بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش ژنتیک

شناسایی و کلون نمودن پروموتر ژن *PEP* موشی

استادان راهنما:

دکتر کامران قائدی

دکترمحمدحسین نصراصفهانی

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

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته سلولی مولکولی گرایش ژنتیک خانم

طاهره سیفی تحت عنوان

شناسایی و کلون نمودن پروموتر ژن *PEP* موشی

در تاریخ ۱۳۹۰/۶/۲۷ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی (نمره ۲۰) به تصویب نهایی رسید.

۱- استادان راهنمای پایان نامه دکتر کامران قائدی با مرتبه علمی استادیار امضاء

دکتر محمدحسین نصر اصفهان با مرتبه علمی استاد امضاء

۲- استادان مشاوران پایان‌نامه 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

گروه زیست شناسی Department Of Biology 1965

تمامی هزینه‌های مصرفی این پایان نامه بر مبنای قرارداد شماره ۸۸/۴۱۹۸۱ پ.ر.ا مورخ۸۸/۰۵/۳۱ از بودجه تحقیقاتی پژوهشگاه رویان تأمین گردیده است.

با توجه به قرارداد شماره ۸۸/۴۱۹۸۱ پ.ر.ا مورخ۸۸/۰۵/۳۱ 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.

جهاد دانشگاهی
۱۳۵۹
پژوهشکده رویان
مرکز تحقیقات
علـوم سلولی و ناباروری

تاریخ: ۸۸/۵/۳۱
شماره: ۸۸/۴۱۹۸۱
پیوست:

جمهوری اسلامی ایران

بسمه تعالی

قرارداد اجرای طرحهای پژوهشی

این قرارداد فی ما بین معاون پژوهشی و آموزشی پژوهشکده رویان به نمایندگی آقای دکتر عبدالحسین شاهوردی 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 می‌شود با شرایط ذیل منعقدمی گردد .

ماده یک ـ 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 می‌شود.

ماده دو ـ مدت قرارداد

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

ماده سه ـ تعهدات پژوهشکده

۱ـ ایجاد تسهیلات لازم جهت استفاده از امکانات و وسایل پیش‌بینی شده در پایان نامه شامل :
الف) در اختیار قراردادن پرونده‌ها/ وسایل و آزمایشگاههای مورد نیاز طرح فوق بر اساس پرسشنامه پیوست

ماده چهار ـ تعهدات دانشگاه

۱ـ درج متن ذیل در صفحات قدردانی و تشکر گزارش نهایی پایان نامه
(هزینه‌های 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 تامین 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 قائدی(عضو هیئت علمی گروهزیست 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: ۶۸-۲۲۳۰۷۹۶۰
دورنگار: ۸۱-۲۲۳۰۶۴۸
صندوق پستی:
۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

جهاد دانشگاهی
۱۳۵۹
پژوهشکده رویان
مرکز تحقیقات
علـوم سلولی و ناباروری

جمهوری اسلامی ایران

بسمه تعالی

تاریخ: ۸۸/۵/۲۱
شماره: ۸۸/۲۲۹۸۱
پیوست:

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

۴- ارائه یک جلد پایان نامه با مندرجات فوق به پژوهشکده رویان

تبصره۱: 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 ـ 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 هیاتی متشکل از دو نفر نمایندگان طرفین و یک نفر داور مرضی الطرفین مسئله را بررسی خواهند نمود و رای هیات مذکور برای طرفین لازم الاتباع خواهد بود.

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

دکتر عبدالحسین شاهوردی
معاون پژوهشی و آموزشی
پژوهشکده رویان

جهاد دانشگاهی
پژوهشکده رویان

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

دبیرخانه ۱۳۴۳

نشانی: تهران
۴۵ متری رسالت
خیابان بنی هاشم
میدان بنی هاشم
خیابان بنی هاشم شمالی
خیابان حافظ شرقی
پژوهشکده رویان
تلفن: ۶۸-۲۲۳۰۷۹۶۰
دورنگار: ۸۱-۲۲۳۰۶۴۸۰
صندوق پستی:
۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

تقدیر و تشکر:

درس معلم ما بود ز مهر و محبتی چون عهده به مکتب آورد طفل گریزپای را

با تشکر از:

استاد بزرگوار، مهربان، صمیم و دلسوز جناب آقای دکتر کاظم قلندری که حضور ایشان و راهنمایی‌های چراغ‌وار ایشان چراغ‌راه این پایان‌نامه بود و قدردانی و سپاسگزاری نمی‌کردم وظیفه‌شناسی خود را در پاسخگویی به سؤالات بنده و راهنمایی‌های ارزشمند ایشان، امید بخش و چراغ راه این جانب بوده و هر سخنی را کم بیاورم که وظیفه‌شناسی کردی این استاد را چندان نصیب ما ساخت.

استاد عالیقدر، پرتلاش، جناب آقای دکتر محمد حسین نصراصفهانی که از تجربیات، مطالعات و رهنمودهای ایشان علم آموخته‌ام از ایزد منان خواستارم که توانایی اکتساب و بردن این علم را به ایشان عطا فرماید.

اگر نبود محبت این دو بزرگوار این جانب تاب تحمل سه سال بدون تعطیلات و دور از خانواده بودن را نداشت و قدر هم‌کنار این دو استاد دانشمند برای این جانب حضور در مکتب علم و اخلاق بود.

استاد مشاور محترم سرکار خانم دکتر زهره جبلی و سرکار خانم مهندس سمیه تنهایی که زحمت مشاوره این پایان‌نامه را داشتند.

استادان محترم آقای دکتر مرتضی چیت‌سازیان و خانم دکتر مریم استاد شریف که زحمت داوری این پایان‌نامه را عهده‌دار شدند.

از همه عزیزانی که پژوهشگاه رویان اصفهان سالمیان، کیانی و نجاتی، خانم کریمی، آقای بیشه‌خواه و همچنین سایر دوستان و همکاران محترم این پژوهشگاه که در انجام این پروژه این جانب را یاری نمودند، بویژه جناب آقای دکتر نعناعی و دکتر دریانی

پدر و مادر عزیزم، که همواره مشوق و حامی بوده‌اند و موفقیت خود را مدیون دعای خیر و حمایت‌های آنها می‌دانم.

خواهرم مهتاب و برادران عزیزم محمد احمد که وجودشان گرمابخش زندگی من است.

از همه دوستان عزیزم در پژوهشگاه رویان و بچه‌های دانشگاه و خوابگاه خدیجه، الیانا، نسیم، وسارا.

تقدیم به:

گبر گوندل پدر علم ژنتیک

استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر کامران قائدی

و پدر و مادر عزیزم

چکیده

پروتئین پراکسیزوی (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 اسیدآمینه‌های۱۱۴ –۳۱ حاوی یک دامنه فیبرونکتین تایپ III می‌باشد. هنوز هیچ نقش خاصِ برای این پروتئین شناخته نشده است. مشخص شده است که بیان ژن *PEP* موشی تحت تأثیر رتینوئیک‌اسید روی سلول‌های بنیادی طی پروسه نوروژنز افزایش می‌یابد. پس، تعیین ویژگی پروموتر *PEP* می‌تواند سناریویی که پشت این رویداد وجود دارد مشخص نماید. بنابراین، هدف این پژوهش کلون نمودن ناحیه پروموتر فرضی *PEP* بود. در مرحله اول، مطالعات بیوانفورماتیکی برای یافتن پروموتر فرضی برای پروموتر *PEP* انجام شد. مطالعات بیوانفورماتیکی، با استفاده از نرم‌افزارهای معمول برای پیش‌بینی پروموتر، یک ناحیه‌ی پروموتر 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 پروموتری دارد. پس، پرایمرهای اختصاصی با قرار دادن دو جایگاه تشخیصی، *Nhe*I و *Ase*I ، بترتیب درانتهاهای بالا وپایین 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 لز کلرید منیزیوم (4mM) در حضور بافر AMS ، برای تکثیر این ناحیه مورد استفاده قرار گرفت قطعات تکثیر شده شامل (۱) اگزون ۱ و قسمتی از اینترون I (ساختار A) (۲) اگزون ۱ که بصورت frame با ژن گزارشگز *EGFP* است (ساختار B) و (۳) قطعه جهش یافته 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 نومدن درون سلول‌های CHO، P19 و سلول‌های بنیادی موشی (mESCs) انجام شد. برای ساخت یک وکتور pDB2 بدون پروموتر، هضم آنزیمی انجام شد. فعالیت پروموتری در سلول‌های CHO با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری ارزیابی شد. داده‌ها نشان داد که قطعه تکثیر شده هنگامیکه در سلول‌های CHO ارزیابی شد عملکرد پروموتری را دارد و فعالیتی ۱۲ برابر ضعیف‌تر از پروموتر CMV را نشان داد. در میان ساختارهای مختلف، ساختار C فعالیت پروموتری بیشتری را نشان داد و برای ترانسفکت درون P19 و mESC انتخاب شد. فعالیت پروموتری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت اسکن شد. به دلیل بیان کم *PEP* در این دودمان‌های سلولی، دودمان یلولی پایدار برای ساختار C تهیه شد. نوروژنز در این دودمان سلولی پایدار تحت تأثیر رتینوئیک‌اسید، ویتامین D و Noggin انجام شد. بیان *PEP* اندوژنز و گزارشگر EGFP با استفاده از RA و Noggin در روز ۶ و ۱۴ افزایش یافت. اما بعد از مواجهه با ویتامینِ کاهش داشت. Noggin بعنوان یک فاکتور مورد نیاز برای نوروژنز مستقل از رتینوئیک اسید استفاده شد. مواجهه با Noggin بیان ژن *PEP* را در روز ۱۴

بطورچشمگیری افزایش داد که نشان داد که افزایش بیان ژن *PEP* ۶ روز اول نوروژنز 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.

کلمات‌کلیدی: *پروموتر، PEP ، EGFP ، پراگزیمال، دیستال، نوروژنز، سلول‌های پیش ساز عصب، Neurosphere، نورون، گلیال، ویتامین D، Noggin.*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- پروموتر ۱

۱-۲- مطالعه پروموتر ۴

۱-۳- پروتئین PEP ۵

۱-۴- بیماری پراکسیزومی ۶

۱-۵- پراکسیزوم و پیری ۷

۱-۶- بیوانفورماتیک و پیش‌بینی پروموتر ۸

۱-۷- رتینوئیک اسید ۹

۱-۸- ویتامین D ۱۰

۱-۹- کشت سلول و رده‌های سلولی ۱۳

۱-۱۰- سلولهای CHO (CHINESE HAMSTER OVARY) ۱۶

۱-۱۱- سلول‌های بنیادی ۱۷

۱-۱۱-۱- انواع سلول‌های بنیادی ۱۷

۱-۱۱-۲- دسته‌بندی دیگر سلول‌های بنیادی ۱۸

۱-۱۱-۲-۱- سلول‌های بنیادی بالغ ۱۹

۱-۱۱-۲-۲- سلول‌های بنیادی زاینده ۱۹

۱-۱۱-۲-۳- سلول‌های بنیادی جنینی ۱۹

۱-۱۲- مشخصات سلول‌های بنیادی جنینی ۲۱

۱-۱۳- کاربرد سلول‌های بنیادی ۲۲

۱-۱۴- سلول‌های بنیادی جنینی موش(MESCS) ۲۳

عنوان **صفحه**

۱-۱۵- سلول‌های بنیادی جنینی P19 ۲۴

۱-۱۶- تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی ۲۵

۱-۱۷- تمایز نورونی به واسطه تشکیل EB ۲۶

۱-۱۷-۱- استفاده از القاءکننده‌های عصبی ۲۷

۱-۱۷-۱-۱- رتینوئیک اسید ۲۸

۱-۱۷-۱-۲- مکانیسم عمل رتینوئیک اسید ۲۸

۱-۱۷-۲- استفاده از محیط انتخابی فاقد سرم ۲۹

۱-۱۸- اهداف ۳۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- تجهیزات و دستگاهها ۳۱

۲-۱-۱- دستگاه‌های مورد نیاز ۳۲

۲-۲- مواد مصرفی ۳۳

۲-۲-۱- بخش مولکولی ۳۳

۲-۲-۱-۱- سویه‌های باکتری ۳۳

۲-۲-۱-۲- وکتور ۳۳

۲-۲-۱-۳- محیط‌های کشت ۳۵

۲-۲-۱-۳-۱- محیط کشت باکتریایی 2YT ۳۵

۲-۲-۱-۴- آنتی‌بیوتیک ۳۶

۲-۲-۱-۵- بافر الکتروفورز 50X TAE ۳۶

۲-۲-۱-۶- اتیدیوم بروماید ۳۷

عنوان **صفحه**

۲-۲-۱-۷- بافر بارگیری ۳۸

۲-۲-۱-۸- شناساگر اندازه DNA ۳۸

۲-۲-۱-۹- پیش‌بینی ناحیه‌ی پروموتری ۳۸

۲-۲-۱-۱۰- تکنیک PCR ۳۹

۲-۲-۱-۱۰-۱- طراحی پرایمر ۳۹

۲-۲-۱-۱۰-۲- مواد مورد نیاز برای PCR توالی‌های GC-RICH ۳۹

۲-۲-۱-۱۱- مواد مورد نیاز برای استخراج DNA از بافت ۴۰

۲-۲-۱-۱۲- مواد مورد نیاز برای استخراج DNA از سلول ۴۱

۲-۲-۱-۱۳- مواد مورد نیاز برای تیمار با DNASEI و سنتز CDNA ۴۱

۲-۲-۱-۱۴-T\A کلون ۴۱

۲-۲-۱-۱۵- ترانسفورماسیون ۴۲

۲-۲-۱-۱۶- کشت و غربالگری سفید/ آبی ۴۲

۲-۲-۱-۱۷- کشت انبوه ۴۳

۲-۲-۱-۱۸- استخراج وکتور از باکتری ۴۳

۲-۲-۱-۱۹- FREEZE-STOCK ۴۳

۲-۲-۱-۲۰- هضم آنزیمی ۴۴

۲-۲-۱-۲۱- استخراج از ژل ۴۴

۲-۲-۱-۲۲- رسوب‌دهی با اتانول ۴۵

۲-۲-۱-۲۳- مواد مورد نیاز برای REAL TIME PCR ۴۵

۲-۲-۲- بخش سلولی ۴۵

۲-۲-۲-۱- محیط کشت HAM'S F12 ..... ۴۶

عنوان **صفحه**

۲-۲-۲-۲- محیط کشت DMEM ۴۶

۲-۲-۲-۳- محیط کشت سلول‌های فیبروبلاستی ۴۷

۲-۲-۲-۴- محیط کشت COMPLETE برای سلول‌های بنیادی جنینی ۴۷

۲-۲-۲-۵- محیط کشت NEUROBASAL و مکمل ۴۸

۲-۲-۲-۶- EGTA ۴۸

۲-۲-۲-۷- PBS برای شستشوی سلول‌ها ۴۹

۲-۲-۲-۹- PBS برای رنگ‌آمیزی ۴۹

۲-۲-۲-۱۰- آنتی‌بیوتیک ۴۹

۲-۳- روش‌ها و تکنیک‌ها ۵۰

۲-۳-۱- بخش مولکولی ۵۰

۲-۳-۱-۱- مطالعات بیوانفورماتیکی ۵۰

۲-۳-۱-۲- استخراج DNA از بافت ۵۰

۲-۳-۱-۳- تکنیک PCR ۵۱

۲-۳-۱-۴- تکثیر ناحیه‌ی پروموتری ۵۴

۲-۳-۱-۵- T\A کلون ۵۵

۲-۳-۱-۶- ترانسفورماسیون ۵۷

۲-۳-۱-۷- کشت و غربالگری سفید/آبی ۵۷

۲-۳-۱-۸- COLONY INSERT CHECK ۵۸

۲-۳-۱-۹- کشت انبوه ۵۸

۲-۳-۱-۱۰- استخراج پلازمید از باکتری ۵۸

۲-۳-۱-۱۱- هضم آنزیمی ۵۹

عنوان **صفحه**

۲-۳-۱-۱۲- کلون نمودن قطعات پروموتری در وکتور PDB2 ۶۱

۲-۳-۲- بخش سلولی ۶۳

۲-۳-۲-۱- بررسی فعالیت پروموتری *PEP* PROMOTER ۶۳

۲-۳-۲-۲- ذوب سلولهای CHO و P19 ۶۳

۲-۳-۲-۳- پاساژ و شمارش سلولی جهت ترانسفکشن ۶۳

۲-۳-۲-۴- ترانسفکشن ۶۵

۲-۳-۲-۵- سلول‌های بنیادی جنینی RB1 و سلول فیبروبلاستی ۶۶

۲-۳-۲-۶- پاساژ سلول‌های بنیادی جنینی ۶۶

۲-۳-۲-۷- جداسازی سلول‌های بنیادی از سلول های فیبروبلاستی ۶۷

۲-۳-۲-۸- کشت سلول‌های RB1 برای انجام ترانسفکش ۶۷

۲-۳-۲-۹- تولید رده سلولی پایدار ۶۸

۲-۳-۲-۱۰- استخراج ژنوم از سلول‌های پایدار ۶۹

۲-۳-۲-۱۱- مسیر تمایز سلول‌ها طی نوروژنز ۷۰

۲-۳-۲-۱۲- آماده سازی نمونه ها جهت استخراجRNA ۷۰

۲-۳-۳- بخش مولکولی ۷۱

۲-۳-۳-۱- استخراج RNA و پروتئین ۷۱

۲-۳-۳-۲- تعیین کیفیت و غلظت DNA و RNA به روش اسپکتروفتومتری ۷۲

۲-۳-۳-۳- تیمار با DNASE I ۷۳

۲-۳-۳-۵- چک کردن کیفیت CDNAها ۷۴

۲-۳-۳-۶- تکنیک REAL-TIME PCR ۷۴

۲-۳-۳-۶-۱- رنگ اینترکاله (SYBR-GREEN I) ۷۵

عنوان **صفحه**

۲-۳-۳-۶-۲- نمودار MELTING ۷۷

۲-۳-۳-۶-۳- تعیین کارایی پرایمرهای مورد استفاده در REAL TIME PCR ۷۸

۲-۳-۳-۶-۴- تنظیمات دستگاه REAL-TIME PCR ۸۰

۲-۳-۳-۶-۵- تنظیم دما و زمان ۸۰

۲-۳-۳-۶-۷- روش انجام تکنیک REAL TIME PCR ۸۱

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱- بخش مولکولی ۸۴

۳-۱-۱- مطالعات بیوانفورماتیکی ۸۴

۳-۱-۱-۱- GENOMATIX ۸۴

۳-۱-۱-۲- CPG FINDER ۸۶

۳-۱-۱-۳- نرم‌افزار GENETYX و GC-PLOT ۸۶

۳-۱-۲- تکثیر توالی پیش‌بینی شده ۸۷

۳-۱-۳- T/A کلون، ترانسفورماسیون و غربالگری و INSERT CHECK PCR ۸۹

۳-۱-۴- استخراج وکتور ۹۲

۳-۱-۵- هضم آنزیمی ۹۳

۳-۱-۶- جداسازی توالی از وکتور با هضم آنزیمی ۹۴

۳-۱-۷- الحاق توالی پروموتری در وکتور بیانی PDB2 ..... ۹۵

۳-۲- بخش سلولی ۹۵

۳-۲-۱- نتایج فلوسایتومتری سلول‌های CHO ترانسفکت شده ۹۵

۳-۲-۲- نتایج ترانسفکت درون سلول‌های P19 و MESC ۹۶

عنوان **صفحه**

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

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

۳-۲-۴-۱- تیمار ویتامین D ۱۰۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

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 رتینوئیک‌اسید و NOGGIN ۱۰۷

۴-۲-۴- تیمار با ویتامینD ۱۰۸

۴-۳- نتیجه‌گیری کلی ۱۰۹

۴-۴- پیشنهادات ۱۱۰

منابع ۱۱۲

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱- ۱- موقعیت پروموتر در دو رشته DNA ۳
شکل۱- ۲- الگوی بیان مارکرهای مختلف عصبی در غلظت های مختلف رتینوئیک اسید ۱۰
شکل ۱- ۳- هترودایمریزاسیون VDR و RXR ۱۲
شکل ۱- ۴- مسیر عملکردی ویتامین D در سیستم عصبی ۱۳
شکل ۱-۵- درجه‌بندی سلول‌های بنیادی ۱۵
شکل ۱-۶- منشا پیدایش رده سلول‌های بنیادی جنینی و چندخاصیتی موش ۲۱
شکل ۱-۷- ساختار توده ای اجسام شبه رویانی (EB) ۲۷
شکل ۲-۱- نقشه ژنتیکی وکتور کلونینگ pTZ57R/T ۳۴
شکل ۲-۲- نقشه ژنتیکی وکتور بیانی pDB2 ..... ۳۵
شکل ۲-۳- ساختار اتیدیوم بروماید ۳۸
شکل ۲-۴- سه توالی تکثیر شده از پروموتر پیشنهادی برای ژن *PEP* موشی ۵۵
شکل ۲-۵- الحاق در pTZ57R/T ۵۶
شکل۲-۶- نمای شماتیک از جایگزینی پروموتر CMV با توالی پروموتری ژن *PEP* ۶۱
شکل ۲-۷- لام شمارش ۶۵
شکل۲-۸- مسیر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به عصب ۷۰
شکل ۲-۹- ساختار SYBR Green ۷۶
شکل ۲-۱۰- اتصال رنگ SYBR Green با مولکول DNA طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ۷۶
شکل۲-۱۱- Melting Curve ۷۷
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 ۷۹
شکل ۳-۱- نتیجه پیش‌بینی ناحیه پروموتری ژن *PEP* ۸۵
شکل ۳-۲- گراف مربوط به درصد GC و موقعیت CpG Island در پروموتر پیشنهادی ۸۷
شکل ۳-۳- توالی‌های تکثیر شده از پروموتر پیش‌بینی شده ۸۸
شکل ۳-۴- سنتز مگاپرایمرها ۸۸
شکل ۳-۵- کشت باکتری‌های ترانسفورم شده ۸۹