بسم الله الرحمن الرحیم

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم **ریحانه رمضانی تمیجانی** دانشجوی مقطع **دکتری** رشته **نانو بیوتکنولوژی** به شماره دانشجویی **۸۶۵۷۲۲۰۰۳** رساله واحدی خود را با عنوان" **انتقال DNAوRNAبه سلولهای یوکاریوتی با واسطه نانوسامانه لیپوزومی**" در تاریخ **۱۳۹۲/۴/۱** روز **شنبه** ساعت **۱۳:۳۰** **در اتاق شماره ۵۰۰۹ دانشکده علوم زیستی** 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 می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر مجید صادقی زاده	استاد	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر مهرداد بهمنش	دانشیار	
۳- استاد مشاور دوم	آقای دکتر سامان حسینخانی	دانشیار	
۴- استاد ناظر داخلی	آقای دکتر خسرو خواجه	استاد	
۵- استاد ناظر داخلی	خانم دکتر مریم نیکخواه	استادیار	
۶- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم	دانشیار	
۷- استاد ناظر خارجی	آقای دکتر سید مهدی رضایت	استاد	
۸- نماینده تحصیلات تکمیلی	خانم دکتر مریم نیکخواه	استادیار	

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 دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

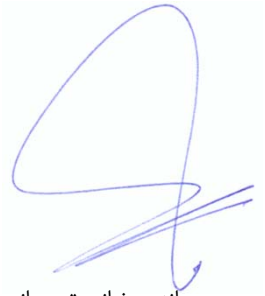
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا 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 آئین‌نامه‌های 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 تاریخ۸۷/۴/۱ 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 **ریحانه رمضانی تمیجانی** دانشجوی رشته نانوبیوتکنولوژی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۶ مقطع دکتری دانشکده علوم زیستی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین 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 آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».



ریحانه رمضانی تمیجانی

۱۳۹۲/۸/۵

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (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 پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

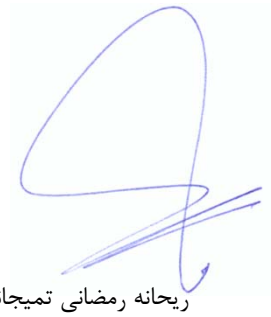
" کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته نانوبیوتکنولوژی است که در سال ۱۳۸۶ در دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده** ، مشاوره **جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش و جناب آقای دکتر سامان حسینخانی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه 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 **ریحانه رمضانی تمیجانی** دانشجوی رشته نانوبیوتکنولوژی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.



ریحانه رمضانی تمیجانی

۱۳۹۲/۸/۵

دانشکده علوم زیستی

رساله دوره دکتری تخصصی(Ph.D.) در رشته نانوبیوتکنولوژی

عنوان:

انتقال DNA و RNA به سلول‌های یوکاریوتی با واسطه نانوسامانه لیپوزومی

نگارش:

ریحانه رمضانی تمیجانی

استاد راهنما:

دکتر مجید صادقی زاده

اساتید مشاور:

دکتر مهرداد بهمنش

دکتر سامان حسینخانی

تابستان ۱۳۹۲

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به

آنان که مهر آسمانی‌شان آرام‌بخش آلام زمینی‌ام است.

به استوارترین تکیه‌گاهم، دستان پر عطوفت پدرم

و به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان پر مهر مادرم.

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره‌ای از دریای بی‌کران مهربانی‌تان را سپاس نتوانم گفت.

امروز هستی‌ام به امید شماست و فردا کلید باغ بهشتم رضای شما.

آوردی گران سنگ‌تر از این ارزان نداشتم تا به خاک پایتان نثار کنم، باشد که حاصل تلاشم ذره‌ای از غبار خستگی‌تان را بزداید.

بوسه بر دستان پر مهرتان

تقدیر و سپاس از

زحمات اساتید گرامی

جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده،

جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش و جناب آقای دکتر سامان حسینخانی

که برای به ثمر رسیدن این پایان‌نامه، همواره از دریای دانش، تجربیات، دانسته‌ها و حمایت‌های این اساتید بزرگوار بهره‌مند بودم.

از تمامی دوستانم در گروه نانوبیوتکنولوژی، ژنتیک، بیوشیمی و بیوفیزیک، به ویژه دوستان خوبم در آزمایشگاه دکتر صادقی‌زاده که همراه و مشوق من در طول این مسیر بودند، سپاسگزاری می‌کنم.

از همسر عزیزم بسیار سپاسگزارم که زحمات فراوانی برای به ثمر رسیدن این رساله متحمل شدند. فراهم‌آوردن آرامش روحی، ایجاد انگیزه و تشویق از طرف ایشان تأثیر به‌سزایی در موفقیت من داشته است.

از دختر عزیزم که در طول این مدت همواره غم دوری از مادر او را آزار می‌داد، معذرت می‌خواهم و امیدوارم او هم در آینده برای پیشرفت و ارتقای کشورش هر چه در توان دارد، انجام دهد.

در پایان از زحمات تمام کسانی که به نوعی در تکمیل‌شدن این پایان‌نامه دخیل بودند، تشکر می‌نمایم و امیدوارم با کاربردی‌شدن این طرح و رفع مشکلات مربوط، تلاش همه این بزرگواران به ثمر برسد.

ریحانه رمضانی

۱۳۹۲/۴/۱۵

چکیده

امروزه بخش عظیمی از تحقیقات پزشکی، زیست شناسی و شیمیایی به تولید یک ساختار غیر ویروسی کارآمد برای انتقال ژن اختصاص یافته است. در میان ساختارهای موجود، لیپوزوم‌های خنثی به دلیل داشتن ساختاری ساده و خودسامانده و در ضمن غیر سمی بودن آنها از ارزش بسزایی برخوردارند. با این وجود به دلیل کارایی پایین این ساختارها در محصورسازی DNA، تا کنون در حیطه انتقال ژن توجه کمی به آنها شده است. در این رساله با استفاده از تکنیک آبگیری- آبدهی دو مرحله‌ای و دقت در آبدهی کنترل شده و تدریجی، برای اولین بار درصد بسیار بالایی از مولکول DNA (۹۸٪) داخل یک غشاء دولایه لیپیدی خنثی، متشکل از DMPC و کلسترول محصورسازی شد. ساختار فسفولیپیدی حاصل از پایداری بسیار بالایی برخودار بود؛ به طوری که بعد از گذشت ۶ ماه همچنان مولکول DNA را داخل ساختار خود حفظ کرده و از آن در مقابل آنزیم‌های تخریب کننده محافظت نمود. این وزیکول‌های دولایه فسفولیپیدی که اندازه‌ای بین ۱۵۰-۱۰۰ نانومتر داشتند؛ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفتند. در تصاویر میکروسکوپی مشخص شد که این لیپوزوم‌ها همانند ویروس‌ها توانایی بالایی در ادغام غشائی از خود نشان می‌دهند. این سامانه لیپوزومی خنثی با انتقال DNA و RNA به سلول‌های یوکارتی CHO تولید کننده پایدار GFP، توانست درصدی از ژن GFP را خاموش سازد. هر چند که کارایی انتقال پایین‌تر از لیپوزوم کاتیونی تجاری (لیپوفکتامین) بود ولی با توجه به مزایای منحصر به فرد این حامل‌ها می‌توان امید داشت که با بهینه‌سازی شرایط، در آینده‌ای نه چندان دور جایگاه ویژه‌ای در سیستم‌های انتقالی بیابند.

کلید واژه: وزیکول‌های دولایه فسفولیپیدی، لیپوزوم خنثی، ویروس مصنوعی، حفاظت از DNA، کارایی محصورسازی DNA

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول ..... ز

فهرست شکل‌ها ..... ح

۱ مقدمه ۱

۲ مروری بر مطالب ۶

۲ـ۱ معرفی کلی لیپوزوم‌ها ۶

۲ـ۲ دلایل طرح و توسعه لیپوزومها به عنوان ابزار تحقیقاتی ۸

۲ـ۳ ابعاد لیپوزوم‌ها ۱۰

۲ـ۳ـ۱ لیپوزوم‌های تک جداره کوچک (SUV) ۱۱

۲ـ۳ـ۲ لیپوزوم‌های تک جدارهای بزرگ ۱۲

۲ـ۳ـ۳ لیپوزوم چند جداره (MLV) ۱۳

۲ـ۴ خصوصیات لیپوزوم‌ها و روشهای مشاهده ۱۸

۲ـ۴ـ۱ پایداری لیپوزوم ۱۹

۲ـ۵ روش‌های تهیه لیپوزوم ۲۴

۲ـ۵ـ۱ روش‌های مکانیکی ۲۴

۲ـ۵ـ۲ روش‌های غیر مکانیکی ۳۱

۲ـ۶ نحوه انتقال دارو توسط لیپوزوم ۳۷

۲ـ۶ـ۱ هدف گیری لیپوزوم‌ها ۳۸

۲ـ۶ـ۲ هدف گیری غیر فعال ۳۹

۲ـ۶ـ۳ هدف گیری فعال ۳۹

۲ـ۷ ژن درمانی چیست؟ ۴۲

۲ـ۷ـ۱ مفهوم ژن‌درمانی در آینده چه خواهد بود؟ ۴۳

۲ـ۷ـ۲ اسیدهای نوکلئیک به عنوان عامل درمان ۴۳
۲ـ۷ـ۳ روش‌های انتقال اسیدهای نوکلئیک..... ۴۳
۲ـ۷ـ۴ ژن درمانی و لیپوزوم ۵۲
۲ـ۸ فسفاتیدیل‌کولین‌ها ۵۶
۲ـ۹ لیپوزوم‌ها به عنوان اولین سلولهای زنده ۵۹
۲ـ۱۰ هدف تحقیق ۶۱
۲ـ۱۰ـ۱ ساخت لیپوزوم خنثی و محصور سازی DNA در ساختار آن ۶۳
۲ـ۱۰ـ۲ انتقال سیستم به سلول یوکاریوتی..... ۶۳
۲ـ۱۰ـ۳ مقایسه کارامدی سیستم در انتقال DNA و RNA ۶۳

۳ مواد وروش‌ها ۶۶

۳ـ۱ طراحی و ساخت الیگونوکلئوتید مناسب..... ۶۶
۳ـ۲ انتخاب حاملی مناسب برای انتقال ژن ۶۸
۳ـ۳ تکثیر و تخلیص حامل PSIRNA-HH1GFP ZEO ۶۸
۳ـ۳ـ۱ انتقال حامل psiRNA-hH1GFP zeo به باکتری GT116 ..... ۶۸
۳ـ۳ـ۲ تخلیص پلاسمید psiRNA-hH1GFP zeo ۷۲
۳ـ۴ انتقال الیگونوکلئوتید سنتز شده از حامل PMA-RQ به حامل PSIRNA-HH1GFP ZEO ... ۷۲
۳ـ۴ـ۱ خارج سازی توالی طراحی شده از پلاسمید pMA-RQ ۷۲
۳ـ۴ـ۲ برش آنزیمی حامل psiRNA-hH1GFP zeo..... ۷۳
۳ـ۴ـ۳ ورود قطعه طراحی شده به پلاسمید psiRNA-hH1GFP zeo (کلونینگ) ۷۳
۳ـ۴ـ۴ انتقال پلاسمید psiRNA-hH1GFP zeo حاوی قطعه مورد نظر به باکتری GT_{116} ۷۴
۳ـ۵ تأیید ورود الیگونوکلئوتید مورد نظر به حامل PSIRNA-HH1GFP ZEO (کلونینگ) ۷۴
۳ـ۵ـ۱ واکنش PCR..... ۷۴
۳ـ۵ـ۲ هضم آنزیمی ۷۷
۳ـ۵ـ۳ توالی‌یابی ۷۸
۳ـ۶ بررسی کارایی توالی پروموتری T7 و فعالیت ریبوزیم ۷۸

۳ـ۶ـ۱ رونویسی در شرایط آزمایشگاهی از توالی طراحی شده ۷۸
۳ـ۶ـ۲ خالص سازی RNA حاصل از فرایند رونویسی در شرایط آزمایشگاه ۷۹
۳ـ۶ـ۳ بررسی و آشکارسازی محصول فرایند رونویسی آنزیم T7 RNA polymerase ۸۰
۳ـ۷ انتخاب زمان مناسب برای فعالیت رونویسی ۸۴
۳ـ۸ آماده سازی لیپوزومها ۸۴
۳ـ۸ـ۱ تهیه لیپوزومهای چند لایه بزرگ ۸۴
۳ـ۸ـ۲ تهیه لیپوزومهای تک لایه کوچک ۸۵
۳ـ۸ـ۳ تهیه لیپوزومهای تک لایه بزرگ ۸۶
۳ـ۸ـ۴ تعیین اندازه و پتانسیل زتا لیپوزومهای تشکیل شده ۸۶
۳ـ۸ـ۵ محصور کردن DNA پلاسمیدی در فضای داخل لیپوزومها ۸۷
۳ـ۸ـ۶ بررسی عوامل مؤثر بر میزان بارگیری DNA توسط لیپوزوم ۸۹
۳ـ۸ـ۷ بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۹۰
۳ـ۸ـ۸ بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم با استفاده ازUV اسپکتروسکوپی ۹۰
۳ـ۸ـ۹ رها سازی DNA محصور شده در ساختار لیپوزوم ۹۱
۳ـ۸ـ۱۰ بررسی میزان مقاومت آنزیمی (DNaseI) ۹۱
۳ـ۸ـ۱۱ بررسی پایداری ساختار لیپوزومی حاوی DNA ۹۲
۳ـ۸ـ۱۲ بررسی ساختار لیپوزومها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ۹۳
۳ـ۹ کشت سلولهای متعلق به دودمان سلول یوکاریوتی CHO ۹۴
۳ـ۹ـ۱ تهیه محیط کشت ۹۴
۳ـ۹ـ۲ غیر فعال سازی FBS ۹۵
۳ـ۹ـ۳ کشت سلولهای CHO ۹۵
۳ـ۹ـ۴ کشت مجدد سلولها ۹۶
۳ـ۹ـ۵ انجماد سلولها ۹۷
۳ـ۹ـ۶ ذوب سلولهای منجمد شده ۹۷
۳ـ۱۰ بررسی سمیت لیپوزومهای حاوی پلاسمید بر روی سلولهای CHO ۹۸

۳ـ۱۰ـ۱ انتقال پلاسمید حاوی GFP به دودمان سلولی CHO توسط لیپوفکتامین ۹۹
۳ـ۱۰ـ۲ انتقال پلاسمید psiRNA-hH1GFP به سلول CHO با استفاده از لیپوزوم ۱۰۰
۳ـ۱۰ـ۳ بررسی عوامل مؤثر در افزایش انتقال پلاسمید به سلولهای CHO توسط لیپوزوم ۱۰۰
۳ـ۱۰ـ۴ تولید دودمان سلولی پایدار تولید کننده پروتئین GFP ۱۰۱
۳ـ۱۰ـ۵ انتقال حامل حاوی توالی shRNA به دودمان سلولی تولید کننده پایدار GFP ۱۰۴

۴ نتایج ۱۰۹

۴ـ۱ طراحی الیگونوکلئوتید مناسب جهت تولید SHRNA برای خاموش‌سازی ژن GFP ۱۰۹
۴ـ۲ انتخاب حاملی مناسب برای انتقال الیگونوکلئوتید به سلول یوکاریوتی ۱۱۰
۴ـ۳ انتقال، تکثیر و تخلیص حامل PSIRNA-HH1GFP ZEO در باکتری GT116 ..... ۱۱۱
۴ـ۴ خارجسازی الیگونوکلئوتید طراحی شده از پلاسمید PMA-RQ ۱۱۱
۴ـ۵ تأیید انتقال الیگونوکلئوتید به پلاسمید PSIRNA-HH1GFP ZEO (کلونینگ) ۱۱۳
۴ـ۵ـ۱ تأیید کلونینگ با هضم آنزیمی ۱۱۳
۴ـ۵ـ۲ تأیید کلونینگ با فرایند PCR ۱۱۴
۴ـ۵ـ۳ تأیید کلونینگ با توالی یابی ۱۱۵
۴ـ۶ بررسی کارایی توالی پروموتری T7 و فعالیت ریبوزیم ۱۱۵
۴ـ۷ انتخاب زمان مناسب برای فعالیت رونویسی ۱۱۶
۴ـ۸ تشکیل لیپوزوم و بررسی خصوصیات آن ۱۱۷
۴ـ۸ـ۱ تعیین اندازه و پتانسیل زتا لیپوزوم‌های تشکیل شده ۱۱۷
۴ـ۸ـ۲ بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۱۱۸
۴ـ۸ـ۳ رها سازی DNA محصور شده در ساختار لیپوزوم ۱۲۳
۴ـ۸ـ۴ بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم با استفاده ازUV اسپکتروسکوپی ۱۲۷
۴ـ۸ـ۵ بررسی میزان مقاومت آنزیمی (DNaseI) ۱۲۸
۴ـ۸ـ۶ بررسی پایداری ساختار لیپوزومی حاوی DNA ۱۲۹
۴ـ۸ـ۷ بررسی ساختار لیپوزوم‌های حاوی DNA با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ۱۳۳
۴ـ۹ بررسی سمیت لیپوزومها ۱۳۴

۴ـ۱۰ انتقال پلاسمید psiRNA-hH1GFP به سلول CHO با استفاده از لیپوزوم ۱۳۶
۴ـ۱۱ بررسی عوامل مؤثر در افزایش انتقال پلاسمید به سلولهای CHO توسط لیپوزوم ۱۳۷
۴ـ۱۱ـ۱ تأثیر کاتیونهای دوظرفیتی ۱۳۷
۴ـ۱۱ـ۲ تأثیر پلی اتیلن گلیکول ۱۳۸
۴ـ۱۲ تولید دودمان سلولی پایدار تولید کننده پروتئین GFP..... ۱۳۹
۴ـ۱۲ـ۱ آزمون MTT برای یافتن غلظت کشندگی مناسب برای آنتی بیوتیک Zeocin ۱۳۹
۴ـ۱۲ـ۲ جداسازی سلولهای تولید کننده GFP به شکل پایدار ۱۳۹
۴ـ۱۳ خاموش‌سازی ژن GFP در سلول CHO با انتقال حامل حاوی shRNA توسط لیپوزوم ... ۱۴۰
۴ـ۱۳ـ۱ حذف ژن GFP از حامل psiRNA-hH1GFP ۱۴۰
۴ـ۱۳ـ۲ انتقال حامل psiRNA-hH1 به سلولهای CHO (تولید کننده پایدار GFP) ۱۴۱
۴ـ۱۴ خاموش‌سازی ژن GFP با انتقال shRNA تولید شده به سلول‌های CHO ۱۴۲

۵ بحث و نتیجه گیری ۱۴۵

۵ـ۱ ساخت لیپوزوم خنثی، محصورسازی DNA داخل ساختار آن و بررسی خصوصیات آن.... ۱۴۶
۵ـ۲ انتقال ژن به سلولهای یوکاریوتی با واسطه لیپوزوم خنثی ۱۵۲
۵ـ۳ انتقال shRNA به سلولهای یوکاریوتی با واسطه لیپوزوم خنثی ۱۵۴

فهرست منابع ۱۵۷

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ ..... ۶۷
جدول ۳-۲ ..... ۷۴
جدول ۳-۳ ..... ۷۴
جدول ۳-۴ ..... ۷۵
جدول ۳-۵ ..... ۷۹
جدول ۳-۶ ..... ۸۳
جدول ۳-۷ ..... ۱۰۵
جدول ۴-۱ ..... ۱۱۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ طرح شماتیک از فضای داخلی لیپوزوم و نحوه قرارگیری داروها در ساختار آن ۷
شکل ۲-۲ دسته‌بندی لیپوزومها بر مبنای ابعاد و ساختار آن ۱۴
شکل ۲-۳ شکل‌گیری ساختار لیپوزوم از فسفولیپیدها در محلول آبی ۱۵
شکل ۲-۴ چگونگی شکل‌گیری ساختارهای MLV و ULV در اثر افزودن آب به فیلم لیپیدی ۳۶
شکل ۲-۵ مقایسه درصد سهم فسفولیپیدهای مختلف در شکل‌گیری غشای سلول و اندامک‌ها ۵۲
شکل ۲-۶ بررسی فسفولیپیدهای تشکیل دهنده غشای سلول و اندامک‌ها ۵۷
شکل ۲-۷ بررسی ساختار فسفولیپیدها ۵۸
شکل ۲-۸ مقایسه ساختار لیپیدهای مختلف موجود در موجودات زنده ۵۹
شکل ۴-۱ نمایی از حامل psiRNA-hH1GFP zeo و محل اثر آنزیم های محدود کننده ۱۱۰
شکل ۴-۲ بررسی ساختار حامل psiRNA-hH1GFP توسط هضم آنزیمی ۱۱۱
شکل ۴-۳ هضم آنزیمی حامل pMA-RQ و psiRNA-hH1 با دو آنزیم ACC65I و HindIII ۱۱۲
شکل ۴-۴ بررسی کیفی فرم خطی حامل psiRNA-hH1GFP و الیگونوکلئوتید خارج شده از حامل pMA-RQ بعد از تخلیص از ژل ۱۱۳
شکل ۴-۵ تأیید کلونینگ با هضم آنزیمی ۱۱۴
شکل ۴-۶ تأیید کلونینگ با تکنیک PCR ۱۱۴
شکل ۴-۷ محصول رونویسی در شرایط آزمایشگاه ۱۱۵
شکل ۴-۸ محصول رونویسی در شرایط آزمایشگاه در زمان‌های انکوباسیون متفاوت ۱۱۶
شکل ۴-۹ بررسی میزان بارگیری DNA توسط لیپوزوم بر اساس روش منجمد و ذوب کردن متوالی ۱۲۰
شکل ۴-۱۰ بررسی میزان بارگیری DNA توسط لیپوزوم از طریق روش آبگیری- آبدهی ۱۲۱
شکل ۴-۱۱ بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم‌ها از طریق آبگیری- آبدهی پی در پی. ۱۲۲
شکل ۴-۱۲ بررسی اثر تیمار تریتون X100 بر روی لیپوزوم‌های حاوی DNA ۱۲۳
شکل ۴-۱۳ بررسی اثر تیمار SDS بر روی لیپوزوم‌های حاوی DNA ۱۲۴
شکل ۴-۱۴ بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف یون منیزیم در میزان بارگیری DNA توسط لیپوزوم. ۱۲۵
شکل ۴-۱۵ بررسی عوامل مؤثر بر میزان بارگیری DNA توسط لیپوزوم ۱۲۶
شکل ۴-۱۶ بررسی اثر تدریجی افزودن آب به فیلم لیپیدی بر میزان بارگیری DNA توسط لیپوزوم ۱۲۷
شکل ۴-۱۷ بررسی میزان بارگیری پلاسمید توسط لیپوزوم‌های خنثی با استفاده از UV اسپکتروسکوپی. ۱۲۸
شکل ۴-۱۸ آزمایش مقاومت نوکلئازی ۱۲۹
شکل ۴-۱۹ بررسی رهایش DNA از لیپوزوم‌ها در طی زمان با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز. ۱۳۰
شکل ۴-۲۰ - بررسی میزان رهایش DNA از ساختار لیپوزوم طی مدت ۶ ماه با استفاده از اسپکتروسکوپی. ۱۳۱
شکل ۴-۲۱ تغییرات در اندازه لیپوزوم‌های حاوی DNA با گذشت زمان ۱۳۲

شکل ۴-۲۲ تغییرات در پتانسیل زتای لیپوزوم‌های حاوی DNA با گذشت زمان ۱۳۲
شکل ۴-۲۳ بررسی پایداری دمایی لیپوزوم‌های حاوی DNA ۱۳۳
شکل ۴-۲۴ تصاویر میکروسکوپ الکترونی لیپوزوم‌ها ۱۳۴
شکل ۴-۲۵ سنجش میزان سمیت ترکیب لیپوزومی حاوی DNA. ۱۳۵
شکل ۴-۲۶ بررسی کارایی ترنسفکشن با فلوریمتری (فلورسانت پلیت ریدر) ۱۳۶
شکل ۴-۲۷ بررسی کارایی ترنسفکشن با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس ۱۳۷
شکل ۴-۲۸ بررسی عوامل مؤثر در افزایش انتقال پلاسمید به سلول‌های CHO توسط لیپوزوم ۱۳۸
شکل ۴-۲۹ بررسی اثر کشندگی آنتی‌بیوتیک بر روی سلولهای CHO ۱۳۹
شکل ۴-۳۰ بررسی بیان پایدار GFP توسط سلول‌های CHO با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس ۱۴۰
شکل ۴-۳۱ تأیید حذف ژن GFP از حامل psiRNA-hH1GFP از طریق هضم آنزیمی ۱۴۱
شکل ۴-۳۲ بررسی کارایی ترنسفکشن و خاموش‌سازی ژن GFP با فلورسانت پلیت ریدر ۱۴۲
شکل ۴-۳۳ درصد کاهش بیان ژن GFP در مقایسه با نمونه کنترل ۱۴۳

فصل اول

مقدمه

۱ مقدمه

پژوهش در ماهیت بیماری‌های ارثی و کشف راه چاره‌ای برای درمان آنها رشته علمی نوینی به نام ژن‌درمانی را پدید آورده که بر پایه علوم مهندسی ژنتیک و DNA نوترکیب استوار است. امروزه با ظهور علم نانوتکنولوژی و تولید نانوساختارهای مختلف و بررسی خصوصیات این ساختارها در بدن موجودات زنده و انسان، ژن‌درمانی هم وارد عرصه جدیدی از رشد و نوآوری شده است. علی رغم کارایی بالای حامل‌های ویروسی در انتقال ژن، به دلیل فعالیت سرطان‌زایی بالقوه متصور برای این ساختارها و نیز پر هزینه بودن ساخت این حامل‌ها در شرایط آزمایشگاه، روز به روز استفاده از آنها محدودتر شده و ساختارهای متنوعی از قبیل پلیمرها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و بسیاری ساختارهای دیگر وارد این عرصه شده‌اند [۱]. سؤالی که به ذهن خطور می‌کند این است که کدامیک از این ساختارها آیندهٔ درخشان‌تری را برای ژن‌درمانی رقم خواهد زد و در نقش یک ویروس مصنوعی برای درمان بیماری‌ها در خدمت بشریت قرار خواهد گرفت؟

آنچه که مسلم است هر چه در ساخت یک حامل الگوبرداری دقیق‌تری چه از نظر ساختاری و چه عملکردی از ویروس‌ها صورت پذیرد، نتایج درخشان‌تری حاصل می‌آید [۲]. در میان ساختارهای موجود، لیپوزوم‌ها به دلیل داشتن ساختاری ساده و خودسامانده و در ضمن کم هزینه بودن ساخت آنها از ابتدا مورد توجه خاصی قرار گرفتند [۳]. آنچه که رؤیای شکل‌گیری شبه‌ویروس‌های درمانی فسفولیپیدی را در آینده به واقعیت نزدیک‌تر می‌کند، مطرح شدن فرضیه‌ای جدید است که با اطمینان زیاد وزیکول‌های لیپیدی دو لایه یا همان لیپوزوم‌ها را به عنوان منشاء حیات معرفی می‌کند

[۴]. در این فرضیه با توجه به خصوصیات منحصر به فرد لیپوزوم‌ها و همچنین سادگی ساختار آنها، ادعا می‌شود که سلول‌های زنده اولیه طی یک فرایند خود به خودی و بدون اعمال هیچ نیروی خارجی، در اثر محصور شدن تصادفی ماکرومولکول‌های بیولوژیک در ساختار بسته و وزیکولی لیپیدهای ساده، حاصل شده‌اند [۵].

لیپوزوم‌ها حین شکل‌گیری به طور خودسامانده قادرند هر ماده‌ای اعم از DNA، RNA و پروتئین و حتی مولکول‌های کوچکی همچون نوکلئوتیدها و یون‌های چند ظرفیتی را داخل یک فضای محصور شده با غشاء دو لایه لیپیدی به دام بیندازند [۶]. این مزیت بزرگ لیپوزوم‌ها این امکان را به محقق می‌دهد که به طور همزمان هم با انتقال دارو و هم انتقال ژن، سلول هدف را مورد درمان قرار دهد. با تمامی این مزایایی که برای لیپوزوم برشمرده شد چرا استفاده درون‌تن از لیپوزوم در انتقال ژن چندان مورد استقبال قرار نگرفته و استفاده از آن تنها به انتقال دارو محدود شده است؟

قبل از به عرصه آمدن لیپوزوم‌های کاتیونی، لیپوزوم‌های خنثی به عنوان مدلی برای مطالعه غشاءهای زیستی مطرح بودند [۷] ولی به دلیل عدم وجود بار مثبت برای ایجاد برهمکنش الکتروستاتیکی با DNA، این ساختارها برای انتقال ژن کنار گذاشته شدند. در عوض وجود بار مثبت سطحی در لیپوزوم‌های کاتیونی و موفقیت آنها در اتصال به اسیدهای نوکلئیک و غشای سلول توجه محققین را به طور خاص به خود معطوف کرد [۸]. بعدها به تدریج موفقیت چشمگیر لیپوزوم‌های کاتیونی در انتقال ژن هم با آشکار شدن سمیت شدید و ناپایدار بودن آنها در سرم تحت الشعاع قرار گرفت [۹].

همانطور که روشن است لیپوزوم‌های خنثی که عموماً از لیپیدهای غشاء سلول‌ها منشاء می‌گیرند، کاملاً غیر سمی بوده [۱۰] و در جریان خون هم پایدار باقی می‌مانند [۱۱]. تنها مشکل این ساختارهای لیپیدی عدم اتصال به DNA برای انتقال آن به سلول هدف است که اگر بتوان میزان محصور شدن DNA داخل این لیپوزوم‌ها را افزایش داد نه تنها این مشکل برطرف گشته، بلکه از DNA در حضور آنزیم‌های نوکلئاز نیز حفاظت می‌شود. در بین روش‌های مناسب برای به دام انداختن

DNA داخل لیپوزوم‌ها، روش آبگیری- آبدهی مؤثرتر از همه نمایان شده است [۱۲]. نکته بسیار جالب همین جاست که در فرضیه پیدایش سلول زیستی اولیه از لیپوزوم‌ها نیز این روش مورد توجه قرار گرفته است[۱۲]. چون بدون هیچ نیروی خارجی و بدون افزودن هیچ ماده اضافی می‌توان با این روش هر نوع ماده‌ای را وارد لیپوزوم کرد. فرض براین است که لیپوزوم‌های اولیه که با فرایند خودساماندهی شکل گرفته بودند بعد از مجاور شدن با DNA، RNA و یا برخی آنزیم‌ها، یک دوره خشکسالی را تجربه کردند و بعد از اینکه به تدریج در مجاورت آب قرار گرفتند تمام این مواد به طور تصادفی در این لیپوزوم‌ها محصور شده و علایمی از حیات ظاهر گردیده است [۵]. آیا امکان تکرار این پدیده در شرایط آزمایشگاه آزمایشگاهی وجود دارد؟ میزان DNA محصور شده در این ساختار لیپوزومی چه میزان خواهد بود؟

برای یافتن جوابی ارزشمند به این پرسش، در این تحقیق با الهام از این فرضیه و با استفاده از روش آبگیری- آبدهی، DNA با کارایی بسیار بالایی به داخل لیپوزوم‌های خنثی متشکل از DMPC، انتقال یافت. نکته مهم و قابل تأمل این‌جاست که برای ورود DNA به داخل ساختار وزیکولی فسفولیپیدی هیچ‌گونه کاتیونی به کار گرفته نشد و مشخص گردید که عدم توانایی لیپوزوم‌های خنثی در ایجاد برهمکنش الکتروستاتیکی با DNA، نمی‌تواند مانعی برای به‌کارگیری آنها در طراحی سیستم‌های انتقالی باشد. بعلاوه DNA به دام افتاده داخل وزیکول‌های دولایه فسفولیپیدی کاملاً به آنزیم‌های تخریب کننده مقاوم بودند و این خود امتیاز ارزشمندی برای این سیستم محسوب می‌شد. در اغلب ساختارهای انتقالی موجود، به دلیل برهمکنش DNA با سطح حامل، مولکول DNA در معرض محیط بیرونی بوده و نسبت به آنزیم‌های تخریب کننده حساس می‌باشد.

نتایجی که تا کنون مبنی بر انتقال DNA به داخل لیپوزوم‌های خنثی گزارش شده است، حاکی از آن است که میزان محصورسازی اسیدهای نوکلئیک در این ساختارها، بسیار پایین بوده و تنها با افزودن لیپیدهای کاتیونی به اجزای سازنده لیپوزوم می‌توان این میزان را افزایش داد [۱۳]. درصورتی که در ساختار لیپوزوم‌های به کار رفته در این تحقیق هیچ‌گونه لیپید کاتیونی استفاده نشده