

مروری بر روش‌های سنجش فعالیت‌های بیولوژیکی پتیدهای ضد میکروبی

مولفان:

دکتر محمد رضا مخبر دزفولی

(استاد دانشگاه تهران، عضو هیئت مدیره فرهنگستان علوم ج.ا.ا.)

دکتر زهره افشاری

(استادیار انستیتو پاستور، ایران)

سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی

۱۳۹۶

سروشانه

عنوان و پدیدآور

مشخصات نشر

مشخصات ظاهری

شابک

وضعیت فهرست نویسی

موضوع

شناسه افزوده

شناسه افزوده

رده بندی کنگره

رده بندی دیویی

شماره کتابشناسی ملی

: مخبر دزفولی، محمدرضا، ۱۳۴۰.

: مروری بر روش های سنجش فعالیت های بیولوژیکی پپتیدهای ضد میکروبی / مولفان زهره افتخاری.

: تهران: سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی، ۱۳۹۶.

: ۲۱۰ ص.

: ۱-۰۷۸-۴۶۰-۶۰۰-۹۷۸

: پپتیدی ضد میکروبی Peptide antibiotics

: بخاری، زهره، ۱۳۶۲.

: سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی

: ۱۷۱۱/۲ پ/۴۳۸ R

: ۵/۱

: ۹۰۴۲۳۸

مروری بر روش های سنجش فعالیت های بیولوژیکی پپتیدهای ضد میکروبی

مولفان: محمدرضا مخبر درزی - زهره افتخاری

ناشر: سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی

چاپ: اوّل - ۱۳۹۶

شمارگان: ۵۰۰ نسخه

قیمت: ۱۳۰۰۰ تومان

شابک: ۱-۰۷۸-۴۶۰-۶۰۰-۹۷۸

این اثر، مشمول قانون حمایت مؤلفان و مصنفان و هنرمندان مصوب ۱۳۴۸ است، هر کسی تمام یا قسمتی از این اثر را بدون اجازه مؤلف (ناشر) نشر یا پخش یا عرضه نماید مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.



سازمان انتشارات

نشانی سازمان انتشارات: تهران - خیابان انقلاب اسلامی - خیابان فخررازی - خیابان شهدای ژاندارمری - پلاک ۷۷، تلفن: ۶۶۹۵۲۹۴۸

مرکز پخش:

خیابان انقلاب - بین فلسطین و چهارراه ولیعصر - جنب مؤسسه نمایشگاه های فرهنگی ایران - تلفن: ۶۶۴۸۷۶۲۵-۶

پایگاه اطلاع رسانی: www.isba.ir پست الکترونیکی: info@isba.ir فروشگاه اینترنتی: www.Jdbookfair.com

فهرست مطالب

فصل اول: مروری بر پتیدهای ضد میکروبی	۳
۱-۱- نقش پتیدهای ضد میکروبی در بیماری‌های جلدی	۴
۲-۱- نقش پتیدهای ضد میکروبی در چشم	۷
۳-۱- عملکرد پتیدهای ضد میکروبی در ایمنی ذاتی ریه	۱۰
۴-۱- نقش پتیدهای ضد میکروبی در دستگاه گوارش	۱۳
فصل دوم: ارزیابی برون‌ریزی مایع و تخریب بیوفیلم باکتری	۲۵
۱-۲- مواد کاربردی	۳۰
۱-۱-۲- نشان‌دار کردن پتید و نخل	۳۰
۲-۲- رشد باکتری و سنجش بیوفیلم	۳۰
۳-۱-۲- مقایسه آب گریزی و تعیین ساختار سویه	۳۱
۲-۲- روش‌ها	۳۲
۱-۲-۲- اتصال پتید با TAMRA SE-۵(۶) و تخلیص	۳۲
۲-۲-۲- سنجش حداقل غلظت مهاری (MIC)	۳۳
۳-۲-۲- شکل‌گیری بیوفیلم و سنجش تخریب	۳۴
۴-۲-۲- چسبیدن باکتری‌ها به پلی استایرین	۳۵
۵-۲-۲- تخریب بیوفیلم	۳۵
۶-۲-۲- تصویربرداری به روش هم کانونی (Con focal)	۳۷
۷-۲-۲- بررسی آب گریزی پتید	۳۸
۸-۲-۲- تعیین ساختار ثانویه پتید با استفاده از طیف‌سنجی Circular Dichroism	۳۸
۹-۲-۲- طیف‌سنجی مادون قرمز قابل تبدیل به Fourier	۳۹

۴۱	۱۰-۲-۲- الیگومریزاسیون پتید در محیط رشد
۴۵	فصل سوم: مطالعه‌ی مهار و ریشه‌کشی بیوفیلیم باکتریایی
۴۶	۱-۳- مواد مورد استفاده
۴۷	۲-۳- روش کار
۴۷	۱-۲-۳- آماده‌سازی پیش کشت
۴۸	۲-۲-۳- رشد بیوفیلیم‌ها برای سنجش
۴۹	۳-۱-۳- رنگ‌آمیزی و سنجش بیوفیلیم
۵۰	۴-۲-۳- تعیین درصد زیست توده بیوفیلیم
۵۰	۵-۲-۳- نتایج سنجش حاصل از آزمایش رنگ‌آمیزی زنده/مرده
۵۵	فصل چهارم: مطالعه پتیدهای ضد میکروبی به‌عنوان عوامل ضدسرطان
۵۶	۱-۴- مقدمه
۵۸	۲-۴- مواد به کار رفته
۵۸	۱-۲-۴- کشت سلول
۵۹	۲-۲-۴- پتیدها
۵۹	۳-۲-۴- رنگ‌آمیزی PI جهت اندازه‌گیری نفوذپذیری غشا توسط فلوسایتومتری
۵۹	۴-۲-۴- رنگ‌آمیزی آنکسین PI/FLUOS-V جهت ارزیابی آپوپتوز/نکروز توسط فلوسایتومتری
۶۰	۵-۲-۴- رنگ‌آمیزی DiOC ₆ جهت اندازه‌گیری پتانسیل غشای میتوکندری توسط فلوسایتومتری
۶۰	۶-۲-۴- سنجش مهاجرت و تهاجم جهت اندازه‌گیری تحرک سلول
۶۰	۷-۲-۴- سنجش آنژیوژنز
۶۱	۳-۴- روش‌های کاربردی
۶۱	۱-۳-۴- کشت سلول
۶۲	۲-۳-۴- پتیدها
۶۳	۳-۳-۴- رنگ‌آمیزی PI جهت اندازه‌گیری نفوذپذیری غشا توسط فلوسایتومتری

۶۳	۱-۳-۴- رنگ آمیزی PI سلول های چسبنده (برای نمونه MDA-MB-231)
۶۴	۲-۳-۴- رنگ آمیزی PI سلول های معلق (برای نمونه، RPMI-8266)
۶۴	۴-۴- رنگ آمیزی آنکسین PI/FLUOS-V، جهت ارزیابی آپوپتوز/ نکروز توسط فلوسایتمتری
۶۵	۱-۴-۴- رنگ آمیزی آنکسین PI/FLUOS-V سلول های چسبنده (برای نمونه MDA-MB-231)
۶۶	۲-۴-۴- رنگ آمیزی آنکسین PI/FLUOS-V سلول های معلق (برای نمونه RPMI-8266)
۶۶	۵-۴- رنگ آمیزی DiOC ₆ جهت اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری با فلوسایتمتری
۶۷	۱-۵-۴- رنگ آمیزی DiOC ₆ سلول های چسبنده (برای نمونه MDA-MB-231)
۶۸	۲-۵-۴- رنگ آمیزی DiOC ₆ سلول های معلق (برای نمونه RPMI-8266)
۶۹	۳-۵-۴- آماده سازی و درج سلول ها قبل از مهاجرت/ تهاجم
۶۹	۴-۵-۴- آماده سازی محفظه های میکروپلاستیکی
۷۱	۵-۵-۴- رنگ آمیزی سلول های مهاجرت کرده
۷۱	۶-۵-۴- تعیین کمیت سلول های مهاجرت کرده
۷۲	۶-۴- سنجش آنژیوژنز
۷۵	فصل پنجم: بررسی ویژگی های ضد سرطانی با استفاده از سلول های سرطانی دهان و کولون
۷۵	۱-۵- مقدمه
۷۶	۲-۵- مواد کاربردی
۷۶	۱-۲-۵- آماده سازی و تنظیم آزمایشگاه برای کشت سلول
۷۸	۲-۲-۵- واکنش گره های کشت بافت
۷۸	۳-۲-۵- دستورالعمل محیط های کشت و خطوط سلولی
۷۹	۴-۲-۵- سنجش سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی
۸۰	۵-۲-۵- واکنش گرها
۸۰	۶-۲-۵- پپتیدها و محلول MTT
۸۱	۳-۵- روش ها

۵-۳-۱- شمارش سلول	۸۱
۵-۳-۲- کشت سلول بنیادی پالپ دندان	۸۳
۵-۳-۳- کشت سلول‌های عضله صاف	۸۴
۵-۳-۴- تعیین تعداد سلول	۸۶
۵-۳-۵- کشت رده سلولی سرطان اسکواموس دهان انسان (HSC4)	۸۶
۵-۳-۶- کشت رده سلولی سرطان روده بزرگ انسان (SW620)	۸۸
۵-۳-۷- سنجش سمیت سلولی در شرایط آزمایشگاهی	۸۹
فصل ششم: استفاده از آنزیم‌ها جهت فعال‌سازی پیش داروهای پپتید ضد میکروبی	۹۳
۶-۱- مقدمه	۹۳
۶-۲- مواد کاربردی	۹۸
۶-۲-۱- سنجش فعالیت در غیاب باکتری	۹۸
۶-۲-۲- سنجش و روش فعال‌سازی در حضور باکتری‌ها	۹۹
۶-۳- روش‌ها	۱۰۰
۶-۳-۱- سنجش فعالیت در غیاب باکتری‌ها	۱۰۰
۶-۳-۲- سنجش فعالیت حضور باکتری‌ها	۱۰۱
فصل هفتم: ویژگی‌های ضد التهابی: خنثی‌سازی لیپوپلی‌ساکارید	۱۰۵
۷-۱- مقدمه	۱۰۶
۷-۲- مواد و آماده‌سازی‌ها	۱۱۱
۷-۲-۱- جداسازی لوکوسیت‌های اولیه انسانی از خون وریدی و یا لایه‌های بافی کوت	۱۱۱
۷-۲-۲- سنجش و روشی برای خنثی‌سازی LPS و LTA	۱۱۱
۷-۲-۳- اندازه‌گیری محتوای سیتوکین پیش التهابی در مایع‌های رویی کشت سلول با DELFIA ..	۱۱۲
۷-۲-۴- اندازه‌گیری سمیت سلولی لوکوسیت توسط سنجش MTT	۱۱۳
۷-۳- روش‌ها	۱۱۳

۱۱۳	۱-۳-۷- جداسازی لوکوسیت‌های اولیه انسانی از خون وریدی و لایه‌های باقی کُوت.....
۱۱۴	۲-۳-۷- تعیین اولیه دوزهای پیروژن مناسب.....
۱۱۵	۱-۲-۳-۷- تحریک لوکوسیت‌ها.....
۱۱۵	۲-۲-۳-۷- اندازه‌گیری محتوای سیتوکین پیش التهابی در مایع‌های رویی کشت سلول با DELFIA.....
۱۱۷	۳-۳-۷- تعیین اولیه تعداد دفعات انکوباسیون.....
۱۱۸	۴-۳-۷- خنثی‌سازی LPS و LTA: سنجش سیتوکین‌ها و زنده مان‌ی.....
۱۲۵	فصل هشتم: پیت‌های ضد میکروبی مؤثر بر بیان ژن بیماری‌زا در باکتری.....
۱۲۵	۱-۸- مقدمه.....
۱۲۷	۲-۸- مواد مورد استفاده.....
۱۲۷	۱-۲-۸- سنجش صفحه گزارشگر بتا-گالاکتوزیداز کیفی.....
۱۲۹	۳-۸- روش‌ها.....
۱۲۹	۱-۳-۸- سنجش صفحه گزارشگر بتا-الاکتوزیداز کیفی.....
۱۳۰	۲-۳-۸- سنجش گزارشگر بتا-لاکتاماز کمی.....
۱۳۵	فصل نهم: فعالیت ضد میکروبی و سمیت سلولی پپتیدهای ضد کرامیت.....
۱۳۷	۱-۹- مقدمه.....
۱۴۰	۲-۹- مواد.....
۱۴۰	۱-۲-۹- فعالیت ضد میکروبی در حضور اشک.....
۱۴۰	۲-۲-۹- جمع‌آوری اشک بازال انسان.....
۱۴۰	۱-۲-۲-۹- کشت باکتریایی.....
۱۴۱	۲-۲-۲-۹- سنجش ضد میکروبی.....
۱۴۲	۳-۲-۹- MTT جهت ارزیابی سمیت پپتیدهای ضد میکروبی بر روی سلول‌های اپیتلیال قرنیه ...
۱۴۲	۱-۳-۲-۹- کشت سلول، محیط کشت رشد و عبور دادن.....
۱۴۲	۲-۳-۲-۹- سنجش سمیت سلولی.....

۱۴۳	۴-۲-۹- سنجش $TNF-\alpha$
۱۴۳	۴-۲-۹-۱- محلول پپتید و LPS.....
۱۴۳	۴-۲-۹-۲- رشد و عبور ماکروفاژ.....
۱۴۴	۴-۲-۹-۳- خنثی‌سازی LPS.....
۱۴۵	۴-۲-۹-۴- روش الایزا.....
۱۴۵	۳-۹- روش‌ها.....
۱۴۵	۴-۹- حالت: ضد میکروبی آزمایشگاهی در حضور اشک انسانی.....
۱۴۵	۴-۹-۱- مجموعه اشک بازال انسان.....
۱۴۷	۴-۹-۲- کشت باکتریایی.....
۱۴۸	۴-۹-۳- سنجش ضد میکروبی.....
۱۴۹	۴-۹-۲- MTT جهت اندازه‌گیری سلولی پپتیدهای ضد میکروبی روی سلول‌های اپیتلیال قریه.....
۱۴۹	۴-۹-۱- کشت سلول و سمیت.....
۱۵۰	۴-۹-۲- سنجش سمیت سلولی.....
۱۵۱	۴-۹-۳- سنجش $TNF-\alpha$
۱۵۱	۴-۹-۱- محلول پپتید و LPS.....
۱۵۱	۴-۹-۲- رشد و پاساژ ماکروفاژ.....
۱۵۲	۴-۹-۳- خنثی‌سازی LPS.....
۱۵۲	۴-۹-۴- روش الایزا.....
۱۵۴	۵-۹- نکات.....
۱۵۹	فصل دهم: بررسی نقش AMP در کراتیت باکتریایی در شرایط درون تنی و برون تنی.....
۱۵۹	۱۰-۱- مقدمه.....
۱۶۳	۱۰-۲- مواد.....
۱۶۳	۱۰-۲-۱- شکاف پپتید ضد میکروبی با استفاده از siRNA.....
۱۶۳	۱۰-۲-۲- آماده‌سازی هموزنی قریه.....

۱۶۴.....	۱۰-۲-۳- تعداد باکتری‌های زنده
۱۶۴.....	۱۰-۲-۴- الایزا و سنجش میلوپراکسیداز
۱۶۵.....	۱۰-۲-۵- Real Time PCR برای بیان پپتیدهای ضد میکروبی
۱۶۶.....	۱۰-۲-۶- رنگ‌آمیزی ایمنی برای بیان پروتئین پپتید ضد میکروبی قرنيه
۱۶۶.....	۱۰-۳-۳- روش‌ها
۱۶۶.....	۱۰-۳-۱- شکافتن AMP در درون بدن توسط siRNA
۱۶۷.....	۱۰-۳-۲- سنجش در شرایط آزمایشگاهی (Ex Vivo)
۱۶۸.....	۱۰-۲-۱- آماده‌سازی هموزنات قرنيه
۱۶۸.....	۱۰-۲-۲- تعداد باکتری‌های زنده
۱۶۹.....	۱۰-۲-۳- پروتکل سنجش میلوپراکسیداز (MPO)
۱۷۰.....	۱۰-۲-۴- سنجش سیتوکین‌ها، کولین‌ها و سایر آنالیزها با کمک الایزا
۱۷۱.....	۱۰-۲-۵- RT-PCR برای تعیین کمیت مرتبط برای بیان پپتید ضد میکروبی
۱۷۳.....	۱۰-۲-۶- رنگ‌آمیزی ایمنی برای بیان پپتید ضد میکروبی قرنيه
۱۷۶.....	۱۰-۴- نکات
۱۸۳.....	فصل یازدهم: فعالیت همولیتیکی پپتیدهای ضد میکروبی
۱۸۳.....	۱۱-۱- مقدمه
۱۸۵.....	۱۱-۲- مواد مورد استفاده
۱۸۶.....	۱۱-۳- روش‌ها
۱۸۶.....	۱۱-۳-۱- آماده‌سازی: ملیتین، سوسپانسیون RBC و پپتیدها
۱۸۶.....	۱۱-۳-۲- روش آزمایش
۱۸۸.....	۱۱-۳-۳- آنکوباسیون و خواندن جذب
۱۸۹.....	۱۱-۳-۴- تفسیر نتایج
۱۸۹.....	۱۱-۴- نکات کاربردی

پیش‌گفتار

با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در علوم دارویی و درمانی در دهه‌های اخیر، در زمان کنونی که با یک دوران پزشکی مواجه هستیم، به نظر می‌رسد به‌ویژه در زمینه فراورده‌های بیولوژیک، معرفی پپتیدهای ضد میکروبی با قابلیت کاربرد بالینی بسیار کمک‌کننده باشد. عفونت‌هایی که در سال‌های گذشته به‌طور معمول درمان می‌شدند، اکنون به‌عنوان چالش‌های پزشکی تهدیدکننده زندگی، ظاهر می‌شوند. معرفی پپتیدهای ضد میکروبی به‌عنوان داروهای درمانی، می‌تواند زمینه‌ساز معرفی فراورده‌های دارویی جدید در زمینه ضد میکروبی و ضد التهابی در زمینه علوم پزشکی و دارویی باشد. شناختی روش‌های درون‌تنی و برون‌تنی جهت ارزیابی اثرات این پپتیدها می‌تواند در ارتقا دانش این محصولات نوپا کمک‌کننده باشد. پپتیدهای ضد میکروبی به‌عنوان یکی از گروه‌های (Antimicrobial Peptides) که به اختصار AMP بیان می‌شوند، متنوع‌ترین ترکیبات ضد میکروبی هستند که به دلیل پیدایش مقاومت باکتری‌های پاتوژن به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد توجه زیاد قرار گرفته‌اند. پپتیدهای ضد میکروبی از اجزای مهم سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی تمامی گونه‌های زیستی محسوب می‌شوند. این ترکیبات در انسان به وسیله گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و بسیاری از سلول‌های اپی‌تلیال تولید می‌شوند. آنها قادر به از بین بردن پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی، ویروس‌ها، میکوباکتریوم‌ها (شامل قارچ‌ها و حتی سلول‌های سرطان‌زا) می‌باشند. برخلاف اغلب آنتی‌بیوتیک‌های معمولی، پپتیدهای ضد میکروبی به‌عنوان تنظیم‌کننده سیستم ایمنی عمل می‌کنند که قادر به افزودن سیستم ایمنی بدن می‌باشند. حضور پپتیدهای ضد میکروبی در ارگان‌های مختلف بدن مانند ریه، دستگاه گوارش و دستگاه ادراری، به‌صورت طبیعی، سد دفاعی در برابر عوامل میکروبی می‌باشند که خداوند متعال در خلقت انسان به درستی، این

پپتیدها را در نقاط حساس بدن برای مقابله با عوامل پاتوژن قرار داده است. پپتیدهای ضد میکروبی در ایمنی ذاتی و توانایی آن‌ها به جذب شیمیایی و فعال‌سازی سلول‌ها نیز نقش مهمی دارند. همچنین پپتیدهای ضد میکروبی، ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان (hMSC) و استئوبلاست‌ها به علاوه سلول‌های اپیتلیال، کراتینوسیت‌ها و سلول‌های ایمنی منشأ لنفاوی و میلوئید را القا می‌کنند. از سوی دیگر نقش پپتیدهای ضد میکروبی را در ایمنی اکتسابی و توانایی آن به القای Th1 و Th2 و پاسخ‌های ایمنی ترکیبی Th1 و Th2 نقش مهم دارند. در نهایت، پپتیدهای ضد میکروبی را در بهبود زخم، بیماری‌های خود ایمنی و رگ زایی در نواحی آسیب دیده، درمان سرطان و غیره نقش مهمی دارند.

با توجه به این بود که این علم در دنیا و اقدامات انجام شده در داخل کشور، از خوانندگان محترم درخواست می‌شود که از بیان هرگونه انتقاد و راهنمایی در جهت بهبود هر چه بهتر تألیف این کتاب دریغ نفرمایند تا مسیر غنی‌تری در اختیار دانشجویان و پژوهشگران عزیز کشورمان قرار گیرد و قدم مؤثری در راستای ارتقای علمی کشور برداشته شود. از خداوند متعال خاشعانه موفقیت روزافزون جامعه علمی، فرد دانش‌پژوهان و فناوران ایران اسلامی و مؤثر واقع شدن این اثر در توسعه علمی و فناوری کشور را خواهانم.