیناسیون بر علیه توکسوپلاسما گوندی ۳۴-۳۳
۲-۶-۱ مزایای واکسیناسیون حیوانات بر علیه توکسوپلاسما ۳۵-۳۴
۲-۶-۲ مزایای واکسیناسیون انسان بر علیه توکسوپلاسما گوندی ۳۵
۲-۶-۳ مروری بر تولید و ارزیابی ایمنولوژیکی واکسنهای ضد توکسوپلاسما گوندی
در ایران و جهان ۴۴-۳۶
۲-۷ آدجوانت ها ۴۴
۲-۷-۱ خواص آدجوانت ها ۴۵
۲-۷-۲ آدجوانت های آلومینیومی ۴۵
۲-۷-۲-۱ مکانیسم تاثیر آدجوانت آلومینیومی در پاسخ ایمنی ۴۵
۲-۷-۲-۲ مزایای آدجوانت های آلومینیومی ۴۶
۲-۷-۲-۳ معایب آدجوانت های آلومینیومی ۴۶
۲-۷-۲-۴ آدجوانت های بسیار رایج ۴۹-۴۶
فصل سوم: مواد و روشها
۳-۱ تکثیر و نگهداری انگل توکسوپلاسما استرینRH ۵۱
۳-۲ استخراج DNA (DNA Extraction) ۵۴-۵۱
۳-۲-۱ استخراج به روش فنل – کلروفرم ۵۲-۵۱
۳-۲-۲ اندازه گیری غلظت DNA و تعیین خلوص آن ۵۲
۳-۲-۳ الکتروفورز DNA ۵۳
۳-۲-۳-۱ طرز تهیه محلول Tris Acetate EDTA(TAE) ۵۳
۳-۲-۳-۲ طرز تهیه ژل آگاروز ۰/۸ درصد برای الکتروفورزDNA ۵۴-۵۳
۳-۳ تکثیر DNA با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۵۷-۵۴
۳-۳-۱- طراحی پرایمرها ۵۷-۵۴
۳-۳-۲ بررسی محصولPCR ۵۷
۳-۴ خالص سازی محصولPCR ۵۷
۳-۴-۱ استخراج DNA توسط کیت شرکت Fermentas ۵۸-۵۷
۳-۵ کلونینگ ژن ROP1 در پلاسمید pTZ57R/T (T- VECTOR) ۵۸

۳-۵-۱ اتصال قطعات DNA (DNA ligation) ۵۸-۵۹
۳-۵-۲ انتقال DNA به باکتری(Transformation) ۵۹-۶۰
۳-۵-۲-۱ تهیه محیط کشت باکتری ۶۰
۳-۵-۲-۲ محیط نگهداری باکتری ها ۶۰-۶۱
۳-۵-۲-۳ طرز تهیه باکتری مستعد (Competent Cell) به روش کلرید کلسیم ۶۱
۳-۵-۲-۴ انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری(ترانسفورماسیون باکتری) ۶۲-۶۳
۳-۶ استخراج پلاسمید نوترکیب به روش دستی ۶۳-۶۴
۳-۶-۱ استخراج پلاسمید به روش Mini-Prep Plasmid DNA extraction ۶۵
۳-۶-۲ استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer ۶۶
۳-۷ روش های تاییدکننده کلونینگ قطعه ROP1 در ناقل پلاسمیدی ۶۶
۳-۷-۱ مقایسه پلاسمید های استخراج شده از کلنی های آبی و سفید ۶۶
۳-۷-۲ برش آنزیمی DNA پلاسمیدی(Restriction mapping) ۶۶-۶۷
۳-۷-۳ روش PCR ۶۷
۳-۷-۴ تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing) ۶۷
۳-۸ ساب کلونینگ قطعه ROP1 در پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ۶۸
۳-۸-۱ برش پلاسمید نوترکیب pT- ROP1 توسط آنزیم های EcoRI و HindIII
وجداسازی قطعه ROP1 ۶۹
۳-۸-۲ برش پلاسمید یوکاریوتیک pcDNA3 توسط آنزیم های EcoRI و HindIII ۶۹-۷۰
۳-۸-۳ اتصال قطعه ROP1 به پلاسمید pcDNA3 ۷۰
۳-۸-۴ انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری E.coli (ترانسفورم کردن باکتری) ۷۰
۳-۹ روش های تاییدکننده کلونینگ قطعه ROP1 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ۷۱
۳-۹-۱ مقایسه پلاسمیدهای pcDNA3 و pcROP1 با الکتروفورز ۷۱
۳-۹-۲ روش PCR ۷۱
۳-۹-۳ مقایسه پلاسمید نوترکیب pcROP1 و پلاسمید pcDNA3 بعد از برش آنزیمی ۷۱
۳-۹-۳-۱ برش پلاسمید نوترکیب pcROP1 با آنزیم های EcoRI و HindIII ۷۱
۳-۹-۴ تعیین توالی مولکول DNA (Sequencing) ۷۲
۳-۱۰ بیان ژن ROP1 در سلول یوکاریوتیک ۷۲

۳-۱۰-۱ انتقال پلاسمید نوترکیب pcROP1 به درون سلول یوکاریوتیک (Transfection) ۷۲-۷۴
۳-۱۱ تایید بیان ژن ROP1 در سلول یوکاریوتیک ۷۴
۳-۱۱-۱ استخراج پروتئین ۷۴
۳-۱۱-۱-۱ تعیین غلظت نمونه های پروتئینی با استفاده از روش برادفورد ۷۴-۷۵
۳-۱۱-۱-۲ تعیین وزن ملکولی پروتئین ها با روش SDS-PAGE ۷۵-۷۹
۳-۱۱-۱-۳ وسترن بلات (Western blot) ۷۹-۸۱
۳-۱۱-۲ RT-PCR ۸۱
۳-۱۱-۲-۱ استخراج RNA ۸۱-۸۲
۳-۱۱-۲-۲ تهیه cDNA از روی RNA ۸۲
۳-۱۱-۲-۳ PCR قطعه ROP1 با استفاده از cDNA تهیه شده از مرحله قبل(RT-PCR) ۸۳
۳-۱۱-۲-۴ الکتروفورز محصول RT-PCR ۸۳
۳-۱۲ ارزیابی ایمنی زایی پلاسمید نوترکیب pcROP1 درموش کوچک آزمایشگاهی ۸۳
۳-۱۲-۱ انتخاب حیوان آزمایشگاهی مناسب ۸۳
۳-۱۲-۲ گروه بندی موشها ۸۳-۸۴
۳-۱۲-۳ ایمن سازی(Immunization) ۸۴
۳-۱۲-۳-۱ نحوه تزریق داخل عضلانی ۸۴-۸۵
۳-۱۲-۳-۲ نحوه مخلوط کردن پلاسمید با آدجونت ها(آلوم و فسفات آلومینیم ($AlPO_4$) ۸۵
۳-۱۲-۴ چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش ها ۸۶
۳-۱۲-۵ بررسی ایمنی هومورال ۸۶
۳-۱۲-۵-۱ آماده سازی آنتی ژن (ST-Ag) ۸۶
۳-۱۲-۵-۲ آماده سازی و استفاده از کیسه دیالیز ۸۷
۳-۱۲-۵-۳ نحوه جمع آوری سرم موشها ۸۷
۳-۱۲-۵-۴ چیکر بورد(Checker board) ۸۷-۸۸
۳-۱۲-۵-۵ آزمایش الایزا غیر مستقیم (Indirect ELISA) ۸۸
۳-۱۲-۵-۶ اندازه گیری ساب تایپ آنتی بادی (Antibody Isotyping) ۸۸
۳-۱۲-۶ بررسی ایمنی سلولی ۸۹
۳-۱۲-۶-۱ روش استخراج لنفوسیت‌ها از طحال موش‌ها ۸۹-۹۰

۳-۱۲-۶-۲ روش کشت سلولهای لنفوسیت طحال موش برای سنجش سایتوکائین ها ۹۰
۳-۱۲-۶-۲-۱ سنجش سایتوکائین(cytokine assay) ۹۳-۹۱
۳-۱۲-۷ ارزیابی آماری نتایج حاصل از آزمایش چالش با سویه RH و ایمنی هومورال و سلولی ۹۳
فصل چهارم: نتایج
۴-۱- نتیجه استخراج DNA ۹۵
۴-۲- نتیجه انجام PCR با استفاده از DNA استخراج شده از انگل ۹۶-۹۵
۴-۳- نتیجه ترانسفورماسیون باکتریها با محصول واکنش اتصال ۹۷-۹۶
۴-۴- نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pT-ROP1 ۹۹-۹۷
۴-۵- نتایج PCR قطعه ROP1 با استفاده از پلاسمید نوترکیب pT-ROP1 ۱۰۰-۹۹
۴-۶- نتایج تعیین توالی (Sequencing) ۱۰۱-۱۰۰
۴-۷- نتیجه ترانسفورماسیون با محصول واکنش اتصال برای ساب کلونینگ ژن ROP1 در پلاسمید بیانی pcDNA3 ۱۰۲
۴-۸- نتایج PCR قطعه ROP1 با استفاده از پلاسمید نوترکیب pc-ROP1 ۱۰۳
۴-۹- نتایج برش آنزیمی پلاسمید بیانی pcDNA3 و پلاسمید نوترکیب pc-ROP1 ۱۰۵-۱۰۴
۴-۱۰- نتایج تعیین توالی ژنی ۱۰۶
۴-۱۱- نتایج ترانسفکت پلاسمید نوترکیب pcROP1 درسلول یوکاریوت ۱۰۷
۴-۱۱-۱- نتایج RT-PCR با RNA استخراج شده از سلولهای ترانسفکت شده با pcROP1 ۱۰۷
۴-۱۱-۲- نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین ها با روش SDS-PAGE ۱۰۸
۴-۱۱-۳- نتایج وسترن بلات ۱۰۹
۴-۱۲- نتایج چالش با سویه با حدت RH و بررسی طول عمر موش ها ۱۱۲-۱۱۰
۴-۱۳- نتایج بررسی ایمنی هومورال ۱۱۳
۴-۱۳-۱ نتایج اندازه گیری IgG (Total IgG) ۱۱۵-۱۱۳
۴-۱۳-۲ نتایج اندازه گیری ایزوتایپ IgG_{2a} ۱۱۶-۱۱۵
۴-۱۴- نتایج بررسی ایمنی سلولی ۱۱۷
۴-۱۴- نتایج سنجش سایتوکائین ها ۱۱۹-۱۱۷
فصل پنجم: بحث و پیشنهادات
۵-۱- بحث ۱۲۶-۱۲۱

۵-۲-پیشنهادات ۱۲۷
منابع و مأخذ: ۱۲۸-۱۳۵

فهرست جداول

عنوان صفحه
جدول(۱-۱): تفاوتهای مورفولوژیک انگل توکسوپلاسما در مراحل مختلف زندگی انگل ۸
جدول(۲-۱):مقایسه تکنولوژی های تهیه واکسن ۲۷
جدول (۲-۲): سیتوکین هایی که به عنوان آدجونت ژنتیکی همراه با واکسنهای DNA استفاده می شوند ۴۷
جدول(۲-۳): آدجونتهای ژنتیکی غیر از سیتوکین ها وآدجونتهای رایج ۴۷
جدول(۳-۱):مقادیر استاندارد در روش برادفورد ۷۵
جدول(۳-۲): نحوه گروه بندی موشها بر اساس نوع ماده تزریقی و تعداد موشها در هر گروه ۸۶
جدول(۴-۱): درصد بقاء و تعداد روزهای زندگی موشهای گروههای مختلف پس از چالش با ۱×۱۰^{۴} تاکی زوئیت زنده توکسوپلاسما گوندی سویه RH ۱۱۱
جدول(۴-۲): میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت مطالعه و مقایسه آنها در طی ۲ نوبت خونگیری ۱۱۳
جدول(۴-۳): مقایسه میانگین OD در آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG_{2a} در سرم موشهای تحت مطالعه ۱۱۵
جدول(۴-۴): مقایسه میانگین مقدارIFN-γ و IL4 در گروههای مختلف ۱۱۷

فهرست شکلها

عنوان صفحه
شکل(۱-۱): تاکی زوئیت انگل توکسوپلاسما گوندی ۷
شکل(۱-۲):آنتی ژنهای توکسوپلاسماگوندی،موقعیت آنها و ژنهایی که آنها را کد می کنند ۱۵
شکل(۱-۳):سیرتکاملی انگل توکسوپلاسما گوندی ۱۵
شکل(۱-۴):مقایسه تاکی زوئیت و برادی زوئیت توکسوپلاسما گوندی ۱۷
شکل(۱-۵):کیست نسجی توکسوپلاسماحاوی برادی زوئیت ۱۸

شکل (۱-۶): اووسیست حاوی دو اسپوروسیست وهشت اسپوروزوئیت ۱۸
شکل(۱-۷) : مراحلی که بعد از خوردن توکسوپلاسماگوندی اتفاق می افتد ۲۲
شکل(۲-۱):انواع راههای تجویز واکسن ژنتیکی ۲۸
شکل(۲-۲) شکل شماتیک یک DNA واکسن ۲۹
شکل(۲-۳): انواع وکتور در DNA واکسن ۲۹
شکل(۲-۴): در این شکل واکنشهای داخل سلولی و بین سلولی در برابر یک
آنتی ژن که منجربه تولیدپاسخ Tc ، Th وآنتی بادی میشود ۳۰
شکل(۳-۱):نقشه ژنتیکی پلاسمید کلونینگ pTZ57R/T ۵۹
شکل(۳-۲):مراحل کلونینگ و غربالگری کلون های ترانسفورم شده ۶۳
شکل(۳-۳): نقشه ژنتیکی پلاسمید یوکاریوتیک بیانی pcDNA3 ۶۸
شکل (۳-۴): آناتومی ماهیچه های Quadriceps و Tibialis پای موش ۸۵
شکل(۴-۱) نتیجه الکتروفورز محصول استخراج DNA بر روی ژل ۰/۸٪ ۹۵
شکل(۴-۲) الکتروفورز محصول PCR با استفاده از DNA ۹۶
شکل(۴-۳): مقایسه باندهای پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های سفید و
کلنی های آبی ۹۷
شکل(۴-۴) و شکل(۴-۵): الکتروفور پلاسمید نوترکیب pT-ROP1 بریده شده
با دو آنزیم بر روی ژل آگاروز ۹۹-۹۸
شکل(۴-۶): الکتروفورز محصول PCR با پلاسمید نوترکیب pT-ROP1 روی ژل
آگاروز ۱٪ ۱۰۰
شکل(۴-۷): توالی ژن ROP1 کلون شده در پلاسمید pT-ROP1 ۱۰۱
شکل(۴-۸):مقایسه باندهای پلاسمید نوترکیب pcROP1 با پلاسمید فاقد
قطعه pcDNA3 ۱۰۲
شکل(۴-۹): الکتروفورز محصول PCR بکمک پلاسمید نوترکیب pcROP1
روی ژل آگاروز ۱٪ ۱۰۳
شکل(۴-۱۰-۱): الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pcDNA3 ۱۰۴
شکل(۴-۱۰-۲): الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcROP1 ۱۰۵
شکل(۴-۱۱): توالی ژن ROP1 کلون شده در پلاسمید pcDNA3 ۱۰۶

شکل(۴-۱۲): الکتروفورز محصول RT-PCR بکمک RNA استخراج شده از
سلولهای CHO ترانسفکت شده باپلاسمید نوترکیب pcROP1 روی ژل آگاروز ۱٪ ۱۰۷
شکل(۴-۱۳): تعیین وزن مولکولی پروتئین ROP1 در SDS-PAGE ۱۰۸
شکل(۴-۱۴): نوارهای نیتروسلولز بدست آمده از روش وسترن بلات با پروتئین سلولهای
CHO ترانسفکت شده و کنترل ۱۰۹

فهرست نمودارها

عنوان

صفحه

نمودار(۳-۱): منحنی استاندار IFN-γ ۹۱
نمودار(۳-۲): منحنی استاندارد IL4 ۹۲
نمودار(۴-۱): نمودار در صد بقاء موشهای گروههای مختلف بعد از چالش ۱۱۲
نمودار (۴-۲): نمودار ستونی میانگین OD سطح توتال IgG در سرم موشهای تحت
مطالعه در ۲ نوبت خونگیری ۱۱۴
نمودار(۴-۳): نمودار ستونی میانگین OD در آزمایش الایزا برای اندازه گیری IgG_{2a} ۱۱۶
نمودار (۴-۴): نمودار ستونی میانگین IFN-γ و IL4 در گروههای مختلف ۱۱۸

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

انگلهای پاتوژن هرساله میلیونها نفررا درسراسرجهان کشته و باعث بیماری ناتوان کننده دربسیاری دیگر میشوند . توکسوپلاسما گوندی نیز یک انگل تک یاخته ای داخل سلولی است که موجب بیماری توکسوپلاسموزیز در انسان و حیوان میشود .این انگل بعد از یک فاز کوتاه حاد وارد فاز نهفته شده که در این مرحله کیستها تشکیل می شود . کیستها بیشتر در بافتهای عصبی و عضلانی مستقر شده و تا پایان عمر میزبان زنده می مانند [۱]. عفونتهای توکسوپلاسمایی در اکثر افراد سالم فاقد علامت و یا همراه علائم خفیف می باشد که شامل تب ، بزرگی غدد لنفاوی و علائم شبه آنفلوانزایی است [۲] . البته در سالهای اخیر تحقیقاتی در زمینه تغییرات شخصیتی ، کاهش عملکرد سایکوموتور و احتمال بیشتر بروز شیزوفرنی در این افراد انجام شده است[۳،۴] . این انگل در افراد با سیستم ایمنی ضعیف علائم شدیدتری ایجاد می کند که شامل انسفالیت ، پنومونی و سایر عوارض است که زندگی را تهدید می نماید[۲] .

عفونت توکسوپلاسموزیز از دو جنبه دامپزشکی و پزشکی حائز اهمیت است. حیوانات علفخوار و اساساً حیواناتی که گوشت و محصولات آنها به مصرف تغذیه انسان می رسد از طریق خاک و گیاهان آغشته به مدفوع گربه آلوده شده که در طی بارداری باعث سقط جنین دام و کاهش فرآورده های دامی می شود بطوریکه زیان ناشی از این بیماری در ایالات متحده سالیانه ۳/۳ میلیارد دلار بر آورد شده است [۵] . از طرفی این انگل علاوه بر ایجاد علائم بالینی در افراد سالم و تشدید علائم نهفته در افراد با ضعف ایمنی مانند افراد مبتلا به ایدز[۵] در زنان باردار نیز باعث سقط جنین ، ناهنجاری و سایر اختلالات تکاملی در جنین می گردد [۶] . شواهد نشان می دهد که آلودگی به توکسوپلاسما از شایعترین عفونتهای انگلی بشر در جهان بوده [۷] بطوریکه تخمین زده شده شکل بدون علامت توکسوپلاسموزیز در ۵۰۰ میلیون تا یک میلیارد نفر از جمعیت انسانی در دنیا وجود دارد [۸] .

از آنجا که انتشار این انگل بسیار وسیع بوده و انتقال آن به راحتی توسط تمام میزبانهای واسط صورت میگیرد به نظر می رسد بهترین راه کاهش زیانهای ناشی از این بیماری پیشگیری از ابتلا انسان و دام به انگل از طریق تهیه داروهای جدید و یا تهیه واکسن مناسب بر علیه بیماری است . تحقیقات متعدد نشان داده که ایمنی ناشی از آلودگی مادر به انگل قبل از بارداری مانع از عبور انگل از جفت شده و در نتیجه جنین محفوظ می ماند . این موضوع نشان می دهد که توقف انتقال جفتی انگل با واکسیناسیون مناسب قبل از حاملگی امکانپذیر است [۹] .مطالعات و تجربیات مختلف نیز نشان داده که احتمال تهیه واکسن مناسب علیه توکسوپلاسموزیز انسانی وجود دارد [۱۰] .

در حال حاضر علی رغم چند دهه تحقیقات و میلیونها دلار هزینه، واکسیناسیون بر علیه عفونتهای انگلی نسبتاً ناموفق بوده است[۱۱]. واکسنهای ارزان و موثری بر علیه انگلهای دامی به صورت تجارتی تهیه و

عرضه می گردند ولی هنوز به واکسنهای با خطر کمتر و موثرتر حتی برای انگلهای تحت کنترل نیاز داریم[۱۲].

تمایل به عدم استفاده از داروهای ضد انگلی افزایش روز افزون دارد .بطور کلی استفاده از دارو برای درمان عفونتهای انگلی در طولانی مدت قابل تحمل و مقرون به صرفه نیست زیرا : باعث ایجاد مقاومت در انگلها شده ، در گوشت و فرآورده های دامی باقی مانده و اثرات سوء در مصرف کننده ایجاد می نمایند و اثرات نامطلوب در محیط بر جای می گذارد[۱۳] .

در مقایسه با داروها ، واکسنها مواد بی خطری و مقرون به صرفه ای هستند زیرا : باقیمانده شیمیایی به جا نگذاشته بنا بر این دوره with-holding برای حیوانات ندارند و از طرفی سازگار با محیط هستند[۱۳،۹].

استراتژی های رایج واکسیناسیون همگی مبتنی بر تولید واکسن با استفاده از عوامل زنده (تضعیف شده یا سالم) و عوامل غیر زنده است که در بسیاری از موارد موفق بوده ولی این استراتژیها برای بسیاری از میکروارگانیسم ها مناسب نبوده و بنابر این استفاده از روشهای جدید مانند استراتژی ملکولی به منظور پیشرفت تولید واکسن ضروری به نظر می رسد [۹]. .

در بیماریهای انگلی نیزتقریباً تمام واکسنهای ضد انگلی که بصورت تجارتی موجود هستند از انگل زنده و یا تضعیف شده تهیه گردیده اند . تمامی این واکسنها: به سختی در آزمایشگاه تولید شده ،گران بوده و تولید آنها فقط بصورت انبوه امکانپذیر است [۱۳] .برای مثال ساده ترین واکسنی که برای پیشگیری از توکسوپلاسموزیز در صنعت دامپروری استفاده می شود واکسن زنده حاوی تاکی زوئیت های تضعیف شده برخی از استرین های انگل است که استفاده از آن برای واکسیناسیون انسان خطرناک است زیرا احتمال فعال شدن آن وجود دارد [۱۴، ۱۳ ، ۱۰] .

استراتژی های جدید (واکسنهای ملکولی) تولید واکسن بر پایه تهیه آنتی ژنهای نوترکیب میکروارگانیسم ها استوار بوده و تحقیقات وسیعی در این زمینه آغاز گردیده است . در این تحقیقات از عامل ژنتیکی ارگانیسم یعنی DNA و یا RNA استفاده می شود. برخی از انواع این واکسنها شامل DNA واکسنها، واکسنهایی با وکتور ویروسی و ترکیبی از این دو است[۱۲]. استفاده از RNA برای تهیه واکسن دارای معایبی است از جمله اینکه: استخراج آن مشکل بوده و پایداری آن نسبت به DNA کمتر است [۱۶،۱۵]. به همین دلیل بیشتر مطالعات با استفاده از DNA انجام می شود . در DNA واکسیناسیون، یک DNA پلاسمید برهنه به درون میزبان تزریق گردیده و سلولهای میزبان پروتئین کد شده را بیان می کنند . این روش یک روش قدرتمند برای القاء پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی اختصاصی است[۱۰،۱۷] . DNA واکسن ها در مقایسه با واکسن های پروتئینی مزایای زیر را دارند [۹ ، ۱۸] :

- ساخت و تولید آنها راحتتر است .

- Ag درحیوانی که واکسیناسیون در آن انجام شده بطور مستقیم تولید شده (همانند یک سیستم یوکاریوت) بنابراین ازمشکل folding نادرست یا فقدان برخی از post translational modifications درنتیجه بیان پروکاریوتی پروتئین های ریکامبینانت اجتناب میشود .
- بیان طولانی مدت آنتی ژن توسط این واکسنها باعث تحریک مداوم سیستم ایمنی می شود .
- این واکسنها باعث تحریک پاسخ ایمنی متفاوت و با کیفیت می شود .
- نیاز به تولید و تخلیص پروتئین ندارند.
- مصرف همزمان این واکسن ها با پلاسمید های کد کننده سیتوکین ها یا ملکولهای محرک ایمنی(آدجوانتها) افزایش یا تعدیل پاسخهای ایمنی علیه آنتی ژن کد شده را به همراه دارد .
- مقاوم به حرارت هستند .
- نیاز به شرایط خاص حمل و نقل و نگه داری ندارند .

البته نتیجه واکسیناسیون به فرمولاسیون واکسن ، مقدار و راه ورود آن ، گونه و حتی استرین میزبان واکسینه شده بستگی دارد . همچنین مکانیسم تاثیر واکسن به نوع تزریق ، راه ورود ، نوع آنتی ژن کد شده ، مقدار DNA و ناقل پلاسمیدی و آدجوانت مورد استفاده بستگی دارد [۱۸، ۱۹] .

در این نوع واکسن خود DNA به عنوان یک آدجوانت عمل نموده و وجود توالی های اختصاصی در DNA ، و وجود عامل غنی از موتیف CpG متیله نشده در وکتور یا افزودن آن به فرمول واکسن ، پاسخ Th1 را به شدت تقویت نموده و فعالیت IL6 , IL12 , IFN-γ را القا می کند [۱۸] .

در سالهای اخیر استراتژی هایی برای افزایش قدرت DNA واکسن ها مورد بررسی قرار گرفته است از جمله آنها : electroporation ، antigen-targeting ، سیتوکین ها ،وکتورهای ویروسی ، لیپوزوم ها یا میکروپارتیکل ها هستند . با اینکه برخی از اینها قادر به افزایش قابل توجه پاسخهای ایمنی ناشی از DNA واکسن ها می باشد ولی استفاده عمومی از آنها به عنوان آدجوانت واکسنی محدودیتهایی دارد . برای مثال electroporation بسیار موثر بوده ولی در انسانها به سادگی قابل استفاده نمی باشد و سیتوکین ها و وکتورهای ویروسی نیز عوارض جانبی داشته و سلامت انسان را به خطر می اندازند . از طرفی نمکهای آلومینیوم که برای واکسن های تجارتی انسانی و دامی بطور وسیع استفاده می شود هنوز به عنوان رایج ترین آدجوانتها محسوب می شوند [۲۰]. جذب آنتی ژنهای پروتئینی به نمکهای آلومینیومی باعث افزایش تحریک پاسخ های ایمنی تیپ Th2 در میزبانهای ایمن سازی شده می شود . مطالعات اخیر نشان داده که نمکهای آلومینیومی که با DNA واکسن ها استفاده می شود می تواند باعث کاهش دوز پلاسمید مورد نیاز برای تحریک پاسخ ایمنی و سوق دادن یا نگهداری پاسخ ایمنی به سمت Th1 شوند [۲۰].