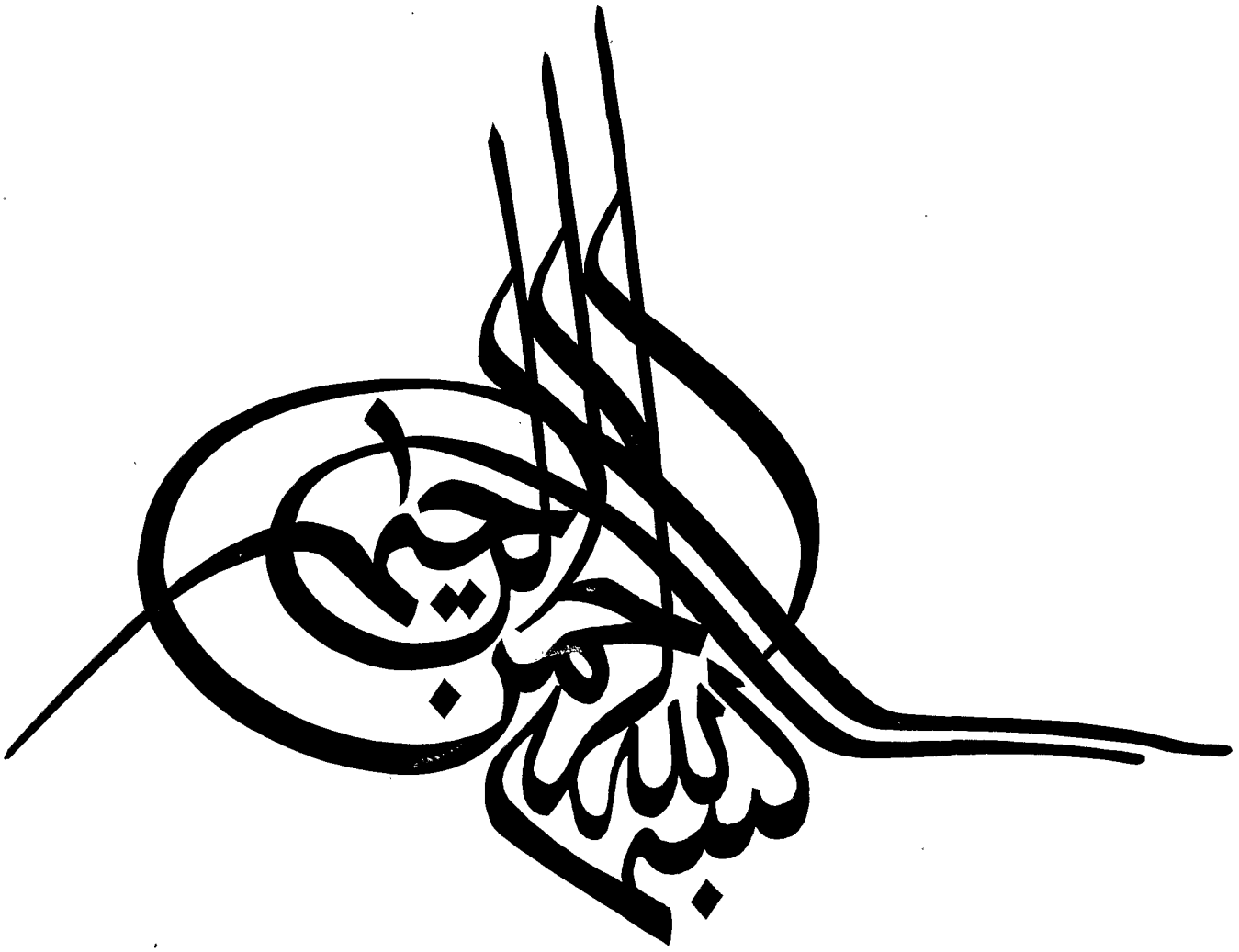

٩٠٨٧٤

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکدهٔ علوم پزشکی

پایان‌نامهٔ دورهٔ کارشناسی‌ارشد بیوشیمی بالینی

موضوع:

آنتی‌بادی نوترکیب برعلیه دیگوکسین با استفاده از فناوری نمایش فاژی و مقایسه خواص آن با آنتی‌بادی منوکلونال هیبریدومایی

نگارش:

بهروز علیرضاپور

استاد راهنما:

دکتر محمدجواد رسایی

استاد مشاور:

دکتر کبری امیدفر

۱۳۸۶/۶/۲۵

زمستان ۱۳۸۵

۹۰۵۷۴

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **آقای بهروز علیرضاپور**

رشته: **بیوشیمی‌بالینی** 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:

جناب آقای دکتر محمدجواد رسایی (استاد راهنما)

سرکار خانم دکتر کبری امیدفر (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر علیرضا مصباح نمین (نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر حسین عبدل تهرانی (استادناظر)

جناب آقای دکتر رسول مدنی (استادناظر)

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های 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 که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های 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 می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود 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 براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل 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 ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

تقدیم به

ساحت مقدس حضرت مهدی (عج)

تقدیم به

پدر و مادر بزرگوارم

به پاس راهی که فراروی نهادند و با فداکاریها و راهنمایی‌های ارزندهٔ خود، پیمودن این مسیر را میسر نمودند.

تقدیم به

خواهران گرامیم

که وجودشان مایهٔ عزت و سرافرازیم می‌باشد.

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که بر این بندهٔ حقیر منت نهاد تا دوره‌ای دیگر از دوران تحصیل علم و کمال را با نتیجهٔ مطلوب و رضایت‌بخش به سرانجام برساند.

حال که با فضل و عنایت خداوند رحمان، موفق به تنظیم و تدوین این پایان‌نامه شده‌ام وظیفه خود می‌دانم از همه عزیزانی که اینجانب را طی انجام این تحقیق کمک و مساعدت نمودند و به نحوی مرا مورد لطف و عنایت خود قرار دادند، مراتب امتنان و تشکر را ابراز نمایم.

از استاد راهنمای گرامی جناب آقای **دکتر محمدجواد رسایی** که با راهنمایی‌های ارزشمند علمی خویش، راهگشای این تحقیق بوده‌اند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

از استاد مشاور گرامی سرکار خانم **دکتر امیدفر** که با همکاریهای صمیمانه و بی‌شائبه خویش مرا در این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

از راهنمایی‌های ارزشمند سرکار خانم **دکتر رجبی** و سرکار خانم **دکتر رهبری‌زاده** تشکر می‌کنم.

از کارشناسان محترم گروههای بیوتکنولوژی پزشکی و بیوشیمی بالینی (خانمها محسنی، افشار، اعتمادی و بناصادق)، اساتید محترم گروههای بیوشیمی بالینی و بیوتکنولوژی پزشکی، دانشجویان محترم (آقایان **احمد آقایی**، چیت‌سازان، علی مطاع کلوانق، یعقوبی چهل‌گز، محمدنژاد آروق، گیل، مقصودی، آتش‌پیکر، صدرالدینی، میرشهابی، خدامی، راز، نژاوند، رحمتی، نادری سهی، احمدوند، محمدی، رجبی معماری، اسماعیلی، خرازیها، صفا، جعفرنژاد، محسنی‌فر، حسن‌نیا، نجارصادقی، شیرعلی، دکتر سیدمجید سیدموسوی، شاکرخطیبی، دهقان بنادکی، پاکروان، مرادی، مریخی، مهدوی [illegible]، فرهادیان اصفهانی، احمد یشیل، میهای چرناتسکو، دکتر سعید گل‌محمدی هریس، رحمانی، دلاوری، بامداد، خوشامن، آقایی و خانمها **بشارتی**، نمک‌چیان، کریمی، رحیم‌پور، زارع، رمضانی، شکوهی تویسرکانی) و از دوستان عزیزم در خوابگاه گلشن و سایر دوستان که دوره کارشناسی‌ارشد را در خدمت آنها بودم، تقدیر و تشکر می‌نمایم.

از پرسنل محترم مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم بیمارستان شریعتی کمال تشکر را دارم.

چکیده

دیگوکسین از داروهای گلیکوزید قلبی است که بطور وسیعی جهت درمان نارسایی احتقان قلبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دیگوکسین دارویی فوق العاده سمی است، به این دلیل مقادیر آن در سرم بیماران تحت درمان باید به طور مداوم اندازه‌گیری شود.

به منظور تولید آنتی‌بادی منوکلونال نوترکیب علیه دیگوکسین، RNA از دو منبع، سلول‌های هیبریدوما و سلول‌های طحال موش ایمن شده با دیگوکسین- BSA استخراج گردید.(موشهای Balb/c با تزریق صفاقی با این آنتی‌ژن پس از ٤-٣ ماه ایمن شدندو ایمن ترین موش جهت تخلیص RNA از بافت طحال انتخاب شد). پس از ساخت cDNA ، ژن زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای زنجیره سبک و سنگین تکثیر گردیدند و سپس با استفاده از روش SOE-PCR ، دو قطعه توسط قطعه اتصالی ۱۵ اسید آمینه‌ای و بر اساس روش تلاطم زنجیره های DNA به طور اتفاقی به یکدیگر متصل شده و ژن تک زنجیره‌ای (scFv) ساخته شد.ژن scFv ساخته شده داخل وکتور فاژمیدی $pCANTAB_{5E}$ کلون شد وسپس به باکتری *E.coli* منتقل گردید. پس از بیان ژن در سطح فاژ، فاژهایی که شکل مناسبی از آنتی‌بادی را در سطح خود نمایش داده بودند به دنبال انجام پنج بار غنی سازی انتخاب گردیدند. سپس با انتقال وکتور فاژمیدی به سویه دیگری از باکتری *E.coli* آنتی بادی محلول تولید گردید و آنتی‌بادی تولید شده از پری‌پلاسم باکتری استخراج گردید. آزمایشات اولیه نشان داد که حیوان ایمن شده قادر به تولید آنتی‌بادی با میل اتصالی بالاتری است، بنابراین scFv حاصل از موش ایمن شده جهت ادامه تحقیقات انتخاب شد.

منحنی استاندارد بین ۱۰۰ pg/ml تا ۱۰۰۰۰۰۰ pg/ml به صورت خطی عمل کرده ولازم به ذکر است که حساسیت روش ۲۷۰pg/ml تعیین گردید. در حالیکه برای آنتی‌بادی منوکلونال هیبریدومایی Pg/ml ۱۰۰ گزارش شده است. در این تحقیق افینیتی آنتی‌بادی کلون برتر (AR۸۵) برای دیگوکسین M^{-1} $3/8\times10^{7}$ محاسبه شد. در حالیکه برای آنتی‌بادی منوکلونال هیبریدومایی M^{-1} $2/6\times10^{8}$ گزارش شده است. از سوی دیگر حد تشخیص نهایی برای آنتی‌بادی نوترکیب ng ۱۰۰۰ در حالیکه برای آنتی‌بادی منوکلونال هیبریدومایی ng ۱۰ گزارش شده است. آزمایشات ما نشان داد که ممکن است آنتی‌بادی منوکلونال نوترکیب خصوصیات مشابهی با آنتی‌بادی منوکلونال هیبریدومایی داشته باشد.

کلمات کلیدی: دیگوکسین، نمایش فاژی، scFv ، SOE-PCR

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱

۱-۱- گلیکوزیدهای قلبی ۲

۱-۱-۱- شیمی ۲

۱-۱-۲- فارماکوکینتیک ۳

۱-۱-۲-۱- جذب و توزیع ۳

۱-۱-۲-۲- متابولیسم و دفع ۳

۱-۱-۳- فارماکودینامیک ٤

۱-۱-٤- اثرات گلیکوزیدها ٦

۱-۱-٤-۱- اثرات گلیکوزیدهای قلبی روی قلب ٦

۱-۱-۵- scFv آنتی‌دیگوکسین و تأثیر آن در رفع مسمومیت ۷

۱-۱-۵-۱ سنجش ELISA برای دیگوکسین ۸

۱-۲- آنتی‌بادی‌ها ۹

۱-۲-۱- تاریخچه ۹

۱-۲-۲- ساختار آنتی‌بادی ۹

۱-۲-۳- ژنتیک آنتی‌بادی ۱۲

۱-۲-٤- کاربرد آنتی‌بادی‌ها ۱۳

۱-۳- تولید آنتی‌بادی‌ها ۱٦

۱-۳-۱- آنتی‌بادی پلی‌کلونال ۱٦

۱-۳-۱-۱- تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ۱٦

۱-۳-۲- آنتی‌بادی مونوکلونال ۱۷

۱-۳-۲-۱- تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ۱۷

۱-۳-۲-۱-۱- روش‌های رایج تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ۱۷

۱-۳-۲-۱-۱-۱- نامیرا کردن سلول‌های B با EBV ۱۷

۱-۳-۲-۱-۱-۲- روش هیبریدوما ۱۸

۱-۳-۲-۱-۱-۳- تولید آنتی‌بادی با تزریق سلول‌های هیبریدوما به حیوان ۱۹
۱-۳-۲-۱-۲- روش‌های نوین تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ۱۹
۱-۳-۲-۱-۲-۱- هیبرید سازی ۲۰
۱-۳-۲-۱-۲-۲- انسانی کردن ۲۰
۱-۳-۲-۱-۲-۳- نمایش فاژی ۲۰
۱-۳-۲-۱-۲-٤- تراریختگی ۲۰
۱-۳-۲-۱-۲-٥- نمایش mRNA-DNA-Protein ۲۱
۱-۳-۲-۱-۲-٦- نمایش ریبوزومی ۲۱
۱-۳-۳- آنتی‌بادی‌های نوترکیب ۲۲
۱-۳-۳-۱- تولید آنتی‌بادی‌های نو ترکیب ۲۲
۱-۳-۳-۱-۱- فناوری نمایش فاژی ۲۳
۱-۳-۳-۱-۲- مراحل کلی انجام آزمایش نمایش فاژی آنتی‌بادی ۲٤
۱-۳-۳-۱-۳- استخراج و تکثیر ژن آنتی‌بادی ۲۸
۱-۳-۳-۱-٤- SOE-PCR ۲۹
۱-۳-۳-۱-٥- طراحی Linker ۳۱
۱-۳-۳-۱-٦- طراحی پرایمر ۳۲
۱-۳-۳-۱-۷- انتقال ژن یا کلون‌سازی ۳۳
۱-۳-۳-۱-۷-۱- وکتورهای مناسب به منظور کلون کردن ژن‌های آنتی‌بادی ۳۳
۱-۳-۳-۱-۷-۲- باکتریوفاژ M13 ..... ۳٤
۱-۳-۳-۱-۷-۳- ساختمان باکتریوفاژ ۳٥
۱-۳-۳-۱-۷-٤- ژنوم باکتریوفاژ ۳٥
۱-۳-۳-۱-۷-٥- آلوده سازی باکتری ۳٥
۱-۳-۳-۱-۷-٦- وکتورهای مشتق شده از M13 ..... ۳٦
۱-۳-۳-۱-۸- مرحله انتخاب (Selection) ۳۸
۱-۳-۳-۱-۸-۱- انتخاب یا غنی سازی به روش Biopanning ۳۹
۱-۳-۳-۱-۸-۱-۱- انتخاب بر اساس میل پیوندی آنتی‌بادی به یک آنتی‌ژن (Simple target) ۳۹

۱-۳-۳-۱-۸-۱-۲- انتخاب بر اساس میل پیوندی آنتی‌بادی به مجموعه‌ای از آنتی‌ژن‌ها (Complex target)..... ٤٠
۱-۳-۳-۱-۸-۱-۳- انتخاب یا غنی سازی فاژ پس از پردازش (Phage processing)..... ٤١
۱-۳-۳-۱-۸-۲- انتخاب کارامد فاژ و یا انتخاب لیگاند بر اساس بیان (LIVE)..... ٤٢
۱-۳-۳-۱-۸-۳- جداسازی..... ٤٣
۱-۳-۳-۱-۸-٤- نکات مرحله غنی‌سازی..... ٤٣
۱-۳-۳-۱-۸-٥- ارزیابی پیشرفت مرحله انتخاب..... ٤٤
۱-۳-۳-۱-۹- تولید آنتی‌بادی محلول..... ٤٥
۱-۳-۳-۱-۹-۱- استخراج آنتی‌بادی محلول..... ٤٥
۱-۳-۳-۱-۱۰- غربالگری..... ٤٥
۱-۳-۳-۱-۱۱- تکنولوژی نمایش فاژ، یک ابزار چند منظوره..... ٤٧
۱-٤- کتابخانه ژن آنتی‌بادی..... ٤٧
۱-٤-۱ انواع کتابخانه‌های ژنی..... ٤٨
۱-٤-۱-۱ کتابخانه ژنی ایمن..... ٤٩
۱-٤-۱-۲- کتابخانه اولیه..... ٤٩
۱-٤-۱-۳- کتابخانه مصنوعی..... ٥٠
۱-٥- افزایش قدرت اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن ٥١
۱-٥-۱- بلوغ میل پیوندی..... ٥١
۱-٥-۲- افزایش ظرفیت آنتی‌بادی یا Avidity..... ٥١
فصل دوم: مواد و روشها ٥٣
۲-۱- مواد، محلولها، محیط کشت و تجهیزات مورد نیاز..... ٥٤
۲-۱-۱- مواد..... ٥٤
۲-۱-۲- محلول ها و بافرها..... ٥٤
۲-۱-۳- محیط‌های کشت..... ٥٦
۲-۱-٤- تجهیزات مورد نیاز..... ٥٨
۲-۲- کشت ، ذخیره‌سازی و ارزیابی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه Digoxin در سلولهای هیبریدومایBBA..... ٥٨
۲-۲-۱ کشت سلولهای منجمد شده (cell revival) ٥٨

۲-۲-۲ تعیین درصد زنده بودن..... ٦٠
۲-۲-۳ شمارش سلولی..... ٦٠
۲-۲-٤ روش ذخیره سازی سلولها..... ٦١
۲-۲-٥- ارزیابی تولید آنتی‌بادی ترشحی از سلولهای هیبریدومای BBA..... ٦١
۲-۳- روش ایمونیزاسیون و خونگیری ازموش..... ٦٢
۲-۳-۱- ایمونیزاسیون..... ٦٢
۲-۳-۲- خونگیری از موش..... ٦٣
۲-۳-۳- ارزیابی تولید آنتی‌بادی برای تیتر کردن سرم موش ایمن..... ٦٣
۲-٤- تخلیص RNA..... ٦٣
۲-٤-۱- مراحل استخراج RNA توتال با استفاده از کیت Qiagene..... ٦٤
۲-٤-۲- روش استخراج RNA توتال از طحال..... ٦٥
۲-٤-۳- اندازه‌گیری غلظت RNA توتال..... ٦٦
۲-٤-٤- الکتروفورز RNA..... ٦٧
۲-٥- ساخت cDNA..... ٦٨
۲-٦- تکثیر ژن VH,VL با روش PCR..... ٦٩
۲-٦-۱- آماده سازی پرایمرها..... ٦٩
۲-٦-۲ PCR اولیه..... ٦٩
۲-٦-۳- لیست پرایمرها..... ٧٠
۲-٦-٤- روش انجام PCR اولیه..... ٧٢
۲-٦-٥- ارزیابی محصول PCR..... ٧٣
۲-٦-٦- استخراج DNA تکثیر یافته از ژل..... ٧٣
۲-٦-۷- مراحل استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت Bioneer..... ٧٣
۲-٦-۸- اندازه‌گیری میزان ژن VH,VL..... ٧٥
۲-٦-۹- اتصال قطعات سبک و سنگین (VH,VL)به یکدیگر و ساخت ژن تک زنجیره‌ای بخش متغیر(scFv)..... ٧٦
۲-٦-۱۰- ساخت کتابخانهٔ فاژمیدی برای scFv موشی..... ٧٧
۲-۷- استخراج پلاسمید (فاژمید)..... ٧٩

۲-۷-۱- مراحل استخراج پلاسمید ۷۹

۲-۷-۲- الکتروفورز محصول پلاسمید استخراج شده ۸۰

۲-۷-۳- ارزیابی کمی میزان پلاسمید ۸۰

۲-۸- هضم آنزیمی ۸۱

۲-۸-۱- برش آنزیمی وکتور و ژن تک‌زنجیره بخش متغیر(scFv) ۸۱

۲-۸-۱-۱- برش با آنزیم SfiI ۸۱

۲-۸-۱-۲- برش با آنزیم NotI ۸۲

۲-۸-۱-۳- غیرفعال کردن آنزیمها ۸۲

۲-۸-۲- ارزیابی کیفیت هضم آنزیمی ۸۲

۲-۸-۳- استخراج وکتور scFv هضم شده از ژل ۸۲

۲-۹- کلون کردن scFv موشی در وکتور فاژمیدی pCANTAB 5E ۸۳

۲-۹-۱- ارزیابی کمی وکتور وscFv بریده شده ۸۳

۲-۹-۲- تعیین نسبت مولی وکتور و scFv ۸۳

۲-۹-۳- عمل چسباندن قطعه ۸٤

۲-۹-٤- تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش الکتریکی ۸٤

۲-۹-٥- آماده‌سازی DNA جهت انتقال الکتریکی ژن به میزبان باکتری ۸٥

۲-۹-٦- انتقال الکتریکی ژن ۸٦

۲-۹-۷- ذخیره سازی باکتری دستکاری شده ۸۷

۲-۹-۸- تأیید اتصال قطعات ژن آنتی‌بادی و DNA فاژمیدی ۸۸

۲-۱۰- رهاسازی اعضاء کتابخانه به شکل فاژی ۸۸

۲-۱۰-۱- تهیه فاژ کمکی ۸۸

۲-۱۰-۲- تعیین تیتر فاژ کمکی تولید شده ۹۰

۲-۱۰-۳- مراحل رها سازی ۹۰

۲-۱۰-٤- جداسازی و تغلیظ فاژ نوترکیب ۹۱

۲-۱۱- تهیه ایمونوژن: اتصال دیگوکسین به BSA ۹۱

۲-۱۲- غنی‌سازی (Panning) ۹۳

۲-۱۲-۱- مراحل غنی‌سازی با استفاده از آنتی‌ژن پوشیده بر سطوح پلیت الایزا ۹٤
۲-۱۲-۲- آلوده‌سازی مجدد باکتری با فاژ نوترکیب ۹٥
۲-۱۲-۳- تکرار مراحل غنی‌سازی و ارزیابی موفقیت غنی سازی ۹٦
۲-۱۲-٤- فاژ- الایزا برای محصولات غنی‌سازی (فاژهای پلی‌کلونال) ۹۷
۲-۱۳- غربالگری فاژمیدهای دلخواه و تعیین خصوصیات آنها ۹۸
۲-۱۳-۱- فاژ الایزا برای غربال فاژهای منوکلونال دلخواه ۹۸
۲-۱۳-۲- غربالگری قطعات آنتی‌بادی بوسیله الایزا ۹۹
۲-۱٤- تهیه قطعه آنتی‌بادی محلول ۱۰۰
۲-۱٤-۱- کشت و تعیین بازده تولید پروتئین نوترکیب ۱۰۰
۲-۱٤-۲- استخراج قطعات آنتی‌بادی از فضای پری پلاسمی ۱۰۱
۲-۱٤-۳- تغلیظ ۱۰۲
۲-۱٥- انجام تست‌های تعیین خصوصیت با استفاده از scFv های استخراج شده از فضای پری‌پلاسمی باکتری ۱۰۲
۲-۱٥-۱- انجام SDS-PAGE برای بررسی scFv استخراج شده از فضای پری‌پلاسمی ۱۰۲
۲-۱٥-۲- انجام دات- بلات بر scFv استخراج شده از فضای پری‌پلاسمی ۱۰٥
۲-۱٥-۳- تهیه محلول استاندارد ذخیره و سایر محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف در بافر و سرم ۱۰٥
۲-۱٥-٤- رسم منحنی استاندارد جهت آنتی‌بادی منوکلونال نوترکیب استخراج شده از پری‌پلاسم باکتری به روش ELISA با آنزیم HRP (رقابتی) ۱۰٦
۲-۱٥-٥- محاسبه تمایل یا افینیتی برای آنتی‌بادی منو کلونال نوترکیب استخراج شده از پری‌پلاسم باکتری ۱۰۸
۲-۱٥-٦- تعیین توالی ژن scFv کلون شده ۱۰۹
فصل سوم: نتایج ۱۱۰
۳-۱- نتایج ELISA محلول روئی سلولهای هیبریدومای BBA تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال علیه Digoxin ۱۱۱
۳-۲- نتایج حاصل از ELISA سرم پلی کلونال موش ایمن ۱۱۲
۳-۳- نتایج تهیه آنتی بادی scFv موشی با فناوری نمایش فاژی ۱۱۲
۳-۳-۱- استخراج و تکثیر ژن آنتی بادی ۱۱۲
۳-۳-۱-۱- نتایج حاصل از قرائت جذب نوری RNA بدست آمده از سلولهای هیبریدوما با استفاده از دستگاه بیوفوتومتر ۱۱۲

۳-۳-۱-۲- تایج حاصل از قرائت جذب نوریRNA بافت طحال ۱۱۳
۳-۳-۱-۳- نتیجه الکتروفورز RNA و cDNA از سلول های هیبریدومائی و بافت طحال ۱۱۳
۳-۳-۱-٤- نتایج PCR اولیه قطعه ژنی VL-L (VLمتصل به لینکر) و VH-L (VH متصل بـه لینکـر) از مخـزن ژنـی سلول های هیبریدوما ۱۱۵
۳-۳-۱-۵- نتایج PCR اولیه قطعه ژنی VL-L (VLمتصل به لینکر) و VH-L (VH متصل به لینکر) از مخزن ژنی بافت طحال موش ایمن ۱۱٦
۳-۳-۱-٦- غلظت محصول تخلیص شده از ژل برای VH-L و VL-L ۱۱٦
۳-۳-۱-۷- نتیجه SOE-PCR و ساخته شدن قطعه ژنی scFv از مخزن ژنی سلول های هیبریدوما ۱۱۷
۳-۳-۱-۸- نتیجه SOE-PCR و ساخته شدن قطعه ژنی scFv از مخزن ژنی بافت طحال موش ایمن ۱۱۸
۳-۳-۱-۹- غلظت محصول تخلیص شده از ژل برای scFv ۱۱۸
۳-۳-۲- نتایج ساخت کتابخانه فاژمیدی ۱۱۹
۳-۳-۲-۱- ارزیابی کمی پلاسمید ۱۱۹
۳-۳-۲-۲- نتیجه الکتروفورز پلاسمید (فاژمید) $pCANTAB_{SE}$ استخراجی از باکتری E.Coli سویه TG1 ..... ۱۱۹
۳-۳-۲-۳- نتیجه برش آنزیمی وکتور فاژمیدی ($pCANTAB_{SE}$) ۱۲۰
۳-۳-۲-٤- تخلیص وکتور و scFv هضم شده با آنزیم ۱۲۰
۳-۳-۲-۵- نتیجه اتصال scFv به وکتور و الکترو پوریشن به داخل باکتری ۱۲۱
۳-۳-۲-۵-۱- نتایج ترانسفورماسیون ۱۲۲
۳-۳-۲-۵-۲- تفسیر نتایج ترانسفورماسیون ۱۲۲
۳-۳-۲-۵-۳- بررسی کیفیت عملکرد اتصال آنزیم لیگاز ۱۲٤
۳-۳-۲-۵-٤- کیفیت الکتروپوریشن ۱۲۵
۳-۳-۳- نتایج غنی سازی ۱۲۵
۳-۳-٤- نتایج انتخاب فاژمیدهای دلخواه و تعیین خصوصیات آنها ۱۲۷
۳-۳-٤-۱- غربالگری فاژمیدها ۱۲۷
۳-۳-٤-۲- غربالگری scFv های محلول ۱۲۸
۳-۳-٤-۳- DOT BLOT و SDS – PAGE ۱۲۹
۳-۳-٤-٤- منحنی استاندارد ۱۳۰

۳-۳-٤-٥- تمایل یا افینیتی (Affinity) ۱۳۲
۳-۳-٤-٦- نتایج تعیین توالی ژن scFv ۱۳۲
۳-۳-٤-۷- نتایج بدست آمده از آنتی‌بادی منوکلونال هیبریدومایی ۱۳۳
۳-۳-٤-۸- مقایسه نتایج بدست آمده از آنتی‌بادی منوکلونال نوترکیب AR85 با آنتی‌بادی منوکلونال هیبریدومایی ۱۳۳
فصل چهارم : بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۳٤
٤-۱- بحث و نتیجه‌گیری ۱۳٥
٤-۲- پیشنهادها ۱٤٦
فهرست منابع ۱٤۸