بسم الله
الرحمن الرحیم

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیئت علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نماید:

ماده ۱ : حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها / رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲ : انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه / رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مقاله باشد.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل لز پایان نامه / رساله نیز منتشر می شود نیز نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳ : انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آیین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ٤ : ثبت اختراعات و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بینالمللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه / رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما و یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵ : این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده است و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

‘

تاریخ: .....

پیوست: .....

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

مادهٔ۱. در صورت اقدام چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

مادهٔ ۲. در صفحه سوم (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کنید:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشتهٔ **بیوتکنولوژی پزشکی** است. که در سال **۱۳۸۸** در دانشکدهٔ **علوم‌پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **محمدجواد رسایی** و مشاورهٔ جناب آقای دکتر **مهدی فروزنده مقدم** از آن دفاع شده است».

مادهٔ ۳. به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادهٔ ٤. در صورت عدم رعایت مادهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادهٔ ۵. دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 مادهٔ ٤ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادهٔ ٦. اینجانب **محسن نواری** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضاء

دانشگاه‌تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

ایمونیزاسیون با میموتوپ های صناعی علیه آنتی بادی مونوکلونال ICR62 و بررسی اثر مهاری آنتی بادی های تولید شده بر روی رشد سلول های A431

نگارش:

محسن نواری

استاد راهنما:

دکتر محمد جواد رسایی

استاد مشاور:

دکتر فروزنده مقدم

۱۳۸۸

تقدیم به:

خانواده گرانقدرم که همواره یاور و پشتیبان من بوده اند،

و همسر مهربانم که با حضورش به من آرامش و قوت قلب می دهد...

سپاس گزاری

اکنون که در پرتو الطاف حق، پژوهش حاضر به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم که از ساتید و دوستان عزیز قدردانی کنم.

جناب آقای دکتر رسایی که در طول انجام این پایان نامه روشنگر راه من بودند و رابطه استاد و شاگرد –آنگونه که باید باشد– را برای اولین بار در ارتباط با ایشان تجربه کردم.

جناب آقای دکتر فروزنده، سرکار خانم دکتر رهبری زاده و جناب آقای دکتر دلیری که از مشاوره ایشان نهایت استفاده را بردم.

سرکار خانم دکتر رجبی که به حق استاد من در آزمایشگاه بودند و از محضر ایشان نهایت استفاده را بردم.

جناب آقای دکتر تهرانی که حق استادی را به جا آوردند.

جناب آقای دکتر مدنی که فرصت استفاده از امکانات انستیتو سرم سازی رازی را فراهم کردند.

سرکار خانم شیخ الاسلامی که همکاری دوستانه ای در انجام این تحقیق داشتند.

آقایان: یاشار سعدیان، علیرضا نادری، دکترجواد محمدنژاد Tدکتر محمد محمدی، دکتر مسعود احمدوند و جناب آقای کروندیان کارشناس محترم گروه بیوتکنولوژی.

خانم ها: فرنوش جعفری، مهرک زارع و کارشناسان محترم گروه بیوشیمی بالینی خانم ها افشار و اعتمادی .

چکیده

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) متعلق به خانواده گیرنده های تیروزین کینازی بوده و از دهه ۸۰ به عنوان یک هدف برای درمان سرطان مطرح شده است. تعداد قابل توجهی آنتی بادی های مونوکلونال بر علیه EGFR تولید شده اند که یکی از این آنتی بادی ها ICR62 می باشد. با توجه به مشکلات آنتی بادی های مونوکلونال – که بیشتر آن ها اساسا موشی هستند- از قبیل هزینه بالا و برهمکنش با سیستم ایمنی، ایمونیزاسیون بر علیه EGFR می تواند جایگزین مناسبی برای آنتی بادی های مونوکلونال باشد. در این راستا، قبلا نقشه اپی توپی آنتی بادی مونوکلونال ICR62 با استفاده از یک کتابخانه نمایش فاژی پپتیدهای تصادفی تعیین شده است. در تحقیق حاضر، توالی مورد نظر که یک می موتوپ (مقلد اپی توپ) می باشد سنتز شده و به مولکول BSA متصل شد. تمایل پپتید به آنتی بادی مونوکلونال ICR62 بررسی و تایید شد. بررسی سرم موش های BALB/C ایمن شده با این مولکول در یک آزمون الایزا بر روی EGFR تخلیص شده از رده سلولی A431، نشاندهنده حضور آنتی بادی بر علیه EGFR تا تیتر ۱:۲۰۰۰ بود. این امر در مورد حیوانات ایمن شده با پپتید خالص مشاهده نشد. سرم های مذکور توانایی ممانعت از رشد سلول های بیان کننده EGFR (رده سلولیA431) در شرایط *in vitro* را نداشتند. بنابراین، IgG خرگوشی بر علیه پپتید متصل به BSA تولید، تخلیص و تیتر آنتی بادی بر علیه EGFR تا ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. آنتی بادی های مذکور توانایی ممانعت از رشد رده سلولی A431 را تا میزان ۱۵٪ داشتند. بنابراین از پپتید به دست آمده می توان به عنوان یک عامل ایمنی زا بر علیه EGFR استفاده نمود. این عامل قطعا می تواند سیستم ایمنی را برای تولید آنتی بادی بر علیه EGFR تحریک نموده که اثرات مثبت در مهار رشد سلول های بیان کننده EGFR داشته و دارای کاربرد در مهار رشد سلول های سرطانی می باشد.

واژگان کلیدی: گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، سرطان، آنتی بادی مونوکلونال، ICR62، می موتوپ، واکسن.

TMU
Factually of Medical Sciences
Tarbiat Modares University

Immunization with Synthetic Mimotopes for Monoclonal Antibody (ICR62) and the Effects of Antibody Raised on the Growth of A431 Cell Line

A Thesis Presented for the Master of Science Degree
In Medical Biotechnology

By:
Mohsen Navari

Supervisor:
Mohammad Javad Rasaee

Advisor:
Mehdi Forouzandeh Moghadam

Tarbiat Modares University
School of Medical Sciences

2009

فهرست مطالب

فصل ۱ مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته..... ۱

۱-۱. مقدمه ۲

۱-۱-۱. گیرنده‌های فاکتور رشد ۳

۱-۲. معرفی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR)..... ۵

۱-۲-۱. ژن EGFR..... ۵

۱-۲-۲. ویژگی های شیمیایی و ساختاری EGFR ٦

۱-۲-۳. لیگاندهای خانواده EGF ۸

۱-۲-٤. پیام رسانی EGFR ۹

۱-۲-٤-۱. بیان و تجزیه EGFR ۹

۱-۲-٤-۲. مسیرهای پیام رسانی EGFR..... ۱۱

۱-۲-۵. نقش فیزیولوژیک EGFR..... ۱۵

۱-۲-٦. EGFR و سرطان ۱٦

۱-۲-۷. مهمترین راهکارهای درمان سرطان با بکارگیری EGFR به عنوان هدف ۱۹

۱-۲-۷-۱. آنتی بادی های مونوکلونال..... ۲۰

۱-۲-۷-۲. مهار کننده های تیروزین کینازی ۲۵

۱-۳. مروری بر فناوری های نمایش و کاربرد های آن..... ۲۷

۱-۳-۱. سیستم‌های نمایشی بیولوژیکی ۲۹

۱-۳-۱-۱. نمایش در سطح ویروس ۲۹

۱-۳-۱-۱-۱. نمایش فاژی ۲۹

۱-۳-۲. ساختمان باکتریوفاژ Ff ۳۰

۱-۳-۳. روش‌های متنوع در نمایش فاژ..... ۳۱

۱-۳-٤. غنی‌سازی کتابخانه‌های نمایش فاژی ۳۲

۱-۳-٤-۱-۱. نمایش در سطح ویروس های یوکاریوتی ۳۳
۱-۳-٤-۲. نمایش بر روی سلول های زنده..... ۳٤
۱-۳-٤-۲-۱. نمایش بر سطح باکتری ۳٤
۱-۳-٤-۲-۲. نمایش بر سطح مخمر..... ۳٤
۱-۳-۵. سیستم‌های نمایشی غیربیولوژیک ۳۵
۱-۳-۵-۱. نمایش ریبوزومی..... ۳۵
۱-۳-۵-۲. نمایش بر mRNA ۳٦
۱-۳-٦. مقایسه فناوری های نمایش ۳۷
۱-۳-۷. کاربردهای نمایش فاژی ۳۹
۱-۳-۷-۱. بیان فاژی پروتئین ها و دومن های پروتئینی ۳۹
۱-۳-۷-۱-۱. جداسازی آنتی بادی های نوترکیب با تمایل بالا ۳۹
۱-۳-۷-۱-۲. تکامل جهت دار پروتئین ها..... ٤۱
۱-۳-۷-۲. نمایش فاژی پپتید..... ٤۲
۱-۳-۷-۲-۱. کتابخانه های نمایش پپتیدهای طبیعی ٤۲
۱-۳-۸. اپی توپ..... ٤۲
۱-۳-۸-۱-۱. کتابخانه های پپتیدهای تصادفی ٤٤
۱-۳-۹. کتابخانه‌های پپتیدهای تصادفی و ژن درمانی..... ٤٤
۱-۳-۱۰. کتابخانه های پپتیدی و پپتیدهای جایگزین آنتی بادی ها..... ٤۵
۱-۳-۱۱. کتابخانه های پتیدهای تصادفی و تعیین نقشه اپی توپی آنتی بادی های مونوکلونال، طراحی واکسن های پپتیدی ٤٦
۱-٤. طراحی واکسن های می موتوپی بر علیه مارکرهای سرطانی با استفاده از کتابخانه های نمایش فاژی پپتیدهای تصادفی..... ٤۸
فصل ۲ مواد و روش ها..... ۵۲
۲-۱. مواد، وسایل و دستگاه ها ۵۳
۲-۱-۱. پپتید..... ۵۳

۲-۱-۲. بافرها و محلول ها ۵۳
۲-۱-۲-۱. بافرهای ELISA ۵۳
۲-۱-۲-۱-۱. الایزای فاژ ۵۳
۲-۱-۲-۱-۲. الایزای پروتئین ٥٤
۲-۱-۲-۱-۳. الایزای سلولی ٥٤
۲-۱-۲-۲. بافرهای کشت سلول ٥٤
۲-۱-۲-۳. بافرهای تخلیص پروتئین ٥٤
۲-۱-۲-۳-۱. تخلیص فاژ ٥٤
۲-۱-۲-۳-۲. تخلیص EGFR ٥٥
۲-۱-۳. تخلیص EGFR از سلول A431 ..... ٥٥
۲-۱-٤. تخلیص EGFR از ژل SDS-PAGE ٥٥
۲-۱-٤-۱. تخلیص IgG خرگوشی ٥٥
۲-۱-٤-۲. بافرهای SDS-PAGE و Western Blotting ٥٦
۲-۱-٤-۲-۱. بافرهای SDS-PAGE ٥٦
۲-۱-٤-۲-۲. محلول های رنگ آمیزی ژل ٥٦
۲-۱-٥. محلول های رنگ آمیزی کوماسی بلو ٥٦
۲-۱-٦. محلول های رنگ آمیزی نیترات نقره ٥٧
۲-۱-٦-۱. بافرهای وسترن بلات ٥٧
۲-۱-٦-۲. بافرهای آزمون رشد سلولی ٥٧
۲-۱-۷. آنتی بادی های مونوکلونال ٥٨
۲-۱-۸. محیط کشت ها ٥٨
۲-۱-۸-۱. محیط کشت های باکتری ٥٨
۲-۱-۸-۲. محیط کشت های سلول جانوری ٥٨
۲-۱-۸-۲-۱. محیط کشت RPMI 1640 ..... ٥٨
۲-۱-۸-۲-۲. محیط کشت DMEM ٥٩
۲-۱-۸-۲-۱. محیط انجماد (Freezing) ٥٩

۲-۱-۹. سویه های سلولی ۵۹
۲-۱-۹-۱. سویه های باکتری..... ۵۹
۲-۱-۹-۲. رده های سلول انسانی ٦۰
۲-۱-۱۰. رزین های کروماتوگرافی ٦۰
۲-۱-۱۱. وسایل ٦۰
۲-۱-۱۲. دستگاه ها ٦۰
۲-۲. روش ها ٦۱
۲-۲-۱. کار با فاژ ٦۱
۲-۲-۱-۱. تکثیر و تخلیص فاژها ٦۱
۲-۱-۲-۲. تعیین تیتر فاژ..... ٦۱
۲-۲-۱-۳. الایزای فاژ..... ٦۳
۲-۲-۲.SDS-PAGE و وسترن بلات ٦٤
۲-۲-۲-۱.SDS-PAGE و رنگ آمیزی ژل ٦٤
۲-۲-۲-۱-۱. تهیه ژل های SDS-PAGE ٦٤
۲-۲-۲-۱-۲. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو ٦٥
۲-۲-۲-۱-۳. رنگ آمیزی با نیترات نقره ٦٥
۲-۲-۲-۲. وسترن بلات..... ٦٥
۲-۲-۳. پروتکل کلی الایزا در این تحقیق..... ٦٦
۲-۲-۳-۱. الایزای پروتئین..... ٦٦
۲-۲-۳-۲. الایزای سلولی..... ٦۷
۲-۲-٤. تخلیص EGFR ٦۸
۲-۲-٤-۱. تخلیص EGFR از سلول های A431 با کروماتوگرافی تمایلی ٦۸
۲-۲-٤-۲. انجام SDS-PAGE و Western Blotting بر روی EGFR تخلیص شده..... ٦۹
۲-۲-٤-۳. تخلیص EGFR از ژل SDS-PAGE ٦۹
۲-۲-٤-٤. الایزا با EGFR تخلیص شده از ژل SDS-PAGE ۷۰
۲-۲-۵. بررسی تمایل ICR62 به پپتید سنتزی ۷۰

۲-۲-۵-۱. الایزای اختصاصی..... ۷۰
۲-۲-۵-۲. الایزای تقلیدی..... ۷۰
۲-۲-٦. ایمن کردن حیوانات..... ۷۱
۲-۲-٦-۱. ایمن کردن موش..... ۷۱
۲-۲-٦-۲. ایمن کردن خرگوش..... ۷۱
۲-۲-۷. تیتر سرم..... ۷۲
۲-۲-۷-۱. تیتر سرم موشی..... ۷۲
۲-۲-۷-۱-۱. بررسی تولید آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های تزریق شده..... ۷۲
۲-۲-۷-۱-۲. تیتر آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های تزریق شده..... ۷۲
۲-۲-۷-۱-۳. تیتر سرم بر علیه EGFR..... ۷۳
۲-۲-۸. الایزای سلولی..... ۷۳
۲-۲-۹. الایزا با EGFR تخلیص شده..... ۷۳
۲-۲-۹-۱. تیتر سرم خرگوشی بر علیه آنتی ژن های تزریق شده..... ۷۳
۲-۲-۱۰. تخلیص و بررسی IgG خرگوشی..... ۷۳
۲-۲-۱۰-۱. تخلیص IgG خرگوشی..... ۷۳
۲-۲-۱۰-۲. تعیین تیتر IgG تخلیص شده بر علیه آنتی ژن های تزریق شده..... ۷٤
۲-۲-۱۰-۳. بررسی IgG تولید شده بر علیه پپتید..... ۷۵
۲-۲-۱۰-۳-۱. تعیین تیتر آنتی بادی بر علیه پپتید..... ۷۵
۲-۲-۱۰-۳-۲. الایزای رقابتی..... ۷۵
۲-۲-۱۰-٤. تعیین تیتر بر علیه EGFR..... ۷۵
۲-۲-۱۱. آزمون رشد سلولی..... ۷٦
۲-۲-۱۱-۱. پروتکل آزمون رشد سلولی..... ۷٦
۲-۲-۱۱-۲. آزمون رشد با سرم موشی..... ۷۷
۲-۲-۱۱-۳. آزمون بررسی اثر میزان سرم موشی بر اثر مهاری آنتی بادی ICR62 بر رشد سلول های A431..... ۷۷
۲-۲-۱۱-٤. آزمون رشد با IgG خرگوشی تخلیص شده..... ۷۸

۲-۲-۱۲. آنالیز آماری ۷۸

فصل ۳ نتایج و یافته ها..... ۷۹

۳-۱. الایزای فاژ..... ۸۰

۳-۲. تخلیص EGFR..... ۸۱

۳-۲-۱. نتایج تخلیص EGFR از سلول های A431..... ۸۱

۳-۲-۲. تخلیص EGFR از ژل SDS-PAGE..... ۸۱

۳-۲-۳. بررسی تمایل آنتی بادی های مونوکلونال ICR61 و ICR62 به EGFR تخلیص شده..... ۸۲

۳-۳. بررسی تمایل آنتی بادی های مونوکلونال ICR62 و ICR61 به پپتید سنتزی..... ۸۲

۳-۳-۱. نتایج الایزای اختصاصی..... ۸۳

۳-۳-۲. نتایج الایزای تقلیدی..... ۸۳

۳-٤. نتایج تیتر سرم..... ۸٤

۳-٤-۱. نتایج تیترسرم موشی..... ۸٤

۳-٤-۱-۱. نتایج بررسی تولید آنتی بادی بر علیه آنتی ژن های تزریق شده..... ۸٤

۳-٤-۱-۲. نتایج تیتر سرم بر علیه P-BSA و BSA..... ۸۵

۳-٤-۱-۳. نتایج تیتر سرم بر علیه EGFR..... ۸٦

۳-٤-۱-۳-۱. نتایج الایزای سلولی..... ۸٦

۳-٤-۱-۳-۲. نتایج تیتر سرم با EGFR تخلیص شده..... ۸٦

۳-٤-۲. نتایج تیتر سرم خرگوشی..... ۸۷

۳-۵. نتایج تخلیص آنتی بادی خرگوشی و بررسی فعالیت آن..... ۸۸

۳-۵-۱. نتایج تخلیص آنتی بادی خرگوشی..... ۸۸

۳-۵-۲. نتایج تعیین تیتر IgG خرگوشی تخلیص شده بر علیه P-BSA و BSA..... ۸۸

۳-۵-۳. نتایج بررسی آنتی بادی های تولید شده بر علیه پپتید..... ۹۱

۳-۵-۳-۱. نتایج تعیین تیتر بر علیه پپتید..... ۹۲

۳-۵-۳-۲. نتایج الایزای رقابتی..... ۹۲

۳-۵-٤. نتایج تعیین تیتر بر علیه EGFR..... ۹۳

۳-٦. نتایج آزمون ممانعت از رشد سلولی..... ۹٤
۳-٦-۱. نتایج آزمون ممانعت از رشد سلولی با سرم موشی ۹٤
۳-٦-۲. نتایج آزمون بررسی اثر میزان سرم موشی بر اثر مهاری آنتی بادی ICR62 بر رشد سلول های A431..... ..... ۹٥
۳-٦-۳. نتایج آزمون ممانعت رشد سلولی با IgG خرگوشی تخلیص شده..... ۹٥
فصل ٤ بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها.....۹۷
٤-۱. بحث و نتیجه گیری..... ۹۸
٤-۲. پیشنهادها ۱۰۹
فهرست منابع.....۱۱۰
چکیده انگلیسی.....۱۱۹

فهرست جداول

جدول ۱-۱ نقش گیرنده های خانواده HER در تکوین..... ۱۵
جدول ۱-۲ نقش لیگاندهای خانواده EGF در تکوین..... ۱۶
جدول ۱-۳ بیان EGFR در انواع سرطان..... ۱۷
جدول ۱-٤. واکسن های می موتوپی بر علیه مارکرهای سرطانی..... ۵۱
جدول ۲-۱. میزان IPTG ، X-GAL و Top-Agar مورد نیاز برای تیتر فاژ..... ٦۲
جدول۲-۲ تهیه ژل تفکیک کننده برای SDS-PAGE..... ٦٤
جدول ۲-۳. تهیه ژل متراکم کننده برای SDS-PAGE..... ٦٤

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱ شکل شماتیک EGFR..... ٦

شکل ۱-۲ ساختار مونومر و دایمر دومن خارج سلولی EGFR..... ۷

شکل ۱-۳ لیگاندهای EGFR..... ۹

شکل ۱-٤ پیام رسانی EGFR..... ۱٤

شکل ۱-۵ واریته های مختلف EGFR..... ۱۹

شکل ۱-٦ محل اثر مهارکننده های EGFR ۲۰

شکل ۱-۷ اساس فناوری های نمایش..... ۲۸

شکل ۱-۸ ساختمان فاژ Ff..... ۳۰

شکل ۱-۹ روش های مختلف نمایش فاژی..... ۳۲

شکل ۱-۱۰ غنی سازی کتابخانه فاژی..... ۳۳

شکل ۱-۱۱. نمایش ریبوزومی..... ۳٦

شکل ۱-۱۲. نمایش mRNA..... ۳۷

شکل ۱-۱۱ مقایسه آنتی بادی های طبیعی و نوترکیب..... ٤۰

شکل ۱-۱۲ اپی توپ خطی و فضایی..... ٤۳

شکل ۱-۱۳.نتایج حاصل ازتست الایزا برای بررسی اختصاصی بودن می موتوپ بیان شده در سطح فاژ برای آنتی بادی مونوکلونال ICR62 در مقایسه با آنتی بادی مونوکلونال ICR61 و BSA به عنوان کنترل..... ۸۰

شکل ۳-۲ انجام SDS-PAGE (ردیف ۱) و وسترن بلات (ردیف ۲) بر روی EGFR تخلیص شده..... ۸۱

شکل ۳-۳. نتایج تایید EGFR تخلیص شده با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال ICR61 و ICR62 در تست الایزا..... ۸۲

شکل۳-٤ نتایج تست الایزا برای بررسی اختصاصی بودن پپتید سنتزی به آنتی بادی ICR62..... ۸۳

شکل ۳-۵. نتایج الایزای تقلیدی پپتید در ممانعت از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ICR61 و ICR62 (کنترل) در اتصال به EGFR تخلیص شده..... ۸٤
شکل ۳-٦. نتایج بررسی اولیه تیتر سرم موش های تزریق شده با پپتید، P-BSA و BSA..... ۸۵
شکل ۳-۷. نتایج تعیین تیتر سرم موشی بر علیه P-BSA و BSA..... ۸۵
شکل ۳-۸. نتایج الایزای سلولی بر روی سلول های A431 با استفاده از سرم موشی..... ۸٦
شکل ۳-۹. نتایج تعیین تیتر سرم موشی بر علیه EGFR..... ۸۷
شکل ۳-۱۰. نتایج تعیین تیتر سرم خرگوشی بر علیه P-BSA و BSA..... ۸۷
شکل ۳-۱۱. SDS-PAGE غیر احیایی IgG خرگوشی تخلیص شده..... ۸۸
شکل ۳-۱۲. بررسی خلوص IgG تخلیص شده بر علیه P-BSA در SDS-PAGE غیر احیایی با دستگاه Helena Processor 24..... ۸۹
شکل ۳-۱۳. بررسی خلوص IgG تخلیص شده بر علیه BSA در SDS-PAGE غیر احیایی با دستگاه Helena Processor 24..... ۸۹
شکل ۳-۱٤. SDS-PAGE احیایی IgG خرگوشی تخلیص شده..... ۹۰
شکل ۳-۱۵. بررسی خلوص IgG تخلیص شده بر علیه P-BSA در SDS-PAGE احیایی با دستگاه Helena Processor 24..... ۹۰
شکل ۳-۱٦. بررسی خلوص IgG تخلیص شده بر علیه P-BSA در SDS-PAGE احیایی با دستگاه Helena Processor 24..... ۹۱
شکل ۳-۱۷. . نتایج تعیین تیتر IgG خرگوشی تخلیص شده بر علیه P-BSA و BSA..... ۹۱
شکل ۳-۱۸. نتایج تعیین تیتر IgG خرگوشی تخلیص شده بر علیه پپتید..... ۹۲
شکل ۳-۱۹.نتایج آزمون رقابتی بین پپتید و آنتی بادی بر علیه P-BSA در اتصال به P-BSA و BSA..... ۹۳
شکل ۳-۲۰. نتایج تعیین تیتر IgG خرگوشی تخلیص شده بر علیه EGFR..... ۹۳
شکل ۳-۲۱. ننایج آزمون ممانعت از رشد سلولی با سرم موشی بر روی سلول های A431..... ۹٤
شکل ۳-۲۲. نتایج آزمون بررسی اثر میزان سرم موشی بر اثر مهاری آنتی بادی ICR62 بر رشد سلول های A431..... ۹۵
شکل ۳-۲۳. نتایج آزمون ممانعت رشد سلولی با IgG خرگوشی تخلیص شده..... ۹٦

فصل ۱

مقدمه

و مروری بر مطالعات انجام شده