بسم الله الرحمن الرحيم

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست فناوری گرایش میکروبی

بررسی و کلونینگ قطعات با آنتی ژنسیته‌ی بالا از آلفا توکسین *Clostridium novyi* تیپ A

استادان راهنما:

دکتر علی مخدومی کاخکی

دکتر محسن فتحی نجفی

پژوهشگر:

نجمه گردنوشهری

اسفند ۹۲

تشکر و قدردانی:

پروردگارا، تو را در بسیاری از لحظات این پایان نامه حس کردم ، سپاسگزارم که فرصتی را به من عطا کردی تا در این راه قدم بگذارم .

بی شک بدون کمک انسان های که در اطرافم هستند انجام این پایان نامه غیر ممکن بود.

استاد گرامی آقای دکتر نجفی ، در پایان نامه ای که استاد راهنمای آن هستید، شما بزرگترین نقش را دارید، شما لذت انجام موفقیت آمیز اولین کار علمی دوران زندگی ام را به من دادید. بدون راهنمایی های شما تامین این پایان نامه بسیار مشکل می نمود.

آقای دکتر مخدومی از کمک های علمی و حمایت های شما در انجام این پایان نامه بسیار سپاسگزارم.

از سرکار خانم مجیدی ،کارشناس ارشد سرم سازی رازی به دلیل یاری ها و راهنمایی هایشان که بسیاری از سختی ها را برایم آسانتر می نمود، سپاسگزارم، همچنین از آقای مهرورز و خانم شعبان بابت کمک های دوستانه اشان ممنون هستم.

اساتید فرزانه، آقای دکتر مشرقی و آقای دکتر دهقانی از این که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدید؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

و

عمیق ترین قدردانی من از خانواده ام هست. زمانی که با آن ها می گذراندم، بسیاری از فشار ها را از من دور می کرد. پدر و مادرم عزیزم شما یک منبع تمام نشدنی از حمایت های روحی و معنوی در طول زندگی ام هستید.

نجمه گردنوشهری

۱۳۹۲

تقدیم به

پدر و مادرم به پاس عشق و صبوری

بی پایانشان

چکیده:

باکتری *Clostridium novyi* سیتو توکسینی به نام آلفا توکسین تولید می کند که با وزن مولکولی حدود ۲۵۰-۲۰۰ کیلو دالتون دارای فعالیت آنزیمی بوده و بر روی گیرنده های Rho سلول های پستانداران تاثیر می گذارد و عامل خونریزی رگ ها و گرد شدن سلول ها در محیط کشت است. بررسی های ایمونولوژیکی نشان می دهد که قسمت کوچک از یک آنتی ژن می تواند سیستم ایمنی را علیه کل آنتی ژن تحریک کند به همین دلیل همسانه سازی (کلون) ناحیه از پروتئین که آنتی ژنسیته ی بالا دارد، امکان جدیدی برای ایمنی علیه توکسین های کشنده است. مرحله‌ی کلیدی این روش شامل شناسایی و انتخاب ناحیه‌ی آنتی ژنیک توکسین می باشد. هدف از این مطالعه به کارگیری ترکیبی از روش های بیوانفورماتیک، زیست شناسی مولکولی و تهیه پروتئین نوترکیب به منظور تولید پروتئین با آنتی ژنسیته‌ی بالا می باشد.

ابتدا قطعات با آنتی ژنسیته ی بالا براساس مطالعات بیوانفورماتیکی و ساختار دوم پروتئین انتخاب و پرایمرهای اختصاصی به منظور تکثیر این قطعات طراحی گردید. قطعات تکثیر شده در وکتور کلونینگ pTZ57RT وارد و سپس در وکتور بیانی pET21a(+) کلون گردید. پلاسمید حاوی قطعه به وسیله‌ی PCR تایید گردید. پس از بیان پروتئین نوترکیب، با استفاده از سولفات آمونیوم پروتئین رسوب داده شد و به وسیله کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی نیمه خالص گردید و خصوصیات آ نتی ژنیک پروتئین با تست های (د ات بلات، وسترن بلات و الایزا) تایید گردید. سپس به منظور بررسی ایمونوژنسیته پروتئین به موش تزریق گردید و سرم حیوان با هدف انجام واکنش متقاطع با توکسین و پروتئین نوترکیب جمع آوری گردید.

نتیجه ی تست های ایمونولوژی آنتی بادی تولید شده بر علیه پروتئین نوترکیب، میل ترکیبی بالایی را در مقایسه با توکسین طبیعی نشان داد. به نظر می رسد، روش های بر پایه‌ی بیوانفورماتیک می تواند

احتمال انتخاب قطعاتی با پتانسیل بالای ایمونوژنسیته را افزایش دهند. این استراتژی روشی برای تولید پپتید واکسن و آنتی بادی برای تست تشخیصی و یا تولید لیگاند برای خالص سازی آنتی بادی ها یا پروتئین ها طبیعی به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی می باشد.

کلمات کلیدی : نواحی آنتی ژنیک، ساختار دوم پروتئین، آلفا توکسین، کلستریدیوم نویی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مروری بر منابع ۱
۱-۱- خانواده کلستریدیا: ۱
۱-۱-۱-کلستریدیا موثر بر اعصاب: ۲
۱-۱-۲-کلستریدیا موثر بر بافت ها: ۲
۱-۱-۳-کلستریدیای تولید کننده ی انتروتوکسین: ۲
۱-۲- معرفی جنس Clostridium novyi ۳
۱-۳-توکسین های باکتریایی: ۵
۱-۴-توکسین های Clostridium novyi ۵
۱-۵-توکسین های خانواده ی بزرگ کلستریدیومی: ۷
۱-۵-۱- ساختار دمین توکسین های بزرگ کلستریدیومی : ۸
۱-۵-۲-تشابه توکسین های بزرگ کلستریدیومی: ۹
۱-۵-۳-عملکرد توکسین های بزرگ کلستریدیومی: ۹
۱-۵-۴-زیرخانواده پروتئین های Rho: ۱۱
۱-۵-۵-گیرنده ی سطح سلولی توکسین: ۱۴
۱-۵-۶-اندوسیتوز به واسطه ی گیرنده و انتقال از غشا: ۱۴
۱-۵-۷-تغییرات دخول به سلول هدف: ۱۶
۱-۵-۸-سازمان یابی دمین آنزیمی : ۱۶
۱-۵-۹-دمین متصل به سوبسترا: ۱۷
۱-۵-۱۰-توکسین های بزرگ کلستریدیومی بعنوان ابزاری در بیولوژی سلولی: ۱۷
۱-۶-خصوصیات کلی آلفا توکسین: ۱۸
۱-۷-اثر آلفا توکسین بر بافت ها و اندام ها: ۱۸
۱-۸-اثر آلفا توکسین بر کشت سلول: ۲۰
۱-۹-رابطه ی باکتریوفاژ ها با تولید آلفا توکسین: ۲۰
۱-۱۰-قدرت برهمکنش میان آنتی ژن-آنتی بادی ۲۱
۱-۱۱-آنتی ژنسیته: ۲۲
۱-۱۲-ایمنی زایی: ۲۲
۱-۱۳-اپی توپ (شاخص آنتی ژنی): ۲۳
۱-۱۴-اپی توپ ها غالب : ۲۳
۱-۱۵-انواع اپی توپ از نظر ساختمان: ۲۳
۱-۱۶-پیش بینی نواحی آنتی ژنیک: ۲۵
۱-۱۷-آنتی بادی ها: ۲۵
۱-۱۸-فناوری DNA نوترکیب: ۲۷
۱-۱۸-۱-کلونینگ: ۲۷
۱-۱۸-۲-حامل های کلون ۲۸

۱-۱۸-۳-انتخاب میزبان مناسب ۲۹
۱-۱۸-۴-حامل های بیان ژن ۳۰
۱-۱۸-۵-ترانسفورماسیون و انتخاب: ۳۱
۱-۱۸-۶-عوامل موثر بر میزان بیان پروتئین نوترکیب: ۳۳
۱-۱۹- واکسیناسیون ۳۳
۱-۱۹-۱-واکسن های زیرواحدی(ساب یونیت) ۳۴
۱-۱۹-۲- واکسن های پپتیدی: ۳۵
۱-۲۰-واکسن های کلستریدیوم نوئی: ۳۵
۱-۲۱-نقش آنتی ژن های نوترکیب در تولید واکسن ها: ۳۶
۱-۲۳-جداسازی و خالص سازی پروتئین ها : ۳۷
۱-۲۴-مروری بر تحقیقات گذشته: ۳۸
۱-۲۰-اهداف تحقیق: ۳۹
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۴۰
۲-۱-تهیه باکتری Clostridium novyi تیپ A ۴۰
۲-۲-تایید مولکولی Clostridium novyi تیپ A ۴۱
۲-۳-استخراج DNA کروموزومی ۴۱
۲-۴-۱-مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی پرایمرهای اختصاصی ۴۲
۲-۴-۲-تهیه پرایمر ۴۳
۲-۵-تکثیر قطعات مختلف از ژن آلفا توکسین توسط PCR ۴۴
۲-۶-کنترل کیفیت و کمیت DNA مورد آزمون ۴۴
۲-۶-۱ -الکتروفورز روی ژل آگارز ۴۴
۲-۶-۲-تعیین کمیت DNA: ۴۵
۲-۷-تکثیر DNA توسط PCR: ۴۵
۲-۸-استخراج محصول PCR از ژل آگارز ۴۷
۲-۹- کلون کردن محصول PCR به روش T/A کلونینگ ۴۸
۲-۹-۱-اجزای کیت T/A کلونینگ محصول PCR ۴۹
۲-۱۰-محیط های کشت باکتری: ۵۰
۲-۱۰-۱-محیط کشت LB مایع: ۵۰
۲-۱۰-۲-محیط کشت LB جامد: ۵۱
۲-۱۰-۳-محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین: ۵۱
۲-۱۰- تهیه سلول مستعد: ۵۱
۲-۱۲- مراحل انجام کلونینگ: ۵۲
۲-۱۲-۱-واکنش الحاق قطعات به ناقل pTZ57R/T ۵۲
۲-۱۲-۲-انتقال ناقل به باکتری مستعد Ecoli: ۵۳
۲-۱۲-۳-غربالگری سلول های نوترکیب: ۵۴
۲-۱۳-تایید همسانه سازی ژن درون ناقل pTZ57R/T ۵۴
۲-۱۳-۱-استخراج سریع پلاسمید: ۵۵
۲-۱۳-۲-تایید کلنی های حاصل با روش PCR: ۵۵
۲-۱۴-۱-استخراج پلاسمید به روش قلیایی ۵۶

۲-۱۴-۲-تعیین کمیت و کیفیت پلاسمید های استخراجی: ۵۷
۲-۱۵-القای بیان ژن ۵۸
۲-۱۵-۱-هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعه مورد نظر ۶۰
۲-۱۵-۲-هضم آنزیمی وکتور بیانی pET21 ۶۱
۲-۱۵-۳-استخراج DNA از روی ژل آگارز ۶۱
۲-۱۶-واکنش الحاق قطعات به ناقل pET21a(+): ۶۱
۲-۱۶-۱-آماده سازی اجزای واکنش الحاق سیستم بیانی ۶۲
۲-۱۷- آنالیز pET و pTZ57RT نوترکیب ۶۳
۲-۱۸-القای سیستم بیانی: ۶۳
۲-۱۹-استخراج پروتئین های نوترکیب: ۶۵
۲-۲۰-شناسایی پروتئین ها ۶۵
۲-۲۰-۱-شناسایی پروتئین ها به روش الایزا (ELISA) ۶۵
۲-۲۰-۲-شناسایی پروتئین ها توسط SDS-PAGE ۶۷
۲-۲۰-۲-۱-تهیه ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۶۸
۲-۲۰-۲-۲-رنگ آمیزی با نیترات نقره ۷۰
۲-۲۰-۳-شناسایی پروتئین‌ها به روش دات بلات ۷۱
۲-۲۰-۴-شناسایی پروتئین‌ها توسط وسترن بلات ۷۲
۲-۲۱-خالص سازی پروتئین نوترکیب: ۷۴
۱-۲۱-۲-رسوب دهی با آمونیوم سولفات ۷۴
۱-۲۱-۲- کروماتوگرافی فیلتراسیون توسط ژل: ۷۴
۲-۲۲- تولید آنتی بادی پلی کلونال موشی علیه پروتئین نوترکیب ۷۷
۲-۲۳-واکنش متقاطع ۷۸
فصل سوم: نتایج ۷۹
۳-۱-بررسی رشد باکتری کلستریدیوم نویی تیپ A ۷۹
۳-۲-استخراج DNA ژنومی از باکتری کلستریدیوم نوئی تیپ A ۸۰
۳-۳-مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی پرایمرهای اختصاصی: ۸۱
۳-۴-تکثیر قطعات مختلف از ژن آلفا توکسین توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز ۹۶
۳-۵-خالص سازی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز ۹۷
۳-۶- T/A کلونینگ ۹۸
۳-۷-تایید همسانه سازی ژن درون ناقل pTZ57R/T ۹۸
۳-۸-تعیین کمیت و کیفیت پلاسمید های استخراجی: ۱۰۱
۳-۹-القای بیان ژن ۱۰۲
۳-۹-۱- هضم آنزیمی دوگانه پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعه ۱و ۶ ۱۰۲
۳-۹-۲- کلونینگ در سیستم بیانی ۱۰۴
۳-۹-۳-تایید انتقال ناقل های نوترکیب به BL21 ۱۰۴
۳-۱۰-آنالیز pET و pTZ57RT نوترکیب: ۱۰۶
۳-۱۱- شناسایی اولیه پروتئین نوترکیب قطعه ی ۱ و ۶ توسط تست دات بلات ۱۰۹
۳-۱۲-شناسایی کیفی پروتئین نوترکیب به وسیله SDS-Page ۱۰۹
۳-۱۳-وسترن بلات قطعه پروتئین نوترکیب: ۱۱۰

۳-۱۴- آزمایش کمی اتصال آنتی ژن نوترکیب قطعات ATF1 و ATF6 با آنتی بادی اختصاصی ۱۱۱
۳-۱۵- خالص سازی پروتئین نوترکیب :..... ۱۱۲
۳-۱۵-۱-کروماتوگرافی فیلتراسیون توسط ژل:..... ۱۱۳
۳-۱۶-تولید آنتی بادی اختصاصی RPATF1 و RPATF2..... ۱۱۴
۳-۱۶-۱-واکنش متقاطع جهت تولید آنتی بادی اختصاصی RPATF1 و RPATF2 ..... ۱۱۴
۳-۱۶-۲-بررسی تولید آنتی بادی اختصاصی rATF1 و rATF6 توسط وسترن بلات..... ۱۱۶
۳-۱۶-۳-مقایسه کمی آنتی ژنسیته آنتی ژن آلفا توکسین با آنتی ژن های نوترکیب RPATF1 و RPATF6 ..... ۱۱۷
فصل چهارم: بحث..... ۱۲۲
پیشنهادات..... ۱۳۰
فصل پنجم: پیوست..... ۱۳۶

فهرست اشکال

شکل ۱- ۱- بیماری های ناشی از خانواده ی کلستریدیا در نشخوارکنندگان ۲
شکل ۱- ۲- سازمان بندی دمین های توکسین های گلیکوزیله کننده ی کلستریدیومی ۹
شکل ۱- ۳– مدل فعالیت گلوکوزیل ترانسفرازی توکسین های بزرگ کلستریدیومی ۱۰
شکل ۱- ۴- نتیجه ی عملکرد توکسین های کلستریدیومی ۱۳
شکل ۱- ۵- مدل دخول و تغییرات داخل سلولی سیتوتوکسین های بزرگ کلستریدیومی ۱۵
شکل ۱- ۶- گوشت آلوده به باکتری C.novyi ۱۹
شکل ۱- ۷-مقطع پارافینی از نمونه ی گوشت آلوده به C.novyi ۱۹
شکل ۱- ۸-اثر آلفا توکسین روی سلول های Vero ۲۰
شکل ۱- ۹– اپی توپ های خطی و ناپیوسته ۲۴
شکل ۱- ۱۰- ساختار شماتیک آنتی بادی ۲۷
شکل ۲- ۱- نقشه پلاسمید pTZ57R/T و مکان های برشی آن ۴۹
شکل ۲- ۲- نقشه pET-21a(+) (Novagene) و مکان های برشی آن ۵۹
شکل ۲- ۳- مراحل الایزای غیر مسنقیم ۶۶
شکل ۲- ۴-مراحل بستن ساندویچ وسترن بلات ۷۳
شکل ۲- ۵- محدوده ی وزن مولکولی برای بستر کروماتوگرافی فیلتراسیون ۷۶
شکل ۲- ۶-تزریق پروتئین نوترکیب به موش ۷۷
شکل ۳- ۱- رشد باکتری کلستریدیوم نویی ۸۰
شکل ۳- ۲- نتایج اسپکتروگرام و الکتروفورز استخراج DNA ۸۱
شکل ۳- ۳– نتایج بلاست توالی آلفا توکسین کلستریدیوم نویی در NCBI ۸۲
شکل ۳- ۴- نتایج همتراز سازی توالی های مختلف آلفا توکسین با نرم افزار مگا۵ ..... ۸۲
شکل ۳- ۵- نتایج حاصل از ترجمه ژن آلفا توکسین در نرم افزار ExPASy ۸۵
شکل ۳- ۶- پیش بینی نواحی هضم آنزیمی ژن آلفا توکسین ۸۶
شکل ۳- ۷- پیش بینی ساختار دوم آلفا توکسین با نرم افزار CLC Main Workbench 6.8.2 ..... ۸۹
شکل ۳- ۸- پیش بینی نقشه آنتی ژنسیته آلفا توکسین ۹۱
شکل ۳- ۹- پیش بینی نقشه هیدروفوبیسیته آلفا توکسین ۹۲
شکل ۳- ۱۰- پیش بینی جرم مولکولی پروتئین نوترکیب ATF1 با استفاده از ابزار ProtParam ۹۵
شکل ۳- ۱۱- ژل الکتروفورز حاصل از واکنش زنجیره ای قطعات مورد نظر ۹۷
شکل ۳- ۱۲– نتایج T/A کلونینگ ۹۸
شکل ۳- ۱۳- تایید pTZ57RT/ATF1، pTZ57RT/ATF4 و pTZ57RT/ATF5 در DH5α ۹۹
شکل ۳- ۱۴- تایید pTZ57RT/ATF2،pTZ57RT/ATF3 در DH5α ۹۹
شکل ۳- ۱۵- تایید pTZ57RT/ATF6 در DH5α ۱۰۰
شکل ۳- ۱۶- تایید pTZ57RT/ATF7 در DH5α ۱۰۰
شکل ۳- ۱۷- تعیین غلظت pTZ57RT/AFT1 با استفاده از دستگاه نانودراپ ۱۰۱
شکل ۳- ۱۸– بررسی کیفی پلاسمید های استخراج شده ی pTZR/T حاوی قطعه ۱۰۲
شکل ۳- ۱۹- نتیجه هضم آنزیمی دوگانه pET21(a+)، pTZ57/ATF1 و pTZ57/ATF6 ..... ۱۰۳
شکل ۳- ۲۰– نتیجه ی ترانسفورماسیون در باکتری Bl21(DE3) ۱۰۴

شکل ۳- ۲۱- تایید قطعه ی ۱ کلون شده در pET21(a+) با پرایمرهای اختصاصی قطعه ی۱ ..... ۱۰۵
شکل ۳- ۲۲- تایید قطعه ی ۶ کلون شده در pET21(a+) با پرایمرهای اختصاصی قطعه ی ۶ ..... ۱۰۵
شکل ۳- ۲۳- نقشه ی پرایمرهای داخلی قطعه یک کلون شده در پلاسمید pTZ57RT ۱۰۶
شکل ۳- ۲۴– تایید جهت صحیح قطعه ی ۱ در پلاسمید pTZR/T ۱۰۷
شکل ۳- ۲۵- نقشه ی پرایمرهای داخلی قطعه ی ۶ کلون شده در پلاسمید pET21(a+) ۱۰۸
شکل ۳- ۲۶- نتایج تست جهت صحیح قطعه ی ۶ در pET21 ..... ۱۰۸
شکل ۳- ۲۷- نتایج دات بلات از بیان قطعات ۱۰۹
شکل ۳- ۲۸- ژل SDS-PAGE 15% پروتئین نوترکیب RPATF1 و RPATF6 تولید شده در E.coli ۱۱۰
شکل ۳- ۲۹- وسترن بلات پروتئین نوترکیب RPATF1 و RPATF6 تولید شده در E.coli ۱۱۱
شکل ۳- ۳۰– مقایسه میل ترکیبی قطعات ۱ و ۶ با آنتی بادی آلفا توکسین ۱۱۲
شکل ۳- ۳۱- نمودار کروماتوگرافی قطعه ی ATF1 ..... ۱۱۳
شکل ۳- ۳۲- نمودار کروماتوگرافی قطعه ی ATF6 ..... ۱۱۴
شکل ۳- ۳۳ – واکنش متقاطع ۱۱۵
شکل ۳- ۳۴– واکنش متقاطع ۱۱۶
شکل ۳- ۳۵- بررسی تولید آنتی بادی اختصاصی ضد توکسین آلفا ۱۱۷
شکل ۳- ۳۶– نتایج واکنش متقاطع آنتی بادی های پروتئین نوترکیب قطعه ی ۱ و آلفا توکسین در الایزا ۱۱۹
شکل ۳- ۳۷– نتایج واکنش متقاطع آنتی بادی های پروتئین نوترکیب قطعه ی ۶ و آلفا توکسین در الایزا ۱۲۰
شکل ۳- ۳۸– مقایسه ی واکنش آنتی بادی های ضد پروتئین نوترکیب ۱۲۱
شکل۴- ۱- مناطق عملکردی سیتو توکسین های بزرگ کلستریدیومی ۱۲۳
شکل۴- ۲- نتایج حاصل از ترجمه ژن آلفا توکسین در نرم افزار ExPASy ۱۲۵
شکل۴- ۳- بررسی نواحی آنتی ژنسیته آلفا توکسین با استفاده از نرم افزار آنلاین IEDB ۱۲۷

فهرست جداول

جدول- ۱- ۱– توکسین های تولید شده از تیپ های کلستریدیوم نویی ۶
جدول- ۱- ۲– خلاصه ی فعالیت توکسین های کلستریدیوم نویی ۷
جدول- ۱- ۳- سوبسترای پروتئینی و سوبسترای همراه توکسین های بزرگ کلستریدیومی ۱۱
جدول ۲- ۱- برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز جهت تکثیر قطعات ۹،۸،۷، ۱۲ ..... ۴۶
جدول ۲- ۲- برنامه حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز جهت تکثیر قطعات ۱۰، ۱۳،۱۱ ..... ۴۶
جدول ۲- ۳- عناصر ژنتیکی ناقل pTZ57R/T ۵۰
جدول ۲- ۴- مقدار محصول PCR پیشنهاد شده در هر واکنش الحاق ۵۲
جدول ۲- ۵- اجزای واکنش الحاق قطعه در ناقل pTZ57R/T ۵۳
جدول ۲- ۶– عناصر ژنتیکی ناقل pET-21a(+) ۶۰
جدول ۲- ۷- اجزای واکنش هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T حاوی قطعه مورد نظر ۶۱
جدول ۲- ۸- اجزای واکنش الحاق قطعه در پلاسمید pET21-a(+) ۶۲
جدول ۲- ۹- درجه حرارت اتصال پرایمرهای اختصاصی وکتورهای pET و pTZ57RT ۶۳
جدول ۲- ۱۰-راهنمای انتخاب درصد آکریل آمید برای جداسازی پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی ۶۸
جدول ۲- ۱۱-مواد و مقادیر لازم جهت تهیه ژل جدا کنندهSDS-PAGE 15% ۶۹
جدول ۲- ۱۲-مواد و مقادیر لازم جهت تهیه ژل متراکم کننده SDS-PAGE 4% ۶۹
جدول ۲- ۱۳-مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر runnig تانک SDS-PAGE ۶۹
جدول ۲- ۱۴-مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه محلول فیکساتیو ۷۰
جدول ۲- ۱۵-مواد مورد نیاز در تهیه محلول نیترات نقره ۷۰
جدول ۲- ۱۶-مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه محلول رنگ زا رنگ آمیزی نیترات نقره ۷۱
جدول ۲- ۱۷- مواد و مقادیر مورد نیاز برای بافر تانک وسترن بلات ۷۳
جدول ۳- ۱- پرایمر های طراحی شده از توالی نوکلئوتیدی آلفا توکسین ۹۴
جدول ۳- ۲- پیش بینی جرم مولکولی پروتئین های نوترکیب با استفاده از ابزار ProtParam ۹۶
جدول ۳- ۳– غلظت محصول PCR پس از استخراج از ژل آگارز ۱٪ ۹۷
جدول ۳- ۴- غلظت پلاسمید های استخراجی ۱۰۱
جدول ۳- ۵-نتایج حاصل از هضم آنزیمی قطعات ۱۰۳
جدول ۳- ۶- واکنش های تاییدی جهت قطعه ی یک کلون شده در پلاسمید pTZ57RT با استفاده از PCR ۱۰۷
جدول ۳- ۷- واکنش های تاییدی جهت قطعه ی ۶ در پلاسمید pET21 با استفاده از PCR ۱۰۸

Abbreviation:

AT : alpha toxin *Clostridium novyi*

PCR: Polymerase Chain Reaction

PBS: Phosphate Buffered saline

OPD: o-PHENYLENEDIAMINE

DAB: 3-3'-DIAMINOBENZIDINE

BSA: Bovine Serum Albumin

OD : Optical Density

ATF1: Fragment 1 alpha toxin

ATF2: Fragment 2 alpha toxin

ATF3: Fragment 3 alpha toxin

ATF4: Fragment 4 alpha toxin

ATF5: Fragment 5 alpha toxin

ATF6: Fragment 6 alpha toxin

ATF7: Fragment 7 alpha toxin

ATF1: Fragment 1 alpha toxin

RPATF1: Recombinant protein of fragment 1 alpha toxin

RPATF6: Recombinant protein of fragment 6 alpha toxin

ab-RPATF1: antibody of Recombinant protein of fragment 1 alpha toxin

ab-RPATF6 : antibody of Recombinant protein of fragment 6 alpha toxin

Ab-alpha toxin: antibody of alpha toxin

فصل اول

مروری بر منابع

۱-۱- خانواده کلستریدیا:

گونه های کلستریدیوم، باکتری های بزرگ، گرم مثبت و اسپوردار هستند. بسیاری از کلستریدیا ساپروفیت بوده و به طور طبیعی در خاک، آب و بقایای گیاهان و حیوانات درحال فساد رشد می کنند. سایرگونه ها مانند *C.perfringens* به طور طبیعی ساکن روده بوده و بعد از مرگ حیوانات به سرعت به خون و بافت ها تهاجم کرده و نقش مهمی در تجزیه لاشه بازی می کنند (Malone, 2004).

کوئینن و همکارانش در سال ۲۰۰۰، خانواده ی کلستریدیا بیماریزا برای گاو و گوسفند را به سه گروه طبقه بندی کردند:

۱-۱-۱-کلستریدیا موثر بر اعصاب:

C.tetani و *C.botulinum* نروتوکسین قوی تولید می کنند که به ترتیب باعث بیماری کزاز و بوتولیسم می شوند.

۱-۱-۲-کلستریدیا موثر بر بافت ها:

اگزوتوکسین تولید شده توسط این کلستریدیا باعث نکروز بافت و مسمومیت کل بافت های بدن[۱] می شود. شامل *C.chauvoei* عامل اصلی قانقاریا در پای گوسفند و گاو[۲] و*C.novyi* که سبب بیماری کبدی ناشی از کرم های پهن کبد[۳] و عوارض ناشی از محصولات جانبی آن ها می شود.

۱-۱-۳-کلستریدیای تولید کننده‌ی انتروتوکسین:

گونه های *C.perfringens* عامل بیماری های روده ومسمومیت سیستمیک ناشی از انتروتوکسین[۴] است. شامل *C.perfringens* تیپ D که سبب بیماری کلیه‌ی پالپی و تیپ B آن که عامل اسهال خونی گوسفندی است(**Quinn et al., 1994**).

Clostridium Species	Disease
Neurotoxic clostridia	
Clostridium tetani	Tetanus
Clostridium botulinum	Botulism
Histotoxic clostridia	
Clostridium chauvoei	Blackleg
Clostridium septicum	Malignant oedema Braxy (sheep)
Clostridium novyi type A	Big head of rams
Clostridium novyi type B	Black disease (necrotic hepatitis)
Clostridium haemolyticum	Bacillary haemoglobinuria
(*C.novyi* type D)	
Clostridium sordellii	Gas gangrene Abomasitis
Enterotoxaemia	
Clostridium perfringens Type B (*C.welchii*)	Lamb dysentery
Clostridium perfringens Type C (*C.welchii*)	Struck
Clostridium perfringens Type D (*C.welchii*)	Pulpy kidney

شکل ۱- ۱- بیماری های ناشی از خانواده ی کلستریدیا در نشخوارکنندگان

[1] - Systemic toxaemia
[2] - Blackleg
[3] - Black disease
[4] - Enterotoxaemia

۱-۲- معرفی جنس *Clostridium novyi*:

C. novyi اولین بار در سال ۱۸۹۴ با نام *Bacillus oedematis maligni* از خوکچه‌ی هندی آلوده، توسط دکتر فردریک نویی از دانشگاه میشیگان جداسازی شد(MacLennan, 1962). این باکتری یک باسیل گرم مثبت، بی هوازی اجباری و تشکیل دهنده اندوسپور(دسته تنیسی شکل) است که مانند *C.perfringens* ارگانیسم موجود در خاک است. *C. novyi* قادر به اکسید کردن مواد غذائی و تبدیل آن به آب و دی اکسیدکربن نمی باشد و لذا محصول نهائی متابولیسم مواد غذائی تولید اسید های چرب و موا د ارگانیک می باشد و بخاطر این نوع متابولیسم بوی تند و نامناسبی از رشد باکتری را می توان استشمام کرد. زمانی که این باکتری به شرایط بی هوازی مانند ماهیچه منتقل می شود تولید توکسین های کشنده می نماید که باعث بیماری زائی می گردد و عامل بیماری قانقاریا می شود. این رفتار برای *C.chauvoei* نیز مشابه است و همین دلیل واکسن دوگانه و یا چند تائی از این دو گونه برای واکسیناسیون استفاده می شود.

C.novyi بر اساس نوع توکسین تولید شده به سه تیپ A و B و غیر بیماریزای C تقسیم می شود. بعضی از محققین گونه *C.haemolyticum* را بعنوان تیپ D کلستریدیوم نوئی تقسیم بندی می نمایند. بدلیل شباهت این باکتری با تیپ C و D از باکتری *C.botulinum*، تعیین گونه و تیپ آن بر اساس تعیین توالی 16s rDNA می تواند از تشخیص اشتباه این دو گونه جلوگیری نماید(Sasaki et al., 2001). مراحل رشد و فاز های رشد باکتری عبارتند از ۱- رشد اولیه که در آن تولید توکسین صورت نمی گیرد.۲- رشد سریع همراه با تولید توکسین ۳- کاهش رشد تولید اسپور و درنهایت توقف تولید توکسین می باشد. با توجه به عدم پاتوژن بودن تیپ C به نظر می رسد سرعت سریع اسپور زائی مانع از تولید توکسین شده و سلول به حالت کمون می رود. لذا بررسی زمان تولید اسپور و تاخیر در آن می تواند در افزایش تولید توکسین موثر باشد. به دلیل بی هوازی بودن این باکتری جدا سازی آن کمی دشوار به نظر می رسد که بایستی در شرایط ویژه مانند حضور گروه های تیول رشد صورت گیرد(Moore, 1968).

C. novyi تیپ A سبب قانقاریا در حیوان و انسان می شود. و تیپ B این باکتری عامل بیماری سیاه [1] است این بیماری سبب مسمومیت حاد در گاو، گوسفند، خوک و اسب می شود. و مرگ در گاو و گوسفند می شود. تیپ A و B هر دو آلفا توکسین تولید می کنند اما تیپ A به سبب ایجاد بیماری در انسان دارای اهمیت بیشتری است (Nishida and Nakagawara, 1964). تیپ B و D بتا توکسین تولید می کنند و تیپ C غیر سمی است در نتیجه بیماریزا نمی باشد.

C. novyi تیپ D سبب هموگلوبینوری باسیلی[2] در گاو ها می شود. گاوهای مبتلا ممکنه مرده پیدا شوند (Malone, 2004). این تیپ از نظر تولید توکسین بسیار نزدیک به تیپ B می باشد با این تفاوت که قادر به تولید آلفا توکسین نمی باشد(Schallehn and Eklund, 1980).

این باکتری در سرتاسر جهان یافت می شود اما بیماری در مناطقی که کرم های پهن کبد یافت می شود فراوان تراست. بیماری سیاه نامش را از ظاهر سیاه و تیره ای که پوست به خاطر پارگی رگ ها در بافت زیر جلدی پیدا می کند گرفته است. باکتری *C. novyi* در خاک موجود است (MacLennan, 1962) و در چراگاه توسط حیوانات خورده می شود. باکتری با تولید اسپور می تواند از روده وارد بدن شود. سپس اسپورها به کبد منتقل می شوند، ورود اسپورها به کبد موجب بیماری نمی شود اما پس از صدمه دیدن کبد توسط کرم های پهن یا سایر عوامل، محیط غیرهوازی به وجود آمده و اسپورها شروع به تکثیر می کند. به محض اینکه اسپورها شروع به رشد کردند، توکسین های نکروز کننده آزاد شده که سبب تخریب بافت محلی و آسیب سیستم عروقی می شود. نشانه های بالینی در گاو ها ناگهانی و شامل بی میلی به حرکت، ضربان قلب ضعیف و کاهش دمای بدن است. معمولا حیوان بعد از یکی دو روز می میرد؛ در گوسفند مرگ بدون هیچ علائم ظاهری ناگهانی هست. بیماری سیاه وقوع فصلی به خاطر نوسانات جمعیت کرم پهن کبد و میزبان حلزون ها دارد. وقوع بیماری معمولا در تابستان و پاییز است، اولین سرما در پاییز سیکل بیماری را متوقف می کند.

[1]- Black disease
[2] - Bacillary hemoglobinuria