بسم الله الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامه **هادی نجفی حاجیور** رشته **ژنتیک** به شماره دانشجویی **۸۸۵۱۱۰۱۰۲۰** تحت عنوان : **" بررسی هم بیانی ژن occ-1 با ژن مجاور آن، appl2 در رده ی سلولی کارسینومای کولون "** از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجهٔ کارشناسی‌ارشد مورد تائید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱-۱ استاد راهنما	دکتر بهرام محمد سلطانی	استادیار	
۱-۲ استاد مشاور	دکتر سید جواد مولی	دانشیار	
۱-۳ استاد ناظر داخلی	دکتر مهرداد بهمنش	دانشیار	
۱-۴ استاد ناظر خارجی	دکتر مسعود سلیمانی	دانشیار	
۱-۵ نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر مجید صادقی زاده	استاد	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب ..... دانشجوی رشته ..... ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۸ .....
مقطع ..... دانشکده ..... متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: .....

تاریخ: ۱۳۹۱/۱۲/۲۴

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ ~~رساله دکتری~~ نگارنده در رشته مرتبط کامپیوتر است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده علوم ریاضی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر بهرام محمدخانی ، مشاوره ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر سعید جاوید و ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر ــــ از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند 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 ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب هادی کفی دانشجوی رشته مرتبط کامپیوتر مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: هادی کفی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴

دانشگاه تربیت مدرّس

دانشکده علوم زیستی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد ژنتیک

عنوان:

بررسی هم‌بیانی ژن OCC-1 به همراه ژن مجاور آن، APPL2، در سرطان کولورکتال

نگارش:

هادی نجفی حاجیور

استاد راهنما:

دکتر بهرام محمدسلطانی

استاد مشاور:

دکتر سید جواد مولی

تیر ۱۳۹۱

تقدیم

حاصل هرآنچه را کم یا زیاد ای پدر، مادر، تقدیم تو باد

تشکر و قدردانی

با تشکر از الطاف خداوند که شامل همه‌ی بندگانش است، از زحمات و صبوری خانواده‌ام در این راه تشکر و قدردانی می‌کنم . از مدرس علم و زندگی خودم آقای دکتر بهرام محمد سلطانی تشکر فراوان دارم و امیدوارم همواره در زندگی خود پله‌های ترقی را مثل همیشه طی کنند. هم‌چنین از دکتر سید جواد مولی استاد مشاورم که همواره دوستشان داشته‌ام تشکر می‌نمایم . برای ایشان نیز آرزوی موفقیت‌های روزافزون دارم . از سایر اساتید گروه (آقای دکتر صادقی‌زاده و آقای دکتر بهمنش) به پاس همه‌ی درسهایی که به من داده‌اند تشکر به عمل می‌آورم . در پایان از تمام آنهایی که در دوره‌ی کارشناسی ارشد یاریگر من بوده اند تشکر می‌کنم .

دست در دست هم نهیم بمهر کشور خویش را کنیم آباد

چکیده:

با در دسترس بودن توالی ژنوم انسان جستجو در مورد ارتباط بین ژنوم و بیماریها ضروری به نظر می‌رسد. روشهای اخیر مبتنی بر بررسی‌های ژنومی به قسمت‌هایی از ژنوم اشاره دارد که با سرطان مرتبطند و به آنها "نواحی مستعدکننده‌ی سرطان" می‌گویند. در این تحقیق ما با بهره از روشی متفاوت از روشهای ژنومیک، به ناحیه‌ی مستعد کننده‌ی جدیدی از سرطان کولورکتال و جمع‌آوری شواهدی مبنی بر این واقعیت پرداخته‌ایم. این ناحیه شامل دو ژن OCC-1 و APPL2 است. این رابطه از نوع هم‌بیانی منفی است و منحصر به سرطان کولون است. این یافته‌ها ما را به یافتن سایر ژنهای مرتبط با سرطان کولورکتال سوق داد. بنابراین دو رونوشت از دو ژن در پائین‌دست ژن OCC-1 که منطقه‌ای فقیر از ژن بود یافت شد. یکی از این رونوشتها در واقع از ژن کاذب ST13 بنام ST13P3 بدست می‌آید. برای اولین بار ما بیان بالای این ژن را در دو رده‌ی سلولی MCF-7 وHep-G2 مشاهده کردیم. بررسی بیان این رونوشت بیان بالای این رونوشت را در سرطان کولورکتال مشخص ساخت. برای شناسایی نقش ژن کلیدی و مهم این ناحیه (OCC-1) بیش‌بیان و ایمونوسیتوشیمی انجام شده و نقش تنظیمی این ژن بر ژن مجاور خود یعنی APPL2 و نیز هسته‌ای بودن این را مشخص ساخت. هم‌چنین مشخص شد که بیش‌بیان رونوشت کامل آن تنها باعث کاهش بیان ژن APPL2 خواهد شد البته پروتئین این ژن همچنانکه مطالعات پیشین نشان داده است دارای عملکرد است. و بنابراین ما جایگاه این پروتئین را مشخص ساختیم.

کلیدواژه: سرطان کولون، RNA غیر کدکننده، بررسی هم‌بیانی، چارچوب خوانش باز، پتانسیل کدکنندگی

فهرست مطالب

فصل ۱- مقدمه ۱

۱-۱- ژنوم انسان ۲

۱-۱-۱- مرحله تعیین توالی ژنوم و پروژه ژنوم انسان ۲

۱-۲- درمان سرطان ۳

۱-۳- حوزه پسا ژنومیک ۳

۱-۴- اساس سازماندهی ژنوم یوکاریوتی ۵

۱-۵- مکانیسم های هماهنگ کنندهی بیان ژنهای مجاور ۸

۱-۵-۱- بیان هماهنگ ژنها بواسطه وجود عوامل تنظیمی مشترک ۸

۱-۵-۲- اثر وجود توالی جداکننده بین ژنهای مجاور بر همبیانی آنها ۱۱

۱-۵-۳- فرضیه ها ۱۲

۱-۶- اثر نوع سازماندهی ژنها بر روی الگوی بیانی آنها ۱۴

۱-۷- تاریخچه و اهمیت بررسی هم بیانی ژنها در سرطان ۱۷

۱-۸- اهمیت اطلاعاتی که از بررسی هم‌بیانی ژنها در سرطان بدست می‌آید ۱۹

۱-۹- منطقه ژنومی 12q23.3 و نحوه سازمان یافتگی ژنها در این منطقه ۱۹

۱-۱۰- ژن OCC-1 ..... ۲۰

۱-۱۱- ژن APPL2 ..... ۲۱

۱-۱۱-۱- مسیرهای سیگنالی مرتبط با خانواده‌ی پروتئینی APPL: ۲۳

فصل ۲- مواد و روش‌ها ۳۲

۲-۱- طراحی آغازگرها ۳۳

۲-۲- توالی و مشخصات آغازگرها ۳۴

۲-۳- فراهم‌سازی بافت از بیماران سرطانی ۳۵

۲-۴- نمونه‌ی پرسشنامه طرح بیماران سرطان کولون ۳۷

۲-۵- استخراج RNA کل از بافتهای سرطانی و نرمال هرکدام از آنها ۳۸

۲-۵-۱- مواد و وسایل لازم: ۳۸

روش تهیه آب تیمار شده با DEPC ۳۹

مراحل کار استخراج RNA (طبق پروتوکل Invitrogen): ۳۹

۲-۶- بررسي كمي و كيفي RNA استخراج شده ۴۱

۲-۷- ساخت cDNA تک‌رشته‌ای از RNA کل ۴۱

مواد و وسایل لازم: ۴۱

مراحل انجام کار: ۴۲

2-8- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۴۳

۲-۹- بهينه سازي دماي انجام واكنش PCR ۴۴

۲-۱۰- الکتروفورز ژل آگارز ۴۵
محلول ها و بافرهاي مورد استفاده در الکتروفورز ژل آگارز ۴۵
۲-۱۰-۱- طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ژل آگارز ۴۶
۲-۱۰-۲- تهیه ژل ۴۷
۲-۱۰-۳- روش انجام الکتروفورز ژل آگارز ۴۷
۲-۱۰-۴- رنگ آمیزی ژل آگارز ۴۸
۲-۱۰-۵- عکسبرداری از ژل آگارز ۴۹
۲-۱۱- بررسی بیان نسبی ژنها ۴۹
۲-۱۱-۱- تکنیک Real Time PCR ۴۹
۲-۱۱-۲- ویژگی های تکنیک ۴۹
۲-۱۱-۳- روش های مرسوم انجام Real-time PCR ۵۰
۲-۱۱-۴- آنالیز داده‌ها ۵۲
۲-۱۱-۵- بازدهی ۵۵
۲-۱۲- کلون کردن ژنها ۵۵
۲-۱۲-۱- کلون کردن ORF ژن OCC-1 در وکتور بیانی pCMV-tag4 ..... ۵۶
۲-۱۲-۲- انتقال وکتور نوترکیب به باکتری مستعد DH5α جهت تکثیر ۶۰
۲-۱۳- کشت سلول ۶۷

۲-۱۳-۱- رده‌های سلولی سرطانی ۶۷
۲-۱۳-۲- تهیه بافر فسفات سالین (PBS) ۶۷
۲-۱۳-۳- تهیه محیط کشت DMEM و RPMI 1640 ..... ۶۸
۲-۱۳-۴- تهیه محلول تریپسین- EDTA(1X) ۶۸
۲-۱۳-۵- انجماد سلول‌ها ۶۹
۲-۱۳-۶- ذوب سلول‌ها ۷۰
۲-۱۳-۷- پاساژ سلول‌ها ۷۰
۲-۱۴- ایمونوسیتوشیمی (ICC) ۷۲
2-14-1- روش خاص کشت سلولهای Hela در جهت انجام ترانسفکشن با لیپوفکتامین ۷۲
۲-۱۴-۲- شمارش سلولها ۷۲
2-14-3- ترانسفکت کردن رده‌ی سلولی Hela ۷۳
2-14-4- ترانسفکشن سلول ۷۴
۲-۱۴-۵- انتخاب سلولهای ترانسفکت شده در برابر سلولهای غیر ترانسفکت شده ۷۴
2-14-6- روش تهیه‌ی محلولها و بافرهای لازم برای انجام ICC ۷۵
فصل ۳- نتایج ۷۹
۳-۱- کیفیت و کمیت RNA های استخراج شده ۸۰
3-2- ارزیابی کیفیت cDNA های سنتز شده از هرکدام از RNA های استخراج شده ۸۱

3-3- تعیین دمای بهینه‌ی اتصال پرایمرها به روش تجربی..... ۸۲

3-4- تایید اختصاصیت محصولات واکنش Real Time PCR..... ۸۳

۳-۵- بررسی بیان تمایزی ژن OCC-1 در بافتها و ردههای سلولی انسانی: ۸۷

3-6- بیان مقایسهای ژنها در بافتهای توموری و غیرتوموری کولورکتال..... ۸۸

۳-۷- بررسی بیان ژن OCC-1 در سایر سرطانها و مقایسه‌ی آن با بافتهای طبیعی ۸۹

۳-۷-۱- بررسی بیان ژن OCC-1 در ۱۰ نمونه از سرطان مری: ۸۹

۳-۷-۲- بررسی بیان ژن OCC-1 در ۵ نمونه از سرطان معده:..... ۹۰

۳-۷-۳- بررسی بیان ژن OCC-1 در۳ نمونه از سرطان مثانه:..... ۹۰

۳-۸- بررسی ارتباط بیان ژن OCC-1 و APPL2 بوسیلهی آنالیز هم‌بیانی..... ۹۱

۳-۹- کشف رونوشت حاصل از یک ژن کاذب در پائین دست ژن OCC-1:..... ۹۴

۳-۱۰- نقش مهاری ژن OCC-1 بر ژن APPL2: ۹۶

۳-۱۱- بیش‌بیان کردن ژن OCC-1 در رده‌های سلولی انسان: ۹۶

۳-۱۱-۱- تکثیر ORF ژن OCC-1 بوسیله‌ی PCR ۹۶

3-11-2- هضم آنزیمی دوگانه قطعه‌ی الحاق شونده (ORF مربوط به ژن OCC-1) ۹۸

۳-۱۱-۳- هضم آنزیمی دوگانه وکتور بیانی pCMV-tag4..... ۹۹

3-11-4- نتیجه‌ی تخلیص قطعات مطلوب بریده شده از ژل آگارز..... ۱۰۰

۳-۱۱-۵- الحاق ORF ژن OCC-1 با وکتور خطی شده‌ی pCMV-tag4: ۱۰۱

۳-۱۱-۶- استخراج وکتور نوترکیب از باکتری Ecoli-DH5α: ۱۰۲

۳-۱۲- انتقال طول کامل رونوشت OCC-1 به رده‌ی سلولی Hela: ۱۰۶

3-12-1- تکثیر و کلونینگ طول کامل رونوشت OCC-1 .....۱۰۶

۳-۱۳- ساخت وکتور بی اثر.....۱۰۸

۳-۱۴- تعیین مقدار کشندگی (LD) آنتی بیوتیک G418 بر سلولهای انسانی:.....۱۰۹

3-15- ایمونو-سیتوشیمی (ICC) ۱۱۱

۳-۱۵-۱- شناسایی پروتئین OCC-1 بعنوان یک پروتئین جدید هسته‌ای کوچک ۱۱۲

فصل ۴- بحث و نتیجه گیری ۱۱۶

۴-۱- اساس بررسی همبیانی ژنهای همسایه‌ی OCC-1 .....۱۱۷

۴-۲- اهمیت تحقیق: ۱۱۸

۴-۳- بررسی نواحی ژنومی اطراف OCC-1.....۱۱۹

۴-۳-۱- ناحیه‌ی بالادست OCC-1..... ۱۱۹

۴-۳-۲- ناحیه‌ی پائیندست ژن OCC-1..... ۱۲۰

۴-۴- ارتباط بیان ژن OCC-1 و ژن مجاور آن، APPL2 در سرطان کولورکتال: ۱۲۲

۴-۵- آیا ماهیت تنظیمی ژن OCC-1 بر ژن APPL2 پروتئین است؟ ۱۲۴

۴-۶- جایگیری پروتئین OCC-1 در هسته:.....۱۲۴

4-7- تعیین نقش ژن OCC-1 با استفاده از بررسی اثر آن بر متابولیسم سلولهای انسانی: ...۱۲۵

۴-۸- نتیجه گیری ۱۲۶

فهرست جدول ها

جدول ۲-۱) نام، توالی و مشخصات بکار برده شده در این طرح..... ۳۴

جدول ۲-۲) اطلاعات مربوط به نمونه‌های بافتی گرفته از بیماران..... ۳۶

جدول ۲-۳) اطلاعات نمونه‌های دریافتی بهصورت دسته‌بندی شده..... ۳۸

جدول ۲-۴) مواد موجود در واکنش PCR و مقدار مورد نیاز برای هرکدام..... ۴۴

جدول ۲-۵) برنامه واکنش زنجیرهای پلیمراز با شیب دمایی (Gradient PCR).....۴۵

جدول ۲-۶) دمای تجربی هرکدام از پرایمرهای موجود در این تحقیق.....۴۵

جدول ۳-۱) نتایج حاصل از اندازهگیری غلظت و خلوص RNA ها توسط نانودراپ.....۸۱

جدول ۳-۲) پلیتهای رشد باکتری Ecoli-DH5α و انواع کنترلهای لازم برای به حداقل رساندن خطای آزمایش ۱۰۲

جدول ۳-۳) بهینه سازی غلظت مناسب برای آنتیبیوتیک G418 برای انتخاب سلولهای Hela ترانسفکت شده... ۱۱۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱) نقش برهمکنش کروموزومی در تنظیم هماهنگ بیان ژنهای مجاور. ۶

شکل ۱-۲) نمایی از UCSC که ناحیه مربوط به ژن HOX-Da را نشان میدهد. ۷

شکل ۱-۳) بیان متناسب ژنها به واسطه‌ی داشتن فاکتورهای رونویسی مشترک. ۹

شکل ۱-۴) جزئیات بیان ژنPAX6 انسان در مقیاس بزرگ ژنومی..... ۱۱

شکل ۱-۵) A) همبستگی بین ژنهای ۱۲

شکل ۱-۶) همبیانی ژنهای مجاور بوسیله‌ی وضعیت کروماتین..... ۱۳

شکل ۱-۷) کنترل بیان ژنهای مجاور بوسیلهی عوامل داخل هسته. ۱۴

شکل ۱-۸) نحوه‌ی سازماندهی ژنوم یوکاریوتها و سطوح تنظیمی ۱۶

شکل ۱-۹) ناحیه‌ی ژنومی واقع در اطراف ژن OCC-1. ..... ۱۹

شکل ۱-۱۰) نمایی از ساختار ژن OCC-1. ..... ۲۰

شکل ۱-۱۱) نحوه‌ی فعالیت مسیر سیگنالی Wnt و اهمیت آن در ایجاد سرطان کولورکتال. ۲۴

شکل ۱-۱۲) طرح برهمکنش پروتئین APPL2 با جز دیگر خانواده‌ی APPL2 و سایر پروتئینهای مرتبط..... ۲۶

شکل ۱-۵) منطقهی کروموزومی 18q و نحوه‌ی سازماندهی ژنها در این منطقه. ۲۷

شکل ۱-۱۴) برهمکنشهای پروتئینهای APPL. ۲۹

شکل ۱-۱۵) ساختار پروتئینهای APPL1 و APPL2. ..... ۳۰

شکل ۱-۶) انواع رابطه‌ی بین بیان ژنها.. ..... ۳۱

شکل ۲-۱) نمودارهاي سيگموئيدي و لگاريتمي رسم شده توسط دستگاهReal-Time. ۵۰

شکل ۲-۱) نمايي شماتيک از روش‌هاي TaqMan و SYBR Green . ۵۱
شکل ۳-۲) انجام واکنش PCR با استفاده از cDNA های بافتهای توموری ۸۲
شکل ۳-۳) طرح الکتروفورز تعیین دمای بهینه بوسیله‌ی Gradient PCR ۸۳
شکل ۳-۴) طرح الکتروفورز ژل آگارز مربوط به ژنهای مطالعه شده در بافتهای سرطانی ۸۴
شکل ۳-۵) گرافهای Real Time PCR مربوط به هرکدام از ژنهای مورد مطالعه ۸۵
شکل ۳-۶) نتیجه‌ی تعیین توالی قطعهی ۲۸۱ جفت بازی مربوط به ژن OCC-1 ۸۶
شکل ۳-۷) ارزیابی بیان ژن OCC-1 در رده‌های سلولی ۸۷
شکل ۳-۸) بررسی بیان ژن OCC-1 در نمونه‌های سرطانی کولورکتال ۸۸
شکل ۳-۹) بررسی بیان ژن OCC-1 در ۱۰ مورد از سرطان مری در برابر بافت سالم. ۸۹
شکل ۳-۱۰) میزان رونوشت ژن OCC-1 در نمونه‌های توموری و غیر توموری سرطان معده ۹۰
شکل ۳-۱۱) میزان رونوشت ژن OCC-1 در نمونه‌های توموری و غیر توموری سرطان مثانه ۹۱
شکل ۳-۱۲) بررسی بیان ژن APPL2 در سرطان کولورکتال ۹۲
شکل ۳-۱۳) رابطه‌ی بیان ژن OCC-1 و APPL2 در سرطان کولورکتال. ۹۴
شکل ۳-۱۴) بیان بالا و قابل رویت رونوشت حاصل از رونویسی ۹۵
شکل ۳-۱۵) نتیجه‌ی PCR ژن OCC-1 در جهت کلون کردن ORF ۹۸
شکل ۳-۱۶) طرح برش آنزیمی دوگانه‌ی قطعه‌ی PCR ۹۹
شکل ۳-۱۷) طرح الکتروفورز برش آنزیمی وکتور.. ۱۰۰
شکل ۳-۱۸) طرح الکتروفورز نتایج استخراج محصولات هضم از ژ ۱۰۱
شکل ۳-۱۹) تائید صحت انجام الحاق ORF مربوط به ژن OCC-1 در وکتور pCMV-tag4 ۱۰۳

شکل ۳-۲۰) کلونی PCR برای تائید الحاق ORF در وکتور pCMV-tag4. ..... ۱۰۴

شکل ۳-۲۱) مراحل برش وکتور و رونوشت کامل OCC-1. ..... ۱۰۷

شکل ۳-۲۲) نتیجه تعیین توالی وکتور بی‌اثر. ۱۰۸

شکل ۳-۲۳) وکتورهای مورد نیاز در تحقیق. ۱۱۲

شکل ۳-۲۴) جایگیری پروتئین OCC-1 در هسته. ۱۱۴

شکل ۳-۲۵) مطالعه‌ی جایگیری زیرسلولی پروتئینها ۱۱۵

۴-۱) نمایی کلی از منطقه‌ی ژنومی ch12q23.3 به همراه فاصله‌ی هر ژن ۱۱۹

شکل ۴-۲) متیلاسیون ناحیه‌ی بالادست ژن کاذب ST13P3 ..... ۱۲۲

فصل ۱- مقدمه

۱-۱- ژنوم انسان

قسمت اعظم یافته‌های ما در مورد اساس ژنتیکی بیماریها، نتیجه مطالعه و بررسی ژنوم انسان است. در ابتدا تنها ارتباط بین ژنها و بیماریهای نادر تک‌ژنی (مندلی) مورد توجه قرار می‌گرفت و اساس ژنتیکی بسیاری از بیماریهای پیچیده مانند سرطان که سهم بیشتری نسبت به بیماریهای تک‌ژنی دارا می باشند بدلیل در دسترس نبودن اطلاعات ژنومی انسان ناشناخته باقی ماند.

۱ - ۱ - ۱ - مرحله تعیین توالی ژنوم و پروژه ژنوم انسان

با توسعه ابزارهای شناسایی ژنوم، بسیاری از فاکتورهای مرتبط با بیماریهای شایع ژنتیکی شناسایی شدند. پس از آن زمینه‌های تحقیقاتی زیادی در راستای مطالعه ژنوم و ارتباط آن با بیماریهای ژنتیکی و همچنین مکانیسم‌های ملکولی بوجود آورنده آنها شروع به کار کردند. بعدها با جمع آوری توالی کل ژنوم برخی موجوداتی مانند C-elegance و با استفاده از آنها بعنوان مدل مطالعاتی ژنوم انسان نقش کلی بسیاری از ژنهای مشابه انسانی در ایجاد بیماری تخمین زده شد[۲۳].