





دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش ژنتیک

شناسایی و کلون نمودن پروموتور ژن *PEP* موشی

استادان راهنما:

دکتر کامران قائدی

دکتر محمدحسین نصر اصفهانی

استادان مشاور:

دکتر زهره حجتی

مهندس سمیه تنهایی

پژوهشگر:

طاهره سیفی

شهریورماه ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه
متعلق به پژوهشگاه رویان اصفهان می‌باشد.



دانشگاه اصفهان

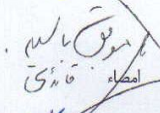
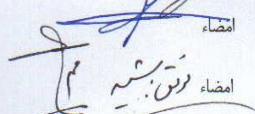
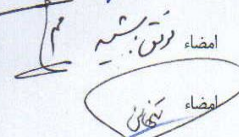
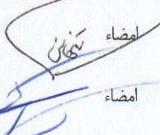
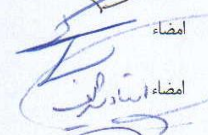
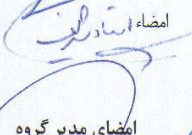
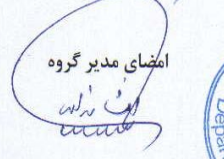
دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته سلولی مولکولی گرایش ژنتیک خانم
طاهره سیفی تحت عنوان

شناسایی و کلون نمودن پروموتور ژن PEP موشی

در تاریخ ۱۳۹۰/۱۶/۲۷ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی (نمره ۲۰) به تصویب نهایی رسید.

- ۱- استادان راهنمای پایان نامه دکتر کامران قاندری با مرتبه علمی استادیار
امضاء: 
- دکتر محمدحسین نصر اصفهان با مرتبه علمی استاد
امضاء: 
- ۲- استادان مشاوران پایان نامه دکتر زهره حجتی با مرتبه علمی استادیار
امضاء: 
- مهندس سمیه تنهایی با مرتبه علمی مربی
امضاء: 
- ۲- استاد داور داخل گروه دکتر منوچهر توسلی با مرتبه علمی دانشیار
امضاء: 
- ۳- استاد داور خارج از گروه دکتر مریم استادشریف با مرتبه علمی استادیار
امضاء: 
- امضای مدیر گروه
امضاء: 



تمامی هزینه‌های مصرفی این پایان نامه بر مبنای قرارداد
شماره ۸۸/۴۱۹۸۱ پ.ر.ا مورخ ۸۸/۰۵/۳۱ از بودجه
تحقیقاتی پژوهشگاه رویان تأمین گردیده است.

با توجه به قرارداد شماره ۸۸/۴۱۹۸۱ پ.ر.۱ مورخ ۸۸/۰۵/۳۱ فی ما بین پژوهشگاه رویان و دانشگاه اصفهان و مفاد تبصره شماره ۱ قرارداد مذکور، از آنجایی که کلیه هزینه‌های مربوط به انجام این پایان نامه توسط پژوهشگاه رویان پرداخت گردیده است، بنابراین در صورتی که نتایج این پایان نامه به ارائه فن آوری و ثبت اختراع منجر گردد، حقوق مادی و معنوی به پژوهشگاه رویان و دانشگاه اصفهان بر اساس میزان سرمایه گذاری مالی طرفین تعلق دارد.

تاریخ: ۱۸/۰۵/۳۱
شماره: ۱۸۰۰۰۱۹۸۱
پیوست:



جمهوری اسلامی ایران

بیتنام



پژوهشکده رویان
مرکز تحقیقات
علوم سلولی و ناپاروری

قرارداد اجرای طرحهای پژوهشی

این قرارداد فی ما بین معاون پژوهشی و آموزشی پژوهشکده رویان به نمایندگی آقای دکتر عبدالحسین شاهرودی و معاون تحصیلات تکمیلی - پژوهشی دانشگاه اصفهان به نمایندگی آقای دکتر محمد رضا رحیمی نژاد که در این قرارداد به ترتیب پژوهشکده و دانشگاه نامیده می شود با شرایط ذیل منعقد می گردد .

ماده یک - موضوع قرارداد

موضوع قرارداد عبارت است از اجرای پایان نامه خانم طاهره سیفی دانشجوی مقطع MSC ژنتیک با عنوان " کلونینگ پروموتور ژن PEP " با مشخصات مندرج در پرسشنامه طرحهای تحقیقاتی که ضمیمه این قرارداد بوده و جزء لاینفک آن محسوب می شود.

ماده دو - مدت قرارداد

مدت قرارداد از تاریخ شروع پس از تصویب پایان نامه / طرح به مدت ۱۲ ماه می باشد .

ماده سه - تعهدات پژوهشکده

۱- ایجاد تسهیلات لازم جهت استفاده از امکانات و وسایل پیش بینی شده در پایان نامه شامل :
(الف) در اختیار قراردادن پرونده ها/ وسایل و آزمایشگاههای مورد نیاز طرح فوق بر اساس پرسشنامه پیوست

ماده چهار - تعهدات دانشگاه

- ۱- درج متن ذیل در صفحات قدردانی و تشکر گزارش نهایی پایان نامه
(هزینه های مصرفی این پایان نامه بر مبنای قرارداد شماره مورخ از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان تأمین گردیده است) .
- ۲- در صورت انتشار نتایج حاصل از پایان نامه / طرح به صورت مقاله یا هر شکل دیگر از سوی دانشگاه ، حفظ حقوق معنوی و ذکر نام پژوهشکده رویان به عنوان آدرس مکاتبه الزامی می باشد. و درج مطلب " هزینه مواد مصرفی و تجهیزات این طرح از بودجه پژوهشکده رویان تأمین می گردد" در انتهای مقاله نیز الزامی می باشد.
- ۳- چاپ کلیه نتایجی که از پایان نامه یا رساله بدست می آید بنام دانشجو، استاد راهنما: آقای دکتر کامران قاندری(عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان) آقای دکتر محمد حسین نصر اصفهانی(عضو هیئت علمی پژوهشکده رویان) وهمچنین اساتید مشاور: خانم دکتر زهره

نشانی: تهران
۴۵ متری رسالت
خیابان بنی هاشم
میدان بنی هاشم
خیابان بنی هاشم شمالی
خیابان حافظ شرقی
پژوهشکده رویان
تلفن: ۶۸-۰۲۲۳-۷۶۶
دورنگار: ۸۱-۰۲۲۳-۶۴۸
صندوق پستی:
۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

تاریخ: ۸۸/۸/۲۱
شماره: ۸۸/۴۱۹۸
پوست:



بیت



پژوهشکده رویان
مرکز تحقیقات
علوم سلولی و ناباروری

حجتی (عضو هیئت علمی دانشگاه اصفهان) و خانم سمیه تنهایی (عضو پژوهشکده رویان) صورت خواهد گرفت.

۴- ارائه یک جلد پایان نامه با مندرجات فوق به پژوهشکده رویان تبصره ۱: در صورتی نتایج طرح یا پایان نامه به ارائه فناوری و ثبت اختراع منجر گردد، حقوق مادی و معنوی (مطابق قرارداد و به نسبت مشارکت مادی) با توجه به میزان سرمایه گذاری طرفین می باشد. (در بخش هزینه های دانشگاه پرداخت حق استاد و مشاور منظور می شود).

ماده پنج - هزینه ها

- ۱- هزینه کل طرح مطابق پرسشنامه: ۵۲/۰۰۰/۰۰۰ ریال
- ۲- هزینه مسافرت به کنگره ها و سفرهای علمی به عهده پژوهشکده نمی باشد.

ماده شش

- در صورت بروز حوادث قهریه و اضطراری چنانچه انجام قرارداد غیر ممکن گردد طرفین حق فسخ خواهند داشت و اگر باعث تعلیق در اجرای موضوع قرارداد گردند چنانچه مدت تعلیق بیش از یکماه باشد طرفین حق فسخ خواهند داشت و چنانچه این مدت یکماه و یا کمتر از یکماه باشد مدت مزبور به مدت قرارداد اضافه می گردد و اجرای موضوع قرارداد ادامه خواهد یافت.

- در صورت بروز اختلاف ما بین طرفین قرارداد هیأتی متشکل از دو نفر نمایندگان طرفین و یک نفر داور مرضی الطرفین مسئله را بررسی خواهند نمود و رای هیأت مذکور برای طرفین لازم الاتباع خواهد بود.

این قرارداد در شش ماده و یک تبصره و ضمائم آن که جزء لاینفک آن می باشد در سه نسخه تنظیم گردیده که هر دو حکم واحد را دارند و در تاریخ جهت اجرا به امضاء طرفین رسید.

دکتر محمدرضا رحیمی نژاد
معاون تحصیلات تکمیلی - پژوهشی
دانشکده علوم دانشگاه اصفهان



دکتر عبدالحسین شاهوردی

معاون پژوهشی و آموزشی

پژوهشکده رویان



نشانی: تهران
۴۵ متری رسالت
خیابان بنی هاشم
میدان بنی هاشم
خیابان بنی هاشم شمالی
خیابان حافظ شرقی
پژوهشکده رویان
تلفن: ۶۸-۲۳۰-۷۹۶
دورنگار: ۸۱-۲۳۰-۶۸۰
صندوق پستی:
۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

تقدیم بہ:

گر گھنڈل پدر عام ژدیک

ارتادبز کو ارم جناب آقای دکتر کامران قندی

پدر و مادر عزیزم

چکیده

پروتئین پراکسیزومی (Pep)، یکی از پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی است که بوسیله ژن *FNDC5* کد می‌شود، که در موش شامل ۶ اگزون است و روی کروموزوم ۴ قرار دارد. cDNA آن توسط Ferrer Martinez و همکارانش کلون شد. این پروتئین همولوژی‌ای با دیگر پروتئین‌ها ندارد، هرچند در زیرواحدهای اسیدآمینه‌های ۱۱۴-۳۱ حاوی یک دامنه فیبرونکتین تایپ III می‌باشد. هنوز هیچ نقش خاص برای این پروتئین شناخته نشده است. مشخص شده است که بیان ژن *PEP* موشی تحت تأثیر رتینوئیک‌اسید روی سلول‌های بنیادی طی پروسه نوروزنر افزایش می‌یابد. پس، تعیین ویژگی پروموتور *PEP* می‌تواند سناریویی که پشت این رویداد وجود دارد مشخص نماید. بنابراین، هدف این پژوهش کلون نمودن ناحیه پروموتور فرضی *PEP* بود. در مرحله اول، مطالعات بیوانفورماتیکی برای یافتن پروموتور فرضی برای پروموتور *PEP* انجام شد. مطالعات بیوانفورماتیکی، با استفاده از نرم‌افزارهای معمول برای پیش‌بینی پروموتور، یک ناحیه‌ی پروموتور فرضی در موقعیت +۱۰۱/-۵۶۱ نسبت به جایگاه آغاز رونویسی ژن *PEP* مشخص شد. آنالیز بیشتر با چندین نرم‌افزار عناصر مختلفی را در این ناحیه را، از قبیل موتیف VDR/RXR در موقعیت +۱۴/-۱۱ و موتیف TFIIB در موقعیت +۶۴/+۵۹. تشخیص داد. CpG Island Finder و GC Plot analysis نشان داد که این ناحیه ۷۰.۰۱٪ GC Rich است و یک CpG Island بعنوان شاخص پروموتوری دارد. پس، پرایمرهای اختصاصی با قرار دادن دو جایگاه تشخیصی، *NheI* و *AseI*، بترتیب درانتهاهای بالا و پایین محصول، طراحی شد. به دلیل ویژگی GC Rich این ناحیه، برای بهینه کردن شرایط PCR، افزودنی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب شرایط PCR تنظیم شده شامل بتائین (1M)، DMSO (10%) و غلظت بالایی از کلرید منیزیم (4mM) در حضور بافر AMS، برای تکثیر این ناحیه مورد استفاده قرار گرفت. قطعات تکثیر شده شامل (۱) اگزون ۱ و قسمتی از اینترون ۱ (ساختار A) (۲) اگزون ۱ که بصورت frame با ژن گزارشگر *EGFP* است (ساختار B) و (۳) قطعه جهش‌یافته در جایگاه آغاز رونویسی (ساختار C) تکثیر بهینه شده این نواحی بطور موفقیت‌آمیزی برای کلون نمودن بعدی این قطعات DNA درون وکتور pTZ. سپس ساب‌کلون درون وکتور بیانی یوکاریوتی مناسب pDB2 بالادست ژن گزارشگر *EGFP* برای ارزیابی بیشتر این ناحیه بعد از ترانسفکت نمودن درون سلول‌های CHO، P19 و سلول‌های بنیادی موشی (mESCs) انجام شد. برای ساخت یک وکتور pDB2 بدون پروموتور، هضم آنزیمی انجام شد. فعالیت پروموتوری در سلول‌های CHO با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری ارزیابی شد. داده‌ها نشان داد که قطعه تکثیر شده هنگامیکه در سلول‌های CHO ارزیابی شد عملکرد پروموتوری را دارد و فعالیتی ۱۲ برابر ضعیف‌تر از پروموتور CMV را نشان داد. در میان ساختارهای مختلف، ساختار C فعالیت پروموتوری بیشتری را نشان داد و برای ترانسفکت درون P19 و mESC انتخاب شد. فعالیت پروموتوری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت اسکن شد. به دلیل بیان کم *PEP* در این دودمان‌های سلولی، دودمان‌ی‌لمولی پایدار برای ساختار C تهیه شد. نوروزنر در این دودمان سلولی پایدار تحت تأثیر رتینوئیک‌اسید، ویتامین D و Noggin انجام شد. بیان *PEP* اندوژن و گزارشگر *EGFP* با استفاده از RA و Noggin در روز ۶ و ۱۴ افزایش یافت. اما بعد از مواجهه با ویتامین کاهش داشت. Noggin بعنوان یک فاکتور مورد نیاز برای نوروزنر مستقل از رتینوئیک‌اسید استفاده شد. مواجهه با Noggin بیان ژن *PEP* را در روز ۱۴

بطور چشمگیری افزایش داد که نشان داد که افزایش بیان ژن *PEP* ۶ روز اول نوروزنز تحت تأثیر رتینوئیک اسید بطور چشمگیری اتفاق میافتد و افزایش بیان ژن *PEP* از مرحله تشکیل Precursor cell تا Neurosphere تحت تأثیر روند عصب‌زایی است.

کلمات کلیدی: پروموتور، *PEP* ، *EGFP* ، پراگزیمال، دیستال، نوروزنز، سلول‌های پیش ساز عصب، *Neurosphere*، نورون، گلیال، ویتامین *D*، *Noggin*.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه
۱-۱-۱	۱- پروموتر
۲-۱-۱	۲- مطالعه پروموتر
۳-۱-۱	۳- پروتئین PEP
۴-۱-۱	۴- بیماری پراکسیزومی
۵-۱-۱	۵- پراکسیزوم و پیری
۶-۱-۱	۶- بیوانفورماتیک و پیش‌بینی پروموتر
۷-۱-۱	۷- رتینوئیک اسید
۸-۱-۱	۸- ویتامین D
۹-۱-۱	۹- کشت سلول و رده‌های سلولی
۱۰-۱-۱	۱۰- سلولهای CHO (CHINESE HAMSTER OVARY)
۱۱-۱-۱	۱۱- سلول‌های بنیادی
۱۱-۱-۱-۱	۱- انواع سلول‌های بنیادی
۱۱-۱-۲	۲- دسته‌بندی دیگر سلول‌های بنیادی
۱۱-۱-۲-۱	۱- سلول‌های بنیادی بالغ
۱۱-۱-۲-۲	۲- سلول‌های بنیادی زاینده
۱۱-۱-۲-۳	۳- سلول‌های بنیادی جنینی
۱۲-۱-۱	۱- مشخصات سلول‌های بنیادی جنینی
۱۳-۱-۱	۱- کاربرد سلول‌های بنیادی
۱۴-۱-۱	۱- سلول‌های بنیادی جنینی موش (MESCS)

۲۴.....	۱۵-۱- سلول‌های بنیادی جنینی P19.....
۲۵.....	۱۶-۱- تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی.....
۲۶.....	۱۷-۱- تمایز نورونی به واسطه تشکیل EB.....
۲۷.....	۱-۱۷-۱- استفاده از القاء‌کننده‌های عصبی.....
۲۸.....	۱-۱-۱۷-۱- رتینوئیک اسید.....
۲۸.....	۲-۱-۱۷-۱- مکانیسم عمل رتینوئیک اسید.....
۲۹.....	۲-۱۷-۱- استفاده از محیط انتخابی فاقد سرم.....
۳۰.....	۱۸-۱- اهداف.....

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۳۱.....	۱-۲- تجهیزات و دستگاهها.....
۳۲.....	۱-۱-۲- دستگاه‌های مورد نیاز.....
۳۳.....	۲-۲- مواد مصرفی.....
۳۳.....	۱-۲-۲- بخش مولکولی.....
۳۳.....	۱-۱-۲-۲- سویه‌های باکتری.....
۳۳.....	۲-۱-۲-۲- وکتور.....
۳۵.....	۳-۱-۲-۲- محیط‌های کشت.....
۳۵.....	۱-۳-۱-۲-۲- محیط کشت باکتریایی 2YT.....
۳۶.....	۴-۱-۲-۲- آنتی‌بیوتیک.....
۳۶.....	۵-۱-۲-۲- بافر الکتروفورز 50X TAE.....
۳۷.....	۶-۱-۲-۲- اتیدیوم بروماید.....

۳۸	۷-۱-۲-۲- بافر بارگیری
۳۸	۸-۱-۲-۲- شناساگر اندازه DNA
۳۸	۹-۱-۲-۲- پیش‌بینی ناحیه‌ی پروموتوری
۳۹	۱۰-۱-۲-۲- تکنیک PCR
۳۹	۱-۱۰-۱-۲-۲- طراحی پرایمر
۳۹	۲-۱۰-۱-۲-۲- مواد مورد نیاز برای PCR توالی‌های GC-RICH
۴۰	۱۱-۱-۲-۲- مواد مورد نیاز برای استخراج DNA از بافت
۴۱	۱۲-۱-۲-۲- مواد مورد نیاز برای استخراج DNA از سلول
۴۱	۱۳-۱-۲-۲- مواد مورد نیاز برای تیمار با DNASEI و سنتز CDNA
۴۱	۱۴-۱-۲-۲- T\A کلون
۴۲	۱۵-۱-۲-۲- ترانسفورماسیون
۴۲	۱۶-۱-۲-۲- کشت و غربالگری سفید/آبی
۴۳	۱۷-۱-۲-۲- کشت انبوه
۴۳	۱۸-۱-۲-۲- استخراج و کتور از باکتری
۴۳	۱۹-۱-۲-۲- FREEZE-STOCK
۴۴	۲۰-۱-۲-۲- هضم آنزیمی
۴۴	۲۱-۱-۲-۲- استخراج از ژل
۴۵	۲۲-۱-۲-۲- رسوبدهی با اتانول
۴۵	۲۳-۱-۲-۲- مواد مورد نیاز برای REAL TIME PCR
۴۵	۲-۲-۲- بخش سلولی
۴۶	۱-۲-۲-۲- محیط کشت HAM'S F12

۴۶ DMEM محیط کشت
۴۷ محیط کشت سلول‌های فیروبلاستی
۴۷ COMPLETE محیط کشت برای سلول‌های بنیادی جنینی
۴۸ NEUROBASAL محیط کشت و مکمل
۴۸ EGTA
۴۹ PBS برای شستشوی سلول‌ها
۴۹ PBS برای رنگ‌آمیزی
۴۹ آنتی‌بیوتیک
۵۰ روش‌ها و تکنیک‌ها
۵۰ بخش مولکولی
۵۰ مطالعات بیوانفورماتیکی
۵۰ استخراج DNA از بافت
۵۱ تکنیک PCR
۵۴ تکثیر ناحیه‌ی پروموتری
۵۵ T\A کلون
۵۷ ترانسفورمسیون
۵۷ کشت و غربالگری سفید/آبی
۵۸ COLONY INSERT CHECK
۵۸ کشت انبوه
۵۸ استخراج پلازمید از باکتری
۵۹ هضم آنزیمی

۱۲-۱-۳-۲- کلون نمودن قطعات پروموتری در وکتور PDB2	۶۱
۲-۳-۲- بخش سلولی	۶۳
۱-۲-۳-۲- بررسی فعالیت پروموتری PEP PROMOTER	۶۳
۲-۲-۳-۲- ذوب سلولهای CHO و P19	۶۳
۳-۲-۳-۲- پاساژ و شمارش سلولی جهت ترانسفکشن	۶۳
۴-۲-۳-۲- ترانسفکشن	۶۵
۵-۲-۳-۲- سلولهای بنیادی جنینی RB1 و سلول فیروبلاستی	۶۶
۶-۲-۳-۲- پاساژ سلولهای بنیادی جنینی	۶۶
۷-۲-۳-۲- جداسازی سلولهای بنیادی از سلولهای فیروبلاستی	۶۷
۸-۲-۳-۲- کشت سلولهای RB1 برای انجام ترانسفکشن	۶۷
۹-۲-۳-۲- تولید رده سلولی پایدار	۶۸
۱۰-۲-۳-۲- استخراج ژنوم از سلولهای پایدار	۶۹
۱۱-۲-۳-۲- مسیر تمایز سلولها طی نوروژنز	۷۰
۱۲-۲-۳-۲- آماده سازی نمونه ها جهت استخراج RNA	۷۰
۳-۳-۲- بخش مولکولی	۷۱
۱-۳-۳-۲- استخراج RNA و پروتئین	۷۱
۲-۳-۳-۲- تعیین کیفیت و غلظت DNA و RNA به روش اسپکتروفتومتری	۷۲
۳-۳-۳-۲- تیمار با DNASE I	۷۳
۵-۳-۳-۲- چک کردن کیفیت CDNAها	۷۴
۶-۳-۳-۲- تکنیک REAL-TIME PCR	۷۴
۱-۶-۳-۳-۲- رنگ اینتر کاله (SYBR-GREEN I)	۷۵

۷۷.....	MELTING نمودار ۲-۶-۳-۳-۲
۷۸.....	REAL TIME PCR تعیین کارایی پرایمرهای مورد استفاده در ۳-۶-۳-۳-۲
۸۰.....	REAL-TIME PCR تنظیمات دستگاه ۴-۶-۳-۳-۲
۸۰.....	تنظیم دما و زمان ۵-۶-۳-۳-۲
۸۱.....	REAL TIME PCR روش انجام تکنیک ۷-۶-۳-۳-۲

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۸۴.....	۱-۳- بخش مولکولی
۸۴.....	۱-۱-۳- مطالعات بیوانفورماتیکی
۸۴.....	۱-۱-۱-۳- GENOMATIX
۸۶.....	۲-۱-۱-۳- CPG FINDER
۸۶.....	۳-۱-۱-۳- نرم افزار GC-PLOT و GENETYX
۸۷.....	۲-۱-۳- تکثیر توالی پیش‌بینی شده
۸۹.....	۳-۱-۳- T/A کلون، ترانسفورماسیون و غربالگری و INSERT CHECK PCR
۹۲.....	۴-۱-۳- استخراج وکتور
۹۳.....	۵-۱-۳- هضم آنزیمی
۹۴.....	۶-۱-۳- جداسازی توالی از وکتور با هضم آنزیمی
۹۵.....	۷-۱-۳- الحاق توالی پروموتری در وکتور بیانی PDB2
۹۵.....	۲-۳- بخش سلولی
۹۵.....	۱-۲-۳- نتایج فلوسایتومتری سلول‌های CHO ترانسفکت شده
۹۶.....	۲-۲-۳- نتایج ترانسفکت درون سلول‌های P19 و MESC

۳-۲-۳- نتایج تهیه رده سلولی MESC پایدار ۹۸

۴-۲-۳- تمایز به عصب تحت تیمار NOGGIN و RA ۹۹

۳-۲-۴-۱- تیمار ویتامین D ۱۰۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث ۱۰۳

۴-۲- نتایج بخش مولکولی ۱۰۴

۴-۲-۱- پروموتر ۱۰۴

۴-۲-۲- مطالعه پروموتر ۱۰۵

۴-۲-۳- تیمار رتینوئیک اسید و NOGGIN ۱۰۷

۴-۲-۴- تیمار با ویتامین D ۱۰۸

۴-۳- نتیجه گیری کلی ۱۰۹

۴-۴- پیشنهادات ۱۱۰

منابع ۱۱۲

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۳	شکل ۱-۱- موقعیت پروموتور در دو رشته DNA.....
۱۰	شکل ۱-۲- الگوی بیان مارکرهای مختلف عصبی در غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید.....
۱۲	شکل ۱-۳- هتروداایمیزاسیون VDR و RXR.....
۱۳	شکل ۱-۴- مسیر عملکردی ویتامین D در سیستم عصبی.....
۱۵	شکل ۱-۵- درجه‌بندی سلول‌های بنیادی.....
۲۱	شکل ۱-۶- منشا پیدایش رده سلول‌های بنیادی جنینی و چندخاصیتی موش.....
۲۷	شکل ۱-۷- ساختار توده ای اجسام شبه رویانی (EB).....
۳۴	شکل ۱-۲- نقشه ژنتیکی وکتور کلونینگ pTZ57R/T.....
۳۵	شکل ۲-۲- نقشه ژنتیکی وکتور بیانی pDB2.....
۳۸	شکل ۲-۳- ساختار اتیدیوم بروماید.....
۵۵	شکل ۲-۴- سه توالی تکثیر شده از پروموتور پیشنهادی برای ژن PEP موشی.....
۵۶	شکل ۲-۵- الحاق در pTZ57R/T.....
۶۱	شکل ۲-۶- نمای شماتیک از جایگزینی پروموتور CMV با توالی پروموتری ژن PEP.....
۶۵	شکل ۲-۷- لام شمارش.....
۷۰	شکل ۲-۸- مسیر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به عصب.....
۷۶	شکل ۲-۹- ساختار SYBR Green.....
۷۶	شکل ۲-۱۰- اتصال رنگ SYBR Green با مولکول DNA طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR).....
۷۷	شکل ۲-۱۱- Melting Curve.....
۷۹	شکل ۲-۱۲- نمودار بدست آمده طی هر واکنش Real Time PCR.....
۷۹	شکل ۲-۱۳- منحنی استاندارد بدست آمده طی هر واکنش Real Time PCR.....
۸۵	شکل ۳-۱- نتیجه پیش‌بینی ناحیه پروموتری ژن PEP.....
۸۷	شکل ۳-۲- گراف مربوط به درصد GC و موقعیت CpG Island در پروموتور پیشنهادی.....
۸۸	شکل ۳-۳- توالی‌های تکثیر شده از پروموتور پیش‌بینی شده.....
۸۸	شکل ۳-۴- سنتز مگاپرایمرها.....
۸۹	شکل ۳-۵- کشت باکتری‌های ترانسفورم شده.....