جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

فصل دوم

هدف از این تحقیق بررسی ایمنی زایی ژنهای L_{12}/L_7 و P۳۹ در موشهای Balac است. بنابراین پس از جداسازی و تکثیر ژنهای فوق مراحل زیر در این تحقیق انجام گرفت.

۱- لکون نمودن ژنهای فوق در یک ناقل انتقال دهنده Cleaning vector

۲- تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژنهای جداشده و مقایسه آن با ژنهای L_{12}/L_7

۳- کلون نمودن ژنها در پلاسمید بیان کننده پروکاریونی Procaryotic expression vector

٤- تولید و تخلیص پروتئینهای L_{12}/L_7 و P۳۹

٥- کلون نمودن آنها در پلاسمید بیان کننده اوکاریوتی Eucaryotic expression vector

٦- هاری کردن پلاسمیدهای فوق از آندوتوکسین

۷- تزریق پلاسمیدها، بسویه واکنش و سویه بیماریزا بروسلاآبورتوس به موش Balb/C

۸- سنجشهای ایمونولوژیک

باکتریها و پلاسمیدهایی که برای انجام این پایان نامه استفاده دشه اند بترتیب زیر می باشند:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

باکتریها: بروسلاآبورتوس سویه های S۱۹ و ٥٤٤ اشدیشیالکی سویه $DH_5\alpha$

اشریشیالکی سویه BL۲۱ – اشریشیاکی سویه BL۲۱(DE۳(Plyss

پلاسمیرها: PGEX٤T۱ – PRT ۲۸a – SK+(pSK) – Pblue Script – PCDNA۳

- جداسازی کروموزوم بروسلا آبورتوس S۱۹:

برای تکثیر ج داسازی ژنهای $L_{۱۲}/L_{۷}$ و P۳۹ ابتدا کروموزوم باکتری جداسازی گردید.

مواد:

بافر TE:

Tris – Hel	۱۰mm
EDTA	۱.۰mm

PH بافر را پس از تهیه برروی ۸ تنظیم می نمائیم.

پروتئیناز K:

CTAB/NaCl:

Nacl	٤.۱gr
CTAB	۱۰gr

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

DDW ۱۰۰ml (Final Volume)

روش:

ابتدا محیط برنسط برات را تهیه و استریل نموده و ۵ml از محیط را با بروسط آبورتوس سویه S۱۹ تلقیح می نمائیم. پس ٤٨ تا ٧٢ ساعت باکتریها رشد کرده و کدورت مناسبی را پیدا می کند. بقیه مراحل تخلیص کروموزوم بشرح زیر است:

۱- ۱/۵ میلی لیتر از سوسپاستیون فوق را مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ می نمائیم. محلول رویی را دور می ریزیم.

۲- ۵۷٦Ml از بافر TE را بر روی رسوب باکتری اضافه کرده و رسوب را در بافر حل می نمائیم. سپس ۳۰ml از SDS(۱۰٪) و ۳ml از پروئیناز K (۲۰mg/ml) را افزوده و بمدت یکساعت در دمای ۳۷°C نگهداری می نمائیم.

۳- پس از مخلوز ۱۰۰Ml از NaCl(۵M) از محلول CTAB/NaCl بمیزان ۸۰Ml اضافه کرده و بمدت ۱۰ دقیق در ٦۵°C انکوبه می کنیم.

٤- هم حجم مخلوط بالا از ترکیب کلروفرم – ایزوآمیل (۲٤/۱) به مخلوط افزوده و سپس از مخلوط بمدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانترفوژ می کنیم. محلول رویی را به لوله دیگر منتقل می نمائیم.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۵- هم حجم محلول روئی ترمیب فنل – کلروفرم – ایزوآمیل (۲۵/۲٤/۱) پس از مخلوط بمدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰vpr سانتریفوژ کرده و محلول رویی به لوله دیگری منتقل می نمائیم.

٦- هم حجم محلول روئی ایزوپروپانل اضافه نموده و مخلوط می کنیم. پس از چند دقیقه DNA کروموزومی ته نشین شده که می توان بات یک پیپت پاستور آنرا جمع آوری نمائیم.

۷- رسوب DNA کروموزومی را با الکل ۷۰٪ شستشو داده و پس از خشک شدن در مجاورت هوا در ۱۰۰Ml از بافر TE حل می نمائیم.

بررسی کمی و کیفی DNA کروموزومی:

برای تعیین خلوط کروموزوم باکتری از مواد و وسایل زیر استفاده میشود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۱- بافر PBE pH=۸(۱۰X)

Tris – base	۸۹۰mM
Boric Acid	۸۹۰mM
EDTA	۲۵mM

۲- آگارز MP

۳- تانک الکتروفورز افقی

روش:

ابتدا آگارز MP در بافر TBE(۰.۵x) را بکمک حرارت حل کرده و ژل آگارز افقی را سینی مخصوص تانک الکتروفورز افقی تهیه می نمائیم. سپس به مقدار ۵Ml از DNA کروموزومی را در چلهک ژل ساخته شده ریخته و در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE(۰.۵x) پس از برقراری جریان الکتریکی مستقیم الکتروفورز می کنیم.

برپا تعیین مقدار DNA نیز پس از تهیه رقت $\frac{1}{50}$ تز کروموزوم DD آنرا در (Optimal Density) طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری می نمائیم. مقدار DNA بر اساس فرمول:عکس رقت × ۵۰ × DD قرائت شده = مقدار DNA تعیین می گردد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

– مرحله پس از جداسازی کروموزوم تکثیر و جداسازی ژنهای مورد نظر است. این فرآیند با استفاده از دستگاه PCR انجام می گردد. در دستگاه PCR با استفاده از عوامل پایه ای، ژن مورد نظر را می توان با استفاده از آنزیم تک پلی مرآز Tag Polymerase تکثیر نمود. عوامل پایه ای ذکر شده شامل موارد ذیل است.

۱– قالب

۲– پرایمر جلو Forward

۳– پرایمر عقب Revers

٤– دروکسی نوکلئوتیدها LNTP

٥– منیزیوم

٦– بافر

۷– آنزیم پلی مرآز

۸– آب مقطر استریل

برای تهیه پرایمرها ابتدا باید آنها را طراحی کرد. برای طراحی پرایمرهای ژن $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ ابتدا مترادف نوکلئوتیدی ژنهای فوق را از مرکز اطلاعاتی NCBI بدست می آوریم.

accession No($L_{۷}/L_{۱۲}$). L۲۷۸۱۹

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

accession No(P۳۹). L۳۰۰۳۸

سپس بر این اساس و درنظر گرفتن نکات استاندارد طراحی پرایمر از جمله طول پرایمر، دمای اتصال G+C%، تولید پرایمر، تولید لوپ یا حلقه و ... ترادف پرایمرهای تعیین میگردد. در این مرحله از آنالیزهای کامپیوتری توسط برنامه Dlogo و Blast استفاده میگردد.

ترادف ژن مورد نظر و پرایمرهای Forward و Reverse برای جداسازی ژنهای فوق از باکتری بروسلا به شرح زیر است:

۱- پرایمرهای $L_{۷}/L_{۱۲}$

Forward:

۵' GGA AAT $\frac{GGA\ TCC}{BamHI}$ $\frac{ATG}{Start}$ GCT GAT CTC GCA AA۳'

Revers:

۵' CCA $\frac{CTC\ \ GAG}{XhoI}$ CTT GAG TTC AAC XTT GGC CA۳'

۲- پرایمرهای P۳۹

Forward:

۵' GCC $\frac{GGA\ TCC}{BamHI}$ $\frac{ATG}{Start}$ GGC GCC TGT TGC CAA ۳'

Reverse:

۵' C CGC $\frac{CTC\ GAG}{Xhol}$ $\frac{TTA}{Stop}$ TTT TGC GGC TTC AA ۳'

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جهت سهولت مراحل کلونینگ و با توجه به محلهای ممکن برای کلون سازی در پلاسمیدهای حد واسط و پلاسمیدهای بیانی دو جایگاه آنزیمی BamHI و XhoI درابتدا و انتهای پرایمر طراحی شده است. پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت MWG آلمان ساخته شد.

برای انجام PCR از دستگاه TECHNE(Cambridge) مدل BENIUS استفاده شده است. برای بهینه سازی تکثیر ژنهای ذکر شده غلظتهای مختلف یون منیزیم (از ۱/۵ تا ۳/۵ میلی مولار) و دماهای مختلف مناسب برای اتصال پرایمرها با DNA کروموزومی (۶۶-۶۳ درجه سانتیگراد) بکار رفته است.

- تائید ژنوم سنتز شده توسط PCR:

برای تایید صحت قطعه ژنوم بدست آمده از PCR از هضم آنزیمی ژنهای فوق استفاده می گردد. چنانچه از هضم آنزیمی ژن L_7/L_{12} با آنزیمهای EC۰RI و Hind III بترتیب قطعات (۱۶۸+۲۰۶) و (۳۰۵+۶۹) باید دیده شود و از هضم آنزیمی ژن P۳۹ با آنزیمهای NEOL و Hind III بترتیب قطعات (۱۳۶+۵۶۰+۷۰۹) و (۵۵۳+۶۵۲) باید دیده شود.

برای تایید نهایی صحت ژنهای تکثیر شده از نظر ماهیت و ترادف نوکلئوتیدی آنها، این ژنها ابتدا در ناقل pSK^+ کلون گردید و سپس برای تعیین سکانس به شرکت مربوط ارسال گردید.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- کلونینگ ژنهای L_{12}/L_7 و P۳۹ در کلونینگ pSK^+:

برای کلونینگ ژنهای فوق ابتدا باید ژنها تحت اثر آنزیمهای BamHI و xhoI قرارگرفته، سپس ناقل پلاسمیدی pSK نیز با آنزیمهای اخیر برش داده شود.

۱- برش آنزیمی ژنهای L_{12}/L_7 و P۳۹ با آنزیمهای BamHI و xhoI.

۲- برش آنزیمی پلاسمید pSK با آنزیمهای BamHI و xhoI پلاسمید pSK در حدود ۲/۹٦kb وزن دارد. این پلاسمید دارای یک ناحیه تکثیری ColE۱، یک ناحیه مقاومت به آمپی سیلین تحریک ناحیه f۱ origin و یک ناحیه بنام multiple cloning site=MCS که جایگاه تعدادی از آنزیمهای تحدیدی را در خود دارد. برای تکثیز پلاسمید فوق از باکتری اشدیشیاکلی *DH5α* استفاده می گردد.

۳- برای برش آنزیمی این پلاسمید ابتدا باکتری حاوی این پلاسمید (*E.coh.DH5α*) را تکثیر میدهد. در ضمن تکثیر باکتری پلاسمید مورد نظر در باکتری همانندسازی کرده و تعداد آن افزایش می یابد. برای تکثیر باکتری از کشت آن در ۲ml محیط LB حاوی ۵۰ng/ml آنتی بیوتیک آمپی سیلین استفاده می شود. پس از ۱۸ ساعت کشت مورد نظر کدورت مناسب را پیدا میکند. پس از آن پلاسمید از باکتری تخلیص میگردد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مواد:

۱- SET buffer:

Sucrose	۵۰mM
EDTA	۱۰mM
Tris-Hcl pH ۸	۱۵mM

۲- بافر لیزکننده:

Lysis Buffer (۱ml)

Na OH (۲N)	۱۰۰ml
SDS (۱۰٪)	۱۰۰ml
DDW	۸۰۰ml

۳- استات پتاسیم ۵ مولار با pH ٤.۲

Potassiun Acetate ۵M for ۱۰۰ml

KAC (٤M)	٦۰ml
Acetic Acid	۱۱.۵ml
DDW	۲۸.۵ml

روش:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ابتدا ۱/۵ میلی لیتر از کشت ۱۸ ساعت باکتری را با استفاده از سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰rpm بمدت ۵ دقیقه رسوب میدهیم. سپس رسوب بدست آمده را در ۱۰۰ml از SET buffer کاملاً حل کرده بمدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار می دهیم. پس از مدت فوق ۲۰۰ml از محلول لیز بافر تازه تهیه شده را در رسوب سوسپانسیون فوق ریخته، بخوبی مخلوط کرده و بمدت ۲ دقیقه در یخ قرار میدهیم. سپی ۱۵۰ml از محلول KAC بر نخلوط فوق ریخته پس از مخلوط نمودن مجدداً بمدت ۵ دقیقه در یخ میگذاریم.

جهت تفکیک پروتئینهای آزادشده سلولی از DNA پلاسمید ۴۵۰ml از ترکیب فنل-کلروفرم – ایزوآمیل الکل (۲۵/۲۴/۱) بر سوسپانسیون حاوی باکتریهای لیز شده افزوده و بمدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰rpm سناتریفوژ می نمائیم. محلول رویی را در لوله دیگر ریخته و به آن یک میلی لیتر اتانل مطلق سرد می افزرائیم. سپس با استفاده از سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰rpm بمدت ۵ دقیقه DNA پلاسمیدی را رسوب میدهیم. DNA رسوب داده را با الکل ۷۰٪ شستشو میدهیم. پس از خشک شدن رسوب در مجاورت هوا، در ۲۰ml از بافر TE حل نموده و به آن ۵µl از آنزیم Rnase A(۵mg/ml) برای حذف RNA موجود اضافه می کنیم و بمدت نیم ساعت در ۳۷˚c قرار میدهیم. برای نگهداری پلاسمید از ۲۰˚c– استفاده میشود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

پس از تلخیص، پلاسمید از نظر کیفی و کمی سنجیده میشود. برای این منظور از روشی که قبلاً در مورد کروموزوم باکتری توضیح داده شد، استفاده میگردد.

- هضم آنزمی پلاسمید sPK:

پس از تعیین غلظت پلاسمیدهای خالص شده هضم آنزیمی آن با استفاده از آنزیمهای BamHI و xhoI صورت میگیرد.

pSK	۵ml(۱۰ng)
BamHI	۱ml
xhoI	۱ml
Baffer (y Lango)	۲ml
DDW	۲۱ml
Tota l	۳۰ml

پس از مدت ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°c برای اطمینان از غلظت و کیفیت نمونه هضم شده آنرا برروی ژل آگارز ۰/۸٪ بررسی می نمائیم.

- هضم آنزیمی ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹:

ژنهای فوق را نیز نظیر پلامید pSK تحت اثر آنزیمهای BamHI و xhoI قرار می دهیم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

$L_{۷}/L_{۱۲}$	۱۰ml	P۳۹	۱۰ml
BamHI	۱ml	BamHI	۱ml
xhoI	۱ml	xhoI	۱ml
Baffer	۲ml	Baffer	۲ml
DDW	۲۱	DDW	۲۱
total	۳۰	total	۳۰

- اتصال ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ با پلاسمید PSK (Ligation preparation)

برای اتصال قطعات ژنی با پلاسمید PSK از آنزیم T٤ DNA Ligale استفاده می شود.

$L_{۷}/L_{۱۲}$	۱۰ml	P۳۹	۱۰ml
PSK	۲ml	PSK	۲ml
T٤ DNA ligale	۱ml	T٤DNA ligale	۱ml
Baffer	۱.۵ml	Baffer	۱.۵ml
DDW	۰.۵ml	DDW	۰.۵ml
total	۱۵ml	total	۱۵ml

مخلوط فوق را بمدت ۱٦ ساعت در ۱٤ c° قرار میدهیم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- انتقال DNA نوترکیب به میزبان E۰ch (HHI) α

- برای انتقال DNA نوترکیب به سلولهای میزبان E۰ch (HHI) α ابتدا باید سلولهای میزبانهای مورد نظر و آماده پذیرش DNA نوتکریب بنمائیم. Competent cell برای تهیه این سلولها از وش زیر استفاده می گردد.

مواد:

محیط SOB

SOB for ۱۰۰ml

۰.۵٪ yeast extract

۲٪ trypton

۱۰mm Nacl

۲.۵mm Kcl

۱۰mm Mgcl۲

۱۰mm MgSo٤

پس از تنظیم pH برروی ۷.۲-۷ تنظیم کرده و پس از آن اتوکلاو می کنیم.

بافر TFBI

TFBI (for ۱۰۰ml)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

KAC		۳۰mm
$MnCl_2.4H_2O$		۵۰mm
Kcl		۱۰۰mm
$Cacl_2.2H_2O$		۱۰mm
Glycerol		۱۵ml
H_2O	Complete to	۱۰۰ml

PH را برروی ۵/۸ تنظیم کرده و پس از آن با اتوکلاو استریل می نمائیم.

بافر TFBII

TFB II	(for ۱۰۰ml)	
MOPS		۱۰mm
$Cacl_2.2H_2O$		۷۵mm
KCL		۱۰mm
Glycerol		۱۵ml
H_2O	Complete to	۱۰۰ml

پس از مخلوط نمودن آنرا با اتوکلاو استریل می کنیم.

روش تهیه Competent Cell

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۱۰۰ میلی لیتر از محیط SOB را در یک ارلن یک لیتری تهیه کرده و اتوکلاو می نمائیم. به محیط فوق ۱ میلی لیتر از کشت ۱۸ ساعت E.col.(DH۵α)را تلقیح می نمائیم. ارلن را برروی شبکه قرار داده و با دور ۲۰۰rpm در دمای ۳۷°C قرار داده تا $OD_{۶۰۰}$.nm به حدود ۰/۵ برسد. ارلن محتوی باکتری را بمدت نیم ساعت در یخ قرار داده و پس از آن بندت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C در ۱۸۰۰rpm سانتریفوژ می کنیم. برروی رسوب بدست آمده ۲۰ /میلی لیتر بافر TFB I اضافه کرده و به آرامی رسوب را در بافر حل نموده و بمدت ۱۰ دقیقه در یخ می گذاریم. سوسپانسیون فوق را بمدت ۱۰ دقیقه در ٤°C با دور ۱۸۰۰rpm سانتریفوژ کرده و به رسوب بدست‌آمده ۲ میلی لیتر بافر FTB II افزوده بمدت ۱۵ دقیقه در یخ قرار می دهیم. پس از این مدت ۱۰۰ml از سوسپانسیون باکتری را در ایندرف ۱/۵ ریخته و آنرا در ۷۰°C نگهداری می نمائیم.

ترانسفورماسیون

مواد لازم:

- سلولهای Competent
- پلاسمید DNA نوترکیبی
- محیط کشت مایع نوترین برات

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- پلیت حاوی محیط کشت نوترین آگار به همراه آمپی سیلین
- گرمخانه ۳۷°C

روش کار:

۱- سلولهای Comptent باکتری E.coli.(DH۵ α) را از ۷۰°C- بیرون آورده روی یخ قرار می دهیم تا باز شود.

۲- مقدار ۱۰ml از مخلوط پلاسمید نوترکیب شده در مرحله قبل، را به سلولهای Competent می افزائیم.

۳- نمونه فوق را بمدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار میدهیم.

٤- پس از زمان فوق اپندرف حاوی نمونه را بلافاصله در گرمخانه ۳۷°C بمدت ۵ دقیقه قرار میدهیم.

۵- مجدداً نمونه ها را بمدت ۲ دقیقه در یخ قرار میدهیم.

٦- مقدار ۸۰۰ml محیط کشت نوترین برات به نمونه فوق اضافه کرده و بمدت یکساعت در ۳۷°C انکوبه مب کنیم.

۷- پس از انکوباسیون، سوسپانسیون فوق را به پلیتهای حاوی نوترین آگار (محتوی ٦۰Ng/cl آمپی سیلین) منتقل کرده و پلیتها را ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار می دهیم.

- غربالگری

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

باکتریهای رشد یافته پس از ترانسفورماسیون در محیط نوترین برات آنتی بیوتیک کشت داده و پس از حدود ۱۸ ساعت که کدورت محیط مناسب شد، پلامیت آنها را تخلیص می کنیم. پلاسمیدهیا تخلیص شده را برروی ژل آگارز ۱٪ بررسی می نمائیم. پلاسمیدهائی که حاوی ژن مورد نظر باشند، حرکت کنتری دارند لذا از سایر پلاسمیدهای فاقد ژن قابل شناسایی می باشند. پس از شناسایی این باکتریها با انجام PCR و هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیمهای BamHI و xhoI مورد تایید قرار می گیرند بطوریکه در PCR قطعه مورد نظر دیده شود و در هضم آنزیمی از پلاسمید خارج شود.

- تعیین ترادف نوکلئوتیدی قطعه مورد نظر:

پس از بدست آوردن کلون مو رد نظر، پلاسمیدها را پس از تخلیص برای تعیین ترداف نوکلئوتیدی به شرکت MWG ارسال نمودیم.

- کلون نمودن ژنها در پلاسمید بیان کننده پروکاریوتی:

برای تولید پروتئین نوترکیب از ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ به سه جزء اصلی نیاز است:

۱- ناقل بیان کننده expression vector

۲- قطعه ژن مورد نظر

۳- میزبان

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۱- ناقل بیان کننده:

در این تحقیق از دو ناقل بیانی استفاده شده است. برای بیان ژن $L_{۷}/L_{۱۲}$ از ناقل PET۲۸۰۰ و برای بیان ژن P۳۹ از ناقل PGEX٤T۱ استفاده شده است.

PRT۲۸۰۰ از شرکت Novageh است. خصوصیات این پلاسمید بقرار زیر است:

الف: این ناقل دارای پروموتور فاژ T۷ می باشد که تحت کنترل اپراتور Lac میباشد.

ب: در این ناقل برای افزایش میزان توجه، جایگاه اتصال به ریبوزوم تهیه شده است.

ج: ترادف ویژه مربوط به ٦ اسید آمینه هیستیدین در ناحیه ٥' مکان کلونینگ ژن قرذار گرفته است.

د: دراین ناقل ناحیه ویژه ای برای آنزیمهای تحدیدی برای وارد کردن ژن تعبیه شده است.

و: ژن مربوط به مقاومت به کانامایسین

هـ: دارای ترادف لازم برای همانندسازی پلاسمید

پلاسمید PGEX٤T۱ از شرکت فارماسیا یم باشد. خصوصیات این پلاسمید بقرار زیر است:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

الف: این ناقل دارای پروموتور تریپتونان است که تحت کنترل اپراتور Lac می باشد.

ب: در این ناقل ربای افزایش میزان ترجمه، جایگاه اتصال به ریبوزوم تعبیه شده است.

ج: ترادف ویژه مربوط به آنزیم گلوتایتون S ترانفرآز که در ناحیه ٥' مکان کلونینگ ژن قرار گرفته است.

د- در این ناقل ناحیه ویژه ای برای آنزیمهای تحدیدی جهت کلون نمودن ژن تعبیه شده است.

و- ژن مربوط به مقاومت آمپی سیلین

هـ - ترداف لازم برای همانندسازی پلاسمید.

- سویه E.coli میزبان: سویه های E.coli نظیر $DH_5\alpha$ با دارا بودن پروتئازها باعث شکسته شدن پذوتئینهای نوترکیب می گردند. از این نظر برای تولید پروتئینهای نوترکیب از سویه هایی استفاده می شود که فاقد آنزیمها باشند. در این تحقیق برای بیان ژن در ناقل PET۲۸۰ از سویه BL۲۱(DE۳)Plyss و برای بیان آن در ناقل PGEX٤T۱ از سویه BL۲۱ استفاده میشود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

برای کلون نمودن ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ در ناقل بیان کننده مراحل زیر انجام می شود:

۱- استخراج قطعه ژنهای مورد نظر از ناقل PSK

۲- برش آنزیمی ناقلهای بیان کننده

۳- اتصال دو قطعه DNA

٤- انتقال DNA نوترکیب به میزان E.coli.(DH٥α)

٥- غربالگری

۱- استخراج قطعه ژنهای مورد نظر از ناقل PSK

برای این منظور ابتدا باکتریهای حاوی کلونهای PSK-$L_{۷}/L_{۱۲}$ و PSK-P۳۹ را در محیط مایع نوترین برایت حای آنتی بیوتیک کشت داده و پس از تخلیص پلاسمید با کمک هضم آنزیمی با دو آنزیم BamHI و xhoI را انجام داده و قطعه ژنی بریده شده مورد نظر را از روی ژل خالص می کنیم که در اینجا در کیت Roche استفاده شده است.

مواد لازم:

- آنزیمهای BamHI و xhoI
- ژل آگارز ۰/۸٪ استخراج ژن
- محلولهای لازم برای تخلیص پلاسمید

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

روش کار:

۱- در دو لوله حاوی ۲ میلی لیتر از محیط نوترین برات حاوی آمپی سیلین از کلون حاوی PSK-$L_{۷}/L_{۱۲}$ و PSK-P۳۹ تلقیح کرده و بمدت ۱۸ ساعت در ۳۷ C انکوبه می نمائیم.

۲- استخراج پلاسمیدها به روشی که قبلاً ذکر گردید.

۳- هضم آنزیم پلاسمید با آنزیمهای BamHI و xhoI که بصورت زیر انجام میگردد:

PSK-$L_{۷}/L_{۱۲}$	٥ml
BamHI	۱ml
XhoHI	۱ml
Baffer (y-tango)	٤ml
DDW	۹ml
Total	۲۰ml

PSK-P۳۹	٥ml
BamHI	۱ml
XhoHI	۱ml
Baffer (y-tango)	٤ml

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

DDW	۹ml
Total	۲۰ml

سپس بمدت ۲ ساعت در ۳۷°C انکوبه می نمائیم.

٤- ژل آگارز ۱٪ را با چاهکهای بزرگ را تهیه کرده و سپس پلاسمیدهای هضم شده را در این چاهکها ریخته و در تانک افقی الکتروفورز می نمائیم. پس از الکتروفوروز، ژل را با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی کرده و قطعه ژن های جدا شده از پلاسمید را با امواج ۱۸V با طول موج بالا مشاهده و از روی ژل آگارز با تیغ اسکالیل برداشت میکنیم.

٥- استخراج قطعه DNA از ژل آگارز با استفاده از کیت Roche کیت استخراج DNA طوری طراحی شده که تهیه و تخلیص DNA از روی ژلهای آگارز را بخوبی امکان پذیر میسازد و نیازی به تخلیص DNA با فنل و رسوب دادن آن با اتانل نمی باشد.

ذرات Silica بکار رفته در این کیت طوری بهینه شده است که قطعات خیلی کوچک DNA براحتی و با مقدار زیاد می توانند به این ذرات اتصال یابند و مجدداً آزاد گردند. در طی مرحلی شستشو دیگر اجزاء اسید نوکلئیک شامل آگارز پروتئینها و اتیدیوم برماید حذف خواهد شد. پس از استخراج DNA از ذرات Silica، DNA محلول در بافر TE و یا آب بدست آید.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

روش کار:

قطعه برش بافته از آگارز حاوی ژن مورد نظر را وزن نموده و به ازای هر ۱۰۰mg از ژل ۳۰۰ml از بافر شماره ۱ به ژل آگارز افزوده و به این مخلوط ۱۰ml از Silica اضافه می نمائیم. پس از بهم زدن بمدت ۱۵ دقیقه در ۵۶°C انکوبه کرده و در هر ۲ تا ۳ دقیقه بشدت مخلوط را بهم می زنیم.

نمونه را بمدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ کرده و بدقت سیوپ رویی را جدا می کنیم رسوب را ۵۰۰ml بافر شماره ۲ شتستشو را

۲- برش آنزیمی ناقلهای بیان کننده:

- در شرایط استریل از باکتری .E.coli حاوی ناقل PET۲۸a برداشت کرده و در ۲ میلی لیتر از محیط نوترین برات حاوی Ng/ml کاناماسین کشت میدهیم. بهمین ترتیب از باکتری .E.coli حاوی ناقل PGEX٤T۱ نیز برداشت کرده و در ۲ میلی لیتر از محیط نوترین برات حاوی ۵۰Ng/ml آمپی سیلین کشت میدهیم. سپس باکتریها را در الکوباتور شیکردار ۳۷°C بمدت ۱۸ ساعت قرار میدهیم.
- به روشی که برای تخلیص پلاسمید ذکر شد، ناقلها را تخلیص می کنیم.
- هضم آنزیمی ناقلهای فوق را با استفادهع از آنزیمهای BamHI و xhoI بروش زیر انجام میدهیم

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

PET ۲۸a	٥ml	PGEX٤T١	٥ml
BamHI	١ml	BamHI	١ml
XhoI	١ml	xhoI	١ml
Baffer(ytango)	٤ml	Baffer(ytango)	٤ml
DDW	٩ml	DDW	٩ml
Total	٢٠	total	٢٠

- پس از مخلوط کردن، نمونه ها را بمدت ۲ ساعت در $37^{\circ}C$ قرار میدهیم.

۳- اتصال دو قطعه DNA به یکدیگر:

برای اتصال ژن $L_{۷}/L_{۱۲}$ با ناقل PET۲۸a و ژن P۳۹ با ناقل PGEX٤١T١

از آنزیم T٤ DNA ligase استفاده میشود.

PET ۲۸a	١m١	PGEX٤T١	١m
$L_{۷}/L_{۱۲}$	٦ml	p۳۹	٦ml
$T_{٤}$ DNA ligale	١ml	$T_{٤}$ DNA ligale	١ml
Baffer	١ml	Baffer	١.٥ml
DDW	٣.٥ml	DDW	٣.٥ml
Total	١٥ml	total	١٥ml

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سپس نمونه های فوق را بمدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۴ °C قرار میدهیم.

۱۴- انتقال DNA نوترکیب به میزان E.coli.(DH۵ α)

برای انتقال DNA نوترکیب به میزان E.coli.(DH۵ α) از سلولهای Competetnt میزبان فوق که قبلاً تهیه شده بود، استفاده گردید. روش انتقال DNA نوترکیب قبلاً شرح داده شد.

۵- غربالگری:

پس از انجام مرحله ترنسفورماسیون حاوی DNA نوترکیب را غربال می کنیم روش غربالگری قبلاً در همین فصل شرح داده شده است.

۳- تولید و تخلیص پرئتئینهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹

همانطور که قبلاً ذکر شد پروتئینهای نوترکیب $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ در سویه هایی از E.coli انجام گرفته است که حداقل تولید پروتئازها را دارند. بهمین دلیل برای تولید پروتئین $L_{۷}/L_{۱۲}$ از میزبان E.coli BL۲۱(DE۳)plyss و برای تولید پروتئین P۳۹ از میزبان E.coli Bl۲۱ استفاده دشه است. مراحل تولید پروتئین های فوق به شرح زیر است.

۱- تهیه Competent cell از باکتریهای E.coli B۱۲۱(DE۳) PLySS (مقاوم به کارآمفنیکل) و E.coli BL۲۱ : برای تهیه این سلول از روشی که قبلاً در همین بخش ذکر شده، استفاده گردیده است.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۲- تخلیص پلاسمیدهای PET ۲۸a- $L_{۷}/L_{۱۲}$ و PGEX٤T۱- P۳۹ از میزبان E.coli.(DH٥α): تخلیص پلاسمیدهای فوق با استفاده از روشی که توضیح داده شده، انجام گرفته است.

۳- انتقال پلاسمیدهای فوق به میزبانهای ذکر شده در بند ۱: ترانسفورماسیون پلاسمیدهای فوق در میزبانها مطابق روشی است که قبلاً ذکر شده است.

٤- القاء: ٥- آنالیز محصول القاء SDS PAGE

بیان پروتئینهای نوترکیب، با انتقال ناقل نوترکیب به سلول میزبان و رشد سلولهای ومیزبان و القاء تولید پروتئین صورت میگیرد.

پروموتورهای استفاده شده در مهندسی ژنتیکی دو دسته هستند.

دسته اول پروموتورهای دائمی که همواره فعال بوده و پروتئین نوترکیب را تولید می کنند و دسته دوم پروموتورهای القایی که در زمانی فعال خواهند بود که مهار از روی آنها برداشته شود.

القاء بیان پروتئین نوترکیب در ناقلهای PET۲۸a و PGEX٤T۱ با استفاده از پروموتورهای القایی بوده که تحت کنترل اپراتور Lac هستند. بدین ترتیب که با افزودن ترکیب IPIG (isoprogyl - B-D-Thiogalctoside) القاء و تولید پروتئین صورت میگیرد. بدین ترتیب که IPTG به پروتئین سرکوب کننده اپراتور Lac متصل شده، آنرا غیرفعال میسازد. پس از آن RNA پلی مرازهای

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سلولی ترادف نوکلئوتیدی پائین دست است پروموتور را شناسایی کرده و رونویسی آغاز میگردد. سپس mRNA رونویسی شده به پروتئین نوترکیب توجه میگردد.

مواد لازم برای القاء:

- محیط کشت نوترین برات
- آنتی بیوتیکهای کانامایسین و آمپی سیلین
- محلول یک مولار IPTG

روش کار:

۱- ابتدا در ۲ میلی لیتر از محلول نوترین برات حاوی آنتی بیوتیکهای کانامایسین و کارآمفنیکل از E,cili BL۲۱(DE۳) Plyss حاوی PET ۲۸a- $L_{۷}/L_{۱۲}$ و در ۲ میلی لیتر از محیط نوترین برات حاوی آمپی سیلین E.coli BL۲۱ حاوی PGWX٤T۱-P۳۹ کشت میدهیم. سپس بمدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷°C برروی شیکر قرار میدهیم.

۲- در دو ارلن یک لیتری مجزا (یک الرلن دارای کانامایسین و کلرآمفنیکل و دیگری حاوی آمپی سیلین) از کشتهای فوق تلقیح می نمائیم. ارلن ها را در گرمخانه ۳۷°C برروی شیکر قرار میدهیم – دور شیکر باید حداقل ۱۷۰rpm باشد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۳- در این مرحله پس از اینکه کشت سلولی در DD۶۰۰ بمقدار ۰/۶ رسید و قبل از القاء یک نمونه (در حدود ۱/۵ میلی لیتر) از محیط کشت برداشت کرده و رسوب سلولی آنرا با سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور بمدت ۵ دقیقه) بدست می آوریم. این رسوب سلولی را نمونه قبل از القاء نامگذاری می کنیم (Before induction=BI) و در ۲۰ ˚C- نگهداری می شود.

٤- القاء بیان ژن را با اضافه کردن IPIG انجام میدهیم بطوریکه غلظت نهایی آن در کشت سلولی به یک میلی مولار برسد.

۵- برای مدت ٤ تا ۵ ساعت کشت سلولها در دمای ۳۷ ˚C روی شیکر قر ار می دهیم این زمان برای القاء و همچنین حداکثر بیان پروتئین نوترکیب لازم است.

٦- پس از این زمان، نمونه دوم (در حد ۱/۵ میلی لیتر) برداشته و آنرا بعنوان نمونه بعد از القاء درنظر میگیریم. رسوب آنرا تهیه کرده و در ۲۰ ˚C- نگهداری می کنیم.

۷- بقیه نمونه های بعد از القاء را سانتریفوژ (۳۰ دقیقه در ٤۰۰۰rpm) کرده و رسوب را برای تخلیص پروتئینها در ۷۰ ˚C- نگهداری می نمائیم.

۵- آنالیز محصول بعد از القاء با SDS PAGE

برای بررسی نتیجه القاء نمونه های قبل از القاء و بعد از القاء باید بوسیله ژل الکتروفورز SDS PAGE بررسی نمائیم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مواد و وسایل لازم برای SDS PAGE

۱- تهیه ژل ۱۵٪

۲- بافر ۵x (هنگام استفاده به بافر ۱x رقیق شود.)

۳- تانک الکتروفورز

٤- منبع نیرو

٥- Loading buffer

٦- رنگ آمیزی ژل DSD PSGE

۷- تهیه ژل ۱۵٪

برای تهیه ژل ۱۵٪ به مواد زیر نیاز داریم

۱- آکریل آمید – بیس ۰.۸٪ bis ۳۰٪ Acrl

آکریل آمید ۳۰ گرم

بیس ۰/۸ گرم

ایندو را با هم مخلوط کرده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر میرسیانیم و

و محلول را در شیشه های تیره در ٤ درجه سانتیگراد نگه میداریم.

۲- تریس هیدروکلراید PH ۸.۸ Tris.cl/SDS PH ۸.۸

تریس Tris base ۹/۱ گرم

آب مقطر ۳۰ میلی لیتر

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

PH این محلول را به ۸/۸ می رسانیم و سپس با استفاده از آب مقطر حجم آنرا به ۵۰ میلی لیتر میرسانیم، سپس مقدار ۰/۲ گرم سدیم دودسیل سولفتات (SDS) به آن می افزائیم.

۳- تریس هیدروکلراید ۶.۸ PH tris.cl/SDS PH ۶.۸

تریس ۶/۰۵ گرم

آب مقطر ۴۰ میلی گرم

ابتدا ایندو را مخلوط کرده و PH آنرا به ۶/۸ میرسانیم سپس با آب مقطر حجم آنرا به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و مقدار ۰/۴ گرم دودسیل سولفات (SDS) به آن افزوده در ۴ C نگداری می کنیم.

۳- آمونیم پرسولفات ۱۰٪ Ammunium persulfate ۱۰٪

آمونیم پرسولفات ۱ گرم

آب مقطر ۱۰ میلی لیتر

۴- بافر الکتروفورز ۵x

تریس Tris base ۱۵ گرم

گلیسین ۱۲ گرم

سدیم دودسیل سولفات ۵ گرم

حجم را با استفاده از آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

روش کار تهیه ژل SDS PAGE

ابتدا صفحات شیشه ای و اسپیسرها را با الکل تمیز می کنیم. اسپیسرها در کناره های جانبی دو شیشه قرار داده و با گیره بخوبی محکم می کنیم سپس بوسیله آگار یک درصد انتهای دو شیشه را به بطور عمودی هستند را بخوبی مسدود می کنیم. پس از تهیه محلول Resolving به آرامی با استفاده از یک پیپت یا ستور از یک گوشه شیشه و در حد فاصل دو شیشه محلول Resolving را میریزیم و حدود $\frac{1}{3}$ باقیمانده از بالای شیشه را برای ریختن محلول Stacking خالی نگه میداریم. بلافاصله برروی محلول Resolving آب یا ایزوبوتانل ریخته تا از مجاورت با اکسیژن دور بماند. پس از اینکه ژل Resolving بخوبی بست، ایزوبوتانل را خالی کرده سطح ژل آب مقطر شسته و آنرا با کاغذ صافی خشک می کنیم. بعد از آن محلول Stacking را افزوده و شانه را که از قبل با الکل شسته شده است در حد فاصل دو شیشع درون محلول staking قرار میدهیم. پس از اینکه Staking نیز بصورت ژل درآمد، صفحات شیشه ای حاوی ژل را در داخل تانک حاوی بافر ۱X قرار داده و شانه را به آرامی خارج میکنیم. در چاهکهای ایجاد شده نمونه های آماده شده (جوئشانده در Liading buffer) را اضافه کرده، تانک را به منبع نیرو و مل نموده و دستگاه را روی ولتاژ مناسب تنظیم می کنیم. پس از گذشت زمان لازم

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

که براساس ولتاژ و اندازه ژل متفاوت است، باندهای پروتئینی برروی ژل تفکیک میشود. برای مشخص شدن باندها را رنگ آمیزی میکنیم.

DS gel – loading buffer

Tris.cl pH ٦.٨	٥٠mm
Dithiotheritol	١٠٠mm
SDS	٢٪
Bromophenol	١٠.%
Glycerol	١٠٪

- رنگ آمیزی ژلهای الکتروفورز SDS PAGE

معمولاً دو روش رنگ آمیزی استفاده میشود:

رنگ آمیزی نقره و رنگ آمیزی کماسی

رنگ آمیزی نقره زمان بیشتری را به خود اختصاص داده اما روشی حساس است که میتواند غلظت پروتئین ١ تا ٥ نانوگرم را مشخص نماید.

روش کماسی سریعتر و ساده تر است ولی حساسیت آن کنتر از رنگ آمیزی نقره است و حدود ٤٠ تا ٥٠ نانوگرم حساسیت دارد.

در این پایان نامه از روش کماسی استفاده شده است.

مواد لازم برای رنگ آمیزی کماسی

١- محلول کماسی

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

کماسی بلو R۲۵۰	۰/۲۵ گرم
متانول	٤٥ میلی لیتر
اسید استیک گلاسیال	۱۰ میلی لیتر
آب مقطر	٤٥ میلی لیتر

۲- محلول رنگبر

اسید استیک گلاسیال	٪۷
اتانل	٪۱۲

- جهت آنالیز نمونه های قبل از القاء و بعد از القاء ابتدا نمونه ها را آماده میکنیم به این صورت که نمونه های قبل از القاء را در Loading buffer حل کرده و بمدت ٥ دقیقه در آبجوش قرار میدهیم.

- ژل SDS PSGE را بروشی که ذکر شد تهیه می نمائیم.

- نمونه های آماده شده را بترتیب: مارکو پروتئینی، نمونه قبل از القاء و نمونه بعد از القاء در چاهکهای ژل میریزیم. سپس تانک را به منبع نیرو و مل نمونه و دستگاه را برروی ولتاژ مناسب تنظیم می کنیم. پس از گذشت لازم که براساس ولتاژ و اندازه ژل متفاوت است باندهای پروتئینی برروی ژل از یکدیگر تفکیک میشوند که برای مشخص شدن باندها را رنگ آمیزی می کنیم.

روش رنگ آمیزی کماسی:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- ابتدا ژل را در داخل رنگ کماسی قرار میدهیم و آنرا برای مدت ۲ تا ۳ ساعت برروی شیکر قرار میدهیم.

- بعد از خالی نمودن محلول رنگ آمیزی، برروی ژل رنگبر را ریخته، تا با حذف رنگهای اضافه باندهای پروتئینی برروی ژل قابل رویت شوند.

خالص سازی پروتئین:

پروتئین های نوترکیب بیان شده در E.coli به دو شکل محلول و غیرمحلول تولید میگردد. در بسیاری از موارد حصوصاً در سطوح بالای بیان، پروتئینهای نوترکیب با یکدیگر تجمع نموده و به شکل اینکلوژن بادی غیرمحلول درمی آیند. اینکلوژن بایدها در مراحل خالص سازی استاندارد به اشکال محلول پروتئینی در حالت طبیعی تبدیل شده و استخراج میگردد.

در این پایان نامه برای تخلیص پروتئینهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ از دو روش استفاده شده است. چنانچه خالص سازی $L_{۷}/L_{۱۲}$ با استفاده از روش Revers Stain انجام گرفت.

- خالص سازی پروتئین $L_{۷}/L_{۱۲}$ با استفاده از Ni:NTA:

جداسازی پروتئینهای دارای دنباله ٦ اسید آمینه هیستیدین با استفاده از تکنولوژی Ni-NTA براساس کروماتوگرافی تمایلی انجام می گردد. نیتروتری استیک اسید NTA (Nitrilo triacotic Acid) دارای ۲ جایگاه آزاد برای میان

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

کنش با his-tag ٦ میباشد. NTA به یونهای فلزی مانند Ni^{2+} با پایداری بالایی مکتصل شده و شرایط سخت شستشو نیز موجب جداشدن یونها از آن نمی گردد.

برای تخلیص پروتئینها معمولاً از Ni-NTA اگارز استفاده می گردد. Ni-NTA آگارز از اتصال Ni-NTA با سفاروز CL-٦B صورت پذیرفته است و ظرفیت اتصال بالایی را با his-tag٦ و پتانسیل اتصال غیراختصاصی بسیار پائینی دارد.

تخلیص پروتئین L_{12}/L_7:

مواد لازم:

بافرهای ۱، ۲، ۳، ٤

دستگاه سونیکاتور

سانتریفوژ

بافر ۱:

گوانیدین	٦ مولار
تریس هیدروکلراید (pH ۷/۹)	۲۰ میلی مولار
کلرید سدیم	۵۰۰ میلی مولار
آکتیل گلوکوزاید	٤ میلی مولار

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بافر ۲:

اوره	٦ موالر
تریس هیدروکلراید (pH ۷/۹)	۲۰ میلی مولار
کلرید سدیم	۵۰۰ میلی مولار
ایمید ازول	۲۰ میلی مولار

بافر ۳:

تریس هیدروکلراید (pH ۷/۹)	۲۰ میلی مولار
کلراید سدیم	۱۵۰ میلی مولار

بافر ٤:

تریس هیدروکلراید (pH٤/٤)	۲۰ میلی مولار
کلراید سدیم	۵۰ میلی مولار
EDTA	۱۰۰ میلی مولار

روش تخلیص پروتئین $L_{۷}/L_{۱۲}$

- رسوب سلولی حاصل از ۱۰۰ میلی لیتر کشت باکتری پس از مرحلهٔ القاء را در ۸ میلی لیتر بخوبی حل کرده و آنرا بمدت یک ساعت و نیم بروی Rocker در حرارت اتاق قرار دادیم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- پس از این مدت نمونه را در یخ قرار داده و سوئیکه نمدیم. زمان سونیکاسیون ۳۰ ثانیه بود که ٦ بار متوالی این کار انجام شد. پس از سونیکاسیون نمونه بخوبی شفاف میگردد.

- نممونه را بمدت ۳۰ دقیق با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۵°C سانتریفوژ کرده و محلول رویی را که حاوی همه پروتئینهای موجود میباشد جمع آوری می نمائیم.

- به نسبت ۱ به ۲ رزین Ni-NTA آگارز را به محلول رویی مرحله قبل اضافه نمودیم. سپس بمدت یکساعت برروی راکر در حرارت اتاق قرار میدهیم.

- با سانتریفوژ کوتاه مدت (۲۰۰۰rpm برای ۲ دقیقه) رزین رسوب کرده، محلول رویی را خالی می کنیم. محلول رویی شامل پروتئینهایی است که به رزین متصل نشده اند.

- شتسشوی رزین در این مرحله با ۲۰ml بافر ۲ انجام میگیرد

- در این مرحله رزین را با ۱۰۰ میلی لیتر بافر ۳ شستشو میدهیم.

- برای جداسازی پروتئین از حدود ۱۰ میلی لیتر بافر ٤ استفاده می شود. رزینها را با بافر ٤ بخوبی مخلوط کرده وب رای مدت ۲ ساعت برروی راکر قرار میدهیم. سپس با انجام یک سانتریفوژ کوتاه (۲۰۰۰ rpm در ۲ دقیقه) رزینهای را جدا می کنیم. محلول رویی حاوی پروتئینهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ است.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- پروتئینهای تخلیص شده را از نظر مقدار و کیفیت بررسی نمودیم.

- خالص سازی پروتئین P۳۹ با استفاده از Revers Stain:

یکی از روشهای تخلیص پروتئینها، رنگ آمیزی معکوس است. این رنگ آمیزی از دو واکنش رقابتی تشکیل شده که طی آن رسوب کردن کمپلکس فلز سنگین – تریس – SDS باعث کدر شدن زمینه ژل میشود درحالیکه از تشکیل کمپلکس در مناطقی که متوسط پروتئین اشغال شده است، جلوگیری میشود.

مواد:

۱– بافر لیزکننده

تریس هیدروکلراید (pH۸)	۵۰۰ml (یک مولار)
کلرید سدیم	۴۰۰ml (۵ مولار)
EDTA	۲۰۰ml (۵.۰ مولار)

این محلولهای را با هم مخلوط کرده و حجم آنها با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر میرسانیم.

۲– بافر شستشو

تریس هیدروکلراید (pH۸)	۲ml (یک مولار)
کلرید سدیم	۴۰۰ml (۵ مولار)
EDTA	۲۰۰ml (۵.۰ مولار)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

این محلولها را با هم مخلوط کرده و حجم آنها با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

طرز تهیه بافرهیا رنگ آمیزی معکوس:

بافر I:

کربنات سدیم	یک گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

بافر II:

ایمیدازول	۱/٤ گرم
SDS	۰/۰۰۲ گرم

بافر III:

سولفات روی ($ZnSo_{٤}+٧H_{٢}O$)	۰/۰۹٦ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

بافر IV:

کربنات آمونیم	۰/۰۹٦ گرم

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

SDS	۰/۰۰۲ گرم
آب مقطر	۲۰ میلی لیتر

روش تخلیص پروتئین P۳۹:

- رسوب سلولی حاصل از ۱۰۰ میلی لیتر کشت باکتری پس از مرحله القاء را در ۱۰ میلی لیتر بافر لیزکننده حل و یک شب در C° ۲۰- نگهداری می گردد.

- محلول حاوی رسوب سلولی را در دمای C° ٤ بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ و سوپ رویی جدا می گردد.

رسوب سلولی در بافر شستشو حل و در دمای C° ٤ سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ می شود. این مرحله تا زمانیکه سوپ روئی کاملاً شفاف شودؤ تکرار می شود. سپس رسوب که همان انکلوژن بادیها هستند در بافر نمونه (Loading buffer) حل و بمدت ٥ دقیقه در آبجوش حرارتا داده می شود و در C° ۲۰- نگهداری میگردد.

- ژل بزرگ آکریل آمید تهیه و با استفاده از سمپلر نمونه فوق را در چاهک بزرگ ژل میریزیم. پس از آن دستگاه را به منبع تغذیه الکتریکی متصل می نمائیم.

- پس از اتمام الکتروفورز، قسمت Stacking از ژل جدا و بمدت ٥ دقیقهع در ظرف حاوی بافر I برروی شیکر قرار میدهیم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- پس از خالی کردن بافر I، بافر II را در ظرف حاوی ژل ریخته و بمدت ۱۵ دقیقه شیکر میشود.

- ژل سه مرتبه با آب مقطر شستشو میشود.

- بافر III را در ظرف محتوی ژل ریخته و بمدت ۳۰ ثانیه تکان میدهیم.

- پس از مشخص شدن باند پروتئینی مورد نظر ژل با آب مقطر شسته میشود..

- ژل را برروی یک شیشه تمیز گذاشته و باند مورد نظر را با تیغ بریده و در هاون خورد می کنیم.

- ژل خرد شده را در یک لوله استریل ریخته و به آن بافر IV اضافه می کنیم و بمدت یک شب برروی راکر میگذاریم.

- سوسپانسیون را با دور ۸۰۰۰rpm، در دمای ٤ C بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده، محلول رویی را جمع آوری میکنیم. در محلول رویی پروتئین P۳۹ وجود دارد.

- دیالز پروتئین:

از سیستم دیالیز برای تعویض بافر پروتئینهای خالص شده استفاده میشود. بدین منظور پروتئین از یک غشاء نیمه تراوا دارای منافذی با اندازه های مناسب عبور داده میشود. در این مرحله سلولهایی که بزرگتر از منافذ غشاء هستند،

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

داخل کیسه دیالیز باقیمانده و پروتئینهای کوچکتر و یونها از غشاء عبور کرده و وارد فضای بیرون کیسه دیالیز میشوند.

مواد و وسایل مورد نیاز

- کیسه دیالیز
- PBS ۱X

طرز تهیه PBS ۱۰x

KH_2PO_4	۲/٤ گرم
Kcl	۲ گرم
Nacl	۸۱ گرم
$No_2Hpo_4.2H_2o$	۱٤ گرم

مواد فوق را در مقدار مناسبی آب مقطر حل کرده pH را بین ۷/٤-۷/۲ تنظیم کرده پس از آن حجم را به یک لیتر میرسانیم. بافر PBS را در هنگام استفاده بصورت ۱X مصرف مینمائیم.

- لکون نمودن ژنهای L_{12}/L۷ و P۳۹ در پلاسمید بیان کننده اوکاریوتی:

پلاسمید بیان کننده اوکاریوتی، ناقلی است که بیان ژنهای مختلف را در سلول های اوکاریوتی امکان پذیر میسازد. وجود یک پروموتور مربوط به سینوسگالو ویروس در ابتدای ژن مورد نظر امکان بیان شدن آن را فراهم می آورد. جایگاه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مربوط به محل اثر آنزیمهای مختلف تحدیدی امکان کلون نمون ژن را در این ناقلین فراهم می آورد.

در این تحقیق از ناقل اوکاریوتی PCDNA۳ از شرکت invitrogen استفاده شده است. در ابتدا پلاسمید فوق را از E.coli.(DH۵ α) تخلیص کرده سپس با آنزیمهای BamHI و XhoI آنرا برش میدهیم. قطعه ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ و برش یافته با آنزیمهای ذکر شده در مرحله بعد به DNA پلاسمید منتقل کرده و در سلولهای E.coli.(DH۵ α) وارد میکنیم. سپس با غربالگری سلولهای حاوی DNA نوترکیب را جستجو می نمائیم.

مراحل لکون سازی ژنهای مورد مطالعه در PCDNA۳ به شرح زیر است.

۱- استخراج قطعه ژنهای مورد نظر از ناقل pSK

۲- برش آنزیمی PCDNA۳

۳- اتصال دو قطعه DNA

٤- انتقال DNA نوترکیب به میزبان E.coli.(DH۵ α)

۵- غربالگری

۱- استخراج قطعه ژنهای مورد نظر از ناقل pSK

پس از تخلیص پلاسمیدهای نوترکیب PSK-$L_{۷}/L_{۱۲}$ و PSK-P۳۹، آنها را با آنزیمهای BanoHI و xhoI برش داده، ژنهای PSK-$L_{۷}/L_{۱۲}$و PSK-P۳۹

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

را پس از الکتروفورز نمودن در ژل آگارز با استفاده از کیت تخلیص می نمائیم.

شرح کامل این مرحله قبلاً آو.رده شده است.

۲- برش آنزیمی PCDNA۳

در شرایط استریل از باکتری Ecoli حاوی ناقل PCDNA۳ برداشت کرده و در ۲ میلی لیتر از محلول نوترین برایت جاوی ۵۰mg/ml آمپی سیلین کشت داده و بمدت ۱۸ ساعت برروی شسکر در گرمخانه ۳۷°C قرار میدهیم.

- طبق روشی که برای تخلیص پلاسمید ذکر شد، ناقل را استخراج میکنیم

- هضم آنزیمی PCDNA۳ را با استفاده از آنزیمهای BanHI و xhoI بروش زیر انجام می دهیم.

PCDNA۳	۵ml
BamHI	۱ml
XhoI	۱ml
Buffer (y tango)	٤ml
DDW	۹ml
Total	۲۰ml

- پس از مخلوط کردن، نمونه را بمدت ۲ ساعت در ۳۷°C قرار میدهیم.

۳- اتصال دو قطعه DNA به یکدیگر:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

برای اتصال ژن های $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ با PCDNA۳ از آنزیم t٤DNA ligase استفاده میگردد.

PCDNA۳	۱ml	PCDNA۳	۱ml
$L_{۷}/L_{۱۲}$	٦ml	$L_{۷}/L_{۱۲}$	٦ml
T٤DNA ligale	۱ml	T٤DNA ligale	۱ml
Buffer	۱.٥ml	Buffer	۱.٥ml
DDW	۳.٥nl	DDW	۳.٥ml
Total	۱٥ml	ligale	۱٥ml

سپس نمونه ها را بمدت ۱٦ ساعت در دمای ۱٤ سانتی گراد قرار میدهیم.

٤- انتقال DNA نوترکیب به میزبان E.coli.(DH٥α)

ترانسفورماسیون DNA نوترکیب PCDNA-$L_{۷}/L_{۱۲}$ و PCDNA-P۳۹ به میزبان DH٥α مطابق روشی که قبلاً ذکر شد، انجام گردید.

٥- غربالگری: پس از انجام ترانسفورماسیون کلونهای حاوی DNA نوترکیب را طبق روش غربالگری که قبلاً شرح آن آمده است را پیدا می نمائیم.

٦- عاری کردن پلامسیدهای نوترکیب PCDNA-$L_{۷}/L_{۱۲}$و PCDNA-P۳۹ از آندوتوکسین:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

تخلیص DNA پلاسمیدی بروش معمول حاوی مقادیر بالایی از آندورتوکسین باکتری E.coli میباشد. تزریق این DNA به موش یا هر حیوان دیگر باعث شوک آنوتوکسینی و مرگ حیوان میگردد. لذا قبل از تزریق به حیوان، DNA مورد نظر باید فاقد آندوتوکسین باشد.

در این مرحله برای پاکسازی پلاسمیدها از آندوتوکسین از کیت Endofree plasmid kit از شرکت کیاژن QIAGEN استفاده شده است.

تخلیص پلاسمیدها با کیت کیاژن براساس روش لیز قلیایی بوده که پس از آن DNA در شرایط pH و نک پائین به رزینهای کیت (Anion-exchang Resin) متصل می گردد. کلیه ناخالصی ها نظیر RNA، پروتئینها، رنگها و ترکیباتی با وزن ملکولی پائین با استفاده از بافرهای شستشو، حذف میگردد. پلاسمید در شرایط بافیر نکی غلیظ تخلیص شده و در مرحله بعد با استفاده از رسوب پلاسمید توسط ایزوپروپانل نمکهای محیط نیز برداشت میشود. پلاسمیدهای خالص شده را ابتدا در PBS حل نموده، تعیین غلظت کرده و در ۲۰˚C- نگهداری می کنیم.

۷- تزریق پلاسمیدهای PCDNA-$L_{۷}/L_{۱۲}$ و PCDNA-P۳۹ به روش Balb/c:

موشهای Balb/cl تهیه شده در ۵ گروه ۲۶ عددی تقسیم میشوند. این گروهها شامل

۱- PBS

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۲- PCDNA۳

۳- PCDNA۳-$L_{۷}$-$L_{۱۲}$

٤- PCDNA۳-P۳۹

٥- PCDNA۳- $L_{۷}$-$L_{۱۲}$, PCDNA۳-P۳۹

گروههای PBS و PCDNA۳ گروههای کنترل منفی هستند به موشهای این گروه به ترتیب BBS و پلاسمید PCDNA۳ در طی مراحل واکسیناسیون تزریق گردید.

به گروههای PCDNA-$L_{۷}/L_{۱۲}$ و PCDNA-P۳۹ از پلاسمیدهاذی تخلیص شده مرحله قبل تزریق شد.

گروه PCDNA۳-P۳۹ و PCDNA۳- $L_{۷}/L_{۱۲}$ از هر دو پلاسمید تزریق میشود.

موشها در سه مرحله بفاصله سه هفته واکسینه شدند. به این ترتیب که ۱۰۰ml از PBS حاوی ۱۰۰mg پلاسمیدهای مورد نظر بطور داخل ماهیچه ای به عضله ران راست یا چپ موشها تزریق شد.

- تزریق سویه واکسن S۱۹: گروه کنترل مثبت شامل موشهایی هستند که به آنها از سویه واکسن S۱۹ تزریق شده باشد. گروه ششم شامل ۱٦ عدد موش گروه فوق را تشکیل میدهند. تعداد ٥×۱۰^{٤} باکتری در میلی لیتر (cfu/ml)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در این موشها بصورت داخل صفاقی تزریق میشود. تزریق سویه واکسن بلافاصله پس از اتمام واکسیناسیون در ۵ گروه قبلی انجام گردید.

مواد:

۱- سویه S۱۹ بروسلاآبورتوس

۲- محلول مک فارلند شماره ۰/۵

۳- محیط کشت بروسلا آگار

٤- محلول PBS استریل

روش:

۱- سویه واکسن S۱۹ از مؤسسه پاستور ایران تهیه گردید.

۲- محلول مک فارلند McFarland شامل لوله هایی حاوی غلظتهای خاصی از $BaCl_2.2H_2O$ و اسید سولفوریک ۱٪ هستند که بعلت نامحلول بودن $Bacl_2$ در اسید سولفوریک کدروتهای خاصی را بوجود می آورند. هر کدروت نشانگر تعداد خاصی از باکتری است. جدول محلولهای مک فارلند بصورت زیر است.

	۰.۵	۱	۲	۳	٤	۵
$Bacl_2.2H_2o$(٪۱/۱۷۵) (ml)	۰.۰۵	۰.۱	۰.۲	۰.۳	۰.٤	۰.۵
H_2OSO_4 (٪۱)	۹.۹۵	۹.۹	۹.۸	۹.۷	۹.٦	۹.۵

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

(ml)

(x10^{8}) (تعداد تقریبی سلولها) ۱.۵ ۳ ۶ ۹ ۱۲ ۱۵

مواد:

۱- $Bacl_{2}.2H_{2}o$ با غلظت ۱/۱۷۵ درصد

۲- $H_{2}OSO_{4}$ با غلظت ۱ درصد

روش: محلول

۹/۹۵ میلی لیتر از محلول اسید سولفئریک ۱٪ را با ۰/۰۵ میلی لیتر از کلرید باریم ۱/۱۷۵ درصد مخلوط می نمائیم.

- برای تهیه سوسپانسیون سویه s۱۹ با تعداد $۱۰^{٤}\times$ ۵ باکتری در میلی لیتر بروش زیر عمل می کنیم.

ابتدا از کشت سویه s۱۹ در PBS سوسپانسیونی را تهیه می کنیم تا کدورت آن معادل شماره ۰/۵ از محلول مک فارلند باشد. در اینصورت تعداد تقریبی باکتریها $۱۰^{۸}/ml\times$ ۵ است. از این سوسپانسیون رقت $\frac{1}{1000}$ باکتری تهیه میگردد. بنابراین تعداد باکتریها در این قسمت $۱/۵\times۱۰^{۵}$ خواهد بود. یک میلی لیتر از سوسپانسیون فوق برداشته و با PBS به حجم ۳ میلی لیتر می رسانیم. درنتیجه تعداد باکتریها در سوسپانسیون فوق باید در حد $۵\times۱۰^{٤}/ml$ باشد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

برای شمارش دقیق باکتریهای زنده، از سوسپانسیون فوق بمقدار ۱۰۰ml برداشت کرده و در محیط بروسلاآگار کشت میدهیم. پلیتهای باکتری را بمدت ۳ روز در دمای ۳۷°C با فشار ۵٪ از گاز CO۲ نگهداری پس از این مدت تعداد باکتریهای زندهد را شمارش می نمائیم.

از سوسپانسیون حاوی ۵×۱۰^{۴}/ml باکتری به مقدار ۱۰۰ml به موشهای گروه ٦ برش داخل صفاتی تزریق میگردد.

- تزریق بروسلا آبورتوس سویه ٥٤٤ بیماریزا به گروههای آزمایشی:

برای بررسی ایمنی زایی واکسنهای $PCDNA۳_{۷}/L_{۱۲}$ و PCDNA۳-P۳۹ بروسلاآبورتوس سویه ٥٤٤ تزریق میگردد. این تزریق داخل صفاتی و یکماه پس از اتمام واکسیناسیون در گروههای فوق الذکر انجام میگردد. این باکتری از انستیتو پاستور تهیه شده است.

بدین منظور طبق روشی که قبلاً ذکر گردید ابتدا سوسپانسیون حاوی ۵×۱۰^{٤} باکتری در میلی لیتر را تهیه کرده و به گروههاذی فوق الذکر تزریق میگردد. از هر ٤ عدد موش انتخاب میگردد.

۸- سنجشهای ایمونولوژیک:

در این تحقیق آزمونهای ایمونولوژیک در جهت تعیین پاسخهای سلولی و هومورال انجام شده است. در نهایت با شمارش تعداد باکتریهای طحال

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

حیوانات واکسینخ شده و مقایسه آن با تعداد باکتریها در حیوانات شاهد، ایموژنیسیته واکسنهای مورد مطالعه بررسی می گردد.

آزمونهای Lymphocyte Transfornation Test (L.T.T) و تعیین انترفرون گاما و انترکولین ۵ برای پاسخهای سلولی و تعیین مقادیر آنتی بادی های IgG۲a و IgG۱ برالی تعیین پاسخهای هومورال انجام گردیده است. مطالعه پاسخهای هومورال و سلولی یکهفته پس از آخرین واکسیناسیون انجام شد.

۱- آزمون L.T.T

فعال کردن امنوسیتها یا تحریک آنها در invitor با روند معمول ورود آنتی ژن به بدن و تحریک امنوسیتهای حساس شده اختصاصی کاملاً مطابقت دارد. تحریک لمنوسیتها در واقع ظرفیت عملکرد لمنوسیتها را بدنبال برخورد با آنتی ژن یا میتوژن و تکثیر آنها را بیان می کند. میتوژنها مواید هستند که قادرند تعداد زیادی از لمنوسیتها را بطور غیراختصاصی تحریک نمایند، درحالیکه آنتی ژنها سلولهایی را که نسبت به آن آنتی ژن حساس شده اند را بطور اختصاصی تحریک میکنند. کانکاوالین A (ConA) و فیتوهماگلوتینین (PHA) عمدتاً میتوژنهای لمنوسیتهای T میباشند.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در این تحقیق پاسخ به آنتی ژن ها و میتوژنها بصورت وارد شدن امفوستها به چرخه تکثیر سلولی و همانند سازی DNA که منجر به تقسیم سلولی میشود، مشخص میگردد.

میزان تکثیر DNA در سلول با مقدار تیمیدین نشاندار (اضافه شده به محیط) در آن مطابقت دارد. میزان تیمیدین نشاندار با شمارش اشعه ساطع شده از مایع سنتیلیشن در دستگاه بتاکانتر تعیین میگردد. شمارش اشعه ساطع شده را برحسب دقیقه Cpm (Count Per Minute) نشان میدهند.

برای اینکه LTT در شرایط اپتیما انجام شود ابتدا باید مناسبترین غلظت آنتی ژن و بهترین دوره نگهداری در آنکوباتور Co۲ بدست آید.

مواد و وسائل:

محیط کشت کامل RPMI و سرم جنین گاوی

بافر PBS ۱۰x

آنتی ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹

موشهای واکسینه شده

کانکاوالین A

تیمیدین ترتیتیوم دار

جنتامایسین

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

رنگ تریپان بلو

مایع سنتیلیشن

فیلتر فایبرگلاس

لام نئوبار

سانتریفوژ یخچال دار

انکوباتور Co۲ با دمای ۳۷°C

دستگاه هاروستر

دستگاه بتاکانتر

لوله ۱۵ میلی لیتری استریل

سرنگ استریل

پلین ٦ سانتی متری استریل

محلول ACK

تهیه محیط کشت کامل	RPMI ١٦٤٠	
محیط کشت	RPMI ١٦٤٠	Gibco
سرم جنین گاوی	٪١٠	
جنتامایسین	٪٠/١	
۲ مرکاپتواتانل	٪٠/١	

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ال – گلوتامین ٪۱

Hepes ٪۱ (۱۰mm)

به منظور از بین بردن فعالیت کمپلمان سرم جنین گاوی، آنرا بمدت ٤٥ دقیقه در دمای ٥٦°C قرار داده شد و سپس در ۲۰°C- نگهداری گردید. پس از مخلوط کردن مواد فوق، pH محیط کشت را بین ۷/٤-۷/۲ تنظیم کرده بعد از فیلتراسیون در یخچال نگهداری میشود.

تهیه رنگ تریپان بلو:

یک حجم از محلول سالین ٥x با چهار حجم از محلول تریپان بلو مخلوط گردید. برای تشخیص سلولهای زنده از این رنگ استفاده میشد. سلولهایی که حیات خود را از دست داده باشند با جذب رنگ به رنگ آبی درمی آیند اما سلولهای زنده بدوت جذب رنگ تلالو خاصی از خود نشان میدهند.

تهیه مایع سنتیلیشن:

PPO (E دی فنیل اکسازول) ٦ گرم

POPOP ۰/۲٥ گرم

TOLUENE یک لیتر

مواد فوق مخلوط شده و در شیشه تاریک نگهداری می شود.

تهیه بافر ACK

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

NH_4cl	۸/۲۹gr
$KHCO_3$	۱g
Na_2EDTA	۳۷.۲mg

پس از حل کردن مواد فوق در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر، pH را برروی ۷/۲ تنظیم کرده و حجم را به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم. پس از اتوکلاو در یخچال نگهداری گردید.

- تعیین مقدار آنتی ژن مناسب ایده آل انکوباسیون:

برای تعیین مقدار آنتی ژن لازم برای بالاترین نحریک لنفوسیتهای جداشده از موش غلظتهای مختلفی از آنتی ژنها برای تحریک سلولها استفاده میگردد. دوره انکوباسیون در انکوباتور Co_2 دار نیز ۳ و ۵ روز انتخاب گردید تا بهترین زمان لازم انکوباسیون بدست آید.

روش:

۱- جداسازی و کشت لنفوسیتهای طحال موش:

۲- تهیه غلظتهای مختلف از آنتی ژنهای L_7/L_{12} و P۳۹

۳- امکوباسیون ۳ و ۵ روزه

٤- افزودن تیمیدین نشاندار

۵- هاروست

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

٦- اندازه گیری رادیواکتیویته سلولها

۱- جداسازی و کشت لنفوسیتهای طحال موش:

- در این مرحله یکی از موشهای گروه PCDNA۳-$L_{۷}/L_{۱۲}$+PCDNA-P۳۹ استفاده میگردد. موش را با استفاده از اتر بیهوش می نمائیم.

- پس از ثابت کردن موش برروی یک سطح، طحال آنرا جدا و در لوله حاوی محیط کشت قرار میدهیم

- طحال جدا شده را در داخل پلیت استریل همراه با محیط کشت ریخته و با استفاده از یک سرنگ سلولهیا طحال (گلوبولهای قرمز و سفید) را از آن خارج می کنیم.

- سلولها را به لوله ۱۵ میلی لیتری منتقل کرده و در سانتریفوژ بمدت ۵ دقیقه در ۱۷۰۰rpm رسوب میدهیم.

- محیط رویی را خارج کردهن پس از هموژن کردن رسوب، ۵ میلی لیتر از بافر ACK به آن افزوده بمدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار میدهیم. در این مدت گلوبولهای قرمز تخریب میشوند. سپس بمدت ۵ دقیقه در دور ۱۷۰۰ سانتریفوژ می کنیم – محلول رویی را خالی می کنیم.

- رسوب سلولی را هموژن کرده، دومرتبه با ۱۰ میلی لیتر محیط کشت شستشو میدهیم.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

- به رسوب نهایی بدست آمده ۲ میلی لیتر کشت افزوده و تعداد سلولهای موجود در محلول را شمارش میکنیم. سپس غلظت سلولی برابر $۲\times۱۰^{۶}/ml$ را تهیه می کنیم و تا زمان استفاده در یخ نگهداری میشود.

۲- تهیه غلظتهای مختلف از آنتی ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹

از آنتی ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ غلظتهای mg/ml ٤۰ و ۲۰ و ۱۰ و ۵ و ۲.۵ در محیط RPMI تهیه میگردد. سپس ۱۰۰ml از رقتهای فوق در دوپلیت ۹٦ خانه استریل طبق شکل زیر می ریزیم. به هر حفره ۱۰۰ml از لنفوسیتهای تهیه شده اضافه می نمائیم. علاوه بر حفره های حاوی آنتی ژن، حفره بدون آنتی ژن (no Antigen) و حفره حاوی کانکاناوالین A (Con A) را بعنوان کنترل قرار میدهیم.

۳- انکوباسیون ۳ و ۵ روزه: یکی از پلیتها را بمدت ۳ و دیگری را بمدت ۵ روز در انکلوباتور Co۲ قرار میدهیم.

٤- افزودن تیمیدین نشاندار: رقت $\frac{1}{200}$ تیمیدین نشاندار را در محیط RPMI تهیه کرده و به هر حفره ۵۰ml اضافه می کنیم. به پلیت ۳ روزه پس از ۷۲ ساعت و به پلیت ۵ روزه پس از ۱۲۰ ساعت از کشت لنفوسیتها تیمیدین نشاندار افزوده می شود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

قبل از افزودن تیمیدین نشاندار، ۱۰۰ml از سوپهای حفره را جهت اندازه گیری انترفرون گاما در انترلوکین ۵ برداشت می کنیم.

۵- پس از طی ۱۶ تا ۱۸ ساعت سلولها را با ساتفاده از دستگاه هاروستر به روی فیلتر فایبرگلاس انتقال بافت.

۶- پس از خشک شدن کامل لان، قطعات فیلتردار را در لوله های مخصو بتاتانکر قرار داده و حدود ۱ میلی لیتر مایع سنتیلیشن به آن اضافه گردید.

۸- رادیواکتیویته سلولها توسط دستگاه بتاکاتر اندازه گیری می شود.

- تعیین LTT در گروههای مختلف موشی:

پس از مشخص شدن مقدار آنتی ژن مناسب و زمان ایده آل انکوباسیون، اندازه گیری LTT در گروههای مختلف موشی انجام می وشد. از هر گروه ٤ عدد موش انتخاب کرده و طبق روشی که ذکر شد، آزمون LTT را انجام دادیم. با ذکر این نکته که تنها از یک غلظت آنتی ژن و یک دوره انکوباسیون استفاده شده است.

همانطور که قبلاً نیز اشاره شد، ۱۰۰ml از سوپ سلولی هر حفره برای تعیین میزان سیتوکانیهای انترفرون گاما و انترکولین ۵ برداشت شده و تا زمان اندازه گیری سینوکانیها در ۷۰ ̊C- نگهداری میشود.

۲- اندازه گیری سیتوکانیهای انترفرون گاما و انترکولین ۵:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سیتوکانیهای تولید شده توسط لنفوسیتها در آزمون LTT با روش تست الیزا اندازه گیری می شوند. در این تحقیق از کیفهای اندازه گیری انتررفون گاما و انترلوکین ۵ استفاده شده است.

در این کیتها سطح حفرات پلیتها توسط آنتی بادیهای ضد سیتوکانیها پوشانده است. پس از افزودن سوپهای سلولی و رقتهای مختلف محلول استاندارد، آنتی بادی کونژوگه ضد سیتوکانیها اضافه میگردد. تغییر رنگ محلول نشانگر و اندازه گیری توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در مرحله بعد انجام میگردد. با رسم منحنی استاندارد غلظت سیتوکانیهای سوپ سلولی اندازه گیری شد.

۳- اندازه گیری آنتی بادی:

برای سنجش ایمنی هومورال، اندازه گیری آنتی بادیهای IgG۲a، IgG۱ انجام می شد. برای این منظور سرم ٤ موشی کاز گروههای مختلف تحت مطالعه جمع آوری و در ۲۰°C- نگهداری میشود. در ابتدا غلظت مناسب آنتی ژن پوشیده شده در سطح پلیت الیزا باید تعیین گردد.

۱- تعیین غلظت آ"نتی ژن:

موارد و وسائل:

پلیت ۹٦ خانه ای الیزا

آنتی ژنهای مورد نظر

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

آنتی بادیهای IgG۲a و IgG۱ موشی ک.نژوگه با میوتین

استوپتاویدین

OPD، PBS ۱x، توئین ۲۰، BSA=Bovin Serum Albumin اسید سولفوریک ۲۰٪

روش:

۱- ابتدا غلظتهای مختلف از آنتی ژنهای $L_{۷}/L_{۱۲}$ و P۳۹ را تهیه می کنیم.

این غلظتها عبارتند از:

۲.۵ , ۵ , ۱۰ , ۱۵ mg/ml

۲- ۱۰۰ml از غلظتهای فوق را در حفره های پلیت ۹۶ خانه ریخته (طبق شکل) و برای تثبیت در پلیت بمدت یک شب در ٤°C قرار گرفت

۳- پلیت را با بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۱٪ توئین ۲۰) سه بار شستشو داده

٤- در چاهکهای پلیت ۱۰۰ml بافر بلوکه کننده (PBS حاوی BSA ۱٪) ریخته و بمدت ۲ ساعت در ۳۷°C نگهداری می کنیم.

۵- مرحله ۳ تکار شد.

٦- رقت ثابت $\left(\frac{1}{60}\right)$ از سرم موشها تهیه کرده و هر حفره ۱۰۰ml از رقت اخیر می ریزیم. پلیت ۲ ساعت در ۳۷°C نگهداری میشود.

۷- مرحله ۳ تکرار می شود

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

۸- ۱۰۰ml از رقت $\frac{1}{250}$ آنتی بادیهای ضد IgG۲a و IgGI به حفره های پلیت میریزیم. پلیت را ۲ ساعت در ۳۷°C نگهداری می کنیم.

۹- مرحله ۳ تکارار میشود.

۱۰- ۱۰۰ml از رقت $\frac{1}{200}$ استرسپتاومرین اضافه گردیده و ۲ ساعت در ۳۷°C نگهداری می شود.

۱۱- مرحله ۳ تکرار میشود.

۱۲- به هر چاهک ۱۰۰ml از محلول سوبسترای OPD تازه تهیه شده افزوده و بمدت ۳۰-۱۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت.

۱۳- پس از این زمان به هر چاهک ۱۰۰ml اسید یولفوریک ۲۰٪ اضافه گردید.

۱٤- میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۹۰ نانومتر تعیین شد.

- تعیین تیتر آنتی بادی IgG۲a و IgG۱

پس از تعیین غلظت آنتی ژن، تیتر آنتی بادی IgG۲a و IgG۱ سرم جمع آوری شده موشها اندازه گیری گردید. این مرحله از آزمایش طبق آنچه در قسمت قبل آورده شده، انجام گرفت.

- اندازه گیری تعداد باکتریهای بروسلاآبورتوس:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

برای بررسی ایمنوژنیسیته واکسنهای مورد مطالعه اندازه گیری تعداد باکتری بروسلاآبورتوس ٥٤٤ در موشهای تلقیح شده با این باکتری انجام گرفت.

مواد و وسایل:

پلیت

محیط بروسلاآگار

هموژناسیون

روش:

طحال موشهای گروههای مورد آزمایش در شرایط استریل برداشت شده و بطور کامل هموژن میگردد. سپس رقتهای $\frac{1}{100}$، $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{10000}$ از آنرا در PBS تهیه کرده و ۱۰۰ml از رقتهای فوق را در محیط بروسلاآگار کشت داده شد. پلیتها را بمدت ۳ شبانه روز در اکوباتور Co۲ دار (٥٪) حرارت ۳۷°C قرارداده می شود. پس از این مدت تعداد باکتریهای رشد یافته را شمارش می کنیم.

www.kandoocn.com