بسم الله الرحمن الرحيم

٢٨٩٣١

۱۳۸۰ /۴۱ .۰۴

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه تهران

مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

پایان‌نامه:

برای دریافت درجهٔ کارشناسی ارشد
در رشتهٔ بیوفیزیک

عنوان :

استقرار DNA روی لیپوزوم‌ها، بررسی لیپوپلکس‌ها

استاد راهنما :

جناب آقای دکتر محمدنبی سربلوکی

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر محمد علی ملبوبی

نگارش :

پونه سادات پورحسینی

12632
۳۵۹۳۱

تیرماه ۱۳۸۰

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

بسمه تعالی

گواهی می‌شود آقای / خانم پونه‌سادات پورحسینی دانشجوی مقطع کارشناسی‌ارشد رشته بیوفیزیک در تاریخ ۸۰/۴/۲۷

از پایان نامه خود دفاع نموده و نمره ۱۹/۷۵ را احراز نمودند.

نام و نام خانوادگی استاد راهنما : جناب آقای دکتر محمدنبی سربلوکی

امضاء

نام و نام خانوادگی استاد ناظر : سرکار خانم دکتر تولیت

امضاء

نام و نام خانوادگی استاد ناظر : جناب آقای دکتر ملبوبی

امضاء

نام و نام خانوادگی استاد ناظر : جناب آقای دکتر عبدعلی ضیایی

امضاء

نام و نام خانوادگی سرپرست تحصیلات تکمیلی : جناب آقای دکتر عزت‌اله کیهانی

امضاء

۸۰/۴/۲۷

تقدیم به ستارگان پرفروغ آسمان زندگیم

پـــدر عـزیـزم

معلم صبر و صداقـت، برتریـن نمونـهٔ تـلاش و محبـت، کسـی کـه واقعیت زندگـی را بـه مـن آموخـت و آسـایش زندگیـم را مدیـون او می‌دانم،

مـادر عـزیـزم

آموزگـار از خودگذشـتگی، محبـت و مهربـانی، اسـوهٔ اسـتقامت، روشنایی‌بخش حیات و امید زندگی من، شـمعی کـه پیشـرفت خـود را مدیون اشک‌های پرامساس و سوختنش می‌دانم،

بـــرادر عـزیـزم

مشـوقی مهربـان و فرح‌بخـش خـاطر بی‌رمـق حـاصل از تلاشـــهای روزانـهٔ مـن.

سپاس بی‌پایان بر

- استاد راهنمای ارجمندم

جناب آقای دکتر محمدنبی سربلوکی

که از اندیشه‌ها، تجارب و دانش ایشان بسیار آموختم و طی مراحل انجام این پایان‌نامه در ارائهٔ طریق از هیچ لطفی فروگذار ننمودند و همواره مرا یاری فرمودند و

- استاد مشاور گرامی

جناب آقای دکتر محمدعلی ملبوبی

بخاطر الطاف بیدریغشان از ابتدا تا اتمام پایان‌نامه که انجام آنرا برای من سهل و آسان نمودند.

سپاس و تشکر از اعضای محترم هیأت داوران، سرکار خانم دکتر تولیت، جناب آقای دکتر ضیائی و جناب آقای دکتر کیهانی که زحمت مطالعه و داوری این پایان‌نامه را متقبل شدند.

تشکر فراوان از :

- عمه‌های مهربانم که در تمام مدت تحصیل و انجام این پایان‌نامه همواره مشوق من بوده‌اند.

- دوستان مهربان هم‌آزمایشگاهی:

خانمها: علمی، مقدونی، خاکی، بهادری و آقایان: امینی‌نسب، سلیمانی، پارسایی، مقرب، رفیعی‌پور و اسدی

- سایر دوستان در کلیهٔ آزمایشگاههای مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک و نیز مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی بخصوص خانمها:لهراسبی، شاه‌حسینی، ملک‌ثابت، پورعسگری، نیکخواه، صباغیان، ستار احمدی، رفعتیان، آقای دکتر خواجه، آقای نظمی و آقای صانعی.

از کلیهٔ کارکنان محترم مرکز در بخشهای مختلف، خانمها: اسدی، بابایی، غفاری، گورکانی، چگینی، مفیدی، صلاح‌پور، قنادی، قاسمی و آقایان فلاح، معارفی‌نژاد، ابراهیم‌زاده، نورنیا، سلیمانی، فرزانه، پازوکی، اختریان، سینه‌چاک، عبدالمالکی، کارکنان محترم بخشهای خدمات، نگهبانی و سایر عزیزان، نهایت قدردانی و تشکر را دارم .

فهرست مطالب

عنـــوان	صفحـــه
چکیـده	I
هـــدف	III
فصل اول : مقدمه	۱
دستگاه‌های انتقال ژن	۶
ویروسی :	
آدنوویروسها	۸
رتروویروسها	۹
AAV	۱۰
غیرویروسی فیزیکی :	
ریزتزریقی	۱۰
روزنه سازی الکتریکی	۱۲
تفنگ ژنی	۱۳
غیرویروسی شیمیایی :	
کلسیم فسفات	۱۴
DNA برهنه	۱۴
پلی کاتیونها	۱۵
دندروزوم‌ها	۱۸
لیپوزوم‌ها :	۱۹
لیپوزوم‌های معمولی	۲۱
لیپوزوم‌های کاتیونی	۲۲
لیپوزوم‌های پلیمردار	۲۳

عنـــوان	صفحـــه
ایمونولیپوزوم‌ها	۲۴
مراحل انتقال و بیان ژن	۲۶
مزیت استفاده از لیپوزوم‌ها نسبت به دیگر روشها	۲۸
فصل دوم : مواد و روشها	
مواد لازم برای انواع استخراج‌های انجام شده	۳۰
دستگاه‌های مورد استفاده	۳۳
استخراج فسفاتیدیل کولین از زرده تخم مرغ	۳۴
کروماتوگرافی لایه نازک	۳۴
روش ساخت لیپوزوم	۳۵
تعیین حجم محصور شده و قطر لیپوزوم‌ها	۳۶
استخراج پلاسمید	۳۷
بررسی سالم بودن پلاسمید استخراج شده	۳۹
اثر آنزیم‌های Hind III و EcoRI	۳۹
تهیه کمپلکس‌های DNA - لیپوزوم	۴۰
تعیین درصد اتصال DNA به لیپوزوم‌ها	۴۰
تعیین حداقل غلظت (نوکلئاز) موثر بر پلاسمید	۴۱
قطعه قطعه شدن پلاسمید توسط نوکلئاز	۴۲
اثر حفاظتی لیپوزوم‌های باردار مثبت بر DNA در مقابل نوکلئاز	۴۲
اثر حفاظتی لیپوزوم‌های پلیمردار و باردار مثبت	۴۳
اثر حفاظتی لیپوزوم‌های ایمن گریز	۴۳
اثر حفاظتی لیپوزوم‌های ساده	۴۳

عنـــوان	صفحـــه

فصل سوم : نتایج

نتایج مربوط به TLC ۴۴

نتایج مربوط به حجم محصور شده و قطر محاسبه شده لیپوزوم‌ها ۴۷

تعیین غلظت پلاسمید ۴۷

نتایج مربوط به سالم بودن پلاسمیدهای استخراجی ۴۸

نتایج اثر آنزیم‌های برشگر Hind III و EcoRI ۵۰

درصد اتصال DNA به لیپوزوم ۵۲

نتایج مربوط به اثرات DNase I بر پلاسمید ۵۴

نتیجه اثر لیپوزوم‌ها بر DNA در مقابل نوکلئاز ۵۶

لیپوزوم‌های کاتیونی ۵۶

لیپوزوم‌های ایمن گریز - کاتیونی ۶۲

لیپوزوم‌های ایمن گریز ۶۴

لیپوزوم‌های ساده ۶۶

فصل چهارم : بحـث

بحـــث ۶۸

نتیجه‌گیـــری ۷۸

منـابـــع ۸۰

چکیده :

مهندسی ژنتیک وژن درمانی از دستاوردهای جدید فناوری زیستی و پزشکی به شمار می‌آیند زیرا قابلیت اعمال تغییرات مورد نظر و یا درمان بیماری‌ها را در بنیادی‌ترین سطح آن در اختیار می‌نهند. همه این دستکاری‌ها در نخستین گام نیاز به ورود اسیدنوکلئیک بطور سالم به درون یاخته هدف دارند. اسیدنوکلئیک می‌تواند DNA ، RNA و یا الیگونوکلئوتیدهای پادسمت (antisense) باشد. مولکول وارد شده به یاخته نه تنها می‌تواند باعث بیان انتخابی یک ژن شود بلکه در مواردی لازم است از بیان بعضی از آنها جلوگیری کند.

برای انتقال اسیدهای نوکلئیک به داخل یاخته روشهای مختلفی ابداع شده و به کار می‌روند که به طور کلی می‌توانند به سه نوع تقسیم شوند : روشهای ویروسی، روشهای غیرویروسی شیمیایی و غیرویروسی فیزیکی. در این پایان نامه از میان روشهای مختلف انتقال ژن، مطالعه لیپوزوم‌ها (دستگاه‌های غیرویروسی) انتخاب و مورد بررسی قرار گرفته است. انواع مختلف لیپوزوم‌ها که از لحاظ اجزای تشکیل دهنده تا حدی با هم متفاوتند، ساخته شده؛ حجم محصور شده توسط آنها اندازه گیری شد. سپس با استفاده از حجم محصور شده، بطور غیرمستقیم، قطر لیپوزوم‌ها محاسبه و تعیین گردید. از نتایجی که تا این مرحله بدست آمد مشخص گردید در انواعی از لیپوزوم‌ها که واجد پلیمر هستند (لیپوزوم‌های ایمن گریز) درصدی از پلیمرها درون لیپوزم‌ها واقع می‌شوند.

سپس کمپلکس‌های DNA - لیپوزوم ساخته شد و درصد اتصال مولکول‌های DNA پلاسمید توسط هریک از انواع لیپوزوم‌ها تعیین گردید. بررسی‌ها نشان داد که در اینمورد لیپوزوم‌های ایمن گریز کاتیونی بسیار موفق بوده‌اند.

در نهایت، اثر حفاظتی انواع مختلف لیپوزوم‌های ساخته شده (کاتیونی، ایمن گریز کاتیونی، ایمن گریز و ساده) بر DNA، در مقابل نوکلئاز DNaseI، بررسی شد و مشخص گردید وجود بار مثبت به حفاظت از DNA کمک بسیاری می‌کند. علت آن می‌تواند به قرار گرفتن DNA بین جداره‌های لیپوزوم‌های کاتیونی مختلف نسبت داده شود. اگرچه لیپوزوم‌های ایمن

گریز - کاتیونی، در این تحقیق مورد تایید قرار گرفته‌اند، باید آزمایشات لازم دربـاره عملکـرد آنها در شرایط in vivo انجام و نتیجه گیری شود.

در این بررسی‌ها، توانایی چهارنوع مختلف لیپوزوم (ساده، کاتیونی، ایمن گریز و ایمن گریز کاتیونی) در حمل DNA و محافظت از آن در مقـابل نوکلئـاز بـا هـم بررسـی شـد تـا از مقایسه آنها باهم بتوان نوع مناسب، را انتخاب کرد.

هـــدف :

بطور کلی، روشهای مختلفی برای انتقال ژن بـه درون یاختـه موجـود اسـت. در ایـن پایان نامه، از میـان روشـهای مختلـف غیرویروسـی انتقـال ژن، لیپوزومهـا مـورد توجـه قـرار گرفته‌اند. هدف این بود که بتوان روشـی یـافت کـه در حیـن سـادگی و حفـاظت از مولکـول اسیدنوکلئیک حداقل اثرات جانبی را روی یاخته داشته باشد. لیپوزومها سـاختارهایی هسـتند متشکل از مولکول‌های طبیعی که پس از ادغام، بخشی از غشـاء یاختـه را تشـکیل می‌دهنـد. بهمین جهت حامل‌های بسیار مطلوبی بنظر می‌رسند.

بطور کلی لیپوزومها از نظر اندازه، بار و اجزای ساختمانی می‌تواننـد بـا هـم متفـاوت باشند. سعی براین است که بتوان از سطح بیرونی لیپوزومها برای اتصـال DNA اسـتفاده کـرد. بنابراین نیاز به استفاده از لیپوزوم‌های با اندازه کوچکتر می‌باشد تا هم نسبت سطح بـه حجـم در آنها افزایش یابد و هم اینکه این وزیکول‌ها (بـه فـرض اسـتفاده در شـرایط in vivo) کمـتر تحت تعقیب دستگاه ایمنی واقع شوند.

با توجه به اینکه در ترکیب اجزای تشکیل دهنده غشای لیپوزومها تنوع زیادی وجود دارد سعی شده انواع مختلف لیپوزومها ساخته شود تا قدرت انتخاب نوع بهتر میسر گردد.

این لیپوزومها به این منظور ساخته می‌شوند که مولکول مورد نظـر (DNA) را بتواننـد سالم به یاخته تحویل دهند بنابراین باید قدرت حفاظت آنهـا از DNA در مقـابل نوکلئـاز هـم تعیین شود.

هریک از انواع لیپوزوم‌های ساده، کاتیونی و ایمن گریز (stealth liposomes) تا کنون بطور مجـزا مورد استفاده قرار گرفته‌اند و حتی انواع تجاری آنها هم ساخته شده و به فـروش می‌رسـد. در این پایان نامه سعی براین است کـه هرسـه مـورد را بـه عـلاوه انـواع کـاتیونی - ایمـن گریـز (بارمثبت و پلیمر هردو روی یک لیپوزوم) با هم بررسی کرد تا به توانایی‌هـای آنهـا در مقـابل هم پی برد.

فصل اول :

مقدمه

همه روزه از طریق رسانه‌های عمومی از پیشرفتهایی که در مهندسی ژنتیک صورت می‌گیرد، خبردار می‌شویم، مثلاً گیاهان ترا ریخته (Transgenic) که می‌توانند نسبت به بعضی از آفت کش‌ها یا شرایط سخت آب و هوایی مصون باشند یا میکروب‌هایی که با هضم بقایای موجودات زنده آسیب دیده و تبدیل آنها به فراورده‌های مفید می‌توانند زنده بمانند. همچنین تقریباً هر هفته ژنهایی کشف می‌شوند که مسؤول ناهنجاریهای مختلفند (از سرطان تا چاقی) و یا ژن درمانی آنان مطرح می‌گردد [۱].

همین مورد آخر یعنی ژن درمانی در علم پزشکی تحول عظیمی ایجاد کرده است چون به طور گزینشی به تشخیص و درمان بیماری در سطح مولکولی می‌پردازد. یعنی با استفاده از این روش با "انتقال ژن" به درمان یا جلوگیری از بیماری اقدام می‌کند. در حالیکه بیشتر داروهایی که امروزه، خاص هرمرض، استفاده می‌شوند پیامدها و عوارض بیماری را درمان می‌کنند. بنظر می‌آید این روش (چون براساس ژن است) هدف برتری را دنبال کند و مدت زمان عمل طولانی‌تری داشته باشد بخصوص باعث می‌شود در نسبت درمان و میزان بهبود بیماری‌هایی که در حال حاضر غیرقابل درمانند یا بطور جزیی کنترل می‌شوند پیشرفتهای چشمگیری ایجاد شود. اولین مطالعات بالینی در ژن درمانی ازسال ۱۹۹۰م. شروع شد و از آن زمان تا به حال بسیار به آن توجه کرده‌اند. جدول ۱ انواع بیماری‌ها و یاخته‌های هدف را نشان می‌دهد که مطالعات بالینی برای آنها در حال پیشرفت است [۲].

جدول ۱ : یاخته‌های هدف برای انتقال ژن در مطالعات بالینی در حال انجام

بیماری	یاخته‌های هدف
سرطان	یاخته‌های تومور، یاخته‌های عرض کننده آنتی‌ژن، یاخته‌های خونی اجدادی، یاخته‌های T، فیبرو بلاست‌ها، یاخته‌های ماهیچه‌ای
ناهنجاری‌های تک ژنی وراثتی	یاخته‌های اپی‌تلیال، ماکروفاژها، یاخته‌های T، یاخته‌های خونی اجدادی، هپاتوسیت‌ها، یاخته‌های ماهیچه‌ای
بیماریهای عفونی	یاخته‌های T، یاخته‌های خونی اجدادی، یاخته‌های عرضه کننده آنتی ژن، یاخته‌های ماهیچه‌ای
بیماریهای قلبی - عروقی	یاخته‌های اندوتلیال، یاخته‌های ماهیچه‌ای
روماتوئید آرتریتیس	یاخته‌های آسترسینوسی[۲]
نشانگان تونل آرنجی[۱]	یاخته‌های عصبی

تاکنون تمام مطالعات بالینی بطور ترجیحی شامل وارد کردن ژن سالم به درون سلول بوده است تا تصحیح و یا جایگزینی ژن‌های ناقص، چراکه انجام آن دو از نظر عملی بسیار مشکل‌تر است. تمام راه‌کارهای بالینی که تاکنون تصویب شده‌اند ژن درمانی را برای یاخته‌های بدنی به کار می‌برند (یاخته‌های سوماتیک) و نه یاخته‌های جنسی (زایا) [۲و۱]. تغییر ژنتیکی یاخته‌های جنسی به دلیل مشکلات موجود در روش کارهای فعلی امکان‌پذیر نیست و مهم‌تر اینکه گاهی در زمره کارهای ناپسند اخلاقی بشمار می‌رود [۳].

هرگاه ژن درمانی مورد بحث افکار عمومی قرار گیرد، درمیان جراید پرتیراژ گرایش به خلق شبحی به نام "ابرانسان‌ها" برانگیخته می‌شود. خوشبختانه، چنین خصوصیاتی مثل هوش و باروری، چند ژنی هستند، یعنی به چندین ژن وابسته‌اند و دستکاری آنها از طریق مهندسی

---

[1]- Cubital tunnel syndrome

[2]- sinovial lining cells