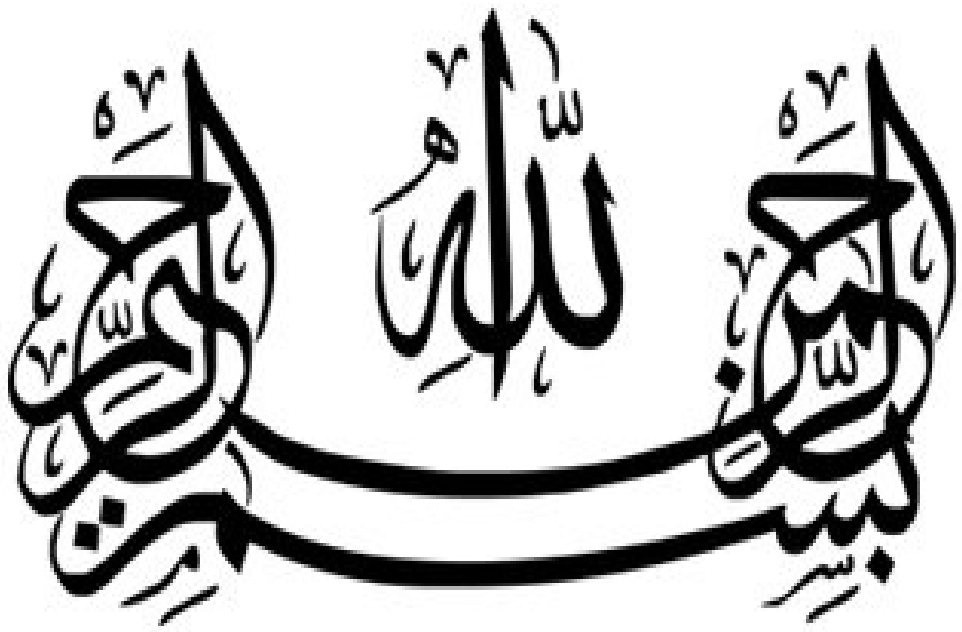
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم زیستی

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای **جعفر وطن دوست** رساله واحدی خود را با عنوان : **" بررسی بیان فاکتور ۹ کربوکسیله در رده سلولی حشره S2 (دروزوفیلا)** " در تاریخ **۹۰/۱۰/۲۱** ساعت **۱۰** در اتاق **۳۴۰۱** ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر علیرضا زمردی پور	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر مجید صادقی زاده	استاد	
۳- استاد مشاور	دکتر رقیه علیپاری	استادیار	
۴- استاد ناظرداخلی	دکتر بهرام محمد سلطانی	استادیار	
۵- استاد ناظرداخلی	دکتر مهرداد بهمنش	دانشیار	
۶- استاد ناظرخارجی	دکتر امیری زاده	استادیار	
۷- استاد ناظرخارجی	دکتر پورفتح الله	دانشیار	
۸- استاد نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سیدجواد مولی	دانشیار	

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 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 **جعفر وطن دوست** دانشجوی رشته **ژنتیک مولکولی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۶** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم زیستی** 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: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶

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 **ژنتیک مولکولی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر **علی رضا زمردی پور** و ~~سرکار خانم~~/جناب آقای دکتر **مجید صادقی زاده** و مشاوره سرکار خانم/~~جناب آقای~~ دکتر **رقیه علیپاری** 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 **جعفر وطن دوست** دانشجوی رشته **ژنتیک مولکولی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضا: ۱۳۹۰/۱۰/۲۶

دانشکده علوم زیستی

رساله دکتری ژنتیک مولکولی

عنوان رساله:

کلون سازی و بررسی بیان فاکتور ۹ کربوکسیله
در رده سلولی حشره S2 (دروزوفیلا)

نام دانشجو:

جعفر وطن دوست

استاد راهنما (اصلی):

دکتر علیرضا زمردی پور

استاد راهنما(دوم):

دکتر مجید صادقی زاده

استاد مشاور:

دکتر رقیه علییاری

دی ۱۳۹۰

تقدیم به

پدرم به استواری کوه

مادرم به زلالی چشمه

همسرم به صمیمیت باران

نهال را باران باید
تا بشوید غبار نشسته بر برگهایش
و سیرابش کند از آب حیات

و آفتاب باید
تا بتاباند نیرو را
و محکم کند
شاخه های تازه روییده را

به نام مادر
بوسه ای باید زد
دست هایی را که
می شویند غبار خستگی روزگار را
و سیراب می کنند روح تشنه را

به نام پدر
بوسه ای باید زد
دست هایی را
که می تابانند نیرو را
و محکم می کنند
استواری پایه های زیستن را

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست و هر چه دارم از اوست.

سپاس او را که آموخت مرا تا بیاموزم، استاد گرامی جناب آقای دکتر علی رضا زمردی پور

او که با اعتماد و صبوری، فرصت انجام ایده های تازه را به من داد. نمی توانم معنایی بالاتر از تقدیر و تشکر بر زبانم جاری سازم و سپاس خود را در وصف این استاد گرانقدر و نیک رفتار آشکار نمایم، که هر چه گویم و سرایم، کم گفته ام.

سپاسگزارم از جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده بخاطر آموخته ها و راهنمایی های ارزنده ایشان.

از استاد مشاورم خانم دکتر علییاری کمال تشکر را دارم که علاوه بر پیشنهادات ارزنده شان، سلول های دروزوفیلا در اختیار ما قرار دادند.

از داوران محترم آقایان دکتر بهمنش، دکتر سلطانی، دکتر پورفتح الله و دکتر امیری زاده و از آقای دکتر مولی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سپاسگزارم و کمال تشکر را دارم.

از خانم دکتر متینه که امکان انجام قسمتی از پروژه را در دانشگاه لیدن هلند فراهم کردند تشکر و سپاسگزاری می کنم.

از تمام دوستان خوب و بزرگوارم در دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم:

آقایان: دکتر سام، دکتر کاردر، مهدی قربانی، احسان فراشاهی، اسماعیل بابایی، محمد حسین صالحی، رضا محمد زاده، بابک بخشی نژاد، حسن بردانیا، حسینی

خانم ها: فریبا عطایی، مریم شاه علی، فاطمه کوه کن، مهنوش فتحی، معین، بهرامی، خورشیدی، منیری

و لازم می دانم از پدر و مادرم، برادر عزیزم و همسرم تشکر کنم که در سایه صبوری، همدلی و همیاری شان به این منظور نایل شدم.

چکیده:

نقص یا کمبود فاکتور ۹ انسانی (یا فاکتور کریسمس) که در مسیر انعقاد نقش کلیدی دارد موجب بیماری هموفیلی B میگردد. در حال حاضر روش معالجه معمول این بیماری ژنتیکی جایگزین درمانی است که با استفاده از فاکتور ۹ مشتق از پلاسمای انسان سالم و یا نوع نوترکیب آن انجام می گیرد. اما امکان آلوده بودن پروتئین های مشتق از پلاسمای انسان به انواع ویروس ها و پریون ها محققین را به سمت تولید انواع نوترکیب این پروتئین سوق داده است. برای تولید پروتئین‌های داروئی در اغلب موارد تغییرات بعد از ترجمه لازم است و سامانه‌های بیانی پستانداران در این رابطه معمولا اولین کاندید هستند. با توجه به مشکلات بیان پروتئین های نوترکیب در سلول های CHO از جمله بیان پایین و ناکارآمدی در گاما کربوکسیلاسیون، لذا رده سلولی اشنایدر (S2) مشتق از دروزوفیلا برای تولید فاکتور ۹ انسانی مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. نشان داده شد که بیان فاکتور ۹ انسانی در سلول های S2 بسیار بیشتر از سلول های CHO است. همچنین فعالیت بیولوژیکی فاکتور ۹ و رسوب آن توسط باریوم سیترات موید قابلیت سلول های S2 برخلاف سایر سلول های حشرات در گاما کربوکسیلاسیون فاکتور ۹ است. با توجه به اینکه گاماکربوکسیلاسیون یکی از اصلی ترین تغییرات بعد از ترجمه است که برای فعالیت فاکتور ۹ ضرورت دارد، تاثیر بیش بیانی آن در این میزبان در انجام گاماکربوکسیلاسیون فاکتور ۹ بیان شده نیز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که برخلاف سلول های پستانداران، بیش بیانی گاما کربوکسیلاز باعث بهبود بیان و فعالیت فاکتور ۹ می گردد.

کلمات کلیدی: هموفیلی **B**، فاکتور انعقادی ۹، رده سلولی اشنایدر، گاما کربوکسیلاسیون

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول ها ..... ح

فهرست شکل ها ..... ک

فصل اول: مقدمه

۱- بیماری هموفیلی B یا کریسمس ۲

۱-۱- تاریخچه هموفیلی ۲

۱-۲- هموفیلی B و علائم آن ۳

۱-۳- بیماران هموفیلی B ٤

۱-۴- روش های درمانی هموفیلی B ٥

۲- فاکتورهای انعقادی و انعقاد خون ۶

۲-۱- فاکتورهای انعقادی ٦

۲-۲- انعقاد خون ۷

۳- فاکتور ۹ انسانی ۹

۳-۱- ساختار ژنتیکی فاکتور ۹ ..... ۱۰

۳-۲- نواحی کدگذار ژن فاکتور ۹ ..... ۱۲

۳-۳- ساختمان پیش ساز فاکتور ۹ ..... ۱۳

۴- فعال سازی فاکتور ۹ ..... ۱۴

۵- تغییرات پس از ترجمه ۱۵

۵-۱- تغییرات پس از ترجمه فاکتور ۹ و نقش این تغییرات در فعالیت بیولوژیکی این فاکتور ۱۷

۶- سیستم های مختلف بیانی ۱۹

۷- خصوصیات آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلایی ۲۳

۸- ضرورت انجام تحقیق ۲۶
۹- اهداف تحقیق ۲۶

فصل دوم: مواد و روشها

۱- نرم افزارها و روش های نرم افزاری ۲۹
۲- مواد مورد نیاز برای بخش مولکولی ۳۰
۲-۱- سویه‌های باکتریایی ۳۰
۲-۲- پلاسمیدها ۳۰
۲-۲-۱- پلاسمید pTZ57R/T (T- وکتور) ۳۰
۲-۲-۲- پلاسمید pcDNA3 ..... ۳۱
۲-۲-۳- پلاسمید pMT/V5/His A ۳۳
۲-۲-۴- پلاسمید pCoHygro ۳٤
۲-۳- پرایمرها ۳٥
۲-۴- مواد شیمیائی مورد نیاز در بخش مولکولی ۳٦
۲-۵- محیط کشت باکتری ۳۷
۲-۶- آنزیم های مورد استفاده در بخش مولکولی ۳۸
۲-۷- نشانگرهای وزن مولکولی DNA ۳۸
۲-۸- محلول ها و بافرهای مورد استفاده در بخش مولکولی ۳۹
۲-۹- کیت‌های آزمایشگاهی مورد استفاده در بخش مولکولی ٤۰
۳- مواد مورد نیاز برای بخش سلولی ۴۱
۳-۱- محیط کشت برای کشت سلول های CHO ٤۱
۳-۲- محیط کشت اختصاصی برای کشت سلول های S2 ..... ٤۱
۳-۳- مواد شیمیائی و آنزیم‌ها ٤۲

۳-۴- بافرها و محلول‌های مورد استفاده در بخش سلولی ٤٣
۳-۵- کیت‌ها، مواد آزمایشگاهی استفاده شده برای بررسی بیان و فعالیت فاکتور ۹ ..... ٤٤
۳-۶- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز جهت SDS-PAGE ٤٥
۳-۷- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای وسترن بلاتینگ ٤٦
۴- روش های پایان‌نامه ۴۷
۴-۱- روش های میکروبی ٤٧
۴-۲- روش‌های بخش مولکولی ٤٩
۴-۲-۱- تهیه ژل آگارز ٤٩
۴-۲-۲- رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید ٤٩
۴-۲-۳- واکنش های PCR ٤٩
۴-۲-۴- واکنش Colony PCR ٥٠
۴-۲-۵- استخراج DNA از ژل آگارز ٥١
۴-۲-۶- خالص سازی محصولات بدست آمده از هضم‌های آنزیمی و PCR ٥١
۴-۲-۷- تخلیص پلاسمید ٥١
۴-۲-۸- مستعد سازی باکتری ها ٥٢
۴-۲-۹- دست ورزی DNA ٥٣
۴-۲-۱۰- آدنیله کردن محصولات تکثیر شده با آنزیم Pfu ٥٥
۴-۲-۱۱- ترانسفورم کردن باکتری ها ٥٥
۴-۲-۱۲- تعیین توالی نوکلئوتیدی ٥٦
۵- روش‌های بخش سلولی ۵۶
۵-۱- کشت سلول ٥٦
۵-۲- پاساژ سلول ها ٥٧

۵-۳- تعیین دوز کشنده دارو به روشMTT Assay..... ۵۸
۵-۴- روش های ترانسفکشن ٦٠
۵-۴-۱- ترانسفکشن با استفاده از کلسیم فسفات ٦٠
۵-۴-۲- ترانسفکشن با استفاده از فیوژن ۶ و لیپوفکتامین ٦١
۵-۴-۳- ترانسفکشن با روش الکتروپوریشن ٦٢
۵-۵- جداسازی کلنی‌های نوترکیب سلول های CHO ٦٣
۵-۶- فریز کردن سلول ها ٦٥
۵-۷- جمع آوری محیط کشت سلول های نوترکیب و بررسی بیان..... ٦٥
۶- روش‌های بررسی بیان و فعالیت فاکتور۹ ..... ۶۶
۶-۱- واکنش RT-PCR ٦٦
۶-۲- اندازه‌گیری آنتی ژن فاکتور ۹ انسانی بیان شده با روش الایزا ٦٧
۶-۳- بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور ۹ در محیط کشت و روش یک مرحله ای انعقاد ٦٨
۶-۴- بررسی پروتئین‌های محیط کشت..... ٦٩
۶-۴-۱- رسوب دهی پروتئین‌های محیط کشت بوسیله باریوم سیترات ٦٩
۶-۴-۲- الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از ژل پلی آکریل آمید حاوی SDS ٧٠
۶-۴-۳- وسترن بلاتینگ..... ٧٢

فصل سوم: نتایج

۱- بخش رایانه ای..... ٧۵
۱-۱- جستجو براساس ناحیه گلای پستانداران ٧۵
۱-۲- جستجو براساس توالی اجمالی و الگوی حاصل از پروپپتید پروتئین های گلای پستانداران ٧٦
۱-۳- جستجو براساس پروپپتید پروتئین های گلای حلزون حلقوی و برخی فاکتورهای انعقادی ٧٦
۱-۴- جستجو براساس پروپپتید پروتئین های گلای حلزون حلقوی ٧٧

۲- بخش مولکولی ۷۹
۲-۱- استخراج و تکثیر cDNA فاکتور ۹ ..... ۷۹
۲-۲- استخراج پلاسمید نوترکیب T.V-hFIX ۸۰
۲-۳ کلون سازی cDNA فاکتور ۹ در T- وکتور ۸۱
۲-۴ کلون سازی cDNA فاکتور ۹ در وکتور پلاسمیدی pMT-V5-His A ۸۳
۲-۴-۱ بررسی صحت وکتور pMT-V5-His A ۸۳
۲-۴-۲ ورود cDNAی فاکتور ۹ در وکتور pMT-V5-His A ۸٤
۲-۵ کلون سازی cDNAی فاکتور ۹ در وکتور pcDNA3 ..... ۸٦
۲-۶ کلون سازی cDNAی EGFP در وکتور pMT-V5-His A ۸۸
۲-۷ استخراج و تکثیر cDNA گاماکربوکسیلاز انسانی ۸۹
۲-۸ کلون سازی cDNAی گاماکربوکسیلاز در T- وکتور ۹۰
۲-۹ کلون سازی cDNA گاماکربوکسیلاز در وکتور پلاسمیدی pMT-V5-His A ۹۲
۳- نتایج بخش سلولی ۹۳
۳-۱ ذخیره سازی سلول ها ۹٤
۳-۲ ترانسفکشن ۹٤
۳-۳ بررسی رشد سلولی و بقا سلول ها ۹٦
۳-۴ بررسی پروموتر متالوتیونین ۹۷
۴- بررسی بیان فاکتور ۹ در بیان موقت ۹۹
۴-۱ بررسی بیان موقت ۹۹
۴-۱-۱ نمودار استاندارد الایزا ۹۹
۴-۱-۲ بررسی بیان موقت فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX ۱۰۰
۴-۱-۳ بررسی بیان موقت فاکتور ۹ در سلول های CHO-hFIX ۱۰۱

۴-۱-۴ مقایسه بیان موقت فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX و CHO-hFIX..... ۱۰۲
۵- بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ ..... ۱۰۳
۵-۱ بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در بیان موقت سلول های S2-hFIX..... ۱۰۳
۵-۲ بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در بیان موقت سلول های CHO-hFIX..... ۱۰۴
۵-۳ مقایسه انعقاد در بیان موقت ۱۰۵
۶- بررسی بیان و فعالیت فاکتور ۹ در بیان دائم ۱۰۶
۶-۱ تهیه کلون های پایدار ۱۰۶
۶-۱-۱ تعیین دوز کشنده آنتی بیوتیک (MTT assay) ۱۰۶
۶-۱-۲ جداسازی کلنی‌های پایدار S2-hFIX ۱۰۷
۶-۱-۳ جداسازی کلنی‌های مقاوم CHO-hFIX ۱۱۱
۶-۲ بررسی بیان دائم فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX..... ۱۱۱
۶-۳ بررسی بیان دائم فاکتور ۹در سلول های CHO-hFIX ۱۱۲
۶-۴- مقایسه بیان دائم فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX و CHO-hFIX ۱۱۳
۶-۵- بررسی فعالیت فاکتور ۹ در بیان دائم سلول های پایدار CHO-hFIX، S2-hFIX ۱۱۴
۶-۵-۱ بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در بیان دائم سلول های S2-hFIX ۱۱۴
۶-۵-۲ بررسی فعالیت فاکتور ۹ در بیان دائم سلول های CHO- hFIX..... ۱۱۵
۶-۵-۳ مقایسه فعالیت فاکتور ۹ در بیان دائم..... ۱۱۵
۷- بررسی اثر بیش بیان گاما کربوکسیلاز ۱۱۷
۷-۱ جداسازی کلنی‌های پایدار S2-hFIX -hγC..... ۱۱۷
۷-۲: بررسی بیان موقت و دائم hFIX در سلول های S2-hFIX-hγC..... ۱۱۹
۷-۳: بررسی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX-hγC ۱۲۲
۸- بررسی بیان کلنی‌های مقاوم روی ژل آکریل آمید حاویSDS (SDS-PAGE) و وسترن بلاتینگ ۱۲۵

۹- رسوب فاکتور ۹ ..... ۱۲۷
۱۰- کارایی ترشح ۱۲۹
۱۱- گلیکوزیلاسیون ۱۳۰
فصل چهارم: بحث ۱۳۱
منابع ۱۴۲
پیوست ۱۴۸

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- فاکتورهای انعقادی و سوبستراهای مرتبط در مسیر انعقاد ۷

جدول۱-۲-اگزون‌ها و اینترون‌های ژن فاکتور ۹ انسانی ۱۱

جدول ۲- ۱- جفت پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق ۳۵

جدول ۲-۲- میزان و ترکیبات محیط های کشت مورد استفاده برای کشت سلول های CHO ۴۱

جدول ۲-۳- میزان (برحسب μl) و ترکیبات استفاده شده در فرایندهای PCR ۵۰

جدول ۲-۴ : برنامه های استفاده شده در انجام واکنش PCR ۵۱

جدول ۲-۵- الگوی حجمی ترکیبات واکنش های هضمی ۵۳

جدول ۲-۶- الگوی حجمی ترکیبات در واکنش های اتصالی این تحقیق ۵۴

جدول ۲-۷- ترکیبات و مقادیر لازم جهت تهیهٔ ژل SDS-PAGE ۷۰

جدول ۳-۱: پروتئین های آشکار شده با جستجو در ژنوم دروزوفیلا با استفاده از توالی پروپپتیدی ۱۷ پروتئین گلای حلزون حلقوی ۷۸

جدول ۳-۲: توالی پرایمرهایی طراحی شده برای تکثیر cDNA فاکتور ۹ ..... ۷۹

جدول ۳-۳: توالی پرایمرهایی طراحی شده برای تکثیر فاکتور ۹ با انتهاهای 5' Kpn I و 3' Xho I ۸۲

جدول ۳-۴: توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر cDNA گاماکربوکسیلاز انسانی ۹۰

جدول ۳-۵: بررسی کلون های مقاوم در محیط میتومیسین ۱۰۸

جدول ۳-۶ بررسی بیان فاکتور ۹ از میان ۳۶ کلون رشد کرده در پلیت ۹۶ خانه ۱۰۹

جدول ۳-۷ بررسی فعالیت فاکتور ۹ از میان ۶ کلون با بالاترین بیان در پلیت ۴۸ خانه ۱۱۰

جدول ۳-۸: انتخاب بهترین کلون برای کشت در مقیاس بالا ۱۱۰

جدول ۳-۹: جداسازی کلونی های مقاوم S2-hFIX- hγC در محیط میتومیسین ۱۱۷

جدول ۳-۱۰: بررسی بیان فاکتور ۹ از میان ۳۰ کلون رشد کرده در پلیت ۹۶ خانه ۱۱۸
جدول ۳-۱۱: ارزیابی کلون های با بالاترین بیان برای انتخاب بهترین کلون با تست انعقاد ۱۱۸
جدول ۳-۱۲: ارزیابی کلون های مقاوم S2-hFIX-hγC برای انتخاب کلون با بیان بیشتر فاکتور ۹ فعال ۱۱۹
جدول ۳- ۱۳: درصد بازیافت فاکتور ۹ نسبت به مقدار اولیه در محیط کشت ۱۲۸
جدول ۳- ۱۴: درصد رسوب فاکتور ۹ کامل کربوکسیله ۱۲۹

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- تصویرشماتیک از مسیر های انعقاد خون و فاکتور های دخیل در آن ۹

شکل۱-۲- سازماندهی مولکولی فاکتور ۹ انسانی به صورت شماتیک ۱۲

شکل۱-۳- ارتباط اگزون‌ها و نواحی‌های فاکتور ۹ ..... ۱۳

شکل۱-۴- ساختمان اولیه فاکتور ۹ انسانی ۱۴

شکل ۱-۵- مسیرهای فعال شدن فاکتور ۹ ..... ۱۵

شکل ۱-۶- مجموعه ای از تغییرات محصولات ترجمه ای که ممکن است بر یک پلی پپتید واقع شود ۱۶

شکل ۲-۱- ساختمان پلاسمید pTZ57R/T (T- وکتور) ۳۱

شکل ۲-۲- ساختمان پلاسمید pcDNA3 ..... ۳۲

شکل ۲-۳- ساختمان پلاسمید pMT/V5/His A ۳۳

شکل ۲-۴- ساختمان پلاسمید pCoHygro ۳۴

شکل ۳-۱: مقایسه نواحی گلا در پروتئین های آشکار شده با پروتئین های گلای شناخته شده انسانی ۷۶

شکل۳-۲: همردیفی پروپپتید پروتئین های گلای حلزون حلقوی و برخی فاکتورهای انعقادی ۷۷

شکل ۳-۳: مقایسه نواحی گلا در پروتئین های آشکار شده با پروتئین های گلای شناخته شده انسانی ۷۸

شکل ۳-۴: فرایند PCR برای تهیه استوک غیرآلوده از باکتریهای واجد T.V -hFIX ۸۰

شکل ۳-۵: تائید وجود cDNA ژن فاکتور ۹ در پلاسمید نوترکیب T.V-hFIX ۸۱

شکل ۳-۶: برش آنزیمی T.V-hFIX با آنزیم های Kpn I و Xho I بطور همزمان ۸۳

شکل ۳-۷: بررسی صحت وکتور pMT-V5-His A ۸۴

شکل ۳-۸: الگوی حرکتی پلاسمید pMT-V5-His A و pMT-hFIX ۸۵

شکل۳-۹: تائید کلون شدن قطعه cDNAی فاکتور ۹ با استفاده از برش پلاسمید pMT-hFIX ۸۶

شکل ۳-۱۰: تائیدکلون شدن hFIX-cDNA درپلاسمید pcDNA3 ..... ۸۷

شکل ۳-۱۱: تائید کلون شدن cDNAی EGFP در پلاسمید pMT-V5-His A ۸۹
شکل۳-۱۲: تهیه گاما کربوکسیلاز با انتهاهای دلخواه 5' Kpn I و 3' Xho I، با استفاده از pfu-PCR ۹۰
شکل ۳-۱۳: تائید وجود cDNAی گاما کربوکسیلاز در پلاسمید نوترکیب T.V- hγC ۹۱
شکل۳-۱۴: تائید کلون شدن قطعه گاماکربوکسیلاز با استفاده از برش پلاسمید pMT- hγC ۹۳
شکل ۳-۱۵: ترانسفکت سلول های S2 با pMT-EGFP به روش لیپوفکشن وکلسیم فسفات..... ۹۵
شکل ۳-۱۶: نمودار رشد سلول های S2 قبل و بعد از ترانسفکشن ۹۶
شکل ۳-۱۷: نمودار بقا سلول های S2 قبل و بعد از ترانسفکشن ۹۷
شکل ۳-۱۸: بررسی بیان فاکتور ۹ در سلول های S2 با فرایند RT-PCR ۹۸
شکل ۳-۱۹: منحنی استاندارد الایزا ۹۹
شکل ۳-۲۰: نمودار بیان موقت فاکتور ۹ در محیط کشت و لیز سلولی سلول های S2-hFIX ۱۰۰
شکل ۳-۲۱: نمودار بیان موقت فاکتور ۹ در سلول های CHO-hFIX ۱۰۱
شکل ۳-۲۲: مقایسه بیان موقت فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX و CHO-hFIX ۱۰۲
شکل۳-۲۳- منحنی استاندارد تست انعقادی بر اساس پلاسمای طبیعی سیتراته انسانی ۱۰۳
شکل ۳-۲۴: نمودار فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در محیط سلول های S2 نوترکیب در زمان های مختلف ۱۰۴
شکل ۳-۲۵: نمودار فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در محیط سلول های CHO نوترکیب در زمان های مختلف ۱۰۵
شکل ۳-۲۶: مقایسه انعقاد در بیان موقت فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX و CHO-hFIX ۱۰۶
شکل ۳-۲۷: تعیین دوز مناسب آنتی بیوتیک هایگرومایسین برای انتخاب کلنی های پایدار سلول های S2 ..... ۱۰۷
شکل ۳-۲۸: ارزیابی بیان دائم فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX ۱۱۲
شکل ۳-۲۹: ارزیابی بیان دائم فاکتور ۹ در سلول های CHO-hFIX ۱۱۳
شکل ۳-۳۰: مقایسه بیان دائم فاکتور ۹ در سلول های S2-hFIX و CHO-hFIX ۱۱۴
شکل ۳-۳۱: ارزیابی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در بیان دائم سلول های پایدار S2-hFIX در زمانهای مختلف ۱۱۵
شکل ۳-۳۲: ارزیابی فعالیت انعقادی فاکتور ۹ در بیان دائم سلول های CHO-hFIX در زمانهای مختلف ۱۱۶
شکل۳-۳۳: مقایسه فعالیت فاکتور ۹ مترشحه از سلولهای پایدار S2-hFIX و CHO-hFIX ۱۱۶