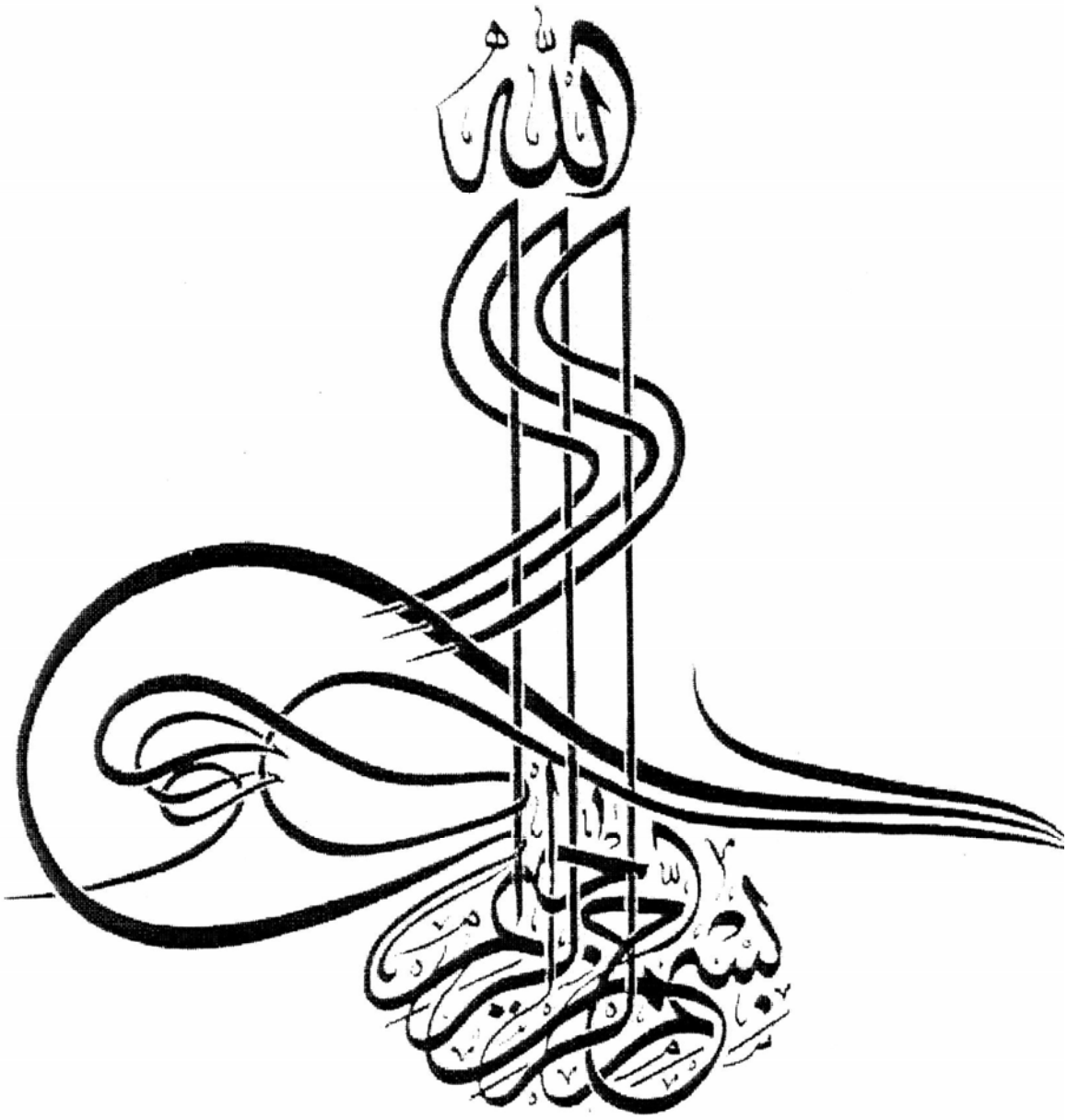
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی- بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان :

بیان آنتی بادی زنجیره سنگین شتری(نانوبادی) علیه زیرواحدUreC آنزیم اوره آز هلیکوباکترپیلوری در پیکیاپاستوریس

اساتید راهنما :

دکتر سید لطیف موسوی گرگری

دکتر معصومه رجبی بذل

دانشجو:

شهربانو پوراسدی

دی ماه ۱۳۹۱

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

خداوندا

به ما توفیق تلاش در شکست، صبر در نومیدی، رفتن بی همراه، جهاد بی سلاح، کار بی پاداش، فداکاری در سکوت، دین بی دنیا، مذهب بی عوام، عظمت بی نام، خدمت بی نان، ایمان بی ریا، خوبی بی نمود، گستاخی بی خامی، مناعت بی غرور، عشق بی هوس و دوست داشتن بی آنکه دوستت بدارند، را عنایت فرما.

تقدیر و تشکر

به مصداق «**من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق** » بسی شایسته است از کسانی که مرا در انجام این تحقیق یاری رساندند تشکر نمایم.

از **پدر و مادر** عزیزم، **خواهر و برادران** دلسوز و مهربانم که آرامش روحی و آسایش فکری مرا فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب ، مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه درسی را به نحو احسن به اتمام برسانم کمال تشکر را دارم.

همچنین صمیمانه ترین مراتب تشکر از:

استاد ارجمند جناب آقای **دکتر سید لطیف موسوی** که از حمایت های بی شائبه ایشان در طول تحصیل و تحقیق برخوردار بودم.

استاد محترم سرکار خانم **دکتر معصومه رجبی بذل** که از راهنمایی های کار ساز و تشویق های ایشان در طول تحقیق بهره برده ام.

از اساتید داور جهت قبول داوری و راهنمایی های آنان صمیمانه قدردانی می کنم.

از زحمات بی دریغ سرکار خانم شکیبا درویش علیپور و آقای نظریان تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از تمامی دوستان محترم خانمها حسینقلی، صفایی، آل رسول، باقری، نوری، حسین پور، پورفرزام، خالویی، آراسته، شاهی، باغبان، سفید، احمدی و آقایان ابراهیمی زاده، نصرتی، باخرد، زارع، دهقانی و سایر دوستانی که کمک های ارزنده شان راهگشای مشکلات بود تشکر می‌نمایم و این اثر علمی را به تمامی **پویندگان مسیر علم و حق** تقدیم می کنم.

چکیده

در طول دو دهه گذشته مخمرمتیلوتروفیک پیکیا پاستوریس به عنوان یکی از موفق‌ترین سیستم‌های بیانی جهت تولید انواعی از پروتئینهای نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است. محبوبیت این سیستم به دلیل چندین عامل است که مهمترین آنها عبارتند از: ۱)سادگی دستکاری ژنتیکی پیکیا پاستوریس و شباهت آن به ساکارومیسز سرویزیه که از شناخته شده ترین سیستمهای آزمایشگاهی در زیست شناسی نوین محسوب می‌شود. ۲)توانایی بیان پروتئین به صورت داخل سلولی و خارج سلولی در سطوح بالا ۳) توانایی انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه ای یوکاریوتی مانند گلیکوزیلاسیون، تشکیل پیوندهای دی سولفیدی و در نتیجه فولدینگ صحیح پروتئین.

با وجود این مزایا، پیکیا پاستوریس می تواند یک جایگزین عالی برای سیستم بیانی اشرشیا کلی باشد . در این پژوهش، آنتی بادی زنجیره سنگین شتری علیه زیر واحد UreC آنزیم اوره‌آز هلیکوباکترپیلوری در پیکیا پاستوریس بیان و سپس تخلیص گردید. ژن VHH دروکتور pPink-HC کلون و در ابتدا به باکتری اشرشیا کلی، سویه *Top10* منتقل شد. سپس وکتور حاوی ژن VHH به منظور ورود به ژنوم مخمرخطی شد و به سلول های مستعد مخمری منتقل گردید. تعدادی از کلونی های ترانسفورم شده انتخاب و در محیط کشت بیانی مخمر (BMGY,BMMY) کشت داده شد و VHHنوترکیب درپیکیا پاستوریس بیان شد . بیان پروتئین به وسیله SDS-PAGE آنالیز گردید و مشاهده شد که میزان بیان پروتئین در مخمر پیکیا پاستوریس نسبت به باکتری اشرشیا کلی بالاتر است.

در نهایت کارایی نانوبادی بیان شده در شرایط invitro مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین مقایسه‌ای بین کارایی نانوبادی بیان شده در باکتری و مخمر صورت گرفت و مشخص شد که نانوبادی بیان شده در مخمر در جهت مهار آنزیم اوره‌آز کارایی بهتری دارد.

کلمات کلیدی: پیکیاپاستوریس، زیرواحد UreC هلیکوباکترپیلوری، نانوبادی، بیان

فهرست

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: تاریخچه و مروری بر مطالعات پیشین ۶

۱-۲- تاریخچه ۷

۲-۲- طبقه‌بندی هلیکوباکترپیلوری ۷

۳-۲- خصوصیات هلیکوباکترپیلوری ۷

۴-۲- عوامل موثر در بیماریزایی هلیکوباکترپیلوری ۸

۱-۴-۲- آنزیم اوره‌آز ۸

۱-۱-۴-۲- واکنش آنزیمی آنزیم اوره‌آز ۸

۲-۱-۴-۲- ساختار آنزیمی آنزیم اوره‌آز ۹

۳-۱-۴-۲- تاثیر pH روی آنزیم اوره‌آز ۹

۴-۱-۴-۲- جایگاه فعال آنزیم اوره‌آز ۹

۵-۱-۴-۲- ویژگیهای ژنتیکی آنزیم اوره‌آز ۹

۱-۵-۱-۴-۲- ژنهای ساختاری ۱۰

۲-۵-۱-۴-۲- ژنهای کمکی ۱۰

۶-۱-۴-۲- تنظیم بیان ژن اوره‌آز ۱۰

۷-۱-۴-۲- موقعیت و فعالیت آنزیم اوره‌آز ۱۱

۸-۱-۴-۲- نقش آنزیم اوره‌آز در بیماری زایی باکتری ۱۱

۲-۴-۲- سیتوتوکسین واکوئله کننده (VacA) ۱۲

۳-۴-۲- سیتوتوکسین وابسته به ژن A (CagA) ۱۲

۴-۴-۲- ادهسین متصل شونده به آنتی‌ژنهای گروه خونی (BabA) ۱۲

۵-۲- نحوه بیماریزایی هلیکوباکترپیلوری ۱۳

۲-۶- روشهای انتقال عفونت هلیکوباکترپیلوری ۱۳
۲-۷- روشهای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در بیماران دارای زخمهای گوارشی..... ۱۴
۲-۸- درمان عفونت ایجاد شده توسط هلیکوباکترپیلوری ۱۴
۲-۸-۱- استفاده از آنتی بیوتیکها ۱۴
۲-۸-۲- استفاده از واکسن ۱۵
۲-۸-۳- استفاده از آنتی‌بادی..... ۱۵
۲-۹- آنتی بادی ۱۶
۲-۹-۱- ساختار آنتی‌بادیها..... ۱۶
۲-۹-۲- محدودیت استفاده از آنتی بادی کامل برای درمان عفونتها..... ۱۸
۲-۹-۳- قطعات آنتی بادی نوترکیب مهندسی شده ۱۹
۲-۹-۳-۱- آنتی‌بادی زنجیره سنگین شتری(VHH) ۱۹
۲-۹-۳-۱-۱- ویژگیهای ساختمانی VHH ۲۰
۲-۹-۳-۱-۲- مقایسه توالی VH آنتی بادی مرسوم با VHH شتری..... ۲۱
۲-۹-۳-۱-۳- فرایند چند واحدی شدن نانوبادیها..... ۲۲
۲-۱۰-۳-۱-۴- برتری نانوبادی نسبت به سایر آنتی‌بادیهای نوترکیب ۲۳
۲-۹-۳-۱-۵- کاربردهای نانوبادی در پزشکی و بیوتکنولوژی..... ۲۴
۲-۱۰- انواع مختلف سیستم های بیانی پروتئین های نوترکیب..... ۲۵
۲-۱۰-۱- سیستم بیانی*E.coli*..... ۲۵
۲-۱۰-۲- *Bacillus subtilis*..... ۲۶
۲-۱۰-۳- قارچهای رشته ای..... ۲۷
۲-۱۰-۴- سیستم بیانی حشرات/*Baculo virus* ۲۷
۲-۱۰-۵- سلولهای پستانداران..... ۲۷
۲-۱۰-۶- مخمر ۲۸

۱-۶-۱۰-۲- مراحل بیان پروتئین خارجی در سیستم بیانی مخمر ۲۹
۲-۶-۱۰-۲- انواع گونه‌های مخمری به منظور بیان پروتئین خارجی ۲۹
۱-۲-۶-۱۰-۲- ساکارومیسز سرویزیه ۲۹
۲-۲-۶-۱۰-۲-هانسلوناپلی مورفا ۲۹
۳-۲-۶-۱۰-۲-یرویالیپولیتیکا ۳۰
۴-۲-۶-۱۰-۲-پیکیا پاستوریس ۳۰
۱-۴-۲-۶-۱۰-۲- تاریخچه سیستم بیانی پیکیا پاستوریس ۳۰
۲-۴-۲-۶-۱۰-۲- مزیتهای سیستم پیکیا پاستوریس نسبت به دیگر سیستمهای بیان یوکاریوتی و پروکاریوتی ۳۱
۳-۴-۲-۶-۱۰-۲- خصوصیات مخمر پیکیا پاستوریس ۳۱
۴-۴-۲-۶-۱۰-۲- انواع سویه های میزبانی مخمر پیکیاپاستوریس ۳۲
۵-۴-۲-۶-۱۰-۲- ویژگیهای عمومی وکتورهای بیانی در پیکیا پاستوریس ۳۴
۶-۴-۲-۶-۱۰-۲- انواع وکتورهای بیانی در مخمر پیکیاپاستوریس ۳۵
۷-۴-۲-۶-۱۰-۲- انواع نشانگرهای انتخابی برای ترانسفرماسیون پیکیاپاستوریس ۳۵
۸-۴-۲-۶-۱۰-۲- انجام تغییرات پس از ترجمه بر روی پروتئینهای بیان شده ۳۶
۱-۸-۴-۲-۶-۱۰-۲-گلیکوزیلاسیون ۳۶
۲-۸-۴-۲-۶-۱۰-۲- تفاوت گلیکوزیلاسیون در پیکیاپاستوریس نسبت به ساکارومیسز سرویزیه ۳۷
۹-۴-۲-۶-۱۰-۲-فراهم کردن امکان مطالعات ساختاری پروتئین بیان شده در سیستم بیانی پیکیا پاستوریس ۳۷
۱۰-۴-۲-۶-۱۰-۲- متابولیسم متانول ۳۸
۱۱-۴-۲-۶-۱۰-۲- ژن ADE2 ..... ۳۹
۱۲-۴-۲-۶-۱۰-۲- پروموتور الکل اکسیداز۱ ..... ۴۰
فصل سوم: مواد و روشها ۴۱

۳-۱: مواد شیمیایی ۴۲
۳-۲- آنتی بیوتیکهای مورد استفاده ۴۴
۳-۳- آنزیم‌های مورد استفاده ۴۴
۳-۴- کیت‌های آزمایشگاهی ۴۴
۳-۵- میزبان باکتری مورد استفاده ۴۴
۳-۶- میزبان مخمری ۴۵
۳-۷- وکتور مورد استفاده جهت زیرهمسانه سازی و بیان آنتی‌بادی نوترکیب VHH علیه UreC ۴۵
۳-۸- مجموعه پرایمرهای استفاده شده به منظور زیرهمسانه سازی ژن نانوبادی علیه UreC در شاتل وکتورpPink-HC ۴۷
۳-۹- محیطهای کشت عمومی مورد استفاده برای سویه باکتریایی ۴۷
۳-۱۰- تهیه استوکهای عمومی مورد استفاده برای مخمر پیکیا پاستوریس ۴۸
۳-۱۰-۱- آماده سازی20% Dextrose(10X) stock solution ۴۸
۳-۱۰-۲- آماده سازی0.02% Biotin(50X) ۴۹
۳-۱۰-۳- آماده سازی5% Methanol(10X) ۴۹
۳-۱۰-۴- آماده سازی 10% Glycerol(10X) ۴۹
۳-۱۰-۵- آماده سازیYNB(10X) ۵۰
۳-۱۰-۶- آماده سازی1M Potassium PHospHate Buffer pH=6 ..... ۵۰
۳-۱۱- محیط کشتهای عمومی مورد استفاده برای سویه مخمری ۵۰
۳-۱۱-۱- محیط کشت YPD-Agar ۵۰
۳-۱۱-۲- محیط کشت YPD-Medium ۵۱
۳-۱۱-۳- محیط کشت YPDS-Medium ۵۱
۳-۱۱-۴- محیط کشت حداقل(Minimal Dextrose Agar (MD-Agar ۵۲
۳-۱۲- محیط کشتهای بیانی مورد استفاده برای مخمر *PichiaPastoris* ۵۳

۳-۱۳- بافرها و محلول‌های مورد نیاز ۵۴
۳-۱۴- وسایل و دستگاههای استفاده شده ۵۵
۳-۱۵- روشها ۵۶
۳-۱۵-۱- مراحل تهیه آنتی ژن UreC (ایمونوژن) ۵۶
۳-۱۵-۱-۱- بررسی بیان پروتئین UreC بر روی ژل پلی اکریل آمید ۵۶
۳-۱۵-۱-۲- رنگ آمیزی ژل بوسیلهٔ رنگ کوماسی بلو ۵۹
۳-۱۵-۱-۳- بیان پروتئین نوترکیب UreC در مقیاس بالا ۵۹
۳-۱۵-۱-۴- تخلیص پروتئین نوترکیب UreC به کمک ستون IMAC به روش دناتوره ۶۰
۳-۱۵-۱-۵- دیالیز محلول حاوی پروتئین تخلیص شده UreC ۶۱
۳-۱۵-۱-۶- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۶۱
۳-۱۵-۲- مراحل بیان نانوبادی علیه زیر واحد UreC آنزیم اوره آز هلیکوباکترپیلوری در مخمر پیکیاپاستوریس ۶۳
۳-۱۵-۲-۱- طراحی پرایمر ۶۳
۳-۱۵-۲-۲- انجام PCR جهت به دست آوردن قطعه ژنی نانوبادی علیه UreC ۶۴
۳-۱۵-۲-۳- تخلیص محصول PCR قطعه نانوبادی علیه UreC ۶۵
۳-۱۵-۲-۴- تخلیص شاتل وکتور pPink-HC ۶۶
۳-۱۵-۲-۵- برش آنزیمی قطعه ژنی نانوبادی و شاتل وکتور pPink-HC با استفاده از آنزیمهای محدود الاثر kpnI , EcoRI ۶۷
۳-۱۵-۲-۶- تخلیص محصول هضم آنزیمی وکتورpPink-HC توسط کیت تخلیص از ژل Bioneer. ۶۸
۳-۱۵-۲-۷- الحاق ژن نانوبادی علیه UreC به وکتور pPink-HC ۶۹
۳-۱۵-۲-۸- تهیه سلول مستعد باکتری *E.coli TOP10* ۷۰
۳-۱۵-۲-۹- ترانسفورم وکتورpPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC به میزبان*E.coli TOP10* ۷۱
۳-۱۵-۲-۱۰- بررسی و آنالیز کلون های دریافت کننده قطعه نانوبادی علیه آنتی ژن UreC ۷۲

۱-۱۰-۲-۱۵-۳- تایید انتقال قطعه ژنی نانوبادی علیه UreC به وکتورpPink-HC با استفاده از Clony PCR ۷۳
۲-۱۰-۲-۱۵-۳- تخلیص پلاسمید از کلون دارای وکتور بیانی pPink-HC حاوی ژن نانوبادی ۷۳
۳-۱۰-۲-۱۵-۳- تایید کلونهای دریافت کننده نانوبادی با استفاده از روش هضم آنزیمی ۷۴
۱۱-۲-۱۵-۳- تهیه استوک از کلون های دریافت کننده قطعه ژن نانوبادی علیه UreC ۷۶
۱۲-۲-۱۵-۳- تایید وکتور بیانی pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC با تعیین توالی ۷۶
۱۳-۲-۱۵-۳- خطی کردن پلاسمید حاوی قطعه ژن نانوبادی علیه UreC با استفاده از آنزیم محدودالاثر Vha4641 ..... ۷۷
۱۴-۲-۱۵-۳-تخلیص پلاسمید خطی شده pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC جهت ترانسفورم به سویه ۱ مخمر *PichiaPink* از طریق رسوب گذاری با اتانول ۷۷
۱۵-۲-۱۵-۳- تهیه سلول مستعد از سلول های مخمر *PichiaPink* جهت فرایند ترانسفورم ۷۸
۱۶-۲-۱۵-۳- انتقال پلاسمید نوترکیب خطی شده حاوی ژن نانوبادی علیه UreC به سلول های مستعد مخمر *PichiaPink* ۷۹
۱۷-۲-۱۵-۳- غربالگری کلون های مخمری دریافت کننده پلاسمید نوترکیب حاوی ژن نانوبادی علیه UreC ۷۹
۱۸-۲-۱۵-۳- تایید کلون های مخمر انتخاب شده با روش Clony PCR ۸۰
۱۹-۲-۱۵-۳- تخلیص ژنوم مخمر ۸۲
۲۰-۲-۱۵-۳- مراحل بیان ژن نانوبادی علیه UreC در سویه ۱ مخمر *PichiaPink* ۸۲
۲۱-۲-۱۵-۳- بررسی بیان پروتئین نانوبادی علیه UreC بیان شده در سویه ۱ مخمر *PichiaPink* .. ۸۳
۲۲-۲-۱۵-۳- بهینه سازی بیان نانوبادی علیه UreC در مخمر *PichiaPink* ۸۴
۲۳-۲-۱۵-۳- تخلیص پروتئین نانوبادی علیه UreC بیان شده در مخمر *PichiaPink* ۸۴
۲۳-۲-۱۵-۳- مراحل انجام لکه گذاری نقطه ای از پروتئین نانوبادی بیان شده علیه UreC در مخمر *PichiaPink* ۸۶

۲۴-۲-۱۵-۳- انجام الایزا جهت تعیین میزان افینیتی نانوبادی بیان شده در مخمر به آنتی‌ژن UreC ۸۷
۳-۱۵-۳- مراحل تولید و تخلیص نانوبادی در سیستم میزبانی باکتری *E.coli BL21* ۸۸
۱-۳-۱۵ -۳- بیان نانوبادی در سیستم میزبانی باکتری*E.coli BL21* ۸۸
۲-۳-۱۵-۳- تخلیص نانوبادی بیان شده در باکتری *E.coli BL21* ۸۹
۳-۳-۱۵- ۳- دیالیز محلول حاوی پروتئین تخلیص شده ۹۰
۴-۳-۱۵-۳- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد ۹۰
۴-۱۵-۳- مقایسه میزان بیان نانوبادی علیه UreC در باکتری و مخمر ۹۰
۵-۱۵-۳ - بررسی اثر مهاری آنزیم اوره‌آز با استفاده از نانو بادی بیان شده در باکتری و مخمر ۹۱
۱-۱-۴- بیان آنتی‌ژن UreC در باکتری *E.coli* ۹۴
فصل چهارم: نتایج ۹۳
۲-۱-۴- تخلیص پروتئین نوترکیب UreC با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA ۹۵
۳-۱-۴- سنجش غلظت پروتئین UreC به روش برادفورد ۹۵
۲-۴- بررسی بیان نانوبادی علیه زیرواحد UreC آنزیم اورهآز هلیکوباکتر پیلوری در سیستم میزبانی باکتری*E.coli* ۹۷
۲-۲-۴- تخلیص نانوبادی علیه UreC بیان شده در باکتری *E.coli BL21* با استفاده از ستون IMAC ۹۸
۳-۲-۴- اندازه گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد ۹۹
۳-۴- نتایج مراحل بیان نانوبادی علیه زیر واحد UreC آنزیم اوره آز هلیکوباکترپیلوری در مخمر پیکیاپاستوریس ۹۹
۱-۳-۴- طراحی پرایمر ۹۹
۲-۳-۴- انجام PCR جهت به دست آوردن قطعه ژنی نانوبادی علیه UreC ۹۹
۳-۳-۴- برش آنزیمی قطعه ژنی نانوبادی علیه UreC و شاتل وکتور pPink-HC ۱۰۰
۴-۳-۴- تخلیص محصولات برش خورده قطعه نانوبادی علیه UreC و وکتور pPink-HC ۱۰۱

۴-۳-۵- بررسی و آنالیز کلونهای دریافت کننده قطعه نانوبادی علیه UreC با استفاده از Clony PCR ۱۰۲

۴-۳-۶- تخلیص پلاسمید از کلون دارای وکتور بیانی pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه قطعه نوترکیب UreC ۱۰۳

۴-۳-۷- تایید کلون های دریافت کننده نانوبادی علیه پروتئین نوترکیب UreC با استفاده از روش هضم آنزیمی ۱۰۴

۴-۳-۸- تایید وکتور بیانی pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC با تعیین توالی ۱۰۶

۴-۳-۹- خطی کردن پلاسمیدpPink-HC حاوی قطعه ژن نانوبادی علیه UreC و تخلیص آن ۱۱۰

۴-۳-۱۰- غربالگری کلون های مخمری دریافت کننده پلاسمید نوترکیبpPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC ۱۱۱

۴-۳-۱۱- تایید کلون های مخمر انتخاب شده با روش Clony PCR ۱۱۲

۴-۳-۱۲- بررسی بیان کلونی‌های مخمر *PichiaPink* حاوی ژن نانوبادی علیه UreC ۱۱۳

۴-۳-۱۳- بهینه سازی بیان نانوبادی در سویه۱ مخمر *PichiaPink* ۱۱۴

۴-۳-۱۴- تخلیص نانوبادی علیهUreC بیان شده در مخمر*PichiaPink* ۱۱۵

۴-۳-۱۵- انجام لکه گذاری نقطه ای از پروتئین نانوبادی علیه UreC بیان شده در مخمر *PichiaPink* ۱۱۶

۴-۳-۱۶- تعیین میزان افینیتی نانوبادی علیه UreC بیان شده در مخمر*PichiaPink* ، با روش الایزا ۱۱۶

۴-۴- مقایسه میزان بیان نانوبادی علیه UreC در باکتری *E.coli* و مخمر *PichiaPink* ۱۱۷

۴-۵- بررسی اثر مهاری آنزیم اوره‌آز هلیکوباکترپیلوری توسط نانوبادیهای تولید شده علیه UreC در باکتری و مخمر ۱۱۸

فصل پنجم: بحث و پیشنهادات ۱۲۱

نتیجه گیری ۱۲۷

پیشنهادات ۱۲۸

فصل ششم: منابع ۱۲۹
فصل هفتم: پیوستها..... ۱۲۹

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۲: ژنهای کد کننده آنزیم اوره آز..... ۱۰
شکل۲-۲: مقایسه آنتی بادی معمولی و زنجیره سنگین..... ۱۸
شکل۳-۲: نمایش ساختار سه بعدی نانوبادی ها و نمایش انطباق آن با دمین VH انسان..... ۲۱
شکل۴-۲: مقایسه قطعه VH آنتی بادی های مرسوم با VHH.....۲۲
شکل۵-۲: متابولیسم متانول در پیکیا پاستوریس..... ۳۹
شکل ۱-۳: نقشه شاتل وکتورpPink-HC و Multiple cloning site آن..... ۴۶
شکل ۱-۴ : بررسی بیان پروتئین نوترکیب UreC با استفاده از SDS-PAGE ۹۳
شکل ۲-۴: بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب UreC با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS-PAGE.....۹۴
شکل۳-۴: بررسی بیان نانوبادی علیه UreC کلون شده در ناقل pET-28a به‌کمکSDS-PAGE.....۹۶
شکل ۴-۴: بررسی تخلیص نانوبادی نوترکیب علیه UreC با ستون میل ترکیبی Ni-NTA روی ژل SDS -PAGE..... ۹۷
شکل ۵-۴: نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به روی پلاسمید حاوی ژن نانوبادی علیه قطعه نوترکیب UreC..... ۹۹
شکل ۶-۴: واکنش هضم آنزیمی وکتور pPink-HC و ژن نانوبادی علیه UreC با استفاده از آنزیم‌های برشی EcoRI,KpnI.....۱۰۰
شکل ۷-۴: تخلیص محصولات برش خورده وکتور pPink-HC و قطعه نانوبادی علیه UreC.....۱۰۱

شکل ۸-۴: تعیین کلون‌های دریافت کننده ژن نانوبادی علیه UreC با استفاده از واکنش Clony PCR..... ۱۰۲

شکل ۹-۴: تخلیص پلاسمید pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC..... ۱۰۳

شکل ۱۰-۴: واکنش هضم آنزیمی اول وکتور pPink-HC حاوی قطعه نانوبادی با استفاده از آنزیم EcoRI..... ۱۰۴

شکل ۱۱-۴: واکنش هضم آنزیمی دوم وکتور pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC با استفاده ازآنزیم KpnI..... ۱۰۴

شکل ۱۲-۴: گراف مربوط به تعیین توالی کلون دریافت کننده ژن نانوبادی ۱۰۶

شکل ۱۳-۴: نتیجه تعیین توالی کلون دریافت کننده ژن نانوبادی علیه UreC..... ۱۰۷

شکل ۱۴-۴: نتایج حاصل از BLAST توالی نانوبادی علیه UreC کلون شده در وکتور pPink-HC با توالی VHH اولیه..... ۱۰۷

شکل ۱۵-۴: نتایج حاصل از BLAST توالی نانوبادی تولیدی در پایگاه های داده NCBI..... ۱۰۸

شکل ۱۶-۴: پلاسمید خطی شده pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC..... ۱۰۹

شکل ۱۷-۴: کلون‌های حاصل از فرایند ترانسفورم وکتور خطی شده pPink-HC حاوی ژن نانوبادی علیه UreC به مخمرهای مستعد شده *PichiaPink* ۱۱۰

شکل۱۸-۴: تایید کلون مخمری دریافت کننده ژن نانوبادی علیه UreC با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۱۱۱

شکل ۱۹-۴: بررسی بیان پروتئین نانوبادی علیه UreC در میزبان مخمر *PichiaPink* به کمک SDS-PAGE..... ۱۱۲

شکل ۲۰-۴: بیان بهینه نانوبادی علیه UreC در سیستم بیانی مخمر*PichiaPink*..... ۱۱۳

شکل۲۱-۴: تخلیص نانوبادی بیان شده علیه UreC در مخمر *PichiaPink* با استفاده از SDS-PAGE..... ۱۱۴

شکل ۲۲-۴: دات بلات نانوبادی علیه UreC بیان شده در مخمر *PichiaPink*..... ۱۱۵

.شکل ۲۳-۴: مقایسه میزان بیان نانوبادی در باکتری *E.coli* و مخمر *PichiaPink* ۱۱۷

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۲: انواعی از سویه‌های میزبانی مخمر پیکیا پاستوریس.....۳۳

جدول ۲ -۲: سویه های *PichiaPink* و نوع ژن حذف شده ۳۴

جدول۱-۳: لیست مواد شیمیایی استفاده شده در این پژوهش ۴۲

جدول ۲-۳ : روش تهیه محلول‌های استاندارد.....۶۲

جدول ۳-۳: لیست ترکیبات استفاده شده در واکنش PCR..... ۶۴

جدول ۴-۳: شرایط انجام واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر.....۶۴

جدول۵-۳: واکنش هضم آنزیمی وکتورpPink-HC ۶۷

جدول۶-۳: واکنش هضم آنزیمی قطعه نانوبادی ۶۷

جدول۷-۳: واکنش الحاقی نانوبادی به وکتور pPink-HC ۶۹

جدول ۸-۳: واکنش هضم آنزیمی وکتور pPink-HC با استفاده ازآنزیم EcoRI ۷۴

جدول ۹-۳: واکنش هضم آنزیمی دوم وکتور pPink-HC حاوی ژن نانوبادی با استفاده از آنزیمKpnI ۷۵

جدول۱۰-۳: واکنش هضم آنزیمی به منظور خطی نمودن وکتور حاوی ژن نانوبادی ۷۶

جدول ۱۱-۳: برنامه زمانی واکنش PCR.....۸۰

جدول۱۲-۳: لیست مواد استفاده شده در واکنش PCR..... ۸۰

جدول ۱۳-۳: مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ژل Separating ۸۴

جدول۱۴-۳: مقادیر مورد نیاز برای تهیه ژل Stacking ۸۴

جدول۱۵-۳: مقدار و اجزا واکنش تست سنجش فعالیت اوره‌آز ۹۱

جدول ۱-۴: غلظت پروتئین UreC تخلیص شده ۹۵

جدول ۲-۴ : محاسبه غلظت نانوبادی تخلیص شده ۹۸

جدول ۲-۵: میزان بیان آنتی‌بادی‌های نوترکیب بیان شده در مخمر پیکیا پاستوریس ۱۲۴

جدول ۳-۵ : مقایسه اثر مهاری نانو بادی تولیدی با سایر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به روی آنزیم اوره-آز..... ۱۲۶

فهرست نمودارها

نمودار۱-۴: نمودار استاندارد برادفورد.....۹۴

نمودار ۲-۴: نتایج الایزا رقتهای مختلف نانوبادی در مقابل رقتهای مختلف آنتی‌ژن ۱۱۶

نمودار ۳-۴ : مهار فعالیت آنزیم اوره‌آز بوسیله نانوبادی تولید شده در مخمر علیه آنتی‌ژن UreC..... ۱۱۸

نمودار ۴-۴ : مهار فعالیت آنزیم اوره‌آز بوسیله نانوبادی تولید شده در باکتری علیه آنتی‌ژن UreC.....۱۱۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

هلیکوباکترپیلوری، باکتری گرم منفی، میکروآئروفیلیک[1]، مارپیچی شکل و تاژکدار است که اولین بار در سال ۱۹۸۲، توسط رابین وارن و بری مارشال در استرالیا کشف شد. این باکتری در موکوس معده انسان کلون می‌شود، رشد آن کند است و یکی از نیازهای رشد آن، سطوح بالایی ازCO_2 است. بعلاوه به شدت به عمل کاتالیزوری اوره‌آز (یکی از آنزیم های مهم در این باکتری) وابسته است که CO_2 را به عنوان محصول واکنش تولید می‌کند[۴;۳]. آنزیم اوره‌آز سبب زنده ماندن باکتری در محیط اسیدی معده می‌شود. زیرا این آنزیم، اوره را که به طور طبیعی به درون معده ترشح می‌شود، به آمونیاک و دی اکسید کربن می‌شکند. آمونیاک با گرفتن اتم هیدروژن از آب به آمونیوم تبدیل می‌شود و یون هیدروکسیدی که از شکست آب ایجاد شده است، با دی اکسید کربن واکنش می‌دهد و بی‌کربنات را تولید می‌کند که باعث خنثی کردن اسید معده و در نتیجه زنده ماندن باکتری می‌شود[۵]. این باکتری از جمله عوامل بیماریزای موثر در حدود نیمی از جمعیت جهان است که مسئول بیماری‌های متعدد از قبیل التهاب معده، زخم معده و دوازدهه و سرطان معده است[۴;۳] . در راستای گزارش توافقیlll Maastrich، مرکز ملی آلمان[2] برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط هلیکوباکترپیلوری، مصرف آنتی بیوتیک‌های کلاریترومایسین و آموکسی‌سیلین یا مترونیدازول همراه با مهار کننده‌های پمپ پروتون(ppi) برای ریشه کنی این باکتری در بیمارانی که قبلاً درمان نشده‌اند، را توصیه کرد. اما این درمان، به خاطر سویه‌های مقاوم به این دارو با شکست مواجه شد[۶]. راه درمان دیگر عفونت‌های باکتریایی، استفاده از آنتی بادی‌ها می‌باشد. با استفاده ازتکنولوژی رایج آنتی‌بادی، امکان تولید آنتی‌بادی هایی با تمایل بالا علیه عفونت‌های میکروبی وجود دارد. چنین آنتی‌بادی‌هایی به آنتی‌ژن‌های باکتریایی حساس هستند و باعث کارایی و ایمنی بیشتر می‌شوند. آنتی‌بادی‌هایی که باعث ازبین رفتن باکتری‌های مقاوم به دارو می‌شوند، با مکانیسم متفاوتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش خود را ایفا می‌کنند. نحوه

[1] MicroaeropHilic
[2] German National Reference centre

عملکرد آنتی‌بادی‌ها به دو صورت است : یا به طور مستقیم سطح باکتری را هدف قرار می‌دهند و یا به صورت غیر مستقیم عمل می‌کنند و از طریق خنثی کردن توکسین‌های باکتریایی یا دیگر فاکتورهای ضروری برای بیماریزایی و بقا عفونت از میزبان محافظت می‌کنند[۷]. یکی از انواع آنتی‌بادی‌های به کار رفته در پیشگیری یا درمان عفونت‌های باکتریایی به‌خصوص هلیکوباکتر پیلوری، آنتی‌بادی زنجیره سنگین تک دمینی شتری است.

لاماها که متعلق به خانواده‌ی *Camelidae SP.* هستند، نه تنها آنتی‌بادی‌های هتروتترامریک معمولی را تولید می‌کنند، بلکه آنتی‌بادی‌هایی تولید می‌کنند که فاقد زنجیره سبک و دمین ثابت زنجیره سنگین(CH_1) هستند[۹;۸]. این آنتی بادی های زنجیره سنگین فقط از طریق تک دمین VH (variable domain conventional antibodies) که برای تفاوت نسبت به VHمعمولی، VHH(variable domain of heavy chain anti bodies)گفته می شود، به آنتی ژن وصل می-شوند[۱۰]. VHH نسبت به سایر مشتقات آنتی‌بادی‌ها نظیر fab،scfv و یا آنتی بادی کامل مزیت‌هایی دارد که عبارتند از:

۱)کلونینگ آسان به علت اندازه کوچک آن، ۲) سهولت انتخاب invivo از یک کتابخانه کامل، ۳) میزان بیان بالا و سهولت در تخلیص آن، ۴) دارای پایداری و حلالیت بالا، ۵) میزان تشابه زیاد با قطعات VH انسانی[۱۲;۱۱]. همچنین آنتی‌بادی نوترکیب تک‌دمینی به علت داشتن اندازه کوچک نسبت به سایر آنتی‌بادی‌ها، قابلیت نفوذ در بافتها و سلولها را دارد که مزیت قابل توجهی است[۱۳]. این آنتی‌بادی‌ها همچنین ظرفیت دوباره فولد شدن را بعد از دناتوراسیون دارند، در حالی که قدرت اتصال آنها همچنان حفظ شده است. بعلاوه VHHها در درجه حرارت بالا پایدارتر هستند و تحت شرایطی مثل درجه حرارت بالاتر از ۹۰ درجه بهتر عمل می‌کنند[۱۴]. همچنین می‌توانند جایگاه آنتی‌ژنی موجود در شکاف ها را مانند جایگاه فعال آنزیم‌ها تشخیص دهند، اما آنتی‌بادی‌های معمولی این توانایی را ندارند[۱۱]. لازم به ذکر است، به VHHهای جدا شده نانوبادی[۳] نیز می‌گویند، زیرا ابعاد آن ها در حد نانومتر است[۱۵;۱۰]. شباهت زیاد این مولکول ها به VH انسانی موجب می‌شود که کاربردهای بالقوه‌ای در تشخیص های ایمنی و نیز ایمنی درمانی داشته باشد[۱۰].

به منظور تولید گسترده آن می‌توان همانند بسیاری از پروتئین‌های درمانی، از سیستم‌های بیان پروکاریوتی و یوکاریوتی استفاده کرد. بر اساس داده‌های موجود، VHH علیه انواع آنتی‌ژن‌های پروتئینی

[3] nanobody