٦١٤١٦٦

٩٤٦٦١

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه
دوره کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

کلونینگ و بیان پروتئین OmpA سالمونلا بر سطح پروبیوتیکهای جدا شده از مجرای گوارشی مرغ

نگارش
مهرناز نوری

استاد راهنما
دکتر فاطمه رهبری زاده

استاد مشاور
دکتر فرهاد موسی خانی

زمستان ۱۳۸۶

۱۳۸۷/۲/۵

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **خانم مهرناز نوری** رشته: **بیوتکنولوژی پزشکی** گرایش:
تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده (استاد راهنما)

جناب آقای دکتر فرهاد موسی خانی (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر حسین عبدل تهرانی (نماینده تحصیلات‌تکمیلی)

جناب آقای دکتر محمدجواد رسایی (استادناظر)

جناب آقای دکتر مسعود هوشمند (استادناظر)

آئین نامه پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه .چاپ و انتشار پایان نامه (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 می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلا به طور 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 پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته بیوتکنولوژی پزشکی است که در سال ۱۳۸۶ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر علیرضا رضازاده و مشاوره دکتر فرهاد رحبار از آن دفاع شده است.

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

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

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب مهرناز نوری دانشجوی رشته بیوتکنولوژی پزشکی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

۱۳۸۷/۱۲/۱۵

نام ونام خانوادگی مهرناز نوری

تاریخ و امضا ۸۶/۱۲/۱۵

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی 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 هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

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 باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید 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 آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما 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 و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگي . مهرناز نوری
تاریخ و امضاء ۸۶،۱۲،۱۵

تقدیم به تمامی پویندگان راه علم و دانش

با صمیمانه‌ترین مراتب تشکر از:

استاد ارجمند سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده

که از رهنمودهای ارزنده و حمایت‌های بی‌شائبه ایشان در مراحل مختلف اجرای این پایان‌نامه بهره‌مند بوده‌ام.

پدر و مادر گرامی‌ام

که امروزم ثمرهٔ زحمات دیروز آنهاست و فداکاریهای بی دریغشان برایم پشتوانهٔ محکمی در رویارویی با مشکلات می باشد

برادر وخواهرمهربانم

که همواره دوستی و یاریشان، امید بخش ادامهٔ راهم بوده است

همسر عزیزم

که با حمایتهای بی دریغش مشوق من در انجام هرچه بهتر این پژوهش بود

و با تشکر و قدردانی از:

- استاد ارجمند سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده که از رهنمودهای ارزنده و حمایت‌های بی‌شائبه ایشان در مراحل مختلف اجرای این پایان‌نامه بهره‌مند بوده‌ام.
- استاد محترم جناب آقای دکتر فرهاد موسی خانی مشاور این تحقیق که مساعدتها و همکاریهای همیشگی شان قابل تقدیر است.
- استاد گرامی جناب آقای دکتر شهرام لواسانی مشاور این تحقیق که از تشویقها و کمکهای ایشان در طول تحقیق برخوردار بوده‌ام.
- تمامی اساتید محترم گروه بیوتکنولوژی پزشکی که از علم و معرفت‌شان در طول مدت کار و تحصیل بهره برده‌ام.
- دوستان و سروران محترم که کمک‌های ارزنده‌شان راهگشای مشکلات بود.
- کارمندان و کارکنان صدیق دانشگاه تربیت مدرس که مرا در اجرای بهینهٔ این تحقیق یاری کرده‌اند.
- کلیه اساتید و همکارانی که به انحاء مختلف مزاحم وقت عزیزشان شده‌ام.

چکیده:

پروبیوتیکها طبق تعریف سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد، میکروارگانیسمهای زنده ای هستند که در صورتیکه به میزان کافی مصرف شوند می توانند برای سلامتی میزبان مفید باشند. آنها می توانند آکولوژی کوچک مجرای گوارشی را در انسان و حیوان تحت تأثیر قرار دهند و در ارتقاء سطح سلامتی مؤثر باشند. سالمونلاها گروهی از باکتریهای میله ای شکل، گرم منفی از خانوادهٔ انتروباکتریاسه هستند که بیماریهای عفونی در انسان و حیوانات ایجاد می کنند. سالمونلا یکی از مهمترین باکتریهای بیماریزاست که عامل تب تیفوئید، سالمونلوز و برخی انواع دیگربیماریهای عفونی در انسان و حیوان است که یک مشکل بهداشتی بزرگ بخصوص در کشورهای در حال توسعه است. OmpA یکی از پروتئینهای غشاء خارجی خانوادهٔ انتروباکتریاسه است که قادر است سیستم ایمنی میزبان وتولید آنتی بادی اختصاصی ضد این پروتئین را تحریک کند.

در این کار، باکتریهای اسید لاکتیک از قسمتهای مختلف دستگاه گوارشی مرغ جدا شدند. باکتریهای جدا شده به وسیلهٔ تستهای بیوشیمیایی شناسایی شدند. ژنوتیپ باکتریها با استفاده از PCR ژن ۱۶SrRNA روی ژنوم استخراج شده از لاکتوباسیلها شناسایی شد. مقاومت به اسیدهای صفراوی و pH=۳ و توانایی باکتری در مهار رشد باکتریهای بیماریزا (سالمونلا انتریتیدیس و اشرشیاکلی) برای انتخاب لاکتوباسیلهای پروبیوتیک استفاده شد. ژنوم سالمونلا تیفی موریوم را استخراج و ژن OmpA را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر کردیم. محصول PCR بدست آمده در وکتور کلونینگ TA(pTZ57R/T cloning vector) قرار داده شد و ترانسفورماسیون میزبان (*E. Coli* TG1) به روش الکتروپوریشن انجام شد. حضور ژن OmpA در باکتریهای ترانسفورم شده بررسی شد وبرای تأیید صحت ژن توالی کلون شده، نمونه تعیین توالی شد. بعد از تأیید توالی در کلونینگ اولیه، ژن OmpA در وکتور بیانی اختصاصی لاکتوباسیل ساب کلون شد. حضور ژن در باکتری گرم مثبت (لاکتوباسیل) با PCR و تعیین توالی ژن انتقالی تأیید شد. بیان پروتئین با استفاده از RT-PCR بررسی شد. بیان سطحی پروتئین با استفاده از واکنش آنتی ژن آنتی بادی انجام شد.

نتایج تستهای تشخیصی بیوشیمیایی برای شناسایی لاکتوباسیلها بعد از مقایسهٔ نتایج تعیین توالی ۱۶ SrRNA با اطلاعات موجود در بانک ژنی تأیید شد. کلونینگ پروتئین OmpA سالمونلا با موفقیت انجام شد و نتایج PCR و تعیین توالی نشان دهندهٔ حضور ژن در باکتری بود. ترانسفورماسیون لاکتوباسیلها با وکتور ساختهٔ شدهٔ لاکتوباسیلی با موفقیت انجام شد. نتایج RT-PCR نشان دهندهٔ بیان ژن در باکتری بود. بیان سطحی نیز بدنبال آگلوتیناسیون باکتری بیان کننده با آنتی سرم ضد سالمونلا تأیید شد.

نتیجه گیری: بیان پروتئینهای هترولوگ در باکتریها یکی از موضوعات جالب توجه در پزشکی مولکولی است.باکریهای اسید لاکتیک یکی از اهداف مهم کاری در این زمینه هستند. در این کار پروتئین OmpA سالمونلا تیفی موریوم، به عنوان گامی نوین در پیشگیری از عفونتهای سالمونلایی به طور موفقیت آمیز در باکتری لاکتوباسیل کلون شد.

کلمات کلیدی: لاکتویاسیل ، پروبیوتیک، بیان، سالمونلا تیفی موریوم، ompA

فهرست مطالب

۱- فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱ تاریخچه ۱
۱-۲ واکسنهای باکتریایی ۴
۱-۲-۱ انواع واکسنهای باکتریایی ۵
۱-۲-۲ واکسنهای حاوی سلول کامل ۶
۱-۲-۳ واکسنهای بدون سلول ۷
۱-۲-۳-۱ واکسنهای زیرواحدپروتئینی ۷
۱-۳ میزبانهای سازنده ۸
۱-۴ سیستمهای زندهٔ تحویل واکسن ۹
۱-۴-۱ باکتریهای گرم منفی ۹
۱-۴-۲ باکتریهای گرم مثبت ۱۰
۱-۴-۳ سیستمهای تحویل ویروسی ۱۰
۱-۴-۴ واکسنهای اسیدنوکلئیکی ۱۰
۱-۴-۵ DNA ۱۰
۱-۴-۵-۱: تحویل پلاسمیدDNA با استفاده از باکتریها ۱۱
۱-۴-۶ RNA ۱۱
۱-۴-۸ پیلی و فلاژل باکتریایی ۱۱
۱-۵ واکسنهای پلی ساکاریدی ۱۱
۱-۶ سیستمهای بیان سطحی باکتریایی ۱۲
۱-۶-۱. سیستمهای مورد استفاده در باکتریهای گرم مثبت ۱۲
۱-۶-۱-۱. پروتئینهای غشاء سلولی ۱۲
۱-۶-۱-۲ پروتئینهای وابسته به غشاء ۱۳
۱-۶-۲ کاربردهای بیان سطحی ۱۴
۱-۶-۲-۱ کاربرد در ایمونولوژی و واکسن سازی ۱۴
۱-۷ واکسنهای مخاطی ۱۴
۱-۷-۱ سیستم ایمنی معدی- روده ای ۱۶
۱-۸ ساختار غشایی در باکتریها ۱۷
۱-۸-۱ پوستهٔ خارجی یا دیوارهٔ سلولی ۱۷

۱-۸-۱-۱ ساختمان شیمیایی دیوارهٔ سلولی ۱۸
۱-۹ سالمونلا و عفونتهای سالمونلایی ۲۱
۱-۹-۱ مورفولوژی و رنگ آمیزی ۲۱
۱-۹-۲ خصوصیات بیوشیمیایی و شرایط رشد ۲۲
۱-۹-۳ ساختمان آنتی ژنیک ۲۲
۱-۹-۴ بیماریزایی در انسان ۲۳
۱-۹-۵ درمان بیماری در انسان ۲۶
۱-۹-۶ شیوع سالمونلا در طیور و فرآورده های آنها ۲۶
۱-۹-۷ شناسایی سالمونلا ۲۷
۱-۹-۸ پیشگیری ۲۷
۱-۹-۹ واکسیناسیون ضد سالمونلا ۲۸
۱-۹-۹-۱ واکسنهای حاوی سلولهای کامل و کشته شدهٔ سالمونلا ۲۸
۱-۹-۹-۲ واکسنهایی که از اجزای باکتری تشکیل شده اند ۲۸
۱-۹-۹-۳ واکسنهای سالمونلای زندهٔ ضعیف شده ۲۹
۱-۹-۹-۴ موتانهای آگزوتروفیک ۲۹
۱-۱۰ پروبیوتیکها ۳۱
۱-۱۰-۱ تعریف و تاریخچه ۳۱
۱-۱۰-۲ اثرات سودمند پروبیوتیکها ۳۳
۱-۱۰-۲-۱ اثر بر رشد و کارکرد فیزیولوژی دستگاه گوارش ۳۳
۱-۱۰-۲-۲- اثرات ضد عوامل بیماریزا ۳۴
۱-۱۰-۲-۳ اثر در بهبود عملکرد سیستم ایمنی و اثرات ضد التهابی ۳۶
۱-۱۰-۲-۴ فعالیتهای ضد سرطانی پروبیوتیکها: ۳۶
۱-۱۰-۲-۵ کاربرد پروبیوتیکها به عنوان حاملین آنتی ژن: ۳۷
۱-۱۱ روشهای بررسی بیان ژن ۳۸
۱-۱۱-۱ بررسی در سطح mRNA ۳۸
۱-۱۱-۱-۱- روشهای بر پایهٔ هیبریداسیون ۳۸
۱-۱۱-۱-۲- روشهای بر پایهٔ تکثیر ۴۰
۱-۱۱-۲- بررسی بیان در سطح پروتئین ۴۲

۱-۱۱-۲-۱- روشهایی که در آنها از توالیهای گزارشگر استفاده می شود..... ۴۲
۱-۱۱-۲-۲- روشهایی که در آنها پروتئین با آنتی بادی اختصاصی ضد آن شناسایی می شود ۴۲
۲-فصل دوم: مواد و روشها ۴۵
۲-۱ جدا کردن لاکتوباسیل از مجرای گوارشی مرغ: ۴۶
۲-۱-۱ جداسازی قسمتهای مختلف دستگاه گوارشی مرغ:..... ۴۶
۲-۱-۲ کشت رسوب به منظور جداسازی باکتری:..... ۴۶
۲-۲ شناسایی باکتری: ۴۶
۲-۲-۱ رنگ آمیزی گرم: ۴۶
۲-۲-۲ جداسازی کلونهای با خواص پروبیوتیکی:..... ۴۷
۲-۲-۲-۱ مهار رشد سالمونلا انتریتیدیس و اشرشیاکلی..... ۴۷
۲-۲-۲-۲ مقاومت در برابر pH اسیدی..... ۴۷
۲-۲-۲-۳ مقاومت در برابر صفرا..... ۴۷
۲-۲-۲-۴ تعیین خصوصیات تخمیری باکتری ۴۷
۲-۲-۲-۵ تأیید ژنتیکی باکتری:..... ۵۰
۲-۳ تکثیر،کلونینگ و تأیید ژن OmpA سالمونلا..... ۵۲
۲-۳-۱ کشت باکتری سالمونلا..... ۵۲
۲-۳-۲ تخلیص ژنوم باکتری ۵۳
۲-۳-۳ الکتروفورز روی ژل آگاروز..... ۵۳
۲-۳-۴ تکثیر ژن OmpA با استفاده از PCR روی ژنوم سالمونلا..... ۵۴
۲-۳-۵ تخلیص محصول PCR از ژل..... ۵۵
۲-۳-۶ کلون کردن قطعه در وکتور کلونینگ T/A ۵۵
۲-۳-۷ تهیهٔ باکتری مستعد..... ۵۶
۲-۳-۸ انتقال الکتریکی محصول واکنش اتصال به میزبان مستعد(Electroporation)..... ۵۷
۲-۳-۹ آنالیز کلونها با PCR..... ۵۸
۲-۳-۱۰ تأیید کلونهای مثبت..... ۵۸
۲-۳-۱۱ تأیید حضور ژن در وکتور با هضم آنزیمی..... ۶۰
۲-۴ آماده سازی وکتورpMG36e..... ۶۱
۲-۴-۱ تخلیص وکتور pMG36e ۶۱

۲-۴-۲ تعویض ناحیهٔ پروموتری وکتور با پروموتر Ldh ۶۲
۲-۴-۲-۱ تکثیر پروموتر Ldh ۶۲
۲-۴-۳ هضم آنزیمی پروموتر و وکتورpMG36e ۶۲
۲-۴-۴ واکنش اتصال ۶۳
۲-۴-۵ ترانسفورم کردن باکتری TG1 مستعد با سازهٔ حاصل از واکنش اتصال ۶۳
۲-۴-۶ تأیید حضور پروموتر ldh در باکتری ترانسفورم شده ۶۳
۲-۵ ساب کلونیگ ژن OmpA در سازهٔ حاوی پروموتر Ldh ۶۳
۲-۵-۱ هضم آنزیمی ۶۳
۲-۵-۲ واکنش رسوب با اتانل ۶۴
۲-۵-۳ واکنش اتصال ۶۴
۲-۵-۴ ترانسفورم کردن باکتری TG1 مستعد با سازهٔ حاصل از واکنش اتصال ۶۴
۲-۵-۵ بررسی کلونیهای مقاوم به آنتی بیوتیک به منظور جستجوی پلاسمید حاوی ژن OmpA ۶۵
۲-۶ ترانسفورم کردن میزبان لاکتوباسیلی با سازهٔ ساخته شده ۶۵
۲-۶-۱ تهیهٔ باکتری مستعد ۶۵
۲-۶-۲ الکتروپوریشن باکتری مستعد ۶۵
۲-۶-۳ بررسی کلونهای مقاوم به آنتی بیوتیک و استخراج پلاسمید از لاکتوباسیلها ۶۵
۲-۷ جستجوی ژن OmpA در پلاسمید تخلیص شده ۶۶
۲-۸ بررسی بیان ژن در باکتری لاکتوباسیل ۶۶
۲-۸-۱ RT-PCR ۶۶
۲-۸-۱-۱ تخلیص RNA از لاکتوباسیل ۶۶
۲-۸-۱-۲ ساخت cDNA ۶۷
۲-۸-۱-۳ PCR روی cDNA ساخته شده از RNA لاکتوباسیلوس سالیواریوس ترانسفورم ۶۸
۲-۸-۲ بررسی بیان سطحی پروئین OmpA ۶۸
۳-فصل سوم: نتایج ۶۹
۳-۱ نتایج جدا کردن لاکتوباسیل از مجرای گوارشی مرغ ۷۰
۳-۲ نتایج شناسایی باکتری ۷۱
۳-۲-۱ نتیجهٔ رنگ آمیزی گرم ۷۱
۳-۲-۲ نتیجهٔ جداسازی کلونهای با خواص پروبیوتیکی ۷۱

۳-۲-۲-۱ نتایج مهار رشد سالمونلا انتریتیدیس و اشرشیاکلی ۷۱
۳-۲-۲-۲ نتیجهٔ مقاومت در برابر pH اسیدی ۷۲
۳-۲-۲-۳ نتیجهٔ مقاومت در برابر صفرا ۷۲
۳-۲-۲-۴ نتایج تعیین خصوصیات تخمیری باکتری ۷۳
۳-۲-۲-۵ نتایج تأیید ژنتیکی باکتری ۷۹
۳-۳ نتایج تکثیر،کلونینگ و تأیید ژن OmpA سالمونلا ۸۲
۳-۳-۱ نتیجهٔ کشت باکتری سالمونلا ۸۲
۳-۳-۲ نتیجهٔ تخلیص ژنوم باکتری ۸۲
۳-۳-۳ نتیجهٔ الکتروفورز روی ژل آگاروز ۸۲
۳-۳-۴ نتیجهٔ تکثیر ژن OmpA با استفاده از PCR روی ژنوم سالمونلا ۸۲
۳-۳-۵ نتیجهٔ تخلیص محصول PCR از ژل ۸۳
۳-۳-۶ نتیجهٔ کلون کردن قطعه در وکتور کلونینگ T/A ۸۳
۳-۳-۷ تهیهٔ باکتری مستعد ۸۳
۳-۳-۸ نتیجهٔ انتقال الکتریکی محصول واکنش اتصال به میزبان مستعد(Electroporation) ۸۴
۳-۳-۹ نتایج مربوط به آنالیز کلونها با PCR: ۸۴
۳-۳-۱۰ تأیید کلونهای مثبت ۸۴
۳-۳-۱۱ تأیید حضور ژن در وکتور با هضم آنزیمی ۸۵
۳-۴ نتایج آماده سازی وکتورpMG36e ۸۷
۳-۴-۱ نتیجهٔ تخلیص وکتور pMG36e ۸۷
۳-۴-۲ نتایج تعویض ناحیهٔ پروموتری وکتور با پروموتر Ldh ۸۷
۳-۴-۲-۱ نتیجهٔ تکثیر پروموتر Ldh ۸۷
۳-۴-۳ نتیجهٔ هضم آنزیمی پروموتر و وکتورpMG36e ۸۸
۳-۴-۴ واکنش اتصال ۸۹
۳-۴-۵ نتیجهٔ ترانسفورم کردن باکتری TG1 مستعد با سازهٔ حاصل از واکنش اتصال ۸۹
۳-۴-۶ تأیید حضور پروموتر ldh در باکتری ترانسفورم شده ۸۹
۳-۵ ساب کلونیگ ژن OmpA در سازهٔ حاوی پروموتر Ldh ۹۰
۳-۵-۱ نتیجهٔ هضم آنزیمی ۹۰
۳-۵-۲ واکنش رسوب با اتانل ۹۰

۳-۵-۳ واکنش اتصال..... ۹۰
۳-۵-۴ ترانسفورم کردن باکتری TG1 مستعد با سازهٔ حاصل از واکنش اتصال..... ۹۰
۳-۵-۵ نتایج بررسی کلونهای مقاوم به آنتی بیوتیک برای جستجوی پلاسمید حاوی ژن OmpA ۹۱
۳-۶ نتایج ترانسفورم کردن میزبان لاکتوباسیلی با سازهٔ ساخته شده ۹۱
۳-۶-۱ تهیهٔ باکتری مستعد ۹۱
۳-۶-۲ بررسی کلونهای مقاوم به آنتی بیوتیک و استخراج پلاسمید از لاکتوباسیلها ۹۱
۳-۷ نتیجهٔ جستجوی ژن OmpA در پلاسمید تخلیص شده ۹۲
۳-۸ نتایج بررسی بیان ژن در باکتری لاکتوباسیل ۹۳
۳-۸-۱ نتیجهٔ RT-PCR ۹۳
۳-۸-۱-۱ نتیجهٔ تخلیص RNA از لاکتوباسیل ۹۳
۳-۸-۱-۲ نتیجهٔ ساخت cDNA ۹۴
۳-۸-۱-۳ PCR روی cDNA ساخته شده از RNA لاکتوباسیلوس سالیواریوس ترانسفورم ۹۴
۳-۸-۲ نتیجهٔ بررسی بیان سطحی پروتئین OmpA ۹۴
۴-فصل چهارم: بحث وپیشنهادات ۹۶
۵-فصل پنجم : منابع ۱۰۳

فصل اول

مقدمه

و مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱ تاریخچه:

تلاش انسان برای واکسیناسیون به قدمت تلاشهای او برای نجات از بیماری است. برای بررسی واکسیناسیون و تاریخچه آن ناگزیر باید از دوران شناخت بیماریها گذشت و در این رابطه در درجه اول می توان از آبله نام برد.
مورخین، انتشار ویروس آبله را بین انسانها از دوران استقرار کشاورزی و مربوط به۱۰۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح ذکر نموده اند. در دومین هزاره قبل از میلاد حداقل وجود آبله در سه جسد مومیایی شده فراعنه مصر گزارش گردیده که مستند تر از همه جسد مومیایی شده رامسس پنجم است که در سال ۱۱۵۷ قبل از میلاد در سن ۴۰ سالگی در اثر ابتلا به بیماری آبله تلف می شود. جسد مومیایی شده وی در سال ۱۹۷۹ به دقت مورد آزمایش قرار گرفته است و علائم جراحات آبله ای در صورت، سینه و دست وپا مشاهده گردیده و از طریق میکروسکوپ الکترونی نیز وجود آبله تأیید گردیده است. در سال ۳۱۳ بعد از میلاد امپراتوری قدیم رم مورد حمله آبله قرار گرفته و تلفات سنگینی را متحمل شده است، بطوریکه گروهی از مورخین بر این عقیده اند که این بیماری در طول تاریخ منشاء تحولات شگرف در شئون اجتماعی ملل مختلف جهان گردیده، تا جایی که یکی از علل تسخیر نیمکره غربی توسط سفیدپوستان را قدرت مخرب ویروس آبله ذکر کرده اند.
در سال ۹۱۰ میلادی دانشمند ایرانی ابوبکرمحمدبن زکری رازی اختلاف بین آبله و سرخک را در کتاب الجدری والحصبه به تفصیل بیان کرده و فرضیه هایی را در زمینه بروز بیماری و راه سرایت آن ارائه نموده است. همچنین استفاده از قطره های چشمی و ادویه و اشربه بسیاری را برای بیماران توصیه نموده است. وی در همان هنگام در شهر ری دلمه های آبله را با قندوگلاب مخلوط می نموده و برای ایجاد ایمنی بصورت خوراکی تجویز می کرده است. [۱]

در اوایل قرن ۱۸ اروپاییانی که به چین سفر می کردند شاهد این بودند که دلمه های آبله را بصورت پودر وارد بینی می کنند و از این راه عمل مایه کوبی را انجام می دهند. همچنین از اروپا، خاورمیانه و هندوستان نیز مسافرانی بودند که روشهای آبله کوبی را با استفاده از دلمه یا چرک آبله ای بر روی پوست سالم یا خراش داده گزارش نموده اند. با وجود اینکه آبله کوبی از قرن ششم میلادی در چین رواج داشته است، لیکن اولین گزارش علمی در این خصوص به دوران جن سانگ [1] (۱۰۲۳تا ۱۰۶۳ میلادی) مربوط می باشد.
در دسامبر ۱۷۱۵، همسر سفیر کبیر بریتانیا در دربار عثمانی با روش آبله کوبی آشنایی پیدا می کند و در ۱۹ مارس ۱۷۱۸ فرزند خود را با موفقیت وبدون خطر شخصا تلقیح می کند. وی موفق می شود که در انگلستان نظرها را به آبله کوبی معطوف نماید.
در سال ۱۷۷۴، بنیامین جستی[2] که در مزرعه بزرگی در یتمینستر[3]در ایالت دورستر[4] در انگلستان به حرفه گاوداری اشتغال داشت و از بیماری آبله گاوی و اثرات آن در ارزش فروش حیوانات مطلع بود، خود بنیامین درجوانی به آبله گاوی مبتلا شده بود همسرش و دو فرزندش را با یک سوزن جوراب بافی با مواد آبله گاوها تلقیح نمود. این کار بعدا مورد توجه ادوارد جنر قرار گرفته و در مکتوبات خود از آنها یاد کرده است.

---
[1] Jen Tsung
[2] Benjamin Jesty
[3] Yetminster
[4] Dorster

ادوارد جنر روستازاده در ۱۷ ماه می ۱۷۴۹ متولد شد و در سال ۱۷۹۲ درجه دکترای پزشکی را دریافت کرد و پزشک روستای برکلی گردید. اولین واقعه در زندگی جنر، آبله کوبی او در سن ۸ سالگی(۱۷۵۷) است که منجر به ابتلای وی به بیماری شدید شد. این واقعه همیشه فکر او را مشغول می کرد تا هنگامیکه پزشک شود و جلوی این بیماری را بگیرد. در سال ۱۷۸۹ در گلوسسترشیر[1]، بیماری ای ظاهر شد که آن را آبله خوکی می گفتند، هر چند معلوم نیست که همان آبله گاوی نبوده باشد. ادوارد جنر فرزند ده ماهه خود را با پوستول پرستارش تلقیح نمود. در ۱۲ ژانویه ۱۷۹۰، جنر، فرزندش و پرستار وی را با آبله حقیقی تلقیح نمود و هیچگونه تورمی در بازو یا نشانه ای از بیماری در آنها ظاهر نگردید. در ۱۴ می ۱۷۹۶، کار تاریخی تلقیح ویروس آبله گاوی توسط ادوارد جنر بر روی بازوی پسر هشت ساله ای به نام هیپس فیپس[2] انجام گرفت و در تاریخ اول جولای ۱۷۹۶، ۷ هفته بعد از تلقیح آبله گاوی، این پسر با مواد آبله واقعی از طریق خراش در پوست بازو آلوده گردید، ولی هیچ اثری از بیماری ظاهر نشد. وی در دو سال مداوم تجربیات خود را روی اشخاص دیگری تکرار کرد و بعد از آنکه این حقیقت غیرقابل انکار برای خودش مسلم شد، در سال ۱۷۹۸ رساله ای در ۶۰ صفحه با عنوان "اطلاعاتی درباره علل و تاثیرات آبله و آبله گاوی بر یکدیگر " منتشر ساخت.

کار جنر با انتقادات و اشکال تراشیهای بسیاری مواجه گردید، تا جایی که مجبور شد برای پاسخگویی به یک سری از انتقادات، به دقت شرایطی را که برای این مایه کوبی لازم است شرح دهد و حتی زمان درستی را که می توان از محتوای تاول برای مایه کوبی استفاده نمود تعیین نماید. در سال ۱۷۹۹ رساله ای را در این باره منتشر کرد ودر سال بعد رساله جنر به عنوان دستورالعمل در اختیار ۴۰ نفر پزشک و جراح قرار گرفت. به سرعت نتایج کار جنر عالمگیر شد. واکسنی که از زمان کشف جنر تا ریشه کنی جهانی آبله به سال ۱۹۷۸(حدود ۱۸۰ سال) مصرف گردید عمدتا واکسن تهیه شده روی پوست گوساله و از سویه ویروسی واکسن بوده است. با کار تاریخی جنر، فصل نوینی در تاریخ پزشکی گشوده شد، ولی در طی سالیان متمادی راه پر فراز و نشیبی را طی نمود تا اینکه با یک برنامه ریزی دقیق که توسط سازمان بهداشت جهانی تدوین گردید و از طریق جلب مشارکت و همکاریهای بین المللی، ظرف کمی بیش از ده سال برنامه ریشه کنی آبله در ۹ دسامبر ۱۹۷۹ به موفقیت نهایی رسید و بیماری آبله که موجب کراهت منظر، کوری و مرگ و میر میلیونی می گردید، ریشه کن شد.[۱]

درست یک قرن بعد از کشف ادوارد جنر، لوئی پاستور شیمیست فرانسوی علاوه بر کشف منشأ بیماری، اثبات نمود که با تزریق بیماریزاهای تخفیف حدت یافته و ایجاد یک بیماری خفیف، می توان نسبت به آن بیماری ایجاد مقاومت و پیشگیری نمود.

در اواخر نیمه دوم دهه۱۸۷۰، پاستور برای تخفیف حدت عامل وبای طیور به موفقیتهایی دست یافت. وی بر حسب تصادف دریافت که کشت ضعیف شده پاستورلامولتیسیدا عامل وبای مرغان می تواند در طیور ایجاد ایمنی کند. با همکاری رابرت کخ، پاستور توانست کشت خالص وبای مرغان را فراهم نماید و در حقیقت اولین تلاش برای تولید واکسن مدرن فراهم گردید. در سال ۱۸۷۶، رابرت کخ باسیل شاربن را توصیف و کشت خالص باسیل سیاه زخم را فراهم کرد، وی با تزریق آن به حیوانات آزمایشگاهی ارتباط بین باسیل و بیماری را به اثبات رساند و دیری نگذشت که پس از تهیه واکسن وبای ماکیان، واکسن شاربن را نیز فراهم نمود. اولین تجربه بر

---

[1] Gloucestershire
[2] hipps Phipps

روی واکسن سیاه زخم در ۵ می ۱۸۸۱ در پویلی لفورت [1] با تزریق باسیل تخفیف حدت یافته سیاه زخم در ۲۴گوسفند، یک بز و شش گاو انجام گردید. سپس حیوانات واکسینه به همراه یک گروه شاهد با باسیل حاد شاربن مورد چالش قرار گرفتند و تنها حیوانات واکسینه سالم باقی ماندند.[۱،۲]

پیدایش و تکامل سایر واکسنها:

در سال ۱۸۸۴ مچنیکف [2] برای اولین بار فرضیهٔ ایمنی سلولی را ارائه داد و سلولهایی را که به میکروارگانیسمها حمله ور می شدند و با بلع آنها و دیگر اجرام خارجی موجب انهدام آنها می گردیدند را فاگوسیت نامید. وی به همراه ارلیش برای تحقیقاتشان در ایمنی شناسی به طور مشترک برندهٔ جایزهٔ نوبل شدند.

امیل رو، از همکاران پاستور و الکساندر یرسین در سال ۱۸۸۸ نشان دادند که باسیلهای دیفتری سم پرقدرتی تولید می کنند. در اواخر قرن نوزدهم، شاهد شکوفایی و به ثمر رسیدن کارهای ابتکاری سالهای دههٔ ۱۸۷۰ و ۱۸۸۰ در توسعهٔ واکسنهای کشتهٔ حصبه، طاعون و وبا هستیم. یرسین و کیتاساتو [3] که جداگانه کار می کردند، در سال ۱۸۹۴ باسیل پاستورلاپستیس، عامل طاعون را کشف کردند. والدمر هافکین [4] کار توسعهٔ واکسن طاعون انسانی را به انجام رساند. او اولین کسی بود که با واکسن کشتهٔ شدهٔ جدید طاعون تزریق شد.

در سالهای ۱۸۴۸ و ۱۸۴۹ جان اسنو [5] نشان داده است که وبا از طریق آب آلوده منتقل می شود، با وجود اینکه عامل آلودگی را نمی شناخت.رابرت کخ در سال۱۸۸۳ ویبریو کلرا، عامل وبا را جدا کرد و ویلهلم کول [6] در سال ۱۸۹۶ واکسن کشته شده با حرارت را تهیه نمود.

رایت اولین واکسن کشته شدهٔ ضد حصبه را در انسان در ۱۸۹۴ آزمایش نمود، ولی در سال ۱۹۱۵، ویدال استفاده از واکسن سه تایی حصبه وشبه حصبهٔ A و Bرا توصیه کرد.

استفاده از مواد شیمیایی برای غیرفعال کردن سموم باکتریها در اوایل قرن بیستم، منجر به تهیهٔ توکسوئید دیفتری و کزاز گردید. تئوبالد اسمیت در ۱۹۰۷ نشان داد که توکسوئیدها در خوکچهٔ هندی ایجاد ایمنی می کند و ایمنی پایدار علیه دیفتری را در خوکچه های تزریق شده با توکسوئید را در ۱۹۰۹ گزارش نمود.

واکسن ضد سل اولین واکسن باکتریایی زنده بعد از واکسن هاری پاستور است. کالمت بنیانگذار انیستیتوپاستور در هندوچین بود. وی همراه گرن واکسن سل را در ۱۹۰۹ معرفی نمود.

در سالهای ۱۹۳۱ تا ۱۹۳۳، گودپاسچر [7] استفاده از پردهٔ کوریوالانتوئید تخم مرغهای جنین دار را برای تکثیر ویروسها معرفی نمود.

اولین موفقیت جدی در زمینهٔ واکسن علیه ریکتزیاها با کشت این عامل بیماریزا در کیسهٔ زردهٔ جنین تخم مرغ توسط کاکس [8] در سال ۱۹۳۶ بدست آمد.

---

[1] Pouilly-Le-Fort
[2] Metchnikoff
[3] Kitasato
[4] Waldemer Haffkine
[5] John Snow
[6] Wilhelm Kolle
[7] E.W. Goodpasture
[8] Cox

دوران طلایی توسعهٔ واکسنها در سال ۱۹۴۹ و با تکثیر ویروسها بر کشت سلول آغاز گردید. اولین واکسن کشت سلولی که اجازهٔ مصرف گرفت واکسن پولیوی کشته شده با فرمالین بود که توسط سالک[1] در سال ۱۹۵۴ تهیه گردید. واکسن زندهٔ پولیو از سویه های تکثیریافته بر کشت سلول توسط آلبرت سابین[2] ارائه شد و به طور گسترده مصرف گردید. واکسنهای دیگری که از کشتهای سلولی تهیه شد واکسن سرخک، سرخجه و هاری بود. بین سالهای ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰، سه واکسن باکتریایی حاوی پلی ساکاریدهای خالص کپسولی منینگوکوکسی، پنوموکوکسی و هموفیلوس آنفلوآنزای نوع ب تهیه شد. [۱،۲،۳]

اولین واکسن نوترکیب با استفاده از مهندسی ژنتیک بر ضد هپاتیت ب از سال ۱۹۸۶ وارد بازار مصرف شد.

تلاش برای ساخت واکسنهای با کارایی بالاتر و عوارض کمتر همچنان ادامه دارد. بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی در کنار هم در صدد توسعهٔ واکسنهای جدید هستند که در مباحث بعدی به آنها اشاره خواهد شد.

۱-۲ واکسنهای باکتریایی:

باکتریها عامل طیف وسیعی از بیماریها در انسان و حیوانات هستند. بیش از یک قرن است که روی واکسنهای ضد باکتریها کار می شود. از آنجا که باکتریها ارگانیسمهای تک سلولی پیچیده ای هستند در سالهای اولیهٔ شناخت واکسنها، طراحی واکسن بسیار سخت بود ولی پیشرفتهای سریع در اواخر دههٔ ۱۹۷۰و در طول دههٔ ۱۹۸۰ در زیست شناسی مولکولی، ایمونولوژی و بیوتکنولوژی کمک شایانی در درک مکانیسم عملکرد باکتریها و دیگر پاتوژنهای بیماریزا کرد. پروتئینهای اختصاصی، ضمائم سلول، کربوهیدراتها و دیگر ساختارهای سطح سلول شناسایی و تعیین خصوصیت شد. مدل فعالیت بسیاری سمهای باکتریایی نیز شناخته شد. شناسایی ساختارهای اختصاصی آنتی ژنی باکتریایی تلاش برای ساخت واکسنهایی بر اساس اجزای خالص شدهٔ سلولی افزایش داد چنین واکسنهایی کارایی بهتری دارند.

دیوارهٔ سلولی در باکتریها خارجی ترین سطح باکتری است که در معرض محیط قرار دارد و در تهیهٔ واکسن مورد توجه است. گرچه جزئیات این ساختار در پاتوژنهای مختلف متفاوت است ولی در مجموع یکسان است. باکتریها غشاء سیتوپلاسمی دارند که با یک دیوارهٔ سلولی کربوهیدراتی محکم احاطه شده است. البته مایکوپلاسماها استثنا هستند. باکتریهای گرم مثبت انواع مختلفی از پروتئینها، کربوهیدراتها و دیگر ماکرومولکولها در سطح سلول دارند که در سطح سلولی قرار گرفته یا به آن چسبیده است. باکتریهای گرم منفی یک غشاء سلولی در خارج دیوارهٔ سلولی دارند که غشاء خارجی نامیده می شود و از پروتئین و لیپوپلی ساکارید تشکیل شده است. بسیاری پاتوژنهای باکتریایی یک لایه کپسول از جنس پلیمرهای کربوهیدراتی دارند که از باکتری حفاظت می کند. ضمائم سلولی از جنس پروتئین نیز در باکتریها وجود دارد. فلاژل یا تار لرزان در حرکت باکتری مؤثر است و پیلی نقش اساسی در چسبیدن باکتری نقش دارد که از عوامل اساسی در تداوم عفونت است و همین امر آنها را اجزای مورد توجهی در واکسنها ساخته است.

---

[1] Jonas Salk
[2] Albert Sabin