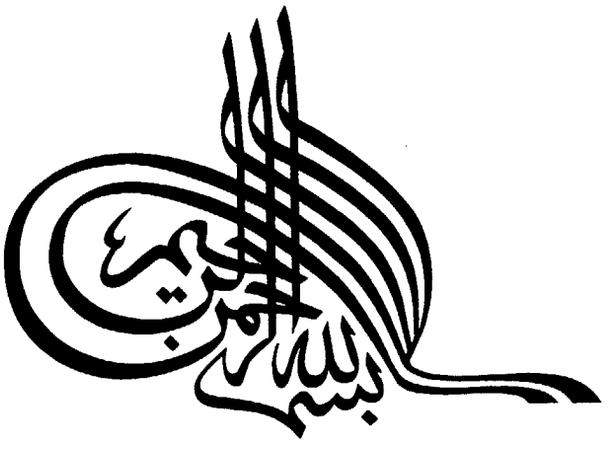


٣٩٣٩٨

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیوفیزیک

۱۳۸۰ /۱۱/ ۲۴

بررسی تغییرات بنای فضایی DNA ناشی از اندرکنش با دندروزوم ولیپوزوم دندریتیک کاتیونی به کمک روشهای دورنگ نمایی دورانی (CD) و طیف سنجی فلورسانس

016212

نگارش:

لیلا خاکی

استاد راهنما:

دکتر محمد نبی سربلوکی

اساتید مشاور:

دکتر حسین نادری منش

دکتر بیژن رنجبر

۳۹۳۹۵

پاییز ۱۳۸۰

۳۹۳۹۵

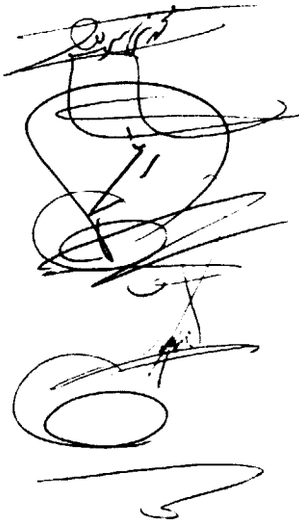
تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعـضـای هیـئـت داوران نـسخـهٔ نـهایی پایان نامه خـانم/ آقای لیلا خاکی

تحت عنوان: **بررسی تغییرات بنای فضای *DNA* ناشی از اندرکنش با دندروزوم و لیپوزوم دندریتیک کاتیونی به کمک روش‌های دو رنگ‌نمایی دورانی *(CD)* و طیف‌سنجی فلورسانس**

را از نظر فرم و محتوات بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجه کارشناسی‌ارشد مورد تایید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر محمدنبی سربلوکی	استاد	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر حسین نادری‌منش	دانشیار	
۳- استاد مشاور	آقای دکتر بیژن رنجبر	استادیار	
۴- استاد ناظر	آقای دکتر مجید صادقی‌زاده	استادیار	
۵- استاد ناظر	آقای دکتر حمید مباشری	استادیار	
۶- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر مجید صادقی‌زاده	استادیار	



بسمه تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ بیوفیزیک است که در سال ۱۳۸۰ در دانشکدهٔ علوم پایه دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر محمدی سربرکی، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر حسین نادری منش و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر بیژن رنجبر از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب لیلا حاکی دانشجوی رشته بیوفیزیک مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: لیلا حاکی

تاریخ و امضا: ۸۷/۰۲/۱۷

تقدیم به:

همه کسانی که مرا آموختند

تشکر و قدردانی

- بـا تشکر فراوان از خانواده ام - بویژه پدر و مادرم - که همراهان صمیمی و همیشگی من بوده و هستند.
- بـا تشکر از استاد گرامی جناب آقای دکتر محمدنبی سربلوکی که از راهنمائی های ارزنده و بیدریغ ایشان بهره مند شدم.
- بـا تشـکر از اساتید محترم مشاور جناب آقای دکتر نادری منش و جناب آقای دکتر رنجبر بخاطر زحمات و تلاش فراوانشان.
- بـا تشـکر از اعضاء محترم هیئت داوران جناب آقای دکتر صادقی زاده و جناب آقای دکتر مباشری که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را پذیرا شدند.
- بـا تشکر از اساتید و کادر محترم هیئت علمی و مسئول محترم آزمایشگاه بیوشیمی سرکار خانم زرندی.
- بـا تشکر از معلم عزیز و همیشگی ام ، مسئول محترم کتابخانه دانشکده علوم جناب آقای عمرانی به پاس تلاش و زحمات فراوانشان.
- بـا تشکر فراوان از همراه و دوست عزیزم خانم لیلا بهادری طولابی بخاطر فدارکاری ها و محبـت های یگانه و همیشگی اش و تشکر از همکلاسیهای بسیار خوبم آقای تقدیر و آقای مهرنژاد.
- بـا تشـکر از همـه دوسـتان عزیـزم بویـژه همکـاران خوبـم در آزمایشگاههای بیوفیزیک، بیوترمودینامـیک، مدلیـنگ، بیوشـیمی، ژنتـیک، NMR ، شـیمی و گیاهـی تربیـت مدرس و آزمایشگاه ماکروملکولهای حیاتی دانشگاه تهران.
- و با تشکر از کلیه عزیزانی که به نوعی مرا در انجام این پایان نامه یاری دادند.

چکیده

امروزه انتقال ژن به دلیل توانایی درمان بسیاری از بیماریها و کاربردهای فراوانش در بیوتکنولوژی از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین دلیل طراحی یا ساخت حامل مناسب به منظور انتقال هرچه بهتر ژن هنوز هم از مسائل مهم و پرطرفدار علم زیست شناسی محسوب میشود.

معمولا برای تعیین کیفیت و کمیت کارایی های یک حامل جدید، گروههای تحقیقاتی متعددی آن را از جنبه های گوناگون مورد بررسی قرار می دهند. یکی از جنبه های مورد بحث در این زمینه، بررسی چگونگی و مقدار تغییراتی است که حامل به DNA تحمیل می کند.

این تحقیق نیز به بررسی تغییرات ساختمانی دو نوع DNA پلاسمیدی و ژنومی (تیموسی) ناشی از همراهی آنها با دو نوع حامل: دندروزم F_1 (نوعی پلیمر سنتزی جدید) و لیپوزوم دندریتیک بار مثبت با استفاده از روشهای دو رنگ نمایی دورانی (CD) و طیف سنجی فلورسانس، می پردازد.

این تغییرات همگی در غلظتهای کم تا غلظتهای زیاد این حاملهای بررسی شده اند، در آزمایشی دیگر با دو نوع پلاسمید با میزان درصد GC متفاوت، حساسیت هر یک از حاملها نسبت به درصد GC بررسی شد و نتایج نشان داد که دندروزوم F_1 کاملا نسبت به درصد GC حساس است. همچنین به کمک واسرشت سازی حرارتی (CD)، میزان تغییرات پایداری DNA هنگام مجاورت با حاملها گزارش شده و در پایان با توجه به بررسی این تغییرات مدل پیشنهادی برای مکانیسم اندرکنش DNA با دندروزوم F_1 و لیپوزوم دندریتیک بار مثبت، ارائه گردیده است.

لغات کلیدی : دی اِن ای ، دندروزوم ، لیپوزوم ، دورنگ نمایی دورانی ، فلورسانس

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول - مقدمه

۱- پیشگفتار ۱

۱-۱- لیپوزومها ٤

۱-۱-۱- لیپوزومها دارای انواع جند جداره‌ای نیز می‌باشند ٥

۱-۱-۲- ترکیبهای ساختمانی پیشنهادی DNA - لیپوزوم ٦

۱-۲- دندریمرها ۸

۱-۲-۱- دندریمرهای پلی‌آمیدو آمین ۹

۱-۲-۲- دندروزومها ۱۰

۱-۳- تغییرات ساختمانی DNA ناشی از اندرکنش‌های قابل برگشت ۱۲

۱-۳-۱- اتصال خارج از مارپیچ مضاعف دو رشته یا اتصال به زنجیره اصلی قند فسفاتی ۱۳

۱-۳-۲- تاثیر انواع کاتیونها بر DNA ۱٦

۱-۳-۳- پیوند به شیارها ۱۹

۱-۳-٤- اندرکنش حلقه‌های آروماتیک مسطح بین جفت بازها ۲۰

۱-۳-٤-۱- نیروهای رج‌بندی بین بازها ۲۲

۱-۳-٤-۲- اثرات ناشی از مولکولهایی که در بین جفت بازهای DNA قرار می‌گیرند ۲٥

عنوان | صفحه

فصل دوم - مواد و روشها

۲- مواد و روشها ۲۸

۲-۱- روش تکثیر و تخلیص DNA پلاسمیدی ۲۸

۲-۲- روش ساخت لیپوزوم ۳۳

۲-۲-۱- تخلیص فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ ۳۳

۲-۲-۲- کروماتوگرافی لایه نازک ۳٤

۲-۲-۳- روش تهیه لیپوزوم ۳٤

۲-۳- روش دو رنگ نمایی دورانی (CD) ۳۵

۲-۳-۱- روش آماده سازی نمونه‌ها ۳۵

۲-۳-۲- طیف گیری به روش دو رنگ نمایی دورانی(CD) ۳۵

۲-٤- روش طیف سنجی فلورسانس ۳٦

فصل سوم - نتایج

۳- نتایج ۳۹

۳-۱- روش دو رنگ نمایی دورانی ۳۹

۳-۲- روش فلورسانس ٤۵

فصل چهارم - بحث و نتیجه‌گیری

٤- بحث و نتیجه‌گیری ۷۸

٤-۱- مطالعه اندرکنش DNA با لیپوزوم شاخه‌دار بار مثبت و دندروزوم از طریق روش دو رنگ نمایی دورانی (CD) ۸۰

عنوان **صفحه**

٤-١-١- بررسی تاثیر دندروزوم (F_1) بر ساختار فضایی DNA ٨١

٤-١-٢- بررسی تاثیر لیپوزوم شاخه‌دار بار مثبت بر ساختار فضایی DNA ٨٤

٤-١-٣- بررسی میزان حساسیت حاملها به میزان درصد GC در DNA توسط روش دو رنگ نمایی دورانی ٨٦

٤- ٢- بررسی تغییرات ساختمانی DNA ناشی از حاملهای دندروزوم (F_1) و لیپوزوم شاخه‌دار بار مثبت با روش فلورسانس ٨٧

٤- ٣ پیشنهادات ٩٢

مقدمه

پیشگفتار:

اسیدهای نوکلئیک نه تنها تشکیل دهنده ماده وراثتی موجودات زنده‌اند،بلکه به مرور زمان بر اهمیت کاربرد آنها برای مقاصد دارویی افزوده می‌شود. بعنوان مثال امروزه اسیدهای نوکلئیک به صورت ژن (۱و۲)واکسن والیگونوکلئوتیدهای معکوس (۵-۳) دارای کاربرهای درمانی فراوانی نظیر پیشگیری از بیماریهای ارثی ویروسی و انواع سرطان می‌باشند، که در اکثر این موارد انتقال ژن نقش اساسی را ایفا می‌کند.

از بین راههای مختلفی که امروزه برای انتقال اسیدهای نوکلئیک به یاخته‌ها کاربرد دارد، می‌توان به روش‌های گوناگون از قبیل رسوب دادن با فسفات کلسیم (٦)، ریز تزریق، dextran-DEAE (۸و۷)، رتروویروسها و ویروسها، همچنین لیپوزمها، دندریمرهای[1] پلی‌آمید و آمین[2] و پلی‌اتیلن ایمنی[3] اشاره کرد(۹).

از روش فسفات کلسیم برای انتقال DNA به تعداد نسبتاً زیادی سلول، در محیط کشت استفاده می‌شود. اما به دلیل آنکه صدمه زیادی به غشای سلولها وارد می‌آورد برای کاربرد در بدن موجودات زنده روش مطلوبی نیست (۱۰و۱۱)، و از آنجایی که روش ریز تزریق قادر است فقط نوکلئیک را به یک سلول منتقل کند، برای انتقال همزمان DNA (یاRNA)به داخل تعداد زیادی سلول در بدن انسان قابل استفاده نیست (۱۱و۱۳) همچنین از معایب استفاده از رتروویروسها در انتقال DNA احتمال تکثیر این ویروسها در بدن و ایجاد سرطان می‌باشد(١٤و١٥) علیرغم آنکه حاملین ویروسی امروزه نیز برای انتقال ژنها کاربرد دارند این نوع حاملین نیز با مشکلاتی نظیر ظرفیت کم برای حمل، امکان ایجاد اختلالهای ناشی از ویروس و عدم توانایی هدفگیریشان برای نوع خاصی از سلولها، روبرو هستند.

---

[1] Dendrimers

[2] Polyamidoamine(PAMAM)

[3] Polyethylenimine(PEI)

بـنظر مـی‌رسـد یکی از موثرترین روشهای شناخه شده برای اسیدهای نوکلئیک به سلولهای و بافتها هم در محیط کشت و هم در داخل بدن موجودات زنده استفاده از لیپوزومهاست.

بـار الکتریکـی لیپوزومها، عامل مهمی است که باید هنگام کاربرد آنها در زمینه انتقال اسیدهای نوکلئـیک در نظـر گرفته شود. همانطور که می‌دانیم به دلیل طبیعت پلی‌آنیونی DNA، نفوذ آن از میان سـلولهای یوکاریوتی و همچنین انتقالش به سطح سلول که اغلب غنی از بارهای منفی است با مشکل فراوانـی روبروسـت. بـرای حل این مسئله و به منظور انتقال ژن، حاملهای مصنوعی مثل لیپوزومها و لیپیدهای کاتیونی و مواد فعال سطحی دیگر طراحی شدند (۲۰-۱۶).

لیپوزومهای بار مثبت،۱۰تا ۱۰۰ برابر بیشتر از لیپوزومهای بار منفی یا خنثی، می‌توانند DNA را منتقل کنند و از این لحاظ حامل بسیار مناسبی بشمار می‌آیند.

امـا از طـرف دیگردر برخی پژوهشها نشان داده شده است که استفاده از لیپوزومهای بار مثبت علـیرغم تمام مزایای آن ممکن است در بدن سبب بروز برخی عوارض نامطلوب شود (۲۱). در واقع ایـن امکـان وجود دارد که حاملهای کاتیونی طراحی شده، در اثر اندرکنش با یونهای منفی خون و یا آنیونهای موجود در آب میان بافتی غیرفعال شوند (۲۲).

از ایـنرو بـا وجود آنکه لیپوزومهای بار مثبت مقدار DNA زیادی را منتقل می‌کنند. محققین به مـنظور بهیـنه کـردن روشـهای انتقال به دنبال تولید حاملهای غیر مثبت یا حاملهایی با بار مثبت کمتر می‌باشند.

ایـن جسـتجو مـنجر بـه پیشـنهاد بعضـی از پلـیمرهای سنتزی به منظور انتقال ژن گردید. این سیستم‌ها بر اساس اندرکنش الکترواستاتیک با DNA پایه‌ریزی نمی‌شوند، و پیش‌بینی می‌شود سرعت آزاد سـازی DNA از ایـن کمـپلکس‌هـای غـیر الکترواسـتاتیکی، بیشـتر از سرعت آزاد سازی آن از کمپلکس لیپد بار مثبت باشد.

بـا ایـن همه هنوز بحث بر سر مزایا و معایب حاملین DNA، بسیار است و گروههای تحقیقی بیشماری از جنبه‌های متفاوت، دست‌اندرکار بررسی این حاملین پیشنهادی می‌باشند.

برخی از ویژگیهایی که برای یک حامل مناسب در نظر گرفته می‌شود، عبارتند از:

- توانایی حمل مقادیر زیاد DNA
- سرعت مناسب در آزادسازی DNA
- کم بودن تغییرات ساختمانی (در حد امکان بدون تغییر بودن) DNA، ناشی از همراهی آن با حامل مورد نظر.
- ایـن تحقـیق بـه بررسـی آخر،یعنی بررسی تغییرات ساختمانی DNA ناشی از انتقال آن با لیـپوزوم شاخه دار بار مثبت و دندروزمها (نوعی پلیمرسنتزی جدید) به کمک روشهای دو رنگ نمایی دورانی[1] (CD) و طیف سنجی فلورسانس[2] می‌پردازد. در روش دو رنگ نمایی دورانـی (CD) تغیـیرات سـاختمانی دوم DNA مورد بررسی قرار گرفته و در روش طیف سـنجی فلورسـانس مقادیر کمی اتصال اتیدیوم بروماید به DNA در حضور حاملین مورد نظر، مطالعه شده است. علاوه بر آن با مطالعه واسرشت سازی حرارتی DNA در حضور و عدم حضور این حاملها، دمای انتقال (Tm) و انرژی آزاد آنها در دمای ۲۵° C در غلظتهای متفاوت محاسبه شده است.

[1] Circular Dichroism

[2] Fluoresence Spectroscopy

۱-۱- لیپوزومها:

در سال ۱۹٦۵ دکتر الک بنگهام (Bangham)و همکارانش، برای نخستین بار متوجه شدند که فسفو لیپیدها در آب به صورت وزیکولهای چند جداره‌ای در می‌آیند که هر جداره غشایی دو لایه از مولکولهای فسفولیپید است، این غشاهای لیپیدی ابتدا بنگوزوم و سپس لیپوزوم نام گرفت(۲۳).

لیپوزومها گویچه‌های بسیارریزی هستند که از فسفو لیپیدهای غیرسمی و کلسترولها ساخته می‌شوند. به عبارت دیگر لیپوزومها شکل بسیار ساده غشاهای سلولی یا یاخته‌ای تو خالی‌اند که درون و بیرون آنها را آب فرا گرفته است.

لیپیدهایی که به تنهایی قادر به تشکیل ساختمان خاص لیپوزوم هستند، شامل: فسفاتیدیل کولین فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل اینوزیتول، فسفاتیدیک اسید، کاردیولیپین و اسفنگومیلین می‌باشند.

تعدادی از لیپیدهای طبیعی و مصنوعی نیز وقتی با لیپیدهای ساختمانی فوق‌الذکر مخلوط شوند می‌توانند لیپوزوم تشکیل دهند، که در این میان می‌توان از کلسترول، فسفاتیدیل اتانل آمین دی استیل فسفات و استئاریل آمین نام برد (۲٤).

در دهه ۱۹۸۰ استعداد کاربرد لیپوزومها در صنایع دارویی و پزشکی کاملاً شناخته شد. از آن تاریخ تاکنون لیپوزومها در زمینه‌های گوناگون بکار گرفته شده‌اند که از آن میان می‌توان به غشاهای سلولی، انتقال دارو، انتقال ماده وراثتی، انتقال پروتئینها، ساخت مواد آرایشی و تولید واکسن اشاره کرد (۲٦و۲۵).خوشبختانه به دلیل سازگاری لیپوزومها و وجود مواد طبیعی در ساختار شیمیایی آنها در حال حاضر برخی از فراورده‌های لیپوزومی پس از انجام مراحل مختلف آزمایشگاهی برای استفاده انسان تصویب شده است (۲۱).

همانطور که در شکل (۱۰۱) دیده می‌شود لیپوزومها را می‌توان مطابق مصارف مختلفی که در پزشکی یا علوم در نظر است تغییر داد و اشکال متنوعی از آنها را تهیه کرد(۳۱-۲۷):