بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس

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

آقای علی نوری زاده رشته بیوشیمی بالینی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « ترانسفکت کردن سلولهای استرومایی مغز استخوان با وکتور حامل ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق ازرده سلولی گلیال (GDNF)و ارزیابی بیان آن در محیط In vitro » در تاریخ ۱۳۹۰/۷/۲۶ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر سید علیرضا مصباح نمین	(استاد راهنمای اصلی)	
دکتر تقی طریحی	(استاد راهنمای دوم)	
دکتر مهدی شمس آرا	(استاد ناظر)	
دکتر مسعود سلیمانی	(استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)	

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 دانشجوی 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 و یا 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 آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- 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 ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ 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 علی نوری زاده دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع کارشناسی ارشد دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین 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 آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

۱۳۹۰/۷/۲۰

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (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 پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

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

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی،راهنمای اول **دکتر سید علیرضا مصباح نمین** ، راهنمای دوم **دکتر تقی طریحی** از آن دفاع شده است.

ماده 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 اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه 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 **علی نوری زاده** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی علی نوری زاده

تاریخ و امضا ۱۳۹۰/۷/۲۰

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

ترانسفکت کردن سلول های استرومایی مغز استخوان با وکتور حامل ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده ی سلولی گلیال(GDNF) و ارزیابی بیان آن در محیط In vitro

نگارش

علی نوری زاده

اساتید راهنما

دکتر سید علی رضا مصباح نمین

دکتر تقی طریحی

پاییز ۱۳۹۰

تقدیم به :

پدر و مادر مهربانم

برادر و خواهران عزیزم

که به من مفهوم زندگی آموختند

و

تمام آنان که دوستشان دارم...

تشکر و قدردانی

در آغاز سخن سپاس بی‌منتهای خود را نثار اساتید گرانقدر راهنما می‌کنم که در این پژوهش مرا با سعه ی صدر و حوصله خویش راهنمایی نمودند ودر سرانجام رساندن این کار مرا یاری دادند:

آقای دکتر سید علی رضا مصباح نمین در مقام استاد راهنمای اول

آقای دکتر تقی طریحی در مقام استاد راهنمای دوم

از حمایت مالی مرکز علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم الانبیای تهران در انجام این پژوهش طبق طرح مصوب ۸۶-N-۱۰۵ کمال تقدیر و تشکر را دارم.

همچنین از گروه بیوشیمی بالینی و گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس و تمامی پژوهشگران و دوستان گرامی در مرکز علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم الانبیای تهران که از بذل تجربیات علمی و عملی خود به اینجانب دریغ نکردند و نیز از اساتید گران قدر ناظر سپاسگزاری می نمایم.

از زحمات و پشتیبانی های خالصانه پدر و مادر بزرگوار و مهربانم که در تمامی مراحل زندگی به من امید، آرامش و محبت هدیه کردند کمال امتنان را دارم و امیدوارم فرزندی صالح برای ایشان و جامعه بوده باشم.

چکیده

ترانسفکت کردن سلول های استرومایی مغز استخوان با وکتور حامل ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده ی سلولی گلیال(GDNF) و ارزیابی بیان آن در محیط In vitro

مقدمه : فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده ی سلولی گلیال (GDNF) از مهم ترین پروتئین ها در رشد و ترمیم سیستم عصبی است. هر گونه نقص در تولید و ترشح این پروتئین موجب اختلالات مختلفی در بازسازی سلول ها در بیماری های مخرب سیتم عصبی می شود.از گزینه های درمانی ممکن، نوروتروفیک درمانی با استفاده از ژن درمانی است. علاقه زیادی در ترمیم سیستم عصبی آسیب دیده با استفاده از پیوند سلول های سلول های بنیادی بالغین به مغز آسیب دیده وجود دارد. ترانسفکشن سلول های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) با وکتوربیانی حامل GDNF و ارزیابی بیان آن، یکی از اولین اهداف این مطالعه می باشد. مواد و روش ها : با استفاده از وکتور pLVPT-GDNF- rtTR - KRAB 2SM2 به عنوان الگو و دو پرایمر دارای جایگاه های آنزیمی *HindIII* و *XhoI*، pro-human GDNF توسط PCR تکثیر شد. محصول PCR خالص سازی شد و سپس در وکتور pSectag2/HygroB ساب کلون شد تا وکتور نوترکیب pSectag2/HygroB-Pro-GDNF حاصل شود.

BMSCs از رت جدا شده و کشت داده شدند. از نظر بیان CD 106،CD45، Fibronectin و CD44 به عنوان مارکرهای سلول های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفتند. سلول های BMSC با pro-GDNF pSectag2/HygroB-human ترانسفکت شده و با افزودن Hygromycin B درغلظت ۲۰۰µg/ml به محیط کشت سلولی پایدار شدند.این سلول ها برای ترشح GDNF با تکنیک های وسترن بلاتینگ و Real Time RT-PCRمورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج : نشان داده شد که سلول های ترانسفکت شده ی پایدار سطح بالایی از human GDNF را ترشح می کنند. بحث : سلول های ترانسفکت شده ی پایدارتوسط این وکتور به اندازه کافی پروتئین human GDNF را ترشح می کنند. این سلول های پایدار را می توان در کاربردهای بالینی ودر درمان اختلالات بازسازی سلول های عصبی استفاده کرد.

کلمات کلیدی : GDNF، BMSCs، سلول درمانی، Real Time RT–PCR، ژن درمانی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱.۱ : فاکتور نوروتروفیک مشتق از رده ی سلولی گلیال و خانواده ی آن ۲

۲.۱ : نقش های GDNF ۵

۳.۱ : سلول های بنیادی ۸

۴.۱ : سلول های بنیادی بالغین ۱۰

۵.۱ : درمان ضایعات عصبی و نخاعی ۱۳

۱.۵.۱ : سلول درمانی ۱۳

۲.۵.۱ : ترشح فاکتورهای نوروتروفیک در روش ژن درمانی ۱۴

۶.۱ : ژن درمانی ۱۵

۷.۱ : معرفی واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۷

۸.۱ : معرفی Real Time PCR ۱۸

۱.۸.۱ : TaqMan ۱۸

۲.۸.۱ : SYBER GREEN I DYE ۲۰

۱.۲.۸.۱ : نحوه ی عمل SYBER GREEN I DYE ۲۰

۲.۲.۸.۱ : مزیت های استفاده از SYBER GREEN I DYE ۲۱

۳.۲.۸.۱ : معایب SYBER GREEN I DYE ۲۱

۳.۸.۱ : Quantitation assays ۲۱

۴.۸.۱ : روش های آنالیز مقداری ۲۲

۹.۱ : اهداف این مطالعه ۲۵

۱.۹.۱ : هدف اصلی ۲۵

۲.۹.۱ : اهداف جزیی ۲۵

۱۰.۱ : فرضیه ۲۶

فصل دوم: مواد و روشها ۲۷

۲.۱ : ویژگی های وکتور بیانی ۲۸

۲.۲ : تهیه ی وکتور های pSecTag2/HygroB و pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 ..... ۳۰

۱.۲.۲ : تهیه باکتری مستعد ۳۲

۱.۱.۲.۲ : جداسازی وکتور pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 از کاغذ صافی ۳۲

۲.۱.۲.۲ : روش تهیه ی محیط کشت و محلول های مورد نیاز ۳۲

۳.۱.۲.۲ : محیط کشت LB جامد ۳۲

۴.۱.۲.۲ : کلرید کلسیم ۵۰ میلی مولار ۳۳

۵.۱.۲.۲ : روش فریز کردن باکتری های مستعد ۳۴

۶.۱.۲.۲ : انتقال پلاسمیدها به درون باکتری(ترانسفورماسیون) ۳۴

۷.۱.۲.۲ : استخراج پلاسمید pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 ..... ۳۵

۸.۱.۲.۲ : ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج شده ۳۸

۹.۱.۲.۲ : بررسی کیفی DNA استخراج شده در ژل آگارز ۳۹

۳.۲ : تائید وجود ژن GDNF بر روی وکتور حامل ۴۱

۱.۳.۲ : انجام هضم آنزیمی پلاسمید pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 ..... ۴۱

۲.۳.۲ : انجام PCR بر روی پلاسمید pLVPT-GDNF-rtTR-2SM2 ..... ۴۳

۳.۳.۲ : انجام Sequencing برای پلاسمید pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 ..... ۴۴

۴.۲ : تهیه ی وکتور بیانی pSecTag2/HygroB ۴۵

۵.۲ : تکثیر Pro-GDNF با PCR ۴۶

۱.۵.۲ : بهینه سازی تکثیر Pro-GDNF ۵۰

۲.۵.۲ : تائید برداشت با PCR ۵۱

۶.۲ : خالص سازی محصول PCR ۵۲
۷.۲ : هضم آنزیمی محصول PCR خالص شده ۵۳
۸.۲ : تخلیص محصول PCR هضم آنزیمی شده ۵۳
۹.۲ : هضم آنزیمی وکتور pSecTag2/HygroB ۵۴
۱۰.۲ : استخراج pSecTag2/HygroB هضم آنزیمی شده از ژل آگارز ۵۵
۱۱.۲ : فرایند اتصال توسط آنزیم لیگاز ۵۷
۱۲.۲ : ترانسفورم کردن باکتری DH5α مستعد با محصول لایگیشن ۵۸
۱۳.۲ : Colony-PCR ۵۸
۱۴.۲ : استخراج پلاسمید نوترکیب و ارزیابی کمی میزان آن ۵۹
۱۵.۲ : تائید وجود قطعه در باکتری های ترانسفورم شده ۵۹
۱.۱۵.۲ : انجام هضم آنزیمی برای پلاسمید pSecTag2/HygroB-GDNF ۵۹
۲.۱۵.۲ : انجام PCR برای پلاسمید pSecTag2/Hygro-GDNF ۶۰
۳.۱۵.۲ : انجام Sequencing برای پلاسمید pSecTag2/HgroB-GDNF ۶۰
۱۶.۲ : تهیه ی وکتور pEGFP-N1 ..... ۶۱
۱۷.۲ : نگه داری باکتری های ترانسفورم شده ۶۲
۱۸.۲ : استخراج سلول های استرومایی مغز استخوان ۶۳
۱.۱۸.۲ : روش تهیه محیط MEM-α ۶۳
۲.۱۸.۲ : استخراج سلول ۶۳
۳.۱۸.۲ : تهیه ی PBS ۶۴
۴.۱۸.۲ : بررسی زنده بودن سلول ها ۶۴
۵.۱۸.۲ : ایمونوسیتوشیمی و ارزیابی بیان مارکرهای BMSCs ۶۵
۶.۱۸.۲ : نگه داری سلول ها ۶۷
۷.۱۸.۲ : پاساژ سلول ها ۶۷

۸.۱۸.۲ : روش فریز کردن سلول ها ۶۸
۱۹.۲ : ترانسفکشن سلول ها با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ..... ۶۹
۱.۱۹.۲ : تعیین غلظت مناسب آنتی بیوتیک برای پایدار کردن سلول ها ۶۹
۲.۱۹.۲ : ترانسفکشن سلول ها ۷۰
۲۰.۲ : استخراج RNA از سلول های ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده ۷۱
۲۱.۲ : بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده ۷۳
۲۲.۲ : تیمار RNA های استخراج شده با DNase I ۷۳
۲۳.۲ : بررسی کمی و کیفی RNA های تیمار شده ۷۴
۲۴.۲ : الکتروفورز RNA ۷۴
۲۵.۲ : تهیه ی cDNA ۷۵
۲۶.۲ : اثبات بیان در سطح RNA با انجام PCR ۷۷
۲۷.۲ : اثبات بیان در سطح پروتئین با انجام SDS-PAGE ۷۹
۱.۲۷.۲ : ارزیابی وجود GDNF در FBS ۷۹
۲.۲۷.۲ : SDS-PAGE ۸۲
۳.۲۷.۲ : سازگار کردن سلول ها با محیط فاقد FBS ۸۳
۴.۲۷.۲ : جمع آوری مایع رویی سلول ها ۸۴
۵.۲۷.۲ : استخراج پروتئین از سلول ها ۸۵
۶.۲۷.۲ : روش برادفورد ۸۵
۷.۲۷.۲ : روش تهیه ی بافرها و مواد مورد نیاز SDS-PAGE ۸۶
۸.۲۷.۲ : انجام SDS-PAGE ۸۸
۹.۲۷.۲ : رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با نیترات نقره ۸۷
۲۸.۲ : وسترن بلاتینگ ۹۲
۱.۲۸.۲ : محلول رنگ آمیزی پانسو-اس ۹۳

۲.۲۸.۲ : انجام وسترن بلاتینگ ۹۳
۲۹.۲ : بررسی کمی بیان با روش Real Time PCR ۹۵

فصل سوم: نتایج ۱۰۱
۱.۳: بررسی کیفی pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 استخراج شده در ژل آگارز ۱۰۲
۲.۳ : تائید وجود ژن GDNF بر روی وکتور حامل ۱۰۳
۱.۲.۳ : انجام هضم آنزیمی پلاسمید pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 ..... ۱۰۳
۲.۲.۳ : انجام PCR بر روی پلاسمید pLVPT-GDNF-rtTR-2SM2 ..... ۱۰۴
۳.۲.۳ : انجام Sequencing برای پلاسمید pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 ..... ۱۰۵
۳.۳ : بررسی کیفی وکتور بیانی pSecTag2/HygroB استخراج شده در ژل آگارز ۱۰۷
۴.۳ : تکثیر Pro-GDNF با PCR ۱۰۸
۱.۴.۳ : بهینه سازی تکثیر Pro-GDNF ۱۰۸
۲.۴.۳ : تائید برداشت با PCR ۱۰۹
۵.۳ : هضم آنزیمی محصول PCR خالص شده و وکتور pSecTag2/HygroB ۱۱۰
۶.۳ : استخراج pSecTag2/HygroB هضم آنزیمی شده از ژل آگارز ۱۱۱
۷.۳ : Colony-PCR ۱۱۳
۸.۳ : استخراج پلاسمید نوترکیب ۱۱۴
۹.۳ : تائید وجود قطعه در باکتری های ترانسفورم شده ۱۱۴
۱.۹.۳ : انجام هضم آنزیمی برای پلاسمید pSecTag2/HygroB-GDNF ۱۱۴
۲.۹.۳ : انجام PCR برای پلاسمید pSecTag2/Hygro-GDNF ۱۱۵
۳.۹.۳ : انجام Sequencing برای پلاسمید pSecTag2/HgroB-GDNF ۱۱۶
۱۰.۳ : تهیه ی وکتور pEGFP-N1 و هضم آنزیمی آن ۱۱۹
۱۱.۳ : استخراج سلول های استرومایی مغز استخوان ۱۱۹

۱۲.۳ : ایمونوسیتوشیمی و ارزیابی بیان مارکرهای BMSCs ۱۲۱
۱۳.۳ : ترانسفکشن سلول ها با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ..... ۱۲۳
۱.۱۳.۳ : تعیین غلظت مناسب آنتی بیوتیک برای پایدار کردن سلول ها ۱۲۳
۲.۱۳.۳ : ترانسفکشن سلول ها با وکتور pEGFP-N1 ..... ۱۲۴
۳.۱۳.۳ : ترانسفکشن سلول ها با وکتور نوترکیب pSecTag2/HygroB-GDNF ۱۲۵
۱۴.۳ : استخراج RNA از سلول های ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده ۱۲۶
۱۵.۳ : الکتروفورز RNA های تیمار شده ۱۲۶
۱۶.۳ : اثبات بیان در سطح RNA با انجام PCR ۱۲۷
۱۷.۳ : اثبات بیان در سطح پروتئین با انجام SDS-PAGE ۱۲۹
۱.۱۷.۳ : ارزیابی وجود GDNF در FBS ۱۲۹
۲.۱۷.۳ : روش برادفورد ۱۳۰
۳.۱۷.۳ : ژل رنگ آمیزی شده پلی آکریل آمید با نیترات نقره ۱۳۳
۱۸.۳ : وسترن بلاتینگ ۱۳۴
۱۹.۳ : بررسی کمی بیان با روش Real Time PCR ۱۳۵

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۴۱
۱.۴ : بحث و نتیجه گیری ۱۴۲
۲.۴ : پیشنهادات ۱۶۱

فهرست منابع ۱۶۳
ضمائم ۱۸۲
چکیده انگلیسی ۱۸۷

فهرست جداول

جدول ۱.۲: برنامه ی دمایی PCR به منظور شناسایی وجود پری پروGDNF بر روی وکتور حامل..... ۴۴

جدول ۲.۲: برنامه ی دمایی PCR به منظور بهینه سازی تکثیر Pro-GDNF ۵۱

جدول ۳.۲: کاهش FBS در محیط کشت سلول های ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده..... ۸۳

جدول۴.۲: لیست مهارکننده های موجود در Protease inhibitor cocktail..... ۸۴

جدول ۵.۲: میزان مواد در واکنش های ۲۰µL ی در Real Time PCR..... ۹۷

جدول ۶.۲: ایجاد برنامه ی دمایی در نرم افزارPCR Step One Real Time به نام Step One Software..... ۱۰۰

جدول ۷.۲: برنامه ی دمایی Melt Curve در نرم افزارPCR Step One Real Time به نام Step One Software..... ۱۰۰

جدول ۱.۳: مقایسه ی اندازه ی rRNA در موجودات مختلف..... ۱۲۷

جدول ۲.۳: OD نمونه های استاندارد درآزمون برادفورد..... ۱۳۱

جدول ۳.۳: Ct تمامی نمونه ها..... ۱۳۹

فهرست نمودارها

نمودار ۱.۳: معادله ی خط و نمودار در آزمون برادفورد ۱۳۲

نمودار ۲.۳: تکثیر در مقابل ΔRn مربوط به کنترل منفی یا NTC در Real Time PCR..... ۱۳۶

نمودار ۳.۳: تکثیر در مقابل ΔRn مربوط به ژن GAPDH در سلول های BMSC ترانسفکت شده ی پایدار و ترانسفکت نشده در Real Time PCR..... ۱۳۷

نمودار ۴.۳: تکثیر در مقابل ΔRn مربوط به ژن GDNF در سلول های BMSC ترانسفکت شده ی پایدار و ترانسفکت نشده در Real Time PCR..... ۱۳۷

نمودار ۵.۳: نمودار ذوب (Melt Curve) تمامی نمونه ها ۱۳۸

فهرست شکل ها

شکل ۱.۱: خانواده ی لیگاندی GDNF و مقایسه توالی اسیدآمینه ای پیش ساز پروتئینی آن ها ۳

شکل ۲.۱: برهم کنش های لیگاند-رسپتور در خانواده یGDNF ، برهم کنش های قوی تر بافلش ممتد نشان داده شده است ۳

شکل ۳.۱: : مسیر پیام دهی GDNF با GFRα و Ret ۴

شکل ۴.۱: مسیر پیام دهی GDNF با NCAM ۵

شکل ۵.۱: روش های مختلف انتقال ژن در ژن درمانی ۱۶

شکل ۱.۲: نقشه ی پلاسمید pSecTag2/Hygro ۳۰

شکل ۲.۲: نقشه ی وکتور pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 ..... ۳۱

شکل ۳.۲: توالی بازهای pSecTag2/HygroA در ناحیه ی MCS ۴۹

شکل ۴.۲: توالی بازهای pSecTag2/HygroB در ناحیه ی MCS ۴۹

شکل ۵.۲: توالی بازهای pSecTag2/HygroC در ناحیه ی MCS ۵۰

شکل ۶.۲: نقشه ی وکتور pEGFPN1 ..... ۶۲

شکل ۷.۲: مکان قرارگیری میکروتیوب ها و نحوه ی چینش آن ها در Real Time PCR ۹۸

شکل ۸.۲: نحوی قرار گیری نمونه های این تحقیق در چاهک های Real Time PCR ۹۹

شکل ۱.۳: استخراج وکتور pLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۰۳

شکل ۲.۳: هضم آنزیمی وکتورpLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۰۴

شکل ۳.۳: انجام PCR بر روی وکتورpLVPT-GDNF-rtTR-KRAB-2SM2 و الکتروفورز آن بر روی ژل ۲٪ ۱۰۵

شکل ۴.۳: نتایج نرم افزار BLAST در سایت NCBI برای ژن Pre-pro-GDNF ۱۰۶
شکل ۵.۳: استخراج پلاسمید pSecTag2/HygroB و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۰۷
شکل ۶.۳: هضم آنزیمی وکتور pSecTag2/HygroB و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۰۸
شکل ۷.۳: برداشت قطعه ی پروGDNF و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۰۹
شکل ۸.۳: انجام PCR بر روی پرو GDNF و الکتروفورز آن بر روی ژل ۲٪ ۱۱۰
شکل ۹.۳: هضم آنزیمی وکتورpSecTag2/HygroB و پرو GDNF و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۱۱
شکل ۱۰.۳: الکتروفورز وکتور هضم آنزیمی شده بر روی ژل و استخراج آن از ژل ۱٪ ۱۱۲
شکل ۱۱.۳: مقایسه ی غلظت پروGDNF هضم آنزیمی شده و نیز وکتور هضم آنزیمی شده بر روی ژل ۱٪ ۱۱۲
شکل ۱۲.۳: Colony-PCR بر روی تک کلون های حاصل از مرحله ی ترانسفورمیشن با محصول لایگیشن و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۱۳
شکل ۱۳.۳: استخراج پلاسمیدهای نوترکیب از تک کلون هایی که در Colony-PCR جواب مثبت داده بودند و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۱۴
شکل ۱۴.۳: هضم آنزیمی پلاسمید حاصل از تک کلون شماره ی ۵ و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۱۵
شکل ۱۵.۳: واکنش PCR بر روی وکتور نوترکیب به منظور شناسایی Pro-GDNF و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۱۶
شکل ۱۶.۳: نتایج نرم افزار BLAST در سایت NCBI برای توالی بازی و اسید آمینه ای Pro-GDNF در وکتور نوترکیب ۱۱۸
شکل ۱۷.۳: الکتروفورز هم زمان وکتور pEGFP-N1 استخراج شده و نیز هضم آنزیمی شده بر روی ژل ۱٪ ۱۱۹
شکل ۱۸.۳: سلول های BMSC، ۲۴ ساعت پس از استخراج بدون شستشو با PBS ۱۲۰

شکل ۱۹.۳: سلول هایBMSC، ۲۴ ساعت پس از استخراج و اولین شستشو با PBS ۱۲۰
شکل ۲۰.۳: سلول های BMSC ، ۴۸ ساعت پس از استخراج ۱۲۰
شکل ۲۱.۳: سلول های BMSC پس از سه پاساژ ۱۲۱
شکل ۲۲.۳: ایمونوسیتوشیمی بر روی سلول های BMSC برای بررسی بیان مارکر CD44 . ۱۲۲
شکل ۲۳.۳: ایمونوسیتوشیمی سلول های BMSC برای بررسی بیان مارکر CD45 ..... ۱۲۲
شکل ۲۴.۳: ایمونوسیتوشیمی سلول های BMSC برای بررسی بیان مارکر CD106 ..... ۱۲۳
شکل ۲۵.۳: ایمونوسیتوشیمی سلول هایBMSC برای بررسی بیان پروتئین فیبرونکتین ... ۱۲۳
شکل ۲۶.۳: سلول هایBMSC ترانسفکت شده با وکتور pEGFP-N1 پس از ۴۸ ساعت ۱۲۴
شکل ۲۷.۳: سلول هایBMSC ترانسفکت شده با وکتور pEGFP-N1 پس از ۷۲ ساعت ۱۲۴
شکل ۲۸.۳: سلولBMSC دچار آپپتوز شده در اثر ترانسفکشن با لیپوفکتامین ۲۰۰۰..... ۱۲۴
شکل ۲۹.۳: مرگ سلول هایBMSC ترانسفکت نشده با اضافه کردن هیگرومایسینB به محیط کشت سلولی..... ۱۲۵
شکل ۳۰.۳: کلون سلول های BMSC ترانسفکت شده ی با بیان پایدار..... ۱۲۶
شکل ۳۱.۳: استخراج RNA از سلول های ترانسفکت شده و ترانسفکت نشده و الکتروفورز آن بر روی ژل ۱٪ ۱۲۷
شکل ۳۲.۳: اثبات بیان فیوژن پروتئین در سلول های BMSC ترانسفکت شده ی پایدار در سطح RNA با روش RT-PCR و الکتروفورز آن در ژل ۲٪ ۱۲۸
شکل ۳۳.۳: اثبات بیانGDNF در سطح RNA در سلول های BMSC ترانسفکت شده ی پایدار و ترانسفکت نشده در سطح RNA با روش RT-PCR و الکتروفورز آن در ژل ۲٪ ۱۲۸
شکل ۳۴.۳: وجودGDNF در سه نمونه ی متفاوت FBS با روش دات بلاتینگ و رفع نور زمینه پس از گذشت زمان ۱۲۹
شکل ۳۵.۳: نمونه های استاندارد و آزمایش در در آزمون برادفورد ۱۳۰
شکل ۳۶.۳: ژل ۱۲٪ پلی آکریل آمید رنگ آمیزی شده با روش نیترات نقره آمونیاکی و باند

GDNF در KDa ۱۵ در سلول های BMSC ترانسفکت شده ی پایدار..... ۱۳۴
شکل ۳۷.۳: فیلم رادیولوژی حاصل از وسترن بلاتینگ و باند های حاصل از بیان پروتئین GDNF ۱۳۵