دانشگاه رازی

دانشکده علوم

جلسه دفاع از پایان نامه دکتری

عنوان:

ساخت نانوواکسن ضد سندرم افت تولید تخم‌مرغ: کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب فیبر ویروس سندرم افت تولید تخم مرغ در باکتری *E. coli* و بررسی ویژگی های اسپکتروسکوپیک پروتئین نوترکیب به صورت منفرد و در اتصال به نانوذره ی آلبومین سرم مرغی (به عنوان حامل).

ارائه دهنده: احمد باقری

زمان: ۱۴۰۰/۰۳/۳۱ ساعت ۱۰:۳۰

اینجانب احمد باقری، موفق به اخذ مدرک کارشناسی زیست شناسی سلولی و مولکولی در سال ۱۳۸۱ از دانشگاه آزاد قم و نیز مقطع کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی، گرایش بیوشیمی در سال ۱۳۹۰ از دانشگاه تهران شرق شدم. و در حال حاضر دانشجوی مقطع دکتری بیوشیمی از دانشگاه رازی کرمانشاه می باشم. اینجانب در زمینه پروتئین، آنزیم شناسی و ایمونوشیمی دارای مهارت می باشم. اینجانب در این سالها از محضر اساتید برجسته ای همچون دکتر علی مصطفایی، دکتر رضا خدارحمی، دکتر سیروس قبادی و خانم دکتر سهیلا کاشانیان و دیگر اساتید ارجمند دانشگاه رازی بهره ها بردم.

ردیف	نام و نام خانوادگی	سمت
۱	دکتر سیروس قبادی	استاد راهنمای اول
۲	دکتر علی مصطفایی	استاد راهنمای دوم

۳	دکتر رضا خدارحمی	استاد مشاور
٤	دکتر حسین فلاحی	داور
٥	دکتر سهیلا کاشانیان	داور
٦	دکتر سهیلا محمدی(از دانشگاه علوم پزشکی)	داور خارجی
۷	دکتر مرتضی حسین‌زاده (از دانشگاه علوم پزشکی)	داور خارجی
۸	موسوی حمزه دکتر	نماینده تحصیلات تکمیلی

چکیده

سندرم افت تولید تخم‌مرغ یک بیماری ویروسی مهم در مرغ‌های تخم‌گذار است که با کاهش تولید تخم‌مرغ و افت کیفیت پوسته همراه بوده و خسارات اقتصادی قابل‌توجهی به صنعت طیور وارد می‌کند. اگرچه واکسن‌های غیرفعال رایج در کنترل این بیماری مؤثر هستند، اما نگرانی‌هایی از نظر ایمنی زیستی، احتمال ناکامل بودن غیرفعال‌سازی ویروس و واکنش‌های التهابی ناشی از ادجوانت‌های روغنی وجود دارد. در این راستا، توسعه واکسن‌های نوترکیب زیرواحدی ایمن و مؤثر به‌عنوان یک راهکار جایگزین مورد توجه قرارگرفته است. در این پژوهش، ویژگی‌های ساختاری، فیزیکوشیمیایی، آنتی‌ژنی و ایمنی‌زایی پروتئین نوترکیب فیبر ویروس سندرم افت تولید تخم‌مرغ کونژوگه‌شده به نانوذرات آلبومین سرم مرغ به‌عنوان یک کاندید واکسن زیرواحدی نوین بررسی شد.

نتایج نشان داد که با بهینه‌سازی توالی ژنی بخش کروی فیبر ویروس، امکان بیان محلول فیبر ویروس سندرم افت تولید تخم‌مرغ در سیستم *E. coli* فراهم شد و بازدهی مناسبی از پروتئین محلول و فعال به‌دست آمد. آزمون‌های هماگلوتیناسیون، انتشار ایمنی دوسویه و الایزا، گردهمایی صحیح سه‌تایی و حفظ ویژگی آنتی‌ژنی پروتئین را تأیید کردند. نانوذرات آلبومین سرم مرغ با استفاده از روش حلالیت‌زدایی و در شرایط ملایم تهیه شدند و از نظر اندازه (حدود ۱۱۲ نانومتر)، توزیع یکنواخت و پتانسیل زتا، پایداری و زیست‌سازگاری مطلوبی را از خود نشان دادند. کونژوگه‌سازی پروتئین نوترکیب فیبر ویروس سندرم افت تولید تخم‌مرغ به نانوذرات موجب افزایش اندازه ذرات تا حدود ۱۳۰ نانومتر شد که بیانگر کونژوگه شدن موفق آنتی‌ژن بود، بدون آن‌که تغییر معنی‌داری در ساختارهای دوم و سوم پروتئین ایجاد کند.

ارزیابی‌های ایمنی‌زایی نشان داد که فرمولاسیون پروتئین نوترکیب فیبر ویروس سندرم افت تولید تخم‌مرغ کونژوگه‌سازی شده به نانوذرات موجب القای پاسخ‌های هومورال قوی‌تر و پایدارتر در مقایسه با پروتئین نوترکیب فیبر ویروس سندرم افت تولید تخم‌مرغ آزاد شده و سطوح بالاتری از آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و مهارکننده هماگلوتیناسیون ایجاد کرده که با واکسن تجاری قابل مقایسه است. افزون بر این، پاسخ ایمنی سلولی نیز به‌طور معنی‌داری تقویت شده، که افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها و ترشح افزایش یافته اینترفرون-گاما و اینترلوکین-٤ آن‌را گواهی می‌دهد و نشان از برانگیختگی متوازن پاسخ‌های هر دو لنفوسیت‌کمکی ۱ و ۲ دارد. در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که فرمولاسیون پروتئین نوترکیب فیبر ویروس سندرم افت تولید تخم‌مرغ کونژوگه‌سازی شده به نانوذرات با برخورداری از ایمنی زیستی بالا، پایداری مناسب، ایمنی‌زایی قوی و قابلیت تولید مقرون‌به‌صرفه، می‌تواند به‌عنوان یک کاندید امیدبخش برای توسعه واکسن‌های زیرواحدی نسل جدید علیه بیماری سندرم افت تولید تخم‌مرغ به‌خدمت گرفته شود. هر چند، انجام بررسی‌های بیشتر ضروری است.

کلیدواژه: سندرم کاهش تولید تخم‌مرغ، واکسن زیرواحدی، پروتئین فیبر نوترکیب، نانوذرات آلبومین سرم مرغ، ایمنی‌زایی، نانوواکسن

Abstract

Egg drop syndrome is an important viral disease in laying hens characterized by reduced egg production and deterioration of eggshell quality, causing substantial economic losses to the poultry industry. Although conventional inactivated vaccines have been effective in controlling this disease, concerns remain regarding biosafety, the possibility of incomplete viral inactivation, and inflammatory reactions induced by oil-based adjuvants. In this context, the development of safe and effective recombinant subunit vaccines has attracted considerable attention as an alternative strategy. In the present study, the structural, physicochemical, antigenic, and immunogenic properties of a recombinant fiber protein of egg drop syndrome virus conjugated to chicken serum albumin nanoparticles were evaluated as a novel subunit vaccine candidate.

The results demonstrated that following optimization of the gene sequence encoding the globular domain of the fiber protein, soluble expression of the egg drop syndrome virus fiber protein in the *E. coli* system was achieved, yielding adequate amounts of soluble, biologically active protein. Hemagglutination, double diffusion, and ELISA assays confirmed the correct trimeric assembly and preservation of antigenic properties of the protein. Chicken serum albumin nanoparticles were prepared by the desolvation method under mild conditions and exhibited favorable characteristics in terms of size (~112 nm), uniform distribution, surface zeta potential, stability, and biocompatibility. Conjugation of the recombinant egg drop syndrome virus fiber protein onto the nanoparticle increased the particle size to ~130 nm, indicating successful antigen attachment, without causing any significant alteration in the protein's secondary or tertiary structures.

Immunogenicity assessments demonstrated that the nanoparticle-conjugated recombinant fiber protein formulation elicited stronger and more sustained humoral immune responses than the free recombinant fiber protein, resulting in higher levels of neutralizing and hemagglutination-inhibition antibodies comparable to those induced by the commercial vaccine. In addition, the cellular immune response was significantly enhanced, as evidenced by increased lymphocyte proliferation and elevated secretion of interferon-gamma and interleukin-4, indicating a balanced stimulation of the responses of both T helper lymphocytes 1 and 2. Overall, the findings of this study suggest that the nanoparticle-conjugated recombinant fiber protein formulation, with its high biosafety, suitable stability, strong immunogenicity, and cost-effective production potential, may serve as a promising candidate for the development of next-generation subunit vaccines against egg drop syndrome. However, accomplishment of further investigations is necessary.

Keywords: Egg drop syndrome, Subunit vaccine, Recombinant fiber protein, Chicken serum albumin Nanoparticles, Immunogenicity, Nanovaccine.