بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی گرایش بیوتکنولوژی(میکروبی)

عنوان

بیان آنتی بادی زنجیره سنگین شتری (نانوبادی) علیه نوروتوکسین بوتولینوم تیپ E در Pichia Pastoris

اساتید راهنما

دکتر سید لطیف موسوی گرگری

دکتر معصومه رجبی بذل

دانشجو

رقیه باغبان

شهریور ماه ۹۱

سپاس نامه

بوسه می زنم بر دستان پر مهر مادرم به پاس تعبیر عظیم و انسانیش از کلمه ایثار، به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودش که سرگردانی و ترس در پناهش به آرامش می گراید و پدرم که توکل و تکیه بر خداوند را به من آموخت.

از آفریدگار خرد درخواست می نمایم بزرگوارانی را که با گشاده رویی راهنمایم بودند در کنف حمایت خویش حفظ و دعای خیر شاگردانشان را بدرقه همیشگی راهشان فرماید و سعادت دنیا و آخرت را برای آنان رقم زند.

در این میان بر خود لازم میدانم از اساتید راهنما جناب آقای دکتر میر لطیف موسوی گرگری و سرکارخانم دکتر معصومه رجبی بذل که در انجام این پایان نامه ، با کرامتی چون خورشید ، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی های کار ساز و سازنده بارور ساختند ، صمیمانه سپاسگزاری نمایم.

از اساتید ارجمند داور جهت قبولی داوری و راهنمایی های آنان صمیمانه قدردانی می نمایم.

از اعضای هیئت علمی و کارکنان محترم دانشگاه شاهد ، همچنین جناب آقای نظریان ، سرکار خانم علیپور و خانم رحمانی که مرا یاری نمودند سپاسگزارم.

از دوستان و همکارانم خانم ها حسین پور، شاهی، پوراسدی، خالویی، پورفرزام، سفید، نوری، پاینده، احمدی، حسین آبادی، جلالی، صفایی، باقری، جاویدان، آل رسول، و آقایان باخرد، ابراهیمی، زارع، دهقانی، علیزاده، نصرتی و جهانگیری که در انجام این طرح پژوهشی سبب شدند که با علاقه و پشتکار قدم بردارم و همراهی و همفکری با آنان سبب پیشبرد این پایان نامه بود، سپاسگزارم.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

پروردگارا:

نه میتوانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای پینه بسته شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم . پس توفیقم ده که هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

فهرست

فصل اول: مقدمه

چکیده

۱-۱- مقدمه ۱
۱-۲- معرفی میکروارگانیسم ۲
۱-۲-۱- جنس کلستریدیوم ۲
۱-۲-۲- طبقه بندی انواع کلستریدیوم ها ۲
۱-۲-۳- ویژگی های رشد: ٤
۱-۲-۴- خصوصیات بیوشیمیایی وکشت: ٤
۱-۲-۵- کلستریدیوم بوتولینوم ٥
۱-۲-۶- علایم بالینی بیماری بوتولیسم ٥
۵- بوتولیسم ناشناخته ٦
۱-۲-۷- مکانیسم بیماریزایی ۷
۱-۲-۸- ساختار توکسین های بوتولینوم ۷
۱-۲-۹- مکانیسم عمل ۱۰
۱-۲-۹-۱- اتصال و ورود به سلول هدف ۱۰
۱-۲-۹-۲- انتقال ۱۰
۱-۲-۹-۳- ممانعت از آزاد سازی نوروترانسمیترها ۱۱
۱-۲-۱۰- روش های تشخیص توکسین کلستریدیوم بوتولینوم ۱۲
۱-۲-۱۰-۱- آزمایش روی موش(mouse bioassay) ۱۳
۱-۲-۱۰-۲- تست های سرولوژیک: ۱٤
۱-۲-۱۰-۳- تست های کشت سنج: ۱٤
۱-۲-۱۱- اپیدمیولوژی بوتولیسم ۱٥
۱-۳- سیستم بیانی مخمر ۱۷
۱-۳-۱- میزبان های مخمری به دو دسته اصلی تقسیم می شوند[۳۶]: ۱۸
۱-۳-۱-۱- ساکارومایسس سرویزیه ۱۸
۱-۳-۱-۲- یرونیا لیپولتیکا ۲۰
۱-۳-۲- مخمرهای غیر متیلوتروف ۲۱
۱-۳-۳-مخمرهای متیلوتروف ۲۲
۱-۳-۳-۱- هانسلا پلی مورفا ۲٤
۱-۳-۳-۲- سیستم بیانی پیکیا پاستوریس ۲٤
۱-۳-۳-۳- تاریخچه سیستم بیانی پیکیا پاستوریس ۲٦
۱-۳-۳-۴- پیکیا پاستوریس: یک مخمر متیلوتروف ۲۷

۱-۳-۳-۵- ترشح پروتئین های هترولوگوس ۳۰
۱-۳-۳-۶- تغییرات پس از ترجمه در مخمر پیکیا پاستوریس ۳۰
۱-۳-۳-۷- انواع سویه های رایج پیکیا پاستوریس ۳۲
۱- سویه X-33 ..... ۳۳
۲- سویه GS115 ..... ۳۳
۳- سویه KM71H ۳۳
۴KH71H- سویه ۳۳
۵- سویه MC100-3 ..... ۳٤
۶- سویه های ۶، ۷ و ۸: ۳٤
۱-۳-۳-۸- سویه مخمر مورد استفاده در این تحقیق ۳۵
۱-۳-۳-۹- وکتور استفاده شده در این تحقیق ۳٦
۱-۴- آنتی بادی ها ۳۷
۱-۴-۱-قطعات متغیر تک زنجیره ای(scFv) ۳۸
۱-۴-۲- قطعه متصل شونده به آنتی ژن(Fab) ۳۸
۱-۴-۳-قطعه Fv ۳۸
۱-۴-۴- آنتیبادی های تک دومنی یا sdAb ۳۹
۱-۴-۵ـ ساختار آنتیبادی ۳۹
۱ـ٤-۶- ناحیه اتصال به آنتیژن: ٤۰
۱-۵- آنتی بادی های زنجیره سنگین شتری ٤۱
۱-۵-۱- ساختار نانوبادی ها ٤۳
۱-۵-۲- ویژگی های نانو بادی ها ٤۵
۱-۵-۳- کاربرد نانوبادی ها در بیوتکنولوژی و پزشکی ٤٦
۱-۶- بیان مسئله: ٤۷
۱-۷- اهداف این پژوهش: ٤۸
۲-۱- مواد و روش ها ۵۰
۲-۱-۱- مواد و محلول های مورد نیاز ۵۰
۱. مواد شیمیایی ۵۰
۲. آنتی بیوتیک ها ۵۱
۳. آنزیم ها وکیت های مورد استفاده ۵۱
۳-۱- آنزیم های برشی اندونوکلئاز ۵۱
۳-۲- کیت های آزمایشگاهی ۵۲
۴. میزبان های باکتریایی E.coli ۵۲
۴-۱- سویه های باکتریایی Top10 ، BL21 E.coli به عنوان میزبان در مراحل کلون سازی و بیان آنتی بادی نوترکیب استفاده شدند. ۵۲
۴-۲- باکتری Clostridium botulinum type E ۵۲
۵. محیط کشت های عمومی استفاده شده برای باکتری ۵۲

۶. میزبان مخمری استفاده شده ۵۳
۷. وکتور مخمری استفاده شده ۵۳
۸. تهیه استوک های عمومی مورد استفاده برای مخمر پیکیا پاستوریس ۵۳
۸-۱- آماده سازی 20% Dextrose(10X) stock solution ۵۳
۸-۲- آماده سازی 0.02% Biotin(50X) ۵۳
۸-۳- آماده سازی 5% Methanol(10X) ۵۴
۸-۴- آماده سازی 10% Glycerol (10X) ۵۴
۸-۵- آماده سازی YNB(10X) ۵۴
۸-۶- آماده سازی 1M Potassium Phosphate Buffer pH=6 ..... ۵۵
۹. ساخت محیط کشت های عمومی مورد استفاده برای مخمرPichia Pink ۵۵
۹-۱- محیط کشت YPD-Agar ۵۵
۹-۲- محیط کشت YPD-Medium ۵۶
۹-۳- محیط کشت YPDS-Medium ۵۶
۹-۴- محیط کشت حداقل Minimal Dextrose Agar ۵۷
۱۰. تهیه محیط کشت های بیانی مورد استفاده برای مخمر PichiaPink ۵۸
۱۰-۱- محیط کشت Buffered Glycerol-Complex Medium Yeast ۵۸
۱۰-۲- محیط کشت Buffered Methanol-Complex Medium Yeast ۵۹
۱۱. پرایمرها ۵۹
۱۱-۱- طراحی و آماده سازی پرایمرهای ژن ۵۹
۱۲. بافرها و محلول های مورد نیاز ۶۰
۱۲-۱- محلول ها و بافرهای مورد نیاز جهت الکتروفورز DNA و RNA ۶۰
۱۲-۲- بافرهای مورد نیاز در روش الیزا ۶۰
۱۲-۳- محلول استوک IPTG 100mM جهت القاء بیان ۶۱
۱۲-۴- محلول ها و بافرهای مورد نیاز برای ژل SDS-PAGE ۶۱
۱۲-۵- بافرهای مورد نیاز جهت تخلیص پروتئین از ستون Ni-NTA ۶۱
۱۲-۶- مواد مورد نیاز جهت تهیه معرف برادفورد ۶۱
۱۲-۷- محلول های مورد نیاز جهت لکه گذاری وسترن ۶۱
۲-۲- وسایل ۶۱
۲-۳- دستگاه ها: ۶۲
۲-۴- روشها ۶۳
۲-۴-۱- مراحل تهیه آنتی ژن(بخش اتصال دهنده توکسین *Bont/E*) ۶۳
۲-۴-۲-هضم آنزیمی پلاسمید های استخراج شده ۶۳
۲-۴-۳- تخلیص محصول هضم آنزیمی ۶۳
۲-۴-۴-آماده سازی ناقل بیانی ۶۴
۲-۴-۵- الحاق قطعه هدف با ناقل برش خورده ۶۵
۲-۴-۶-تهیه سلول های مستعد ۶۶

۲-۴-۷- انتقال DNA نوترکیب به داخل سلول های مستعد اشرشیا کلی ٦٦
۲-۴-۸- بررسی و آنالیز کلون های حاوی DNA نوترکیب(بخش اتصال دهنده توکسینBoNT/E) ٦٧
۲-۴-۹- تهیه استوک از کلون های تایید شده در مرحله قبل ٦٨
۲-۴-۱۰-بیان ژن نوترکیب(بخش اتصال دهنده توکسین BoNT/E) ٦٨
۲-۴-۱۱- بررسی پروتئین بیان شده روی ژل آکریل آمید(SDS-PAGE) ٦٩
۲-۴-۱۲- رنگ آمیزی ژل به وسیله ی کوماسی بلو ٧١
۲-۴-۱۳- تخلیص پروتئین های نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA ٧١
۲-۴-۱۴- تعیین غلظت پروتئین از محلول حاوی پروتئین های نوترکیب ٧٢
۲-۴-۱۵- دیالیز پروتئین های حاصل از تخلیص ٧٣
۲-۵- مراحل بیان نانوبادی علیه نوروتوکسین بوتولینوم نوع E در مخمر پیکیا پاستوریس ٧٤
۲-۵-۱- مراحل آزمایشگاهی ضروری جهت بیان ژن نانوبادی ٧٤
۲-۵-۱-۱- تهیه وکتورهای PichiaPink™ نوترکیب شامل ژن نانوبادی ٧٥
۱- طراحی پرایمر ٧٥
۲- انجام PCR جهت به دست آوردن ژن نانوبادی ٧٥
۳- هضم وکتور به کار رفته وقطعه نانوبادی با آنزیم های برشی محدودالاثر ٧٥
۴- تخلیص محصولات هضم آنزیمی توسط کیت تخلیص از ژل Bioneer ٧٦
۲-۵-۱-۱-۵- لیگاسیون به منظور به دست آوردن وکتور نوترکیب حاوی ژن نانوبادی ٧٧
۲-۵-۱-۲- تهیه سلول های مستعد باکتری E.coli (الکتروکامپتنت) ٧٨
۲-۵-۱-۲- ترانسفورم وکتور pPink-HC حاوی ژن به میزبان E.coli TOP10 ..... ٧٩
۲-۵-۱-۲-۱- تخلیص وکتور pPink-HC دارای ژن مورد نظر ٨٠
۲-۵-۱-۳- خطی نمودن پلاسمید کلون شده ٨٣
۲-۵-۱-۳-۱- تخلیص پلاسمید خطی شده pPink-HC حاوی ژن جهت ترانسفورم به مخمر PichiaPink ٨٣
۲-۵-۱-۴- مستعد سازی سلول های مخمرPichiaPink™ جهت فرایند ترانسفورم ٨٤
۲-۵-۱-۵- انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول های مستعدPichiaPink™ به روش ا لکتروپوراسیون ٨٥
۲-۵-۱-۶- غربالگری کلنی های مخمر ٨٥
۲-۵-۱-۷- تخلیص ژنوم مخمر ٨٦
۲-۵-۱-۸- تایید کلون های مخمر انتخاب شده با روش Colony PCR ٨٦
۲-۵-۱-۹- بیان کلنی های نوترکیب حاوی ژن نانوبادی ٨٨
۲-۵-۱-۱۰- تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از سیستم الکتروفورز Native PAGE ٩٠
۲-۵-۱-۱۱- بررسی پروتئین تولید شده بر روی ژل آکریل آمید(SDS-PAGE) ٩٢
۲-۵-۱-۱۲- بهینه سازی بیان پروتئین در مخمر پیکیا پاستوریس ٩٢
۲-۵-۱-۱۳- مقایسه میزان بیان پروتئین نوترکیب در مخمر پیکیا پاستوریس و باکتری اشرشیا کلی ٩٣
۲-۵-۱-۱۴- مراحل وسترن بلاتینگ پروتئین نوترکیب تخلیص شده با آنتی بادی های ضد هیستیدین ٩٤
۲-۵-۱-۱۶- انجام آزمایش درون تن برای مقایسه کارایی نانوبادی بیان شده در باکتری اشرشیا کلی و مخمر پیکیا پاستوریس ٩٧
۲-۵-۱-۱۶-۲- ارزیابی In vivo برای تعیین کارایی خنثی کنندگی نانوبادی و مقایسه کارایی نانوبادی بیان شده در باکتری و مخمر ... ٩٧
۳-۱- ترادف ژن بخش متصل شونده *BoNT/E* پس از اعمال تغییر کد واژه ها متناسب با ترجیح کدونی در *E.coli* ٩٩

۳-۲- تخلیص پلاسمید ۱۰۰
۳-۳- هضم آنزیمی پلاسمید های استخراج شده ۱۰۱
۳-۴- زیر همسانه سازی قطعهbp ۱۳۰۲ (قسمت اتصال دهنده توکسین) در ناقل بیانی pET28a ۱۰۱
۳-۵- بیان ژن در ناقل pET28a ۱۰۲
۳-۶- تخلیص پروتئین های نوترکیب ۱۰۳
۳-۷- سنجش غلظت پروتئین ۱۰۵
۳-۸- آزمایش الیزا با استفاده از آنتی توکسین استاندارد بوتولینوم تیپ E و پروتئین نوترکیب ۱۰۶
۳-۹- مراحل بیان نانوبادی علیه نوروتوکسین بوتولینوم نوع E در مخمر پیکیا پاستوریس ۱۰۷
۳-۹-۱- تهیه وکتورهای PichiaPink™ نوترکیب حاوی ژن نانوبادی ۱۰۷
۱) طراحی پرایمر ۱۰۷
۲) انجام PCR جهت به دست آوردن ژن نانوبادی ۱۰۸
۳) هضم وکتور وقطعه نانوبادی با آنزیم های برشی محدودالاثر جهت انجام واکنش الحاق ۱۰۹
۴) تخلیص محصولات هضم آنزیمی توسط کیت تخلیص از ژل Bioneer ۱۱۰
۳-۹-۲- تخلیص وکتور pPink-HC دارای ژن مورد نظر ۱۱۱
۳-۹-۳- خطی نمودن پلاسمید کلون شده و تخلیص آن ۱۱۲
۳-۸-۴- غربالگری کلنی های مخمر ۱۱۳
۳-۹-۵. تایید کلون های مخمر انتخاب شده با روش Colony PCR ۱۱۵
۳-۹-۶- بیان کلنی های نوترکیب حاوی ژن نانوبادی ۱۱۶
۳-۹-۷. بهینه سازی بیان پروتئین در مخمر پیکیا پاستوریس ۱۱۷
۳-۹-۸. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از سیستم الکتروفورز Native PAGE ۱۱۸
۳-۹-۹. مقایسه میزان بیان پروتئین نوترکیب در مخمر پیکیا پاستوریس و باکتری اشرشیا کلی ۱۱۹
۳-۹-۱۰. آنالیز نانوبادی تولیدی با روش وسترن بلات با کمک آنتیبادي منوکلونال ضد His Tag ۱۱۹
۳-۹-۱۱. ارزیابی میزان تمایل نانوبادی به آنتی ژن (قسمت اتصال دهنده توکسین نوع E) با آزمایش الایزا ۱۲۰
۳-۹-۱۲. ارزیابی In vivo برای تعیین کارایی خنثی کنندگی نانوبادی و مقایسه کارایی نانوبادی بیان شده در باکتری و مخمر ۱۲۲
۴-۱- رویکرد کلی پژوهش ۱۲۵
۴-۲- ویژگی های نوروتوکسین بوتولینوم نوع E: ۱۲۶
۴-۳- سیستم بیانی پیکیا پاستوریس ۱۲۸
نتیجه گیری کلی: ۱۳۳
۴-۴- پیشنهادات ۱۳۳

منابع ۱۳۳

پیوست ها ۱۴۰

Abstract ۱۵۰

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ رابطه گونه های مهم کلستریدیوم بر اساس توالی های ژنی۱۶S rRNA..... ۳

شکل ۱-۲ ساختار مولکولی نوروتوکسین بوتولینوم ، (L:Light chain) و (H: Heavy chain)..... ۸

شکل۱-۳ ساختار سوم نوروتوکسین بوتولینوم..... ۹

شکل۱-۴ مکانیسم عمل نوروتوکسین بوتولینوم (BoNT) ۱۲

شکل۱-۵ تصویر میکروسکوپی مخمر پیکیا پاستوریس..... ۲۶

شکل ۱-۶ واکنش بیوشیمیایی مربوط به متابولیسم متانول که در پراکسی زوم مخمر پیکیا پاستوریس رخ می دهد..... ۲۸

شکل۱-۷ تصویر وکتور pPink-HC..... ۳۷

شکل۱-۸ ساختار آنتی بادی ها ، قطعات Fab ، Fv ، scFv..... ۴۰

شکل ۱-۹ تصاویر نواحی CDR ۴۱

شکل ۱-۱۰ انواع آنتی بادی ها و قطعات آنها..... ۴۴

شکل۱-۱۱ تفاوت ساختاری آنتی بادی های معمول پستانداران با آنتی بادی های تک زنجیره ای شتری..... ۴۵

شکل ۳-۱ ترادف ژن بخش متصل شونده*BoNTE* ۹۹

شکل۳-۲ تصویر ژل الکتروفورز پلاسمید $pET\text{-}23_a$ تخلیص شده..... ۱۰۰

شکل۳-۳ الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی $pET\text{-}23_a$ حاوی قطعه 1302bp..... ۱۰۱

شکل ۳-۴ ژل آگاروز مربوط به پلاسمیدهای هضم شده با آنزیم های XhoI وEcoRI..... ۱۰۲

شکل۳-۵ بررسی بیان ژن در شرایط دناتوره بر روی آکریل آمید ۱۲ در صد..... ۱۰۳

شکل ۳-۶ بررسی تخلیص پروتئین نوترکیب..... ۱۰۴

شکل ۳-۷ وکتور pPink-HC..... ۱۰۷

شکل ۳-۸ الکتروفورز محصول..... ۱۰۸

شکل ۳-۹ هضم وکتور و قطعه نانوبادی با آنزیم های KpnI و E.coRI..... ۱۰۹

شکل ۳-۱۰ تخلیص محصولات هضم آنزیمی..... ۱۱۰
شکل ۳-۱۱ تخلیص وکتور pPink-HC دارای ژن VHH..... ۱۱۱
شکل ۳-۱۲ وکتور خطی شده pPink-HC حاوی ژن VHH..... ۱۱۲
شکل ۳-۱۳ مراحل کلونینگ و غربالگری کلنی های مخمر..... ۱۱۳
شکل۳-۱۴ کلون های حاصل از ترانسفورم وکتور خطی به مخمرهای مستعد شده ۱۱۴
شکل۳-۱۵ تایید کلون های مخمر انتخاب شده با روش Colony PCR..... ۱۱۵
شکل۳-۱۶ بررسی بیان ژن نانوبادی در مخمر به کمک SDS-PAGE..... ۱۱۷
شکل۳-۱۷ بهینه سازی بیان ژن نانوبادی در مخمر..... ۱۱۷
شکل ۳-۱۸ تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از سیستم الکتروفورز Native PAGE..... ۱۱۸
شکل۳-۱۹ مقایسه میزان بیان پروتئین در مخمر و باکتری..... ۱۱۹
شکل۳-۲۰ وسترن بلاتینگ نانوبادی بیان شده در مخمر بعد از تخلیص..... ۱۲۰

فهرست جداول

جدول ۱-۱ بررسی موارد بوتولیسم انسانی از سال ۲۰۰۹-۲۰۰۱ توسط مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها در آمریکا..... ۶
جدول۱-۲ گونه های مخمری متیلوتروف و غیر متلوتروف استفاده شده برای بیان پروتئین های نوترکیب..... ۲۱
جدول ۱-۳. سویه های بیانی مخمر پیکیا پاستوریس..... ۳۳
جدول ۱-۴ : سویه های Pichia Pink و نوع ژن حذف شده..... ۳۶
جدول۱-۱ لیست مواد شیمیایی استفاده شده ۵۰
جدول۲-۱واکنش هضم انزیمی ناقل pET23a حاوی ژن مورد نظر..... ۶۳
جدول۲-۲ واکنش هضم آنزیمی ناقل بیانی pET28a..... ۶۵

جدول ۲-۳ واکنش الحاق بعد از تعیین غلظت ناقل pET28a و قطعه الحاقی..... ۶۷

جدول۲-۴ واکنش هضم آنزیمی وکتور pET28a..... ۷۳

جدول۲-۵ روش تهیه محلول های استاندارد..... ۷۴

جدول۲-۶ مراحل آزمایشگاهی ضروری جهت بیان ژن نانوبادی با استفاده از سیستم PichiaPink™..... ۷۵

جدول۲-۷ لیست مواد استفاده شده در واکنش PCR ۷۵

جدول۲-۹ واکنش هضم آنزیمی وکتور pPink-HC با استفاده از آنزیم EcoRI..... ۷۶

جدول۲-۱۰واکنش الحاق ناقل pPink-HC و قطعه الحاقی..... ۷۷

جدول۲-۱۱ هضم آنزیمی وکتور حاوی ژن نانوبادی جهت خطی نمودن آن..... ۷۵

جدول۲-۱۲ برنامه زمانی واکنش PCR..... ۸۳

جدول۲-۱۳ لیست مواد استفاده شده در واکنش PCR..... ۸۸

جدول ۲-۱۴ مقادیر مورد نیاز از هر کدام از محلول های SDS-PAGE جهت تهیه ژل ۱۵٪..... ۸۸

جدول۳-۱ محاسبه غلظت محلول های پروتئینی خالص شده..... ۹۲

جدول ۳-۲ نتایج حاصل از الیزای رقت های مختلف نانو بادی در مقابل رقت های مختلف آنتی ژن..... ۱۰۵

جدول ۳-۳ ارزیابی In vivo برای تعیین کارایی خنثی کنندگی نانوبادی ۱۲۲

فهرست نمودارها

نمودار۳-۱ نمودار استاندارد برادفورد..... ۱۰۵

نمودار۲-۳ بررسی آزمایش الیزا با استفاده از آنتی توکسین استاندارد تیپ E و پروتئین نوترکیب..... ۱۰۶

نمودار۳-۳ نتایج الیزای رقت های مختلف نانوبادی در مقابل رقت های کاهش یافته آنتی ژن..... ۱۲۰

فصل اول

مقدمه

چکیده

مخمر پیکیا پاستوریس یک میزبان برجسته برای تولید پروتئین های نوترکیب است و در مقایسه با دیگر سیستم های بیانی مزایای فراوانی دارد. از جمله اینکه این سیستم به عنوان یک یوکاریوت، قادر است تعداد زیادی از تغییرات پس از ترجمه همچون پردازش پروتئولتیک، فولدینگ صحیح، تشکیل پیوند های دی سولفیدی و گلیکوزیلاسیون پروتئین ها را انجام دهد. همچنین قادر به استفاده از متانول به عنوان تنها منبع کربن در غیاب گلوکز و ترشح پروتئین های تولید شده به محیط می باشد. 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 نوروتوکسین بوتولینوم نوع E در پیکیا پاستوریس بیان و سپس تخلیص گردید. ژن VHH دروکتور pPink-Hc کلون و در ابتدا به باکتری اشرشیا کلی(top10) منتقل شد. وکتور™ PichiaPink 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) کشت داده شد. VHH نوترکیب 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. کارایی نانوبادی بیان شده در مخمر، در بدن موجودات زنده (موش) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین مقایسه ای میان کارایی نانوبادی بیان شده در مخمر و باکتری صورت پذیرفت. نانوبادی بیان شده در مخمر توانست در بدن موش های مورد آزمایش، دوز کشنده ۵۰ درصد توکسین را، در ۲۵ درصد موش ها تا ۴ برابر افزایش دهد. همچنین نانوبادی بیان شده در باکتری توانست زمان زنده ماندن موش ها را به دو برابر افزایش دهد. در پایان مشخص شد که نانوبادی بیان شده در مخمر در جهت مهار توکسین کارایی بهتری دارد.

۱-۱- مقدمه

بوتولیسم یک بیماری نادر با فلج پیش رونده است که به وسیله توکسین تولید شده توسط باکتری کلستریدیوم بوتولینوم تحت شرایط بی هوازی ایجاد می گردد. نوروتوکسین های بوتولینم (BoNT) با ممانعت از آزادسازی استیل کولین از انتهاهای عصب پیش سیناپسی، بر روی سیستم اعصاب محیطی عمل می کنند و موجب فلج شل شونده می شوند. هولوتوکسین ها با وزن مولکولی ۱۵۰کیلو دالتون، شامل سه دمین هستند که به طور جداگانه مسئول اتصال پذیرنده نورونی، انتقال و کاتالیز می باشند. این توکسین ها به محض ورود به نورون های حرکتی، موجب برش پروتئولتیک پروتئین های SNARE می شوند که این پروتئین ها نقش کلیدی در آزاد سازی نوروترانسمیترها بازی می کنند. پروتئولیز SNARE، توسط دمین ۵۰ کیلودالتونی توکسین به نام متالوپروتئیناز (زنجیره سبک (Lc) نیز نامیده می شوند)، صورت می گیرد. در تعدادی از سروتیپ های بوتولینوم شناخته شده، پروتئازها به طور قابل توجهی در سیتوسل سلول عصبی پایدارند و سمیت آنها برای چندین ماه باقی می ماند. BoNT ها به دلیل توانایی بسیار زیاد، مقاومت و تولید نسبتا آسانشان از جدی ترین تهدیدکننده های بیوتروریسم هستند. عوامل ضد توکسینی وجود دارد که اگر قبل از ظهور علائم سمیت تزریق شوند، می توانند از سمیت BoNT پیشگیری کنند. به طور رایج، هیچ پادزهری که بتواند نشانه های سمیت را بعد از ظهور آنها بر طرف کند، وجود ندارد. در نتیجه بیماران مبتلا به بوتولیسم برای چندین ماه باید تحت مراقبت های تنفسی قرار بگیرند. چندین تیم تحقیقاتی در حال تولید داروهای مولکولی کوچکی هستند که پروتئازهای BoNT Lc را مهار کنند و سمیت را برطرف نمایند. بیومولکول هایی که با افنیتی بالا به پروتئازهای BoNT متصل می شوند، به ویژه آنهایی که فعالیت آنزیم را مهار می کنند، می توانند در توسعه عوامل درمانی بوتولیسم نقش داشته باشند[۱-۴].

با توجه به توانایی بسیار بالای نوروتوکسین ها در ایجاد بیماری و میزان مرگ ومیر در بیماران نیاز به توسعه واکسن بر علیه این عارضه ضروری به نظر می رسد. طراحی نسل جدید واکسن های بوتولینوم و استفاده از قطعه Hc نوروتوکسین ها به عنوان بخش ایمونوژن و کاندیدای واکسن بسیار مورد توجه است.

۱-۲- معرفی میکروارگانیسم

۱-۲-۱- جنس کلستریدیوم

تمام کلستریدیوم ها، باسیل های میله ای شکل گرم مثبت وتولید کننده اسپور بوده که طول آنها ۳ تا ۸ میکرون و پهنای آنها ۱/۲- ۰/۴ میکرون می باشد. بیشتر کلستریدیوم ها بی هوازی اجباری وتعداد کمی نیز آئروتولرانت (متحمل در برابر اکسیژن) می باشند. به استثنای کلستریدیوم پرفرنژانس که غیر متحرک می باشد، بیشتر گونه های کلستریدیوم متحرک با تاژک های پری تریش هستند. به جز موارد بسیار نادر، اسپورهای این جنس رویش نمی یابند مگر شرایط احیای مناسب دردسترس باشد و اکسیژن نیز وجود نداشته باشد. کلستریدیوم ها وقتی که شرایط بی هوازی برای آنها فراهم گردد، به راحتی در آزمایشگاه کشت می شوند[۵].

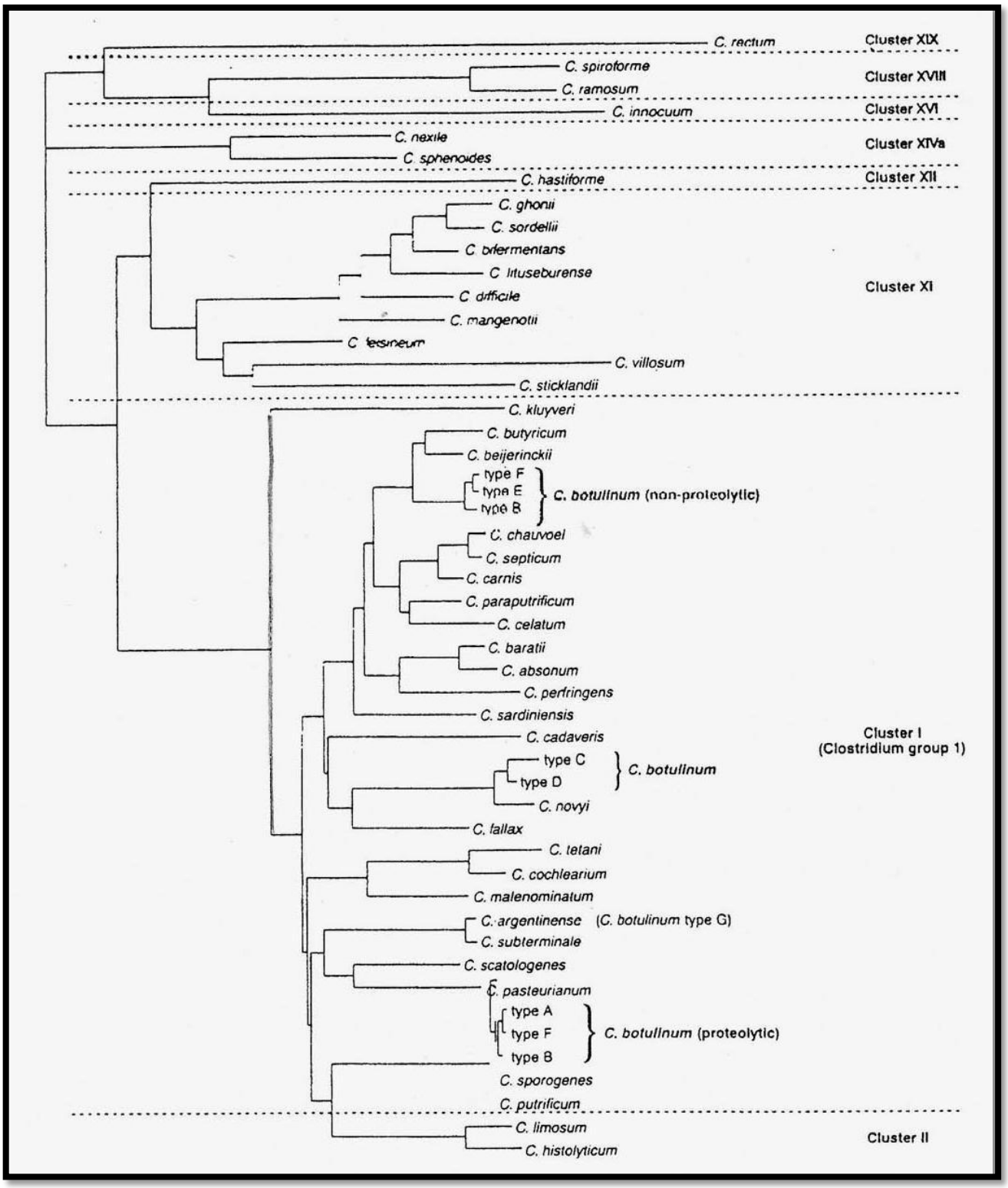
۱-۲-۲- طبقه بندی انواع کلستریدیوم ها

جنس کلستریدیوم بر اساس مورفولوژی، نوع بیماری، پاتوژنسیتی، توکسیژنسیتی، منبع جداسازی، خصوصیات فیزیولوژیکی و متابولیکی، رنگ آمیزی ، ویژگی های سرولوژیک ، همسانی DNA و همسانی ردیف ژن RNA ریبوزومی طبقه بندی می شوند. کتاب باکتریولوژی سیستماتیک برجی[1] ۸۳ گونه را در جنس کلستریدیوم فهرست کرده است. نام ۷۵ گونه از جنس کلستریدیوم به وسیله کمیته بین المللی باکتریولوژی سیستماتیک به صورت رسمی تصویب گردید. نام ۴۶ گونه دیگر به این لیست اضافه و نام سه گونه قبلی از آن حذف گردیده و در مجموع ۱۱۸ گونه سمی کلستریدیوم طبقه بندی شده است[۶, ۷]. گونه های کلستریدیوم بر اساس موقعیت بازهای نوکلئوتید DNA به دو جنس تقسیم می شوند. گوناگونی ارگانیسم های طبقه بندی شده به عنوان جنس کلستریدیوم با مطالعات همسانی ژن S rRNA ۱۶ بیشتر نمایان می گردد[۸]

در مطالعه ای که بر اساس درصد بازهای C+G رشته های DNA و همسانی ژن ۲۳S rRNA گونه های کلستریدیوم انجام گرفت، جنس کلستریدیوم به چهار گروه تقسیم گردید(۱۴). سه گروه اول دارای درصد پایین G+C (۲۳-۲۲%) و گروه چهارم داری گونه هایی با درصد بالای G+C (۴۵-۴۱٪) می باشد. اخیرا با بررسی توالی ژنی ۱۶S rRNA از ۱۲۹ گونه های مختلف کلستریدیوم تاکسونومی متفاوتی در نظر گرفته شد که بر اساس این بررسی شجره نامه به ۱۹ شاخه تقسیم شده است. اکثر گونه های پزشکی در

1.bergey's systematic bacteriology

شاخه ۱ قرار دارد شکل(۱-۱). گروهی، گونه تولید کننده تیپ G کلستریدیوم بوتولینوم را با کلستریدیوم آئروجنز مرتبط می دانند، در نتیجه کلستریدیوم بوتولینوم را به سه گروه تقسیم می کنند[۸, ۹].



شکل ۱-۱. رابطه گونه های مهم کلستریدیوم بر اساس توالی های ژنی۱۶S rRNA

۱-۲-۳- ویژگی های رشد:

کلستریدیوم ها می توانند قندهای گوناگونی را تخمیر کنند. بسیاری می توانند پروتئین ها را هضم کنند. شیر توسط بعضی از آنها اسیدی می شود و توسط بعضی دیگر هضم می شود و" تخمیر طوفانی"(یعنی ایجاد لخته ای که توسط گاز تکه تکه می شود) توسط یک گروه از آنها (کلستریدیوم پر فرنجنس) صورت می گیرد. آنزیم های مختلف توسط گونه های مختلف تولید می شوند.

۱-۲-۴- خصوصیات بیوشیمیایی وکشت:

این باکتری بی هوازی مطلق بوده در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه به خوبی رشد می کند . محیطهای اندکی قلیایی برای رشد میکروب مناسب تر است. باکتری در محیطهای مایع به ویژه آبگوشت حاوی قطعات کبد به فراوانی رشد می کند و اگر مقدار ٪۵ گلوکز به محیط کشت افزوده شود، رشد بهبود خواهد یافت. کلونی های باکتری در سطح محیط آگار و در شرایط بی هوازی ، کوچک ، نامنظم و نیمه شفاف به رنگ سفید مایل به خاکستری تا قهوه ای متمایل به زرد و دارای سطحی گرانولار دیده می شود.

کلونی در عمق محیط کرک دار است . کلستریدیوم بوتولینوم ژلاتین را ذوب می کند(در سویه های مختلف متغیر است) . گلوکز را بطور کامل و فروکتوز، ساکاروز ، مالتوز و سالیسین را بطور متغیر(بسته به سویه های مختلف مثبت یا منفی بودن آن متفاوت است) تخمیر می کند اما قادر به تخمیر لاکتوز و زایلوز نیستند . تخمیـر با تولید گاز همـراه است و مواد حاصل از تخمیر مقدار زیادی اسید استیک است. اسیدهای چرب دیگری نیز ایجاد می شود که مقدار و نوع آن بر حسب سویه باکتری متفاوت است و شامل اسیدهای بوتیریک ، ایزوبوتیریک ، والریک و ایزوکاپروئیک است[۱۰, ۱۱].

تست لیپاز مثبت، اما تستهای اندول و نیترات و اوره آنها منفی است. از نظر تاثیر بر مواد پروتئینی بعضی از سویه ها پروتئولیتیک و بعضی دیگر غیر پروتئولیتیک هستند. سویه های پروتئولیتیک کلستریدیوم بوتولینوم را پارابوتولینوم نیز می گویند که این سویه ها شیر را به کندی منعقد و لخته حاصل را هضم می کنند. سرم منعقد و سفیده تخم مرغ بسته شده را هضم و محیط را کدر و بوی بد و نامطبوعی تولید می کنند. در محیطهای حاوی تکه های مغز و گوشت نیز در اثر هضم این بافتها بوی زننده ای ایجاد می نمایند[۱۰, ۱۱].

۱-۲-۵- کلستریدیوم بوتولینوم

گونه کلستریدیوم بوتولینم از نظر ژنتیکی شامل چهار گروه مختلف می باشد، به طوری که فقط از نظر توکسین شبیه به هم اند و از نظر سایر ویژگی ها با هم متفاوتند. توکسین بوتولیسم براساس تفاوت آنتی ژنیک خود به انواع A,B,C,D,E,F,G تقسیم می شود که انواع F وA,B,E در انسان بیماریزا بوده در حالیکه انواع C,D تقریبا به طور انحصاری در حیوانات موجب بیماری می گردد. نوع G بیماری خاصی را تا کنون به وجود نیاورده است (جدول ۱-۱)[۲, ۱۲-۱۴]. اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم در نمونه های خاک و رسوبات دریایی در سرتاسر دنیا یافت می شوند. سم تولید شده به وسیله این باسیل از جنس پروتئین است که نسبت به حرارت حساس بوده و حرارت ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت یا ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه آن را از بین می برد. این سم نسبت به اشعه دارای مقاومت بالایی است و آنتی بیوتیک هم روی آن بی اثر است و آب اکسیژنه ۱۰ درصدی نیز روی آن اثری ندارد. باکتری در pH کم اسیدی و شرایط غلظت پایین اکسیژن رشد می کند و تولید توکسین می کند. این سموم شناخته شده مرگ آوری هستند که با اثر کلی بر روی اعصاب ، باعث فلج پیش رونده در بیمار می شوند[۷۵].

۱-۲-۶- علایم بالینی بیماری بوتولیسم

بیماری بوتولیسم از زمان های گذشته قبل از اینکه عامل باکتریایی و مکانیزم اثر توکسین آن مشخص شود، شناخته شده بود. بیماری هایی که ناشی از مسمومیت سم بوتولیسم می باشند به پنج نوع مختلف تقسیم می شوند: (جدول۱-۱)

۱- بوتولیسم غذایی[۱]

۲ -بوتولیسم زخم[۲]

۳- بوتولیسم نوزادان[۳]

۴-بوتولیسم بزرگسالان[۴]

---

1. Foodborne botulism
2. Wound botulism
3. Infant botulism

۵- بوتولیسم ناشناخته[1]

در بوتولیسم غذایی، توکسین به وسیله غذا وارد معده شده، پس از هضم از طریق گردش خون به ماهیچه ها می رسد و مانع از آزاد شده استیل کولین در اعصاب محیطی می گردد که این امر سبب فلج شل در عضلات می شود. میزان سمیت آن در موش یک دهم تا یک نانوگرم بر کیلوگرم وزن بدن و در انسان یک دهم تا دو میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن می باشد[۴, ۱۵, ۱۶].

جدول ۱-۱: بررسی موارد بوتولیسم انسانی از سال ۲۰۰۹-۲۰۰۱ توسط مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها در آمریکا

Type of botulism	Average number of cases per year	Percent of total	BoNT Serotypes
Infant	85	66	A, B, E, F
Wound	24	19	A, B
Foodborne	19	15	A, B, E, F
Adult	0.4	0.3	A, B, F
Unknown	1.4	1	A, B, F

انواع کلستردیوم بوتولینوم ها ممکن است در داخل ماده غذایی، تولید موادی به نام بوتیسین(buticine) کنند، که این ماده از رشد بقیه کلستردیوم ها جلوگیری می کند. مثلا اگر در یک ماده غذایی کلستردیوم نوع F تولید بوتیسین کرده باشد، تیپ E در این ماده غذایی رشد نمی کند، مگر این که به محیط، تریپسین که فعال کننده تیپ E است و مانع تاثیر بوتیسین انواع دیگرمی شود، اضافه کنند.

نشانه های عمومی بوتولیسم دوبینی، دید تار، لکنت زبان، ضعف عضلانی و خشکی دهان می باشد که پزشکان با توجه به نشانه های بیماری و معاینه فیزیکی بیمار، بیماری را تشخیص می دهند.

---

1. Unknown Botulism