View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by Qazvin University of Medical Sciences Repository

بسمه‌تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین

معاونت پژوهشی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان :

کلون ، بیان و تخلیص فرم کوتاه شده پروتئین نوترکیب Omp2b از بروسلا آبورتوس

اساتید راهنما :

جناب آقای دکتر مهدی سهمانی

جناب آقای دکتر سعید بوذری

استاد مشاور :

سرکار خانم دکتر مریم گلشنی

نگارنده :

نفیسه واعظ نیا

پاییز ۱۳۹۴

چکیده

هدف: بروسلوز جز بیماری های مشترک بین انسان و دام بوده و سالانه خسارت های فراوانی را به بهداشت جامعه و صنعت دامپروری وارد می سازد. با توجه به تلاش های متعددی که تا به حال در جهت جلوگیری از گسترش این پاتوژن به عمل آمده، اما همچنان شاهد گسترش آن در کشورهای مختلف جهان هستیم. امروزه واکسن های حیوانی متعددی برای ایمن ساختن گله های دامی در دسترس قرار دارد. عدم موفقیت قطعی این تلاش ها در متوقف ساختن این پاتوژن محققین را به پیدا کردن راهی نوین در نایل آمدن به این هدف واداشته است. با توجه به نقش مهم پروتئین های غشاء خارجی باکتری بروسلا آبورتوس در ایجاد ایمنی در بدن میزبان، تحقیقات متعددی بر روی این پروتئین ها صورت گرفته است هدف این مطالعه بررسی بیان فرم truncated پروتئین نوترکیب Omp2b در *E. coli* و سعی در تایید استفاده از فرم truncated این آنتی ژن به منظور ایمنی زایی بهتر در تحقیقات بعدی است.

مواد و روش ها: در این تحقیق ابتداً، مطالعات بیوانفورماتیک به منظور انتخاب آنتی ژن های حفاظت شده انجام گرفت و براساس آن با استفاده از سرویس BLAST-P آنتی ژن های Omp2b حفاظت شده بین سویه های مختلف بروسلا آبورتوس بررسی و انتخاب گشت. فرم کوتاه شده ای از آنتی ژن Omp2b(TOmp2b) با توجه به اپی توپ های با اتصال قوی به MHC II که در سویه های مختلف حفاظت شده اند طراحی گشت. فرم کوتاه شده ی توالی پروتئینی به دست آمده با استفاده از I-TASSER server مدل سازی گشت. بر اساس توالی مربوطه پرایمرهایی جهت تکثیر ژن TOmp2b طراحی شدند. DNA سویه ی استاندارد بروسلا آبورتوس ۵۴۴ جهت تکثیر ژن TOmp2b استخراج گردیده، سپس با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر شد. ژن TOmp2b در وکتور پلاسمیدی pET28a کلونگشت. ساختار pET28a-TOmp2b به E. coli TOP10 ترانسفورم گشته و فرایند ترانسفورماسیون با روش Colony-PCR تائید شد. به منظور بیان پروتئین نوترکیب، pET28a-TOmp2b به *E. coli* BL21 (DE3) منتقل گردید و با استفاده از القاگر IPTG بیان پروتئین نوترکیب تحریک گشت. خصوصیات پروتئین نوترکیب با روش های SDS-PAGE و Western blotting مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین بیان شده با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد.

نتایج: بیان پروتئین نوترکیب TOmp2b در سویه حاوی این قطعه در پلاسمید pET28a با استفاده از ۰,۲ mmol القاگر IPTG مشاهده گردید. میزان پروتئین بیان شده پس از تخلیص با استفاده از روش برادفورد ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر از محیط کشت اندازه گیری شد. خصوصیات پروتئین نوترکیب با روش های SDS-PAGE و Western blotting مورد بررسی قرار گرفت که این پروتئین مطابق بر داده های بیوانفورماتیک kD ۳۶,۶ وزن داشت.

بحث: استفاده از فرم truncated ژن Omp2b با حذف سیگنال پپتید، به بیان بیشتر پروتئین نوترکیب TOmp2b در مقایسه با مطالعات گذشته انجامید. همچنین، با در نظر داشتن خصوصیات آنتی ژنیک و محافظت کنندگی پروتئین Omp2b انتظار می رود که TOmp2b همان خصوصیات پروتئین وحشی را داشته باشد. بنابر نتایج بدست آمده و مطالعات اخیر بیان پروتئین نوترکیب TOmp2b راه را برای مطالعات ساخت واکسن در آینده هموار کند.