بسم الله
الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی دکتری رشته ی زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی

تولید نانوبادی علیه ویروس پاپیلومای انسانی با روش نمایان سازی فاژی و تعیین خصوصیات آن

استادان راهنما:

دکتر سید حمید زرکش اصفهانی

دکتر فاطمه رهبری زاده

پژوهشگر:

سارا مینائیان

اسفند ماه ۱۳۹۰

كليه حقوق مادي مترتب بر نتايج مطالعات، ابتكارات و نوآوري هاي ناشي از تحقيق موضوع اين پايان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی دکتری رشته ی زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی خانم سارا مینائیان

تحت عنوان

تولید نانوبادی علیه ویروس پاپیلومای انسانی با روش نمایان سازی فاژی و تعیین خصوصیات آن

در تاریخ ۹۰/۱۲/۱۰ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر سید حمید زرکش اصفهانی با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۲- استاد راهنمای پایان نامه دکتر فاطمه رهبری زاده با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر مجید بوذری با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر رسول روغنیان با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر محمد حسین نصر اصفهانی با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

امضای مدیر گروه

تقدیم با بوسه بر دستان بهترین ها:

به مادر نازنینم که از او هر چه بگویم باز هم کم گفته ام

خورشیدی شد و از روشنایی اش جان گرفتم و در ناامیدی ها نازم را کشید و لبریزم کرد از شوق

اکنون حاصل دستان خسته اش رمز موفقیتم شد

به خودم تبریک می گویم که او را دارم و دنیا با همه بزرگیش مثل او را ندارد

به پدر بزرگوارم که شوق زیبای نفس کشیدن و روح مهربان هستی ام است

او که عمری خستگی ها را به جان خرید تا توانست طعم خوش

پیروزی را به من بچشاند

به پدر بزرگ گرانمایه ام که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی ایستادگی را تجربه نمایم

اوکه همیشه و همه جا یار و یاورم است.

به خاله مهربانم که بودنش تاج افتخاری است بر سرم و سایه مهربانیش سایه سار زندگیم

او که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بود و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات

به برادر عزیزم که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامشم است

او که دوست و همراه همیشگی ام در زندگی است

خدایا

سپاس مرا بپذیر و زبان قاصر مرا در شکر نعمت های فراوانت گویا نما. این اندک را با تمام عشق و اشتیاق بندگی ام به بارگاه مقدس و رفیعت تقدیم می کنم و سر بر سجده می گذارم که بی لطف و عنایت تو توان برداشتن گامی با من نبود. سپاس بیکران که این مسیر را پیش روی من قرار دادی و توان مقابله با مشکلات را به من عطا فرمودی.

با سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر سید حمید زرکش اصفهانی که در سایه عنایت، راهنمایی ها و الطاف بی حدشان مجال انجام این پایان نامه برایم محقق گشت.

سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده که با زحمات بی دریغ و راهنمایی های ارزنده ایشان این پایان نامه به ثمر نشست.

استادان محترم جناب آقای دکتر رسول روغنیان، جناب آقای دکتر مجید بوذری و جناب آقای دکتر محمد حسین نصر اصفهانی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند.

جناب آقای دکتر سعید افشارزاده مدیر محترم گروه زیست شناسی جهت همکاری ها و الطاف بی دریغشان.

تمامی اساتید گروه زیست شناسی به ویژه بخش میکروبیولوژی که افتخار شاگردیشان برایم افتخار بزرگی است.

تمامی کارکنان گروه زیست شناسی به ویژه آقای انتشاری، خانم باقری، ،آقای حیدری و خانم قربانی جهت همکاری های بی دریغ و محبت های بی حدشان.

تشکر ویژه از خانم ها شریف زاده، کیایی، شبستری، شیری، نریمانی، عرب، فخریان، اخوان، شمس و تمامی کسانی که در انجام این پایان نامه مرا یاری نمودند.

چکیده

ویروس پاپیلومای انسانی عامل اصلی سرطان دهانه رحم می باشد. عفونت پایدار با تیپ های پر خطر ویروس پاپیلومای انسانی به مدت طولانی منجر به سرطان دهانه رحم و نئو پلازی های اینترا اپیتلیال می گردد. سرطان دهانه رحم پس از سرطان سینه دومین عامل مرگ و میر در زنان می باشد. متاسفانه این سرطان در کشورهای در حال توسعه از شیوع بیشتری برخوردار است. ابتلا به این ویروس علایم خاصی ندارد و به راحتی از فردی به فرد دیگر انتقال پیدا می کند. مطالعات انجام شده نشان می دهد روش های موثر در پیشگیری از عفونت ویروس پاپیلومای انسانی می تواند منجر به کاهش شیوع و مرگ و میر ناشی از سرطان دهانه رحم گردد. اخیرا با پیشرفت هایی که در زمینه ساخت آنتی بادی های مونوکلونال صورت گرفته است امید های تازه ای در پیشگیری، درمان هدفمند و تشخیص زود هنگام بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان ها حاصل شده است. نانوبادی ها کوچکترین قطعه متصل شونده به آنتی ژن می باشند که از آنتی بادی های زنجیره سنگین شتری مشتق شده اند. نانوبادی ها در مقایسه با آنتی بادی های معمولی خواص ویژه ای از خود نشان می دهند که از جمله آنها کوچکی اندازه، پایداری بالا، حلالیت زیاد و قابلیت تولید انبوه می باشد.

این تحقیق با هدف تولید نانوبادی اختصاصی علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی و اتصال آن به آنزیم HRP صورت گرفت. به این منظور با استفاده از تکنیک نمایش فاژی در ابتدا کتابخانه فاژمیدی علیه پروتئین L1 چهار تیپ ویروس پاپیلومای انسانی شامل تیپ های ۶، ۱۱، ۱۶ و ۱۸ غنی سازی شد. چندین کلون از کتابخانه غنی سازی شده جداسازی شدند و با استفاده از تکنیک مونوکلونال فاژ الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. توالی بهترین کلون ها تعیین و بررسی شد. سپس بیان قطعات نانوبادی در باکتری Rosetta gami 2 انجام شد و به کمک تکنیک الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از این مرحله نانوبادی های انتخاب شده از نظر ویژگی، حساسیت و تمایل اتصال تعیین خصوصیت شدند. دو نانوبادی برای تولید انبوه انتخاب شدند که تولید آنها توسط تکنیک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. سپس این دو نانوبادی به کمک ستون Ni- NTA تخلیص شدند و کیفیت تخلیص آنها با روش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان بهترین نانوبادی به آنزیم HRP متصل شد و عملکرد آن به کمک تست الایزا بررسی گردید. نانوبادی تخلیص شده قادر به اتصال اختصاصی و با افینیتی بالا به آنتی ژن L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ می باشد.

از این نانوبادی می توان جهت شناسایی پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ استفاده نمود. همچنین کاربرد این نانوبادی در زمینه پیشگیری و تشخیص عفونت ویروس پاپیلومای انسانی می تواند تحت بررسی های بیشتری قرار گیرد.

کلید واژه ها: نانوبادی، ویروس پاپیلومای انسانی، نمایش فاژی، پروتئین L1 ، آنزیم HRP

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- ویروس پاپیلومای انسانی ۱

۱-۱-۲- ساختار ویروس پاپیلومای انسانی و خواص فیزیکی ۱

۱-۱-۳- ژنوم و پروتئین های ویروس پاپیلومای انسانی ۲

۱-۱-۴ چرخه زندگی ویروس پاپیلومای انسانی ۴

۱-۱-۴-۱ اتصال ویروس به سطح سلول میزبان ۴

۱-۱-۴-۲ ورود ویروس به داخل سلول ۴

۱-۱-۴-۳ بقا ژنوم و عفونت زایی ۵

۱-۱-۴-۴ تکثیر و خروج ویروس از سلول ۶

۱-۱-۵ پروتئین L1 ..... ۶

۱-۱-۶ انواع پر خطر و کم خطر ویروس پاپیلومای انسانی ۸

۱-۱-۷ عفونت تناسلی ویروس پاپیلومای انسانی ۹

۱-۱-۸ نئوپلازی اینترا اپیتلیال دهانه رحم ۱۰

۱-۱-۹ پاسخ ایمنی ۱۰

۱-۱-۱۰ عوامل خطر ابتلا به سرطان دهانه رحم ۱۱

۱-۱-۱۱ شیوع آلودگی با ویروس پاپیلومای انسانی ۱۳

۱-۱-۱۱-۱ شیوع عفونت پاپیلومای انسانی در زنان ۱۳

۱-۱-۱۱-۲ شیوع عفونت ویروس پاپیلومای انسانی در مردان ۱۴

۱-۱-۱۲ تشخیص زود هنگام سرطان دهانه رحم ۱۴

عنوان **صفحه**

۱ ۱-۱-۱۲-۱ تست پاپ اسمیر ۱۵

۱-۱-۱۲-۲ روش هیبرید شدن در محل ۱۶

۱-۱-۱۲-۳ ایمونوهیستوشیمی ۱۶

۱-۱-۱۲-۴ آزمایش زنجیره ای پلی مرازی ۱۶

۱-۱-۱۳ پیشگیری از سرطان دهانه رحم به کمک واکسیناسیون ۱۷

۱-۲ آنتی بادی ها ۱۹

۱-۲-۱ تاریخچه ۱۹

۱-۲-۲ ساختار آنتی بادی ۱۹

۱-۲-۲-۱ ساختار ژنتیکی آنتی بادی ۲۱

۱-۲-۳ آنتی بادی های مونوکلونال ۲۲

۱-۲-۴ مهندسی آنتی بادی ۲۴

۱-۲-۵ انواع آنتی بادی های نوترکیب ۲۴

۱-۲-۶ آنتی بادی درمانی ۲۷

۱-۲-۶-۱ آینده ایمونوتراپی ۲۷

۱-۳ تکنیک نمایش فاژی ۲۹

۱-۳-۱ جداسازی و غربالگری آنتی بادی های نوترکیب توسط تکنیک نمایش فاژی ۳۱

۱-۴ اهداف مهندسی آنتی بادی ۳۲

۱-۴-۲ کاربرد آنتی بادی های نوترکیب در مصارف پزشکی ۳۲

۱-۴-۲-۱ انسانی کردن آنتی بادی ها ۳۳

۱-۴-۲-۲ ایمونوتوکسین ها ۳۴

عنوان **صفحه**

۱-۴-۲-۳ آنتی بادی های با خاصیت دوگانه ۳۴

۱-۴-۲-۴ آنتی بادی های متصل به سوپر آنتی ژن ۳۵

۱-۵ نانوبادی ها ۳۶

۱-۵-۱ آنتی بادی های زنجیره سنگین در خانواده شترها ۳۷

۱-۵-۲ مزایای نانوبادی ۳۸

۱-۵-۲-۱ حلالیت بالا ۳۹

۱- ۵-۲-۲ پایداری بالا در شرایط سخت ۳۹

۱-۵-۲-۳ شباهت بالای VH انسانی با VHH ۴۱

۱-۵-۲-۴ شناسایی آنتی ژن های خاص ۴۱

۱-۵-۲-۵ تسهیل ساخت کتابخانه ۴۲

۱-۵-۲-۶ بیان بالای نانوبادی ها ۴۳

۱-۵-۲-۷ ویژگی نسبت به آنتی ژن و تمایل بالای اتصالی ۴۳

۱-۶ مراحل کلی تکنیک نمایش فاژی برای تولید نانوبادی ۴۳

۱-۶-۱ استخراج و تکثیر ژن نانوبادی ۴۴

۱-۶-۲ کلون سازی کتابخانه در وکتورهای فاژی ۴۴

۱-۶-۲-۱ وکتورهای مناسب برای کلون کردن در تکنیک نمایش فاژی ۴۵

۱-۶-۲-۲ ساختار باکتریوفاژ M13 ..... ۴۵

۱-۶-۲-۳ آلوده سازی باکتری توسط فاژ M13 ..... ۴۶

۱-۶-۲-۴ فاژ کمکی ۴۸

۱-۶-۲- ۵ وکتور فاژمیدی ۴۸

عنوان **صفحه**

۱-۶-۳ انتخاب کلون ۴۹

۱-۶-۴ غربالگری ۵۱

۱-۶-۴-۱ غنی سازی بر اساس میل پیوندی آنتی بادی به یک آنتی ژن ۵۲

۱-۶-۴-۲ غنی سازی بر اساس میل پیوندی آنتی بادی به مجموعه ای از آنتی ژن ها ۵۳

۱-۶-۴-۳ انتخاب یا غنی سازی فاژ پس از پردازش ۵۴

۱-۶-۴-۴ انتخاب کارآمد فاژ و یا انتخاب لیگاند بر اساس بیان ۵۵

۱-۷ کاربردهای نانوبادی ۵۷

۱-۷-۱ نفوذ به تومورها ۵۷

۱-۷-۲ نانوبادی ها علیه سموم ۵۷

۱-۷-۳ نانوبادی علیه ویروس ها ۵۸

۱-۷-۴ نانوبادی علیه انگل ها ۵۹

۱-۷-۵ نانوبادی علیه باکتری های پاتوژن ۶۰

۱-۷-۶ نانوبادی علیه تومورمارکرها ۶۰

۱-۷-۷ نانوبادی های چند ظرفیتی ۶۲

۱-۷-۸ نانوبادی ها ابزارهای کارامد در تصویربرداری ۶۴

۱-۸ ایمونواسی ۶۶

۱-۸-۱ ایمونو حسگرها ۶۷

۱-۹ اهداف مورد نظر این تحقیق ۶۹

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ مواد ۷۰

عنوان **صفحه**

۲-۱-۱ تهیه باکتری مستعد *E. coli* ۷۰

۲-۱-۲ تکثیر و تخلیص فاژ کمکی M13KO7 ..... ۷۱

۲-۱-۳ تعیین تیتر فاژ کمکی ۷۲

۲-۱-۴ تکثیر کتابخانه فاژمیدی pComb3x حاوی نانوبادی ۷۲

۲-۱-۵ ذخیره سازی کتابخانه ژنی پس از انتقال به میزبان ۷۳

۲-۱-۶ غنی سازی با آنتی ژن L1 ..... ۷۳

۲-۱-۷ تعیین تیتر فاژهای ورودی و خروجی مراحل غنی سازی ۷۴

۲-۱-۸ بررسی محصولات غنی سازی توسط تکنیک پلی کلونال فاز الایزا ۷۴

۲-۱-۹ غربالگری فاژهای مونوکلونال مورد نظر با استفاده از تکنیک مونوکلونال فاژ الایزا ۷۵

۲-۱-۱۰ بررسی ژن نانوبادی در کلون های انتخابی به کمک تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرازی ۷۶

۲-۱-۱۱ استخراج پلاسمید از کلون های منتخب ۷۷

۲-۱-۱۲ تهیه باکتری Rosetta gami 2 ..... ۷۷

۲-۱-۱۳ آلوده سازی باکتری Rosetta gami 2 با فاژهای انتخاب شده ۷۷

۲-۱-۱۴ ترشح قطعات نانوبادی محلول از باکتری Rosetta gami 2 ..... ۷۸

۲-۱-۱۵ استخراج نانوبادی های محلول از باکتری ۷۸

۲-۱-۱۶ بررسی میزان واکنش نانوبادی های محلول حاصل از فاژهای منتخب با آنتی ژن L1 ویروس پاپیلومای تیپ ۱۶ ..... ۷۸

۲-۱-۱۷ بررسی ویژگی نانوبادی های منتخب ۷۹

۲-۱-۱۸ بررسی حساسیت نانوبادی های منتخب ۸۰

۲-۱-۱۹ بررسی تمایل اتصال نانوبادی های منتخب ۸۱

عنوان **صفحه**

۲-۱-۲۰ کشت انبوه نانوبادی منتخب ۸۲

۲-۱-۲۱ استخراج سیتوپلاسمی نانوبادی با استفاده از امواج مافوق صوت ۸۲

۲-۱-۲۲ SDS-PAGE و وسترن بلات ۸۲

۲-۱-۲۳ تخلیص نانوبادی های منتخب با استفاده از ستون IMAC ۸۳

۲-۱-۲۴ کونژوگاسیون نانوبادی SM8 به آنزیم HRP ۸۴

۲-۱-۲۵ بررسی تیتر نانوبادی متصل به آنزیم HRP از طریق آزمایش چکربورد الایزا ۸۴

۲-۲ نرم افزار ها و سایت های اینترنتی بیوانفورماتیکی ۸۵

۲-۳ روشها ۸۶

۲-۳-۱ تهیه باکتری مستعد *E.coli* ۸۶

۲-۳-۲ تکثیر و تخلیص فاژ کمکی M13KO7 ..... ۸۷

۲-۳-۳تعیین تیتر فاژ کمکی ۸۸

۲-۳-۴ تکثیر کتابخانه فاژمیدی pComb3x حاوی نانوبادی ۸۹

۲-۳-۵ ذخیره سازی کتابخانه ژنی پس از انتقال به میزبان ۹۱

۲-۳-۶ غنی سازی با آنتی ژن L1 ..... ۹۱

۲-۳-۷ تعیین تیتر فاژهای ورودی و خروجی مراحل غنی سازی ۹۳

۲-۳-۸ بررسی محصولات غنی سازی توسط تکنیک پلی کلونال فاژ الایزا ۹۴

۲-۳-۹ غربالگری فاژهای مونوکلونال مورد نظر با استفاده از تکنیک مونوکلونال فاژ الایزا ۹۵

۲-۳-۱۰ بررسی ژن نانوبادی در کلون های انتخابی به کمک تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مرازی ۹۷

۲-۳-۱۱ الکتروفورز ۹۹

۲-۳-۱۱-۱ بافرهای مورد نیاز ۹۹

عنوان **صفحه**

۲-۳-۱۲ استخراج پلاسمید از کلون های منتخب ۱۰۰

۲-۴ تولید نانوبادی های محلول ۱۰۲

۲-۴-۱ تهیه باکتری Rosetta gami 2 ..... ۱۰۳

۲-۴-۲ آلوده سازی باکتری Rosetta gami 2 با فاژهای انتخاب شده ۱۰۳

۲-۴-۳ ترشح قطعات نانوبادی محلول از باکتری Rosetta gami 2 ..... ۱۰۴

۲-۴-۴ استخراج نانوبادی های محلول از باکتری ۱۰۴

۲-۴-۵ بررسی میزان واکنش نانوبادی های محلول حاصل از فاژهای منتخب با آنتی ژن L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۰۵

۲-۵ تعیین خصوصیات نانوباد های منتخب ۱۰۶

۲-۵-۱ بررسی ویژگی نانوبادی های منتخب ۱۰۶

۲-۵-۲ بررسی حساسیت نانوبادی های منتخب ۱۰۸

۲-۵-۳ بررسی تمایل اتصال نانوبادی های منتخب ۱۰۹

۲-۶ تولید نانوبادی محلول در مقیاس انبوه ۱۱۱

۲-۶-۱ استخراج سیتوپلاسمی نانوبادی با استفاده از امواج مافوق صوت ۱۱۱

۲-۶-۲ بررسی میزان نانوبادی های تولید شده به کمک آزمایش SDS-PAGE ۱۱۲

۲-۷ تخلیص نانوبادی های منتخب با استفاده از ستون IMAC ۱۱۸

۲- ۷-۱ محلول ها و بافرهای مورد نیاز برای IMAC ۱۱۹

۲-۷-۲ روش شارژ ستون نیکل ۱۲۰

۲-۷-۳ تخلیص به کمک ستون نیکل ۱۲۱

۲-۷-۴ بررسی نانوبادی تخلیص شده توسط تکنیک وسترن بلات ۱۲۲

عنوان **صفحه**

۲-۸ بررسی انفورماتیکی نانوبادی منتخب ۱۲۵

۲-۹ کونژوگاسیون بهترین نانوبادی به آنزیم HRP ۱۲۵

۲-۹-۱ بافر و محلول های تهیه شده برای کونژوگاسیون ۱۲۶

۲-۹-۲ مراحل کونژوگاسیون ۱۲۷

۲-۹-۳ بررسی تیتر نانوبادی اتصال یافته به HRP بعد از کونژوگاسیون ۱۲۸

فصل سوم: نتایج

۳-۱ تخلیص فاژمید حاوی ژن نانوبادی علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی ۱۳۰

۳-۱-۱ تکثیر و تخلیص فاژ کمکی M13KO7 ..... ۱۳۰

۳-۱-۲ تکثیر کتابخانه فاژمیدی pComb3x حاوی نانوبادی ۱۳۰

۳-۱-۳ نتایج حاصل از غنی سازی ۱۳۲

۳-۱-۴ بررسی تعداد فاژهای قبل و بعد از غنی سازی ۱۳۲

۳-۱-۵ نتایج فاژ الایزا پلی کلونال پس از هر مرحله از غنی سازی ۱۳۳

۳-۱-۶ نتایج فاژ الایزا برای فاژهای مونوکلونال ۱۳۳

۳-۱-۷ نتایج Colony- PCR کلون های انتخابی ۱۳۴

۳-۱-۸ نتیجه تعیین توالی کلون های انتخاب شده ۱۳۶

۳-۲ تولید نانوبادی در فاز محلول و بررسی میزان واکنش آن با آنتی ژن L1 ..... ۱۳۸

۳-۲-۱ نتایج تولید نانوبادی های محلول ۱۳۸

۳-۲-۲ تعیین میزان واکنش نانوبادی های انتخاب شده علیه آنتی ژن L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۳۹

۳-۳ بررسی خصوصیات نانوبادی های منتخب ۱۳۹

عنوان **صفحه**

۳-۳-۱ بررسی ویژگی نانوبادی های منتخب ۱۴۰

۳-۳-۲ بررسی حساسیت نانوبادی های منتخب ۱۴۴

۳-۳-۳ بررسی تمایل اتصال نانوبادی های منتخب ۱۴۹

۳-۴ کشت انبوه دو نانوبادی منتخب ۱۴۹

۳-۴-۱ نتایج حاصل از کشت انبوه کلون های منتخب توسط تکنیک SDS-PAGE ۱۵۰

۳-۵ تخلیص نانوبادی های منتخب و ارزیابی آن توسط تکنیک وسترن بلات ۱۵۰

۳-۶ بررسی بیوانفورماتیکی نانوبادی SM8 ..... ۱۵۲

۳-۶-۱ بررسی توالی اسید آمینه ای نانوبادی SM8 ..... ۱۵۲

۳-۶-۲ تعیین Frameworks و Complementarity- Determining Region توالی اسید آمینه ای نانوبادی SM8 ..... ۱۵۳

۳-۶-۳ بلاست توالی پروتئینی نانوبادی SM8 به منظور مقایسه با سایر توالی ها ی موجود در بانک اطلاعات ژنی سایت NCBI ۱۵۴

۳-۶-۴ نمایش مدل سویسی ساختار فضایی نانوبادی ۱۵۴

۳-۵ کونژوگاسیون نانوبادی منتخب به آنزیم HRP و بررسی میزان واکنش آن ۱۵۵

۳-۵-۱ کونژوگاسیون نانوبادی SM8 با آنزیم HRP ۱۵۵

۳-۵-۲ بررسی تیتر نانوبادی متصل به آنزیم HRP از طریق آزمایش چکربورد الایزا ۱۵۵

فصل چهارم: بحث و پیشنهادات

بحث ۱۵۷

نتیجه گیری ۱۷۰

پیشنهادات ۱۷۱

منابع و ماخذ ۱۷۲

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ شمایی از ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی ۳

شکل ۱-۲ چرخه زندگی ویروس پاپیلومای انسانی در بافت اپیتلیوم دهانه رحم ۶

شکل ۱-۳ شکل ساختار مونومری و پنتامری پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی ۷

شکل۱- ۴ مدل اتیولوژی عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی و ابتلا به سرطان دهانه رحم ۱۲

شکل ۱-۵ ساختار ملکول آنتی بادی ۲۱

شکل۱-۶ ساختار شماتیک آنتی بادی کلاسیک و مشتقات نوترکیب آن ۲۶

شکل۱-۷ فرایند نمایش فاژی با استفاده از خاصیت میزان تمایل اتصال آنتی ژن به آنتی بادی ۳۰

شکل ۱-۸ شکل آنتی بادی کلاسیک، آنتی بادی زنجیره سنگین شتری و نانوبادی ۳۶

شکل ۱-۹ توالی های VH و VHH به همراه مناطق CDR و مناطق داربستی آنها ۴۰

شکل ۱-۱۰ نانوبادی اختصاصی لیزوزیم ۴۲

شکل ۱-۱۱ شکل شماتیک باکتریوفاژ M13 به همراه DNA و پروتئین های تشکیل دهنده آن ۴۶

شکل ۱-۱۲ آغاز مرحله عفونت زایی فاژ در باکتری ۴۷

شکل ۱- ۱۳ شکل شماتیک از مراحل کلون کردن و انتخاب ژن نانوبادی از یک شتر ایمن ۵۱

شکل ۱-۱۴ اشکال دو ظرفیتی و پنج ظرفیتی نانوبادی ۶۳

شکل۱-۱۵ شکل شماتیک از تکنیک ایمونواسی ۶۷

شکل ۲-۱ کیت تخلیص پلاسمید از شرکت Nucleospin ۱۰۱

شکل ۲-۲ سوار کردن دستگاه و قرار دادن آن در تانک الکتروفورز درتکنیک SDS-PAGE ۱۱۷

شکل ۲-۳ مراحل سوار کردن دستگاه و قرار دادن آن در تانک الکتروفورز در تکنیک وسترن بلات ۱۲۴

شکل ۳-۳ تکثیر کتابخانه فاژمیدی به کمک فاژ کمکی ۱۳۱

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۲ نتایج الکتروفورز Colony-PCR کتابخانه ژنی ۱۳۵

شکل ۳-۳ نتایج الکتروفورز Colony PCR کتابخانه ژنی ۱۳۵

شکل ۳- ۴ نتایج الایزای کلون های تولید کننده نانوبادی محلول علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی ۱۳۹

شکل۳- ۵ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM3 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۳۹

شکل ۳- ۶ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM4 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۴۱

شکل ۳- ۷ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM5 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۴۱

شکل ۳- ۸ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM6 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۴۲

شکل ۳- ۹ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM7 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۴۲

شکل ۳- ۱۰ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM8 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۴۳

شکل ۳- ۱۱ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM9 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۴۳

شکل ۳- ۱۲ نتایج بررسی ویژگی و اختصاصیت نانوبادی SM10 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ ..... ۱۴۴

شکل ۳-۱۳ میزان حساسیت نانوبادی SM3 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶..... ۱۴۵

شکل ۳-۱۴ میزان حساسیت نانوبادی SM4 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶..... ۱۴۵

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۵ میزان حساسیت نانوبادی SM5 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶..... ۱۴۶

شکل ۳-۱۶ میزان حساسیت نانوبادی SM6 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶..... ۱۴۶

شکل ۳-۱۷ میزان حساسیت نانوبادی SM7 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶..... ۱۴۷

شکل ۳-۱۸ میزان حساسیت نانوبادی SM8 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶..... ۱۴۷

شکل ۳-۱۹ میزان حساسیت نانوبادی SM9 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶..... ۱۴۸

شکل ۳-۲۰ میزان حساسیت نانوبادی SM10 علیه پروتئین L1 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶.. ۱۴۸

شکل ۳-۲۱ نتایج SDS-PAGE دو نانوبادی منتخب (SM8 و SM5) بیان شده در کشت انبوه..... ۱۵۰

شکل ۳-۲۲ نتیجه وسترن بلات دو نانوبادی تخلیص شده (SM8 و SM5) به کمک ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل. ۱۵۱

شکل ۳-۲۳ شمایی از نتیجه تعیین توالی ژن نانوبادی SM8 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن نانوبادی در برنامه BioEdit..... ۱۵۲

شکل۳-۲۴ نتیجه بررسی توالی اسید آمینه ای نانوبادی SM8 در نرم افزار Gene Runner..... ۱۵۳

شکل ۳-۲۵ تعیین بخش های Frameworks و Complementarity-Determining Regions توالی اسید آمینه ای نانوبادی SM8..... ۱۵۳

شکل ۳-۲۶ شمایی از بلاست توالی نانوبادی SM8 با سایر توالی های بانک ژنی NCBI..... ۱۵۴

شکل ۳-۲۷ مدل سویسی نواری کارتونی ساختار سه بعدی نانوبادی SM8..... ۱۵۵

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ مونوکلونال آنتی بادی های تائید شده توسط اداره غذا و داروی آمریکا..... ۲۳

جدول ۱-۲ مقایسه خواص نانوبادی ها و آنتی بادی های نوترکیبی مانند Fab و scFv..... ۳۹

جدول ۱-۳ مثال هایی از کاربرد های درمانی نانوبادی ها..... ۶۵

جدول ۲-۱ چرخه دمایی واکنش زنجیره ای پلی مرازی..... ۹۸

جدول ۲-۲ مقادیر بافر TAE (10X)..... ۹۹

جدول ۲-۳ ترکیبات ژل متراکم کننده (٪۵)..... ۱۱۴

جدول ۲-۴ ترکیبات ژل جدا کننده (٪۱۲/۵)..... ۱۱۵

جدول ۲-۵ ترکیبات بافر اتصال با pH=۸..... ۱۲۰

جدول ۲-۶ ترکیبات بافر شستشو با pH=۸..... ۱۲۰

جدول ۲-۷ ترکیبات بافر رها سازی با pH=۸..... ۱۲۱

جدول ۳-۱ نتایج حاصل از تعیین تیترفاژ خروجی و ورودی در هر سه مرحله از فرایند غنی سازی.... ۱۳۲

جدول ۳-۲ نتایج حاصل از فاژ- الایزای پلی کلونال (بر حسب جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر علیه آنتی ژن L1 چهار تیپ ویروس پاپیلومای انسانی در مراحل مختلف غنی سازی..... ۱۳۳

جدول ۳-۳ نتایج مونوکلونال فاژ الایزا برای تعدادی از کلونهای انتخابی از مرحله سوم غنی سازی..... ۱۳۴

جدول ۳-۴ نتایج تمایل اتصال نانوبادیهای منتخب به پروتئین L1 ویروس پاپیلومای تیپ ۱۶..... ۱۴۹

جدول۳- ۵ نتایج حاصل از بررسی تیتراسیون نانوبادی SM8 کونژوگه به آنزیم HRP..... ۱۵۶