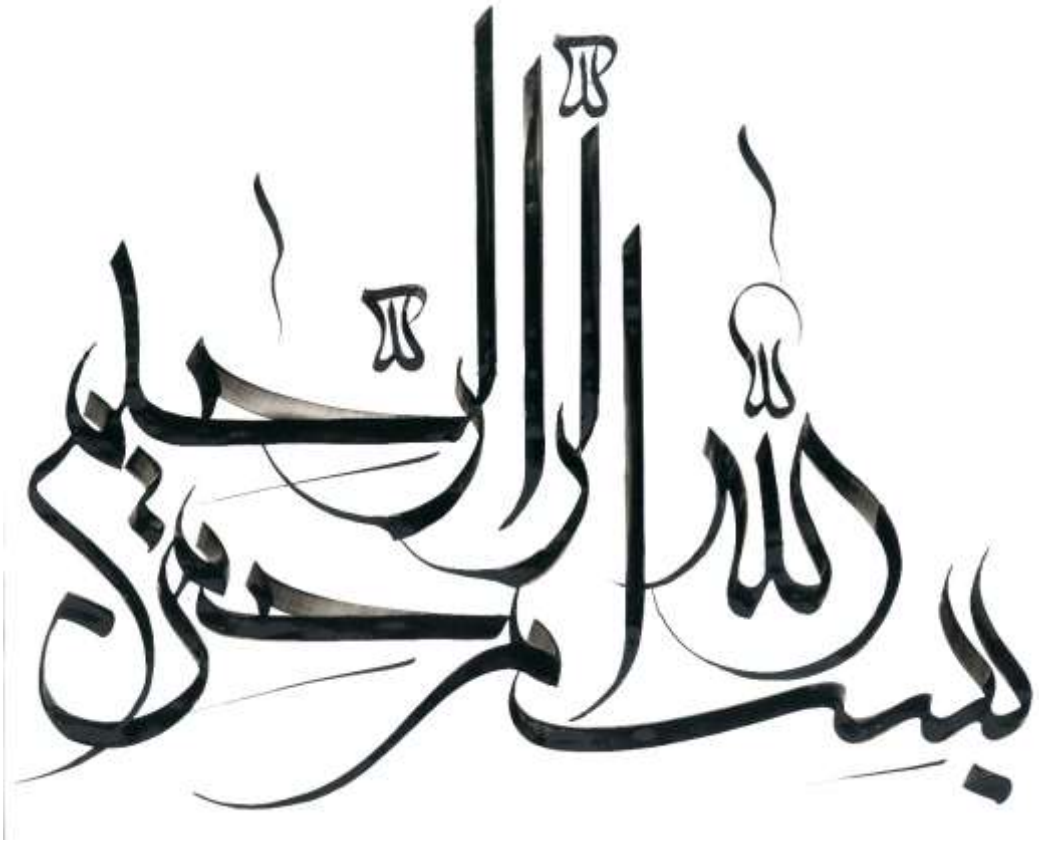
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش ژنتیک

سنتز و کلونینگ cDNAی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ۱۱۱ (VEGF111)

استاد راهنما:

دکتر زهره حجتی

پژوهشگر:

فریبا دهقانیان

شهریور ماه ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر دست آوردهای مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از پژوهش موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است. دانشجو موظف به رعایت آیین‌نامه و منشور اخلاق در پژوهش برای ارائه و یا چاپ مطالب مستخرج از پایان‌نامه خود می‌باشد.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش ژنتیک

خانم فریبا دهقانیان تحت عنوان

سنتز و کلونینگ cDNAی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی۱۱۱ (VEGF111)

در تاریخ ..... توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه .....به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر زهره حجتی با مرتبه علمی دانشیار امضا

۲- استاد داور داخل گروه دکتر مجید متولی باشی با مرتبه علمی دانشیار امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر منوچهر توسلی با مرتبه علمی دانشیار امضا

امضای مدیر گروه

سپاس خدایی راکه مرانشان بندگی بخشید و گردن آویز عبودیت بر گردنم آویخت.

مفتخرم که گل بوسه ی سپاس بر دستان همیشه پر مهر پدر و مادرم می نشانم و همواره مرهون محبت های بی دریغشان هستم.

سپاسگزارم از استادی که در لحظه لحظه های زمان تحصیلم، گام هایم را به سمت و سوی ثمربخش و سودمند راهنمایی نمودند، استاد گرانقدرم سرکار خانم دکتر زهره حجتی، هر زمان که دشواری های مسیر وجودم را کدر می ساخت روشنای علم و هدایت ایشان چراغ راهم می شد.

با سپاس فراوان از اساتید داور، جناب آقای دکتر متولی باشی که همیشه با تذکر نکات مهم و ارزنده و راهنمایی های بی دریغشان مرا یاری نمودند و جناب آقای دکتر توسلی که چنان پدری مهربان مرا مورد لطف خود قرار دادند و زحمت داوری این پایان نامه را قبول نمودند.

همچنین از استاد محترم دکتر ولیان قدردانی نموده و موفقیت روزافزون شان را در زندگی از خدای متعال مسألت دارم.

با سپاس از دوست عزیزم، سرکار خانم مریم کی که با احساسی فراتر از یک دوست، همچون خواهری مهربان در به ثمر رسیدن این پایان نامه و گردآوری مطالب مفید مرا یاری نمود.

تقدیم

به مروارید صدف امامت، وجود نازنینی که عطر نفس هایش شفای جان هاست و و نور نگاهش روشنی بخش دلهاست، دردانه ای که عالم به قیامش قائم و گیتی از فیض وجودش در شعفی دائم.

با بهترین مرتبه ی قدردانی همراه با بوسه ای از سر ارادت بر دستان پدرم، روشنایی بخشی که سراسر زندگی ام از تلألو خورشید وجودش گرمی گرفت و مسیر صحیح زندگی ام با وجود همه سختی ها چون روز روشن شد.

به مادرم که همراهی وجودش به من جان تازه ای بخشید و مرکب راهوار آرزوهایم به هدایت او در سرزمین علم و عمل به مقصد رسید.

به برادران عزیز و با محبتم، علی و امیر که در مسیر زندگی مرا همراه بودند.

چکیده

رگ‌زایی یک فرآیند زیستی مهم در بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک است. فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی گروهی از شناخته‌شده‌ترین و کلیدی‌ترین فاکتورهای رشد در فرآیند رگ‌زایی بوده و در در میان تمام اعضای این خانواده، VEGF-A مهم‌ترین عضو می‌باشد. در حال حاضر VEGFها به‌طور گسترده‌ای در جهان توسط تکنیک‌های مهندسی ژنتیک به صورت نوترکیب تولید شده و در تحقیقات مختلف رگ‌زایی، سلول‌های بنیادی، پزشکی ترمیمی و مهندسی کشت بافت مورد مصرف قرار می‌گیرند. VEGF-A به صورت واریانت‌های مختلفی وجود داشته که حاوی اگزون‌های متفاوت، ویژگی‌های برجسته متمایز و الگوهای بیانی اختصاصی می‌باشند.

در بین تمام ایزوفرم‌های VEGF-A، فاکتور جدید VEGF-۱۱۱ با ویژگی رگ‌زایی قوی و پایداری بسیار بالا از اهمیت ویژه‌ای در تحقیقات بیولوژی مولکولی برخوردار بوده و به عنوان یک فاکتور درمانی پیشنهاد می‌شود. رگ‌زایی ناقص و ایسکمی یکی از مشکلات مهم در پزشکی و در بسیاری از اختلالات شامل بیماری های قلبی – عروقی و جراحت‌ها می‌باشد. در این شرایط پاتولوژیک، اگرچه افزایش سطح mRNAی مربوط به VEGF-A تشخیص داده می‌شود، محیط پروتئولیتیک و مخصوصاً سرین پروتئازهایی مانند پلاسمین منجر به تجزیه‌ی VEGF-A و رگ‌زایی ناقص می‌شوند. ویژگی رگ‌زایی قوی در واریانت VEGF-۱۱۱ و مقاومت آن نسبت به فرآیند پروتئولیز، آن را به کاندید جالب و جذاب برای کاربردهای درمانی در بیماری‌های ایسکمیک تبدیل نموده است. بیان این ایزوفرم ویژه در سلول‌هایی که در معرض اشعه‌ی UV-B و داروهای ژنوتوکسیک قرار گرفته‌اند، القا شده و به طور طبیعی در سلول‌های نرمال فاقد بیان می‌باشد.

هدف از مطالعه‌ی حاضر، سنتز و کلونینگ cDNAی فاکتور رشد VEGF-۱۱۱ به صورت نوترکیب همراه با افزودن توالی اینترونی به منظور بالا بردن میزان بیان و ترجمه‌ی این ایزوفرم می‌باشد. در این راستا، طی واکنش‌های PCR مجزا قطعات کد کننده اگزون‌های ۴-۱ و اینترون ۵-۴ تکثیر شده و با قرار دادن توالی کد کننده جایگاه شناسایی یکی از آنزیم‌های نوع IIs به نام *Eco*31I در پرایمرهای مورد نظر، این دو قطعه‌ی به یکدیگر متصل شده و در وکتور pBud.CE4.1 کلون گردیدند. در ادامه، پلاسمید نوترکیب pBud-VEGF111 درون باکتری *E.coli* Top10 ترانسفورم شده و پس از تأیید فرآیند کلونینگ درون دو لاین سلولی CHO *dhfr*- و HEK 293 ترانسفکت گردید. سپس، بیان ایزوفرم VEGF-۱۱۱ توسط تکنیک Real time PCR و در دو لاین سلولی مورد استفاده بررسی شد. در نهایت تولید پروتئین VEGF-۱۱۱ از طریق دو تست دات بلات و الایزا به طور کیفی مورد مطالعه قرار گرفت.

واژگان کلیدی: رگ‌زایی، VEGF-۱۱۱، تکنیک Real time PCR، تست‌های دات بلات و الایزا

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- رگ‌زایی ۱

۱-۱-۱ تاریخچه شناخت فرآیند رگ‌زایی ۲

۱-۱-۲ مکانیسم رگ‌زایی ۲

۱-۲ رگ‌زایی و بیماری‌ها ۳

۱-۲-۱ رگ‌زایی و سرطان ۴

۱-۲-۲ رگ‌زایی و ایسکِمی ۶

۱-۳ فاکتورهای مؤثر در فرآیند رگ‌زایی ۶

۱-۴ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) ۹

۱-۵ VEGF-A ۱۰

۱-۵-۱ ساختار ژن *VEGF-A* ۱۱

۱-۶ مکانیسم‌های کنترل کننده بیان ژن *VEGF-A* ۱۲

۱-۶-۱ عناصر تنظیمی موجود در ناحیه پروموتری ۱۲

۱-۶-۲ فرآیند پیرایش متناوب ۱۳

۱-۶-۳ ناحیه تنظیمی ۵′UTR ۱۴

۱-۶-۴ ناحیه تنظیمی ۳′UTR ۱۶

۱-۷ خانواده رسپتورهای VEGF (VEGFRs) ۱۶

۱-۷-۱ دیمریزاسون و فعال‌سازیVEGFRها ۱۷

۱-۷-۱ VEGFR1 و مسیرهای انتقال پیام آن ۱۷

عنوان **صفحه**

۱-۷-۲ VEGFR2 و مسیرهای انتقال پیام آن ۱۹

۱-۸ ایزوفرم‌های VEGF-A ۱۹

۱-۸-۱ عملکرد زیستی ایزوفرم‌های VEGF ۲۲

۱-۸-۲ تنظیم پیرایش اگزون ۸ در ژن *VEGF-A* ۲۴

۱-۸-۳ اینترکشن ایزوفرم‌های VEGF-165 و VEGF-165b با رسپتور VEGFR2 ..... ۲۶

۱-۹ اهمیت مطالعه ی فرآیند پیرایش متناوب در VEGF ۲۷

۱-۱۰ ایزوفرم VEGF-111 ..... ۲۸

۱-۱۰-۱ بررسی ارتباط میان ساختار و ویژگی‌های VEGF111 ..... ۳۰

۱-۱۰-۲ VEGF-111، یک عامل درمانی نوید بخش ۳۱

۱-۱۰-۳ زمینه های کاربرد فاکتور نوترکیب VEGF ۱۱۱ ..... ۳۲

۱-۱۱ تاثیر توالی‌های اینترونی در فرآیند رونویسی و ترجمه ۳۳

۱-۱۱-۱ نقش فرآیند پیرایش در خروج mRNA از هسته به سیتوپلاسم و کارآیی ترجمه ۳۳

۱-۱۲ افزایش بیان VEGF در تومورهای پستان ۳۴

۱-۱۳ روش‌های ساخت cDNA ۳۵

۱-۱۴ کشت سلول‌های یوکاریوتی ۳۶

۱-۱۴-۱ رده‌ی سلولی تخمدان همستر چینی (CHO) ۳۷

۱-۱۴-۲ رده‌ی سلولی جنینی کلیه انسانی (HEK 293) ۳۷

۱-۱۵ اهداف مطالعه ۳۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها

عنوان **صفحه**

۲-۱- دستگاه‌های مورد استفاده ۳۹

۲-۲ استخراج DNA ژنومی از خون ۴۰

۲-۲-۱ مواد مورد نیاز برای استخراج DNA ژنومی از خون ۴۰

۲-۲-۲- روش استخراج DNA ژنومی از خون ۴۱

۲-۳ استخراج RNA از بافت تازه توموری پستان ۴۲

۲-۳-۱ مواد لازم جهت استخراج RNA از بافت تازه توموری پستان ۴۲

۲-۳-۲ روش استخراج RNA از نسج طبیعی و توموری تازه ۴۲

۲-۴ تعیین کمیت و خلوص RNA ۴۳

۲-۴-۱ تعیین کمیت و خلوص RNA به روش اسپکتروفتومتری ۴۳

۲-۴-۲ تعیین صحت استخراجRNA توسط ژل آگارز ۴۳

۲-۵ ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده ۴۴

۲-۵-۲ مواد لازم جهت سنتز cDNA ۴۴

۲-۵-۳ مراحل ساخت cDNA ۴۴

۲-۶ تکنیک PCR ۴۵

۲-۶-۱ مواد لازم جهت انجام PCR ۴۵

۲-۶-۲ غلظت یون منیزیم ۴۶

۲-۶-۳ داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) ۴۶

۲-۷ سنتز cDNAی ایزوفرم VEGF-111 با استفاده از روش PCR مبتنی بر آنزیم‌های نوع IIs ۴۶

عنوان **صفحه**

۲-۷-۱ طراحی پرایمرهای ویژه در راستای تکثیر دو قطعه مورد نیاز برای سنتز cDNAی ایزوفرم VEGF-111 ..... ۴۷

۲-۷-۲ پرایمرهای طراحی شده برای سنتز قطعه حاوی اگزون‌های ۱و ۲و ۳ و۴ و قطعه حاوی اینترون ۵-۴ و اگزون ۸ ..... ۵۰

۲-۷-۳ آماده سازی پرایمرها ۵۰

۲-۷-۴ بهینه‌سازی PCR برای دمای اتصال پرایمرها ۵۰

۲-۷-۵ روش انجام PCR برای تکثیر قطعه حاوی اگزون‌های ۱و ۲و ۳و ۴ از روی cDNA بافت توموری پستان ۵۱

۲-۷-۶ روش انجام PCR برای تکثیر قطعه حاوی اینترون ۵-۴ از روی DNA ژنومی خون محیطی ۵۲

۲-۸ ژل الکتروفورز ۵۳

۲-۸-۱ مواد مورد نیاز جهت ژل الکتروفورز ۵۳

۲-۸-۱-۱ بافر TBE ۵۳

۲-۸-۱-۲ بافر TAE ۵۳

۲-۸-۱-۳ اتیدیوم بروماید ۵۳

۲-۸-۱-۴ ژل آگارز ۵۴

۲-۸-۱-۵ نشانگرهای اندازه DNA ۵۴

۲-۸-۱-۶ بافر بارگیری ۵۴

۲-۸-۲ تانک الکتروفورز ۵۵

۲-۸-۳ روش انجام ژل الکتروفورز ۵۵

۲-۹ وکتورpBud.CE4.1، وکتور مورد استفاده برای کلون نمودن ایزوفرم VEGF-111 ..... ۵۵

عنوان **صفحه**

۲-۱۰ سویه باکتریایی ۵۷

۲-۱۰-۱ شرایط کشت و نگهداری ۵۷

۲-۱۰-۲ محیط کشت لوریا-برتنی (LB) ۵۷

۲-۱۰-۳ آنتی‌بیوتیک زئوسین ۵۸

۲-۱۰-۴ محیط کشت لوریا-برتنی‌آگار (LBA) ۵۹

۲-۱۱ استخراج پلاسمید با استفاده از پروتکل کتاب sambrook ۵۹

۲-۱۱-۱ مواد مورد نیاز برای استخراج پلاسمید با استفاده از پروتکل کتاب sambrook ۵۹

۲-۱۱-۲ مراحل استخراج پلاسمید به روش دستی از کتاب sambrook برای تهیه وکتور pBud.CE4.1 مورد نیاز در مرحله الحاق ۶۰

۲- ۱۲ هضم آنزیمی ۶۱

۲-۱۲-۱ مواد لازم برای هضم آنزیمی با استفاده ازآنزیم‌های محدودکننده ۶۱

۲-۱۲-۱-۱ آنزیم محدود کننده *Eco*31I (BsaI) ۶۱

۲-۱۲-۱-۲ آنزیم محدود کننده *Kpn*I ۶۱

۲-۱۲-۱-۳ آنزیم محدود کننده *Bgl*II ۶۲

۲-۱۲-۲ هضم آنزیمی محصولات PCR و وکتور pBud.CE4.1 ..... ۶۲

۲-۱۲-۳ هضم آنزیمی دوگانه ۶۳

۲-۱۲-۳-۱ روش انجام هضم آنزیمی دوگانه با استفاده از دو آنزیم *Eco*31I و *Kpn*I ۶۳

۲-۱۲-۳-۲ انجام هضم آنزیمی دوگانه با استفاده از دو آنزیم *Eco*31I و *Bgl*II ۶۴

۲-۱۲-۳-۳ انجام هضم آنزیمی دوگانه وکتور pBud.CE4.1با استفاده از دو آنزیم *Kpn*I و *Bgl*II ۶۴

عنوان **صفحه**

۲-۱۳ تیمار وکتور با آنزیم آلکالین فسفاتاز ۶۴

۲-۱۳-۱ مواد مورد نیاز برای تیمار وکتور با آنزیم آلکالین فسفاتاز ۶۴

۲-۱۳-۲ مراحل تیمار وکتور pBud.CE4.1 با آنزیم آلکالین فسفاتاز ۶۵

۲-۱۴ استخراج DNA پلاسمیدی و محصول PCR از ژل ۶۶

۲-۱۴-۱ مواد لازم برای استخراج DNA پلاسمیدی و محصول PCR از ژل ۶۶

۲-۱۴-۲ مراحل استخراج DNA پلاسمیدی و محصول PCR از ژل ۶۶

۲-۱۵ تعیین غلظت DNA ۶۷

۲-۱۷ تکنیک الحاق ۶۸

۲-۱۷-۱ مواد لازم برای تکنیک الحاق ۶۹

۲-۱۷-۲ روش انجام تکنیک الحاق ۶۹

۲-۱۸ تهیه سلول‌های مستعد *E.coli* ۶۹

۲-۱۸-۱ مواد مورد نیاز برای تهیه سلول‌های مستعد *E.coli* ۶۹

۲-۱۸-۲ مراحل تهیه سلول‌های مستعد *E.coli* ۶۹

۲-۱۹ ترانسفورماسیون سلول‌های مستعد *E.coli* ۷۰

۲-۱۹-۱ مواد مورد نیاز برای ترانسفورماسیون سلول‌های مستعد *E.coli* ۷۰

۲-۱۹-۲ مراحل ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیت pBud.CE4.1 به سلول‌های مستعد *E.coli* ۷۰

۲-۲۰ استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمنتاز ۷۰

۲-۲۰-۱ مواد لازم برای استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمنتاز ۷۰

۲-۲۰-۲ مراحل انجام استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمنتاز ۷۱

عنوان **صفحه**

۲-۲۰-۳ روش انجام استخراج پلاسمید با استفاده از کیت فرمنتاز ۷۱

۲-۲۱ کشت سلول ۷۲

۲-۲۱-۱ تهیه‌ی محلول‌های مورد نیاز در کشت سلول ۷۲

۲-۲۱-۱-۱ تهیه محلول استوک هیپوگزانتین ۰/۱ مولار ۷۳

۲-۲۱-۱-۲ تهیه محلول استوک تیمیدین ۰/۱ مولار ۷۳

۲-۲۱-۱-۳ تهیه محلول PBS ۰/۰۱ مولار ۷۳

۲-۲۱-۱-۴ مقادیر مورد نیاز از آنتی‌بیوتیک و سرم FBS ۷۳

۲-۲۱-۱-۵ محلول DMSO ۷۳

۲-۲۱-۱-۶ محلول Trypsin/EDTA ۷۳

۲-۲۱-۲ محیط کشت ۷۴

۲-۲۱-۲-۱ محیط کامل برای رشد سلول‌های CHO *dhfr* - ۷۴

۲-۲۱-۲-۲ محیط کامل برای رشد سلول‌های HEK 293 ..... ۷۴

۲-۲۱-۳ رده‌های سلولی مورد استفاده ۷۵

۲-۲۱-۴ نکات کلی قبل از پروسه‌ی کشت سلول ۷۵

۲-۲۱-۵ روش ذوب سلول‌های فریزشده ۷۵

۲-۲۱-۶ پاساژ سلول‌ها ۷۵

۲-۲۱-۶-۱ روش پاساژ سلول‌ها ۷۵

۲-۲۱-۷ فریز سلول‌ها ۷۶

۲-۲۱-۷-۱ روش فریز سلول‌ها ۷۶

۲-۲۱-۸ شمارش سلول‌های CHO *dhfr* - و HEK 293 ..... ۷۷

عنوان **صفحه**

۲-۲۱-۹ کاشت سلول در پلیت کشت سلولی ۱۲ خانه ۷۷

۲-۲۱-۹-۱ روش کاشت سلول ۷۸

۲-۲۱-۱۰ ترانسفکشن سلول‌های CHO *dhfr* - و HEK 293 با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۷۸

۲-۲۱-۱۰-۱ مواد مورد نیاز برای ترانسفکشن سلول‌های CHO *dhfr*- و HEK 293 با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۷۸

۲-۲۱-۱۰-۲ مراحل انجام ترانسفکشن سلول‌های CHO *dhfr*- و HEK 293 با استفاده از کیت لیپوفکتامین ۷۹

۲-۲۲ استخراج RNA از سلول‌های CHO *dhfr* -و HEK 293 ..... ۸۰

۲-۲۲-۱ مواد مورد نیاز برای استخراج RNA از سلول‌های CHO *dhfr*- و HEK 293 ..... ۸۰

۲-۲۲-۲روش استخراج RNA از سلول‌های CHO *dhfr*- و HEK 293 با استفاده از کیت کیاژن ۸۰

۲-۲۳ سنتز cDNA از روی RNA استخراج شده از سلول‌های CHO *dhfr* - و HEK 293 ..... ۸۱

۲-۲۳-۱ انجام PCR بر روی cDNA سنتز شده با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای Real Time PCR ۸۱

۲-۲۳-۲ طراحی پرایمرهای مناسب جهت انجام Real Time PCR ۸۱

۲-۲۳-۳ آماده سازی پرایمرهای Real time PCR ۸۲

۲-۲۳-۳ روش انجام PCR بر روی cDNAی سلول‌های ترانسفکت شده به منظور بهینه‌سازی شرایط مورد نیاز برای انجام Real time PCR ۸۲

۲-۲۴ واکنش Real-time PCR برای بررسی میزان بیان ایزوفرم VEGF-111 کلون شده ۸۳

۲-۲۴-۱ مواد مورد نیاز برای انجام واکنش ۸۳

۲-۲۴-۲ انتخاب ژن کنترل مناسب ۸۴

۲-۲۴-۳ تهیه کیت مناسب جهت انجام Real Time PCR ۸۴

عنوان **صفحه**

۲-۲۴-۴ روش انجام Real Time PCR ۸۵

۲-۲۴-۵ زمان و دمای انکوباسیون بهینه مراحل مختلف Real Time PCR ۸۵

۲-۲۴-۶ تعیین اختصاصیت هر جفت پرایمر پس از انجام Real Time PCR ۸۶

۲-۲۴-۷ بررسی کمیت ژن هدف *VEGF* و ژن‌های کنترل *EEF1A1* و *ACTB* ۸۶

۲-۲۵ تکنیک دات بلات به منظور بررسی بیان پروتئینVEGF-111 ..... ۸۷

۲-۲۵-۱ مواد لازم برای انجام واکنش دات بلات ۸۷

۲-۲۵-۲ تهیه محلول‌های مورد نیاز برای انجام دات بلات ۸۸

۲-۲۵-۲-۱ محلول PBS ۸۸

۲-۲۵-۲-۲ محلول Blocking ۸۹

۲-۲۵-۲-۳ محلول شست و شو ۸۹

۲-۲۵-۲-۴ محلول آنتی‌بادی ۸۹

۲-۲۵-۲-۵ معرف ECL ۸۹

۲-۲۵-۳ پروتکل دات بلات با استفاده از آنتی بادی Momoclonal Anti-polyHistidine Peroxidase Conjugate ۹۰

۲-۲۵-۳-۱ مراحل انجام دات بلات ۹۰

۲-۲۶ تکنیک الایزا ۹۱

۲-۲۶-۱ مواد مورد نیاز در روش الایزا ۹۱

۲-۲۶-۱-۱ بافر کربنات (Coating buffer) ۹۱

۲-۲۶-۱-۲ محلول Blocking ۹۱

۲-۲۶-۱-۳ محلول شست و شو ۹۲

عنوان **صفحه**

۲-۲۶-۱-۴ محلول آنتی‌بادی ۹۲

۲-۲۶-۱-۵ محلول TMB ۹۲

۲-۲۶-۱-۶ محلول متوقف کننده ۹۲

۲-۲۶-۲ تعیین غلظت نسبی VEGF-111 تولید شده به روش الایزا ۹۲

۲-۲۶-۳ مراحل انجام الایزا ۹۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱ استخراج DNA ژنومی ۹۵

۳-۲ استخراج RNA از بافت توموری پستان ۹۶

۳-۳ سنتز cDNA ۹۶

۳-۴ تکثیر قطعه حاوی اینترون ۵-۴ و اگزون ۸ بر روی DNA ژنومی با استفاده از PCR ۹۷

۳-۴-۱ تنظیم کردن دمای اتصال پرایمرها جهت انجام واکنش PCR برای تکثیر قطعه حاوی اینترون ۵-۴ و اگزون ۸ ..... ۹۷

۳-۵ تکثیر قطعه حاوی اگزون‌های ۱ ، ۲، ۳ و ۴ از cDNA بافت توموری پستان ۹۸

۳-۵-۱ تنظیم کردن دمای اتصال پرایمرها جهت انجام واکنش PCR برای تکثیر قطعه حاوی اگزون‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ ..... ۹۸

۳-۶ استخراج پلاسمید pBud.CE4.1 از باکتری اشرشیا کلی سویه DH5α با استفاده از پروتکل کتاب sambrook ۹۹

۳-۷ هضم آنزیمی دوگانه ۱۰۰

۳-۷-۱ هضم آنزیمی دوگانه محصول PCR مربوط به ناحیه اینترونی ۵-۴ و محصول PCR اگزون‌های ۱، ۳،۲ و ۴ ..... ۱۰۰

۳-۷-۲ هضم آنزیمی دوگانه وکتور pBud.CE4.1 با استفاده از دو آنزیم *Kpn*I و *Bgl*II ۱۰۰

عنوان **صفحه**

۳-۸ نتیجه استخراج DNA پلاسمیدی و محصول PCR از ژل ۱۰۱

۳-۹ تیمار وکتور pBud.CE4.1 با آنزیم آلکالین فسفاتاز ۱۰۲

۳-۱۰ واکنش الحاق ۱۰۲

۳-۱۱ ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب ساخته شده ۱۰۳

۳-۱۲ تأیید ترانسفورماسیون در باکتری *E.coli* Top10 با انجام هضم دوگانه بر روی پلاسمیدهای استخراج شده در راستای انتخاب کلنی‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب ۱۰۴

۳-۱۴ استخراج پلاسمید نوترکیب حاوی cDNA ایزوفرم VEGF-111 با استفاده از کیت فرمنتاز به منظور استفاده در مرحله ترانسفکشن سلول‌های یوکاریوتی ۱۰۴

۳-۱۵ تعیین توالی قطعه ۸۰۹ جفت بازی کلون شده در وکتور pBud.CE4.1 ..... ۱۰۵

۳-۱۶ کشت سلول ۱۰۶

۳-۱۶-۱ کشت سلول‌های *dhfr*- CHO و HEK 293 ..... ۱۰۶

۳-۱۶-۲ شمارش و کشت سلولی ۱۰۷

۳-۱۷ استخراج RNA از سلول‌های *dhfr* - CHO و HEK 293 ..... ۱۰۷

۳-۱۸ واکنش PCR معمولی بر روی cDNA سنتز شده با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای Real Time PCR ۱۰۸

۳-۱۹ Real Time PCR ۱۰۹

۳-۱۹-۱ منحنی تکثیر ۱۰۹

۳-۱۹-۲ ترسیم و بررسی منحنی ذوب ۱۱۳

۳-۱۹-۳ بررسی بیان افزاینده ژن *VEGF* در دو رده سلولی HEK 293 و *dhfr* - CHO در نتیجه ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب pBud-VEGF111 ..... ۱۱۵

۳-۱۹-۴ مشاهده محصولات Real time PCR بر روی ژل ۱۱۶

عنوان **صفحه**

۳-۲۰ دات بلات به منظور بررسی تولید پروتئین VEGF-111 ..... ۱۱۷

۳-۲۱ بررسی تولید پروتئین VEGF-111 توسط دو لاین سلولی CHO *dhfr*- و HEK 293 به روش الایزا ۱۱۸

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی نوترکیب ۱۱۹

۴-۲ کلونینگ ایزوفرم‌های مختلف VEGF-A ۱۲۰

۴-۳ بررسی سیر تحقیقاتی ایزوفرم VEGF-111 ..... ۱۲۱

۴-۴ وارد نمودن توالی اینترونی در cDNAی ایزوفرم VEGF-111 ..... ۱۲۱

۴-۵ سنتز cDNAی ایزوفرم VEGF-111 با استفاده از روش PCR مبتنی بر آنزیم‌های نوع IIs ۱۲۳

۴-۶ بررسی میزان بیان و تولید پروتئین VEGF-111 در دو رده سلولی CHO *dhfr*- و HEK 293 ..... ۱۲۳

۴-۵ نتیجه‌گیری کلی ۱۲۵

۴-۶ پیشنهادها ۱۲۶

منابع و مأخذ ۱۲۷

پیوست‌ها ۱۳۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱- ۱ مکانیسم رگ‌زایی ۳

شکل ۱- ۲ رگ‌زایی و بیماری‌ها ۴

شکل ۱ -۳ تعادل رگ‌زایی ۷

شکل۱-۴ نمایش ساختار سه بعدی VEGF ۱۰

شکل ۱-۵ ساختار ژن *VEGF-A* ۱۱

شکل ۱-۶ پیرایش متناوب در ژن *VEGF-A* ۱۳

شکل ۱-۷ نواحی تنظیمی مختلف ژن *VEGF-A* ۱۵

شکل ۱-۸ نمایش شماتیک اتصال اعضای مختلف خانواده VEGF به رسپتورهای VEGFR ۱۶

شکل ۱-۹ جایگاه‌های فسفریلاسیون در رسپتور VEGFR1 و مسیرهای انتقال پیام پایین دست آن..... ۱۸

شکل ۱-۱۰ مسیرهای انتقال پیام پایین دست رسپتور VEGFR2 ..... ۲۰

شکل ۱-۱۱ پیرایش متناوب در اگزون ۸ ..... ۲۱

شکل ۱-۱۲ مکانیسم تنظیم فرآیند پیرایش متناوب در اگزون ۸ ..... ۲۴

شکل ۱-۱۳ مقایسه ساختار آمینواسیدی دو ایزوفرم VEGF-165 و VEGF-165b ۲۵

شکل ۱-۱۴ اینترکشن ایزوفرم‌های VEGF-165وVEGF-165b با رسپتور VEGFR2 ..... ۲۷

شکل ۱-۱۵ نمایش mRNAی ایزوفرم VEGF-111 ..... ۲۹

شکل ۱-۱۶ نقش فرآیند پیرایش در رونویسی و ترجمه ۳۴

شکل ۲-۱ توالی اگزون‌های مربوط به ژن *VEGF-A* و ایزوفرم ویژه VEGF-111 ..... ۴۷

شکل ۲-۲ دیاگرام شماتیک از نحوه‌ی طراحی پرایمرهای ویژه در راستای تکثیر دو قطعه مورد نیاز برای سنتز cDNAی ایزوفرم VEGF-111 بر مبنای روش مبتنی بر آنزیم نوع IIs ۴۹