دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان

تهیه فیوژن پروتئین اگزوتوکسینA (دومینI,II) - فلاژلین(بخش N-ترمینال) سودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی پاسخ های ایمنی درموش BALB/c

نگارش

اصغر تنومند

اساتید راهنما

دکتر صفر فرج نیا-دکتر شهین نجار پیرایه

بهار ۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای اصغر تنومند رشته **باکتری شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **تهیه فیوژن پروتئین اگزوتوکسین A (دومین I ، II) – فلاژلین (بخش N – ترمینال) سودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی پاسخ های ایمنی در موش BALB/c** » در تاریخ **۱۳۹۲/۳/۶** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنمای اصلی	دکتر صفر فرج نیا	
استاد راهنمای دوم	دکتر شهین نجار پیرایه	
استاد مشاور	دکتر جعفر مجیدی	
استاد ناظر	دکتر اشرف محبتی مبارز	
استاد ناظر	دکتر مهرداد بهمنش	
استاد ناظر	دکتر سید داور سیادت	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر بی تا بخشی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری 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 هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب اصغر تنومند دانشجوی رشته باکتری شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع دکتری دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۲-۴-۲۰

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته باکتری شناسی پزشکی است که در سال ۱۳۹۲ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقای دکتر صفر فرج نیا و خانم دکتر شهین نجار پیرایه ، مشاوره آقای دکتر جعفر مجیدی از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب اصغر تنومند دانشجوی رشته باکتری شناسی پزشکی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: اصغر تنومند

تاریخ و امضا: ۹۲/۳/۲۰

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان

تهیه فیوژن پروتئین اگزوتوکسین A (دومین I,II) - فلاژلین(بخش N-ترمینال) سودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی پاسخ های ایمنی درموش BALB/c

نگارش

اصغر تنومند

اساتید راهنما

دکتر صفر فرج نیا-دکتر شهین نجار پیرایه

استاد مشاور

دکتر جعفر مجیدی

بهار ۱۳۹۲

-تقدیم به روح پرفتوح پدرم

و مادر مهربانم که در مسیر پرپیچ و خم زندگی، مشعل امید را در شب‌های زندگی برایم به ارمغان آورد از خواسته هایش گذشت، سختی ها را به جان خرید و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کرد تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم .

-تقدیم به همسر مهربانم

که همواره برایم نمودار تمام عیار صداقت و شکیبایی بوده و در تمام طول تحصیل، همراه و همگام من بوده و با قلبی آکنده از عشق و معرفت؛ محیطی سرشار از سلامت، امنیت، آرامش و آسایش برایم فراهم آورده است.

-تقدیم به گل های نازنینم سیناو آیناز

که همواره زمانهای زیادی را از آنها دریغ کردم با عطر دلنشین وجودشان می توان به رنجهای زندگی هم دل بست.

حمد و سپاس

به درگاه خداوندی که وجود انسان را به زیور علم و معرفت بیاراست و آن را امتیاز بر سایر مخلوقاتش قرار داد، حکیمی که برقلم سوکند خورد و علیمی که اولین آیه خود را بر رسول خاتم(ص) با "اقرء" (بخوان) آغاز نمود.

با تشکرفراوان از:

- استاد ارجمند جناب آقای دکترفرج نیا که نه فقط علم ، بلکه ادب و خضوع را از ایشان آموخته ام و از راهنمایی های موثرشان استفاده کردم.
- استاد ارجمند سرکار خانم دکترپیرایه که درتمام دوران تحصیل راهنمایی های ارزنده ایشان بسیار کمک کننده بوده و نکته سنجی های قابل تحسین داشتند.
- استاد ارجمند جناب آقای دکترمجیدی که کمک های ارزنده و موثری درمراحل ایمونیزاسیون داشته و با نظم مثال زدنی همراه ما بودند.
- استاد ارجمند سرکارخانم دکتر مبارز که پیشنهادات ایشان باعث غنی شدن این مطالعه گردید.
- استاد ارجمند سرکارخانم دکتربخشی مدیریت محترم گروه که با سعه صدر تمام همکاری صمیمانه داشتند.
- آقای دکتر گودرزی، خانمها دکتردکترزاده که تجربیات ارزنده شان بسیار کمک کننده بود.
- تمامی دانشجویان گروه بویژه همکلاسی های خوبم آقای دکتر جزایری، خانمها دکتراحمدرجبی و دکتر کرمستجی و دوست خوبم آقای حمید مصطفی زاده که همدل و همراه بودند.
- استاد ارجمند جناب آقای دکتر دستمالچی به خاطرهمکاری صمیمانه ایشان.
- جناب آقای دکتر مسگری، خانم دکتر رهبرنیا وآقای فلاحتی از همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تبریز به خاطرهمکاریهای صمیمانه ایشان در اجرای مرحله حیوانی مطالعه.
- خانمها رفیعی و صمیمی کارشناسان محترم گروه به خاطر همکاریهای آنها در هماهنگی امور.

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا عامل مهم عفونت بیمارستانی بوده که سپتی سمی ناشی از آن باعث مرگ ومیر زیادی می شود. این باکتری دارای تعداد زیادی از فاکتورهای مقاومت آنتی بیوتیکی با واسطه پلاسمیدوکروموزوم بوده و آنتی بیوتیکهای جدید نیز مرگ و میر ناشی از آن را کاهش نداده اند. به دلیل مقاومت بالا، ایمونوپروفیلاکسی و ایمونوتراپی ممکن است راه موثری برای کنترل و درمان عفونتهای سودوموناس آئروژینوزا در بیماران بستری در بیمارستان، بیماران سوخته و بیماران سیستیک فیبروزیس باشند. فاکتورهای ویرولانس و آنتی ژنیک مختلف نظیر پروتئین های غشای خارجی، توکسین ها، فلاژل، پیلی پلی ساکاریدهای با وزن مولکولی بالا برای طراحی واکسن و واکسیناسیون مورد بررسی قرار گرفته اند. هدف این مطالعه تولید و تخلیص فیوژن پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A- فلاژلین و ارزیابی خواص ایمنی زایی آن بعنوان کاندید واکسن جدید بوده است. ابتدا ژنهای اگزوتوکسین Aو فلاژلین تکثیر ، کلون و در باکتری *E. coli* بیان گردید. فیوژن پروتئین نوترکیب با روش افینیتی کروماتوگرافی نیکل تخلیص گردیده و کیفیت و ساختار آن با روشهای SDS-PAGE و وسترن بلات ارزیابی گردید. آلودگی فیوژن پروتئین نوترکیب به لیپوپلی ساکارید بوسیله تست limulus amoebocyte lysate وتوکسیسیته آن در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی ایمونوژنیسیته، گروههای موشی در روزهای ۰-۲۱-۴۲ و ۷۲ با اگزوتوکسینA (دومین I,II) ، فلاژلین ، اگزوتوکسینA (دومین I,II)- فلاژلین، اگزوتوکسینA (دومین I,II) + فلاژلین و PBS بصورت زیر جلدی واکسینه شدند. یک هفته بعد از آخرین تزریق، تولید آنتی بادی در گروههای موشی بوسیله الایزا بررسی گردید و در نهایت میزان محافظت موشهای ایمن وغیر ایمن با تزریق (2X LD50 (7.5×10^7 CFU یک سویه بالینی بصورت داخل صفاقی بررسی گردید. براساس نتایج الایزا تولید آنتی بادی در تمامی گروههای موشی ایمن در مقایسه با گروه شاهد معنی دار بود($P=.00001$). محافظت موشها در مقابل تزریق داخل صفاقی (2X LD50 (7.5×10^7 CFU یک سویه بالینی در گروه دریافت کننده اگزوتوکسینA (دومین I,II)- فلاژلین معنی دار بود($P=0.05$). نتایج این مطالعه پیشنهاد می کند که اگزوتوکسینA (دومین I,II)- فلاژلین یک ایمونوژن قوی بوده و می تواند بعنوان کاندید واکسن جدید در مطالعات واکسن ضد سودوموناسی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، اگزوتوکسینA (دومین I,II)- فلاژلین ، کاندید واکسن، فیوژن پروتئین

فهرست مطالب

فصل اول-مقدمه ومروری برمطالعات انجام شده ۱

۱-۱. سودوموناس آئروژینوزا..... ۲

۱-۱-۱. خصوصیات کلی باکتری..... ۲

۱-۱-۲. بیماریزایی سودوموناس آئروژینوزا..... ۴

۱-۱-۳. فاکتورهای ویرولانس سودوموناس آئروژینوزا..... ۷

۱-۱-۴. دفاع میزبان درمقابل عفونتهای سودوموناس آئروژینوزا..... ۱۶

۱-۲. اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا..... ۱۶

۱-۲-۱. ساختار و مکانیسم عمل..... ۱۶

۱-۲-۲. تنظیم تولید اگزوتوکسین A..... ۲۲

۱-۲-۳. سمیت توکسین برای ماکروفاژها..... ۲۴

۱-۲-۴. اثر اگزوتوکسین A روی نوتروفیلها و مونوسیتها..... ۲۵

۱-۲-۵. اثراگزوتوکسین A برروی تولید سایتوکاین توسط سودوموناس آئروژینوزا..... ۲۶

۱-۲-۶. آسیب کبدی القا شده توسط اگزوتوکسین A..... ۲۷

۱-۳. فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا..... ۲۸

۱-۳-۱. ساختار فلاژل وفلاژلین و نقش آن در بیماریزای سودوموناس آئروژینوزا..... ۲۸

۱-۳-۲. اثر فلاژلین در ایمنی اکتسابی..... ۳۳

۱-۴. ضرورت ایمونیزاسیون و ایمونوتراپی در مبارزه با عفونتهای سودوموناس آئروژینوزا.....۳۵
۱-۵. مروری بر مطالعات گذشته درتهیه واکسن برای سودوموناس آئروژینوزا.....۳۶
۱-۶. آنتی ژن و فرضیات این مطالعه.....۴۶
فصل دوم - مواد و روش ها.....۴۸
۲-۱. تهیه و تعیین هویت سویه باکتریایی تولید کننده اگزوتوکسین A و فلاژلین.....۵۵
۲-۲. استخراج DNA ژنومی.....۵۵
۲-۳. الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز.....۵۶
۲-۴. طراحی پرایمر ۵۷
۲-۵. تکثیر ژن ExoA با آنزیم *Pfu* DNA polymerase.....۵۹
۲-۶. تکثیر ژن FliC با آنزیم *Pfu* DNA polymerase.....۶۱
۲-۷. تخلیص ژنfliC و ExoA تکثیرشده از محصولPCR ۶۲
۲-۸. تهیه وتکثیر ژن فیوژن ExoA-FliC با روش Overlapping PCR.....۶۲
۲-۹. تخلیص ژن فیوژن ExoA-FliC از ژل ۶۴
۲-۱۰.کلون سازی ژن فیوژنExoA-FliC با روش T/A Cloning.....۶۴
۲-۱۰-۱. اضافه کردن نوکئوتید آدنین دار به ژن فیوژن.....۶۵
۲-۱۰-۲. الحاق ژن فیوژنExoA-FliC و وکتور ۶۶

۲-۱۰-۳. تهیه سلول مستعد از باکتری E.Coli DH5α ۶۸
۲-۱۰-۴. ترانس فورماسیون به روش شوک حرارتی ۶۸
۲-۱۱. غربالگری کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب PTZ57R-ExoA-FliC ۶۹
۲-۱۱-۱. استخراج پلاسمید با روش جوشاندن و انجام PCR ۶۹
۲-۱۱-۲. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت و انجام PCR ۶۹
۲-۱۱-۳. هضم آنزیمی ۷۰
۲-۱۱-۴. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن فیوژن ۷۱
۲-۱۲. ساب کلونینگ ۷۱
۲-۱۳. بررسی بیان فیوژن پروتئین و انجام SDS-PAGE ۷۳
۲-۱۳-۱. تهیه نمونه ها ۷۳
۲-۱۳-۲. آماده سازی ژل و ران کردن نمونه ها ۷۴
۲-۱۴. تهیه لایزت سلولی و بررسی محلول بودن پروتئین بیان شده ۷۶
۲-۱۵. تهیه لایزت سلولی و تولید انبوه فیوژن پروتئین ۷۶
۲-۱۶. تخلیص *فیوژن پروتئین* در شرایط دناتوره با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی با رزین نیکل ۷۷
۲-۱۷. دیالیز پروتئین تخلیص شده ۷۸
۲-۱۸. سنجش پروتئین به روش برادفورد ۷۸
۲-۱۹. آزمایش وسترن بلات ۸۰
۲-۲۰. تهیه اگزوتوکسین A (دومین I,II) نوترکیب ۸۱

۲-۲۱. بررسی میزانLPS نمونه ها به روشLAL ۸۱

۲-۲۲. تهیه فلاژلین نوترکیب و ارزیابی آن ۸۲

۲-۲۳. ارزیابی استریلیتی ۸۲

۲-۲۴.آزمون سمیت در موش..... ۸۲

۲-۲۵. برنامه ایمونیزاسیون..... ۸۲

۲-۲۶. آزمایش الایزا ۸۴

۲-۲۷. طراحی آزمایش الایزای با کوتینگ باکتری..... ۸۵

۲-۲۸. آزمون اپسونو فاگوسیتوز با ماکروفاژهای موش..... ۸۶

۲-۲۸-۱. تهیه ماکروفاژ ۸۶

۲-۲۸-۲. آماده سازی سرم..... ۸۶

۲-۲۸-۳. آماده سازی سوسپانسیون باکتری..... ۸۶

۲-۲۸-۴. انجام آزمون ۸۶

۲-۲۹. آزمون فعالیت باکتریسیدال سرم..... ۸۷

۲-۳۰. چالش حیوانات ایمن..... ۸۸

۲-۳۱. آنالیزآماری داده ها..... ۸۸

فصل سوم - نتایج..... ۸۹

۳-۱. تعیین هویت سویه باکتریایی تولید کننده اگزوتوکسین A و فلاژلین..... ۹۰

۳-۲. استخراج و بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده ۹۱
۳-۳. انجام PCR برای ژن اگزوتوکسین A (دومین I,II) ۹۱
۳-۴. انجام PCR برای ژنfliC ۹۲
۳-۵. تخلیص ژنfliC و ExoA تکثیرشده ازمحصولPCR ۹۳
۳-۶. تهیه وتکثیر ژن فیوژن ExoA-FliC با روش Overlapping PCR..... ۹۴
۳-۷.تخلیص ژن فیوژنExoA-FliC از ژل..... ۹۵
۳-۸. کلون سازی و اثبات حضور ژن فیوژن ExoA-FliC و ExoA در وکتور بیانی..... ۹۶
۳-۹. تایید ژن فیوژن ExoA-FliC با استخراج پلاسمید و انجام PCR..... ۹۶
۳-۱۰. تایید قطعه ژن فیوژن ExoA-FliC با هضم آنزیمی..... ۹۷
۳-۱۱. تایید قطعه ژن فیوژنExoA-FliC با تعیین توالی ۹۸
۳-۱۲. تایید ژن ExoA با استخراج پلاسمید وانجام PCR..... ۹۹.
۳-۱۳. تایید قطعه ژنExoA با هضم آنزیمی ۱۰۰
۳-۱۴. تایید قطعه ژن ExoA با تعیین توالی..... ۱۰۱
۳-۱۵. بیان پروتیئن فیوژن نوترکیب ۱۰۲
۳-۱۶. بیان اگزوتوکسینA(I,II) نوترکیب ۱۰۵
۳-۱۷. آزمایش وسترن بلاتینگ ۱۰۹
۳-۱۸. نتیجه اندازه گیری میزان LPS موجود در پروتئین ها ۱۱۲

۳-۱۹. نتایج الایزا ۱۱۳
۳-۲۰. آزمون فعالیت باکتریسیدال سرم..... ۱۱۶
۳-۲۱. نتایج آزمون اپسونوفاگوسیتوز با ماکروفاژهای موش..... ۱۱۸
۳-۲۲. نتایج چالش حیوانات ایمن..... ۱۱۹
فصل چهارم- بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها..... ۱۲۲
۴-۱.ضرورت و راههای مبارزه باعفونتهای سودوموناس آئروژینوزا..... ۱۲۳
۴-۲. انتخاب آنتی ژنهای مورد بررسی دراین تحقیق..... ۱۲۶
۴-۳. تولید پروتئین های نوترکیب وارزیابی آنها..... ۱۲۹
۴-۴. پیشنهادها..... ۱۴۲
فهرست منابع..... ۱۴۳
ضمائم ۱۷۰
چکیده انگلیسی ۱۸۰

فهرست جداول

جدول ۱-۱ خلاصه ای از آسیب های ایجاد شده بوسیله سودوموناس آئروژینوزا دسته بندی شده براساس محل عفونت ۵

جدول۱- ۲ خلاصه ای از عوامل بیماریزای سودوموناس آئروژینوزا.....۱۳

جدول ۳-۱.جذب نوری اندازه‌گیری شدهٔ درگروههای مختلف موشی, یک هفته بعد از آخرین تزریق در رقت ۱:۱۰۰۰۰سرم.....۱۱۳

جدول ۳-۲. نتایج جذب نوری اندازه‌گیری شدهٔ چهارماه بعد از آخرین تزریق در رقت ۱:۱۰۰۰۰ سرم.....۱۱۴

جدول ۳-۳. نتایج جذب نوری اندازه‌گیری شدهٔ در Whole cell ELISA با کوتینگ سودوموناس آئروژینوزای سویه ۸۸۲۱M.....۱۱۵

جدول ۳-۴. نتایج جذب نوری اندازه‌گیری شدهٔ در Whole cell ELISA با کوتینگ سودوموناس آئروژینوزای سویه بالینی.....۱۱۶

جدول۳-۵. میزان زنده ماندن موش ها بعد از تزریق داخل صفاقی سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا ۱۲۰

جدول ۴-۱ مقایسه نتایج بررسی های مختلف روی اگزوتوکسین A و فلاژلین ومطالعه حاضر.....۱۳۵

فهرست اشکال

شکل۱-۱. فاکتورهای ویرولانس سودوموناس آئروژینوزا براساس محل آنها.....۸

شکل ۱-۲.ساختار اگزوتوکسین A براساس عملکرد.....۱۸.

شکل ۱-۳. ساختار سه بعدی اگزوتوکسین A.....۱۹

شکل ۱-۴. مقایسه ساختار اگزوتوکسین A و اگزوتوکسین دیفتری.....۲۰

شکل ۱-۵. مکانیسم اتصال , ورود و تاثیر اگزوتوکسین A درتوقف پروتئین سازی در سلولهای میزبان.....۲۱

شکل ۱-۶. ساختار فلاژل.....۲۹

شکل ۱-۷. ساختار فلاژلین.....۳۱

شکل ۱-۸. اتصال و عملکرد فلاژلین در سلولهای پستانداران.....۳۳

شکل ۳-۱. کلونی های سودوموناس آئروژینوزای سویهPAO1 بر روی محیط LB اگار.....۹۰

شکل ۳-۲. DNA ژنومی استخراج شده ۹۱

شکل ۳-۳. نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن ExoA. ۹۲

شکل ۳-۴. نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن ۹۳

شکل ۳-۵. نتیجه الکتروفورز محصول تخلیص از ژل ژنهای ExoA وFliC.....۹۴

شکل ۳-۶. نتیجه الکتروفورز محصول Overlapping PCR ۹۵

شکل ۳-۷. نتیجه الکتروفورز محصول تخلیص از ژل.....۹۶

شکل ۳-۸ نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن فیوژن ExoA-FliC ۹۷

شکل ۳-۹. نتیجه الکتروفورز محصول هضم انزیمی وکتور نوترکیب PET22b-Exo-FliC با آنزیم های BamhI و Xho I ۹۷

شکل ۳-۱۰. نتیجه الکتروفورز محصول PCR ژن ExoA..... ۱۰۰

شکل ۳-۱۱. نتیجه الکتروفورز محصول هضم انزیمی وکتور نوترکیب PET22b-ExoA با آنزیم های BamhI و Xho I ۱۰۰

شکل ۳-۱۲.بررسی بیان پروتیئن فیوژن نوترکیب با SDS-PAGE..... ۱۰۳

شکل ۳-۱۳.بررسی بیان پروتیئن فیوژن نوترکیب در ساعات مختلف با SDS-PAGE..... ۱۰۳

شکل ۳-۱۴.بررسی بیان پروتیئن فیوژن نوترکیب در مایع رویی و لیزات سلولی بعداز سونیکاسیون..... ۱۰۴

شکل ۳-۱۵.بررسی فیوژن پروتئین تخلیص شده با SDS- PAGE..... ۱۰۵

شکل ۳-۱۶.بررسی بیان اگزوتوکسینA(I,II) نوترکیب با SDS-PAGE..... ۱۰۶

شکل ۳-۱۷.بررسی بیان پروتیئن اگزوتوکسینA(I,II) نوترکیب در ساعات مختلف با SDS-PAGE..... ۱۰۶

شکل ۳-۱۸.بررسی بیان پروتیئن فیوژن اگزوتوکسینA(I,II) نوترکیب در مایع رویی ولیزات سلولی بعداز سونیکاسیون..... ۱۰۷

شکل ۳-۱۹.بررسی اگزوتوکسینA(I,II) تخلیص شده با SDS- PAGE..... ۱۰۸

شکل ۳-۲۰. بررسی اگزوتوکسینA(I,II) تخلیص شده با SDS- PAGE..... ۱۰۸

شکل ۳-۲۱. نتایج وسترن بلاتینگ با آنتی بادی اگزوتوکسین A برای فیوژن پروتئین..... ۱۰۹

شکل ۳-۲۲. نتایج وسترن بلاتینگ با آنتی بادی اگزوتوکسین A برای اگزوتوکسین A..... ۱۱۰

شکل ۳-۲۳. نتایج وسترن بلاتینگ با سرم بیماران دارای عفونت سودوموناس آئروژینوزا بجای آنتی بادی برای فیوژن پروتئین..... ۱۱۱

شکل ۳-۲۴. نتایج وسترن بلاتینگ با سرم بیماران دارای عفونت سودوموناس آئروژینوزا بجای آنتی بادی برای اگزوتوکسین A..... ۱۱۱

شکل ۳- ۲۵ . مقایسه CFU باکتری ها در زمان های ۰ و ۶۰ دقیقه در گروه موشی ایمن شده با فیوژن پروتئین اگزوتوکسین-فلاژلین با رقت ۱:۴۰ با استفاده از سودوموناس آئروژینوزای 8821M..... ۱۱۷

شکل ۳-۲۶ . مقایسه CFU باکتریها در آزمون اپسونوفاگوسیتوز در گروه موشی ایمن شده با فیوژن پروتئین اگزوتوکسین-فلاژلین..... ۱۱۹

فصل اول

مقدمه ومروری برمطالعات انجام شده