بسم الله الرحمن الرحیم

**حق مالکیت**

**تمامی هزینه های این طرح توسط پژوهشگاه رویان تامین شده است.**

دانشکده علوم پایه وفناوری‌های نوین زیستی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی – گرایش سلولی و مولکولی

# بهینه‌سازی بیان هورمون محرک فولیکولی انسانی در سلول‌های تخمدان همستر چینی بوسیله‌ی بهینه‌سازی شرایط محیط کشت

**نگارش**

**مینو غفاری**

**اساتید راهنما**

**دکترمحسن قرنفلی ، دکتر محمد حسین صنعتی**

**اساتید مشاور**

**آقای امیر امیری یکتا، دکتر فاطمه تابنده ، دکتر حمید گورابی**

بهمن ماه ۱۳۹۳

فرم ۰۸/د

دانشگاه علم و فرهنگ
معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی
اداره کل تحصیلات تکمیلی

**بسمه تعالی**

**صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد**

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر(عج) جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم **مینو غفاری** تحت عنوان : " **بهینه سازی بیان هورمون محرک فولیکولی انسانی در سلول‌های تخمدان همستر چینی بوسیله بهینه سازی شرایط محیط کشت** "در تاریخ ۱۳۹۳/۱۱/۲۱ با حضور هیأت داوران در دانشگاه علم و فرهنگ برگزار گردید. بدینوسیله، ارزشیابی نهایی پایان نامه به شرح ذیل است.

□ قبول با نمره: ۲۰ به حروف: بیست درجه( عالی ) □ دفاع مجدد □ مردود

| اعضای هیات داوران | نام و نام خانوادگی | رتبه علمی | امضا |
|---|---|---|---|
| ۱- استاد راهنمای اول: جناب آقای دکتر محسن قرنفلی | | | |
| ۲- استاد راهنمای دوم: جناب آقای دکتر محمدحسین صنعتی | | | |
| ۳- استاد مشاور اول: جناب آقای دکتر حمید گورابی | | | |
| ٤- استاد مشاور دوم: سرکار خانم دکتر فاطمه تابنده | | | |
| ٥- استاد مشاور سوم: جناب آقای امیر امیری یکتا | | | |
| ٦- استاد داورداخلی: سرکار خانم دکتر مریم شاه حسینی | | | |
| ۷- استاد داورخارجی: جناب آقای دکتر علی اصغر کارخانه ای | | | |
| ۸- نماینده تحصیلات تکمیلی: سرکار خانم دکتر مریم شاه حسینی | | | |

اداره کل تحصیلات تکمیلی

بر اساس ماده ۲۰ آیین‌نامه آموزشی درجه ارزشیابی پایان نامه به شرح زیر است:

الف) نمره از ۱۹ تا ۲۰ عالی

نمره از ۱۸ تا ۱۸/۹۹ بسیار خوب

نمره از ۱۶ تا ۱۷/۹۹ خوب

نمره از ۱۴ تا ۱۵/۹۹ قابل قبول

ب) نمره کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول

ضروری است که یک نسخه تکمیل شده این فرم مطابق شیوه‌نامه تدوین پایان‌نامه‌ها در ابتدای پایان‌نامه الصاق می گردد.

تقدیم به:

مادرم،

که هرچه دارم از اوست.

## چکیده

هورمون محرک فولیکولی انسانی، یکی از اعضای خانواده‌ی هورمون‌های گنادوتروپینی است. این هورمون گلیکوپروتئینی مانند دیگر اعضای این خانواده، ماکرومولکولی هترودایمر است که از دو زیرواحد تشکیل شده است. زیرواحد عمومی مشترک در تمام اعضای این خانواده $\alpha$ و زیر واحد دیگر $\beta$ نامیده می‌شود. این هورمون بطور طبیعی در باروری زنان و مردان نقش دارد و به عنوان دارو در درمان ناباروری بطور گسترده‌ای استفاده می‌گردد. تولید صنعتی این دارو امروزه به دو صورت نوترکیب و استخراجی از ادرار زنان یائسه صورت می‌گیرد. تولید این هورمون بصورت نوترکیب و با کمک مهندسی ژنتیک مزایایی نسبت به نوع استخراجی از ادرار دارد که از آن قسم می‌توان مواردی مانند عدم آلودگی باهورمون LH ، عدم آلودگی با عوامل بیماریزای ویروسی و پریونی و همچنین خالص‌سازی آسان‌تر را نام برد. در نتیجه تمایل به تولید این دارو بصورت نوترکیب روز به روز افزایش یافته است. تولید این دارو در مقیاس صنعتی هنگامی دارای توجیه است که با کمترین هزینه ممکن، و با بیشترین بازده انجام پذیرد. بدین منظور در این مطالعه سعی شده است که برای کاهش هزینه تولید، تاثیر کاهش میزان سرم جنین گاوی محیط‌کشت سلول‌های نوترکیب CHO به عنوان یکی از گران‌ترین ترکیبات محیط‌کشت، بررسی گردد. علاوه بر این برای بالا بردن میزان بیان این هورمون شرایط محیط‌کشت مانند دما و pH مد نظر قرار گرفته است. در این مطالعه با تغییر دما در بازه ($۲۸^{\circ}C$-$۳۷^{\circ}C$) و pH در بازه(۶/۷-۷/۶)، دما و pH ای که در آن بیشترین بیان وجود دارد تعیین گردید و در انتها تاثیر این دو عامل بطور همزمان بر میزان بیان هورمون بررسی شد. و مشاهده گردید با تاثیر pH و دمای بهینه‌ی در این آزمایش که به‌ترتیب ۷ و $۲۸^{\circ}C$ می‌باشد و در محیط حاوی ٪۳FBS میزان بیان را تا ۱۴ برابر افزایش داد.



**کلمات کلیدی:** هورمون محرک فولیکولی، بهینه‌سازی شرایط محیط کشت، افزایش بیان گلیکوپروتئین‌ها

**فهرست مطالب**

**عنوان** **صفحه**


**فصل اول - مقدمه و کلیات** ۱

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- اهداف طرح و ضرورت انجام طرح ۳

۱-۳- اهداف تحقیق ۳

۱-۴- ناباروری ۴

۱-۴-۱- علل ناباروری در دوجنس زن و مرد ۵

۱-۵-خانواده‌ی هورمون‌های گنادوتروپینی ۶

۱-۶- هورمون FSH انسانی ۷

۱-۶-۱- زیر واحد α هورمون FSH انسانی ۹

۱-۶-۲- زیر واحد β هورمون FSH انسانی ۱۰

۱-۶-۳-پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار هورمون FSH ۱۱

۱-۶-۴- نقش ساختارهای قندی در عملکرد هورمون FSH ۱۲

۱-۷- عملکرد هورمون FSH در بدن و نقش آن در درمان ناباروری ۱۳

۱-۷-۱- عملکرد هورمون FSH در مردان ۱۳

۱-۷-۲- عملکرد هورمون FSH در زنان ۱۴

۱-۷-۳- عملکرد هورمون FSH در درمان ۱۵

۱-۸- گیرنده‌ی هورمون FSH ۱۶

۱-۹- تاریخچه‌ی تولید هورمون FSH برای مصارف دارویی ۱۹

۱-۱۰- سیستم‌های بیانی مختلف برای تولید دارو ۲۲

۱-۱۰-۱- سیستم‌های بیانی پروکاریوتی ۲۲

۱-۱۰-۲- سیستم‌های بیانی یوکاریوتی ۲۳

۱-۱۰-۲-۱- گیاهان ۲۴

۱-۱۰-۲-۲-مخمر ۲۴

۱-۱۰-۲-۳- سیستم‌های بیانی پستانداران ۲۵

۱-۱۰-۲-۳-۱- سیستم بیانیCHO ۲۶

۱-۱۰-۲-۳-۲- سیستم‌های بیانی انسانی ۲۸

۱-۱۱- شرایط و عوامل محیطی موثر بر تولید پروتئین نوترکیب ۲۹

۱-۱۱-۱- دما و pH ۲۸
۱-۱۱-۲- میزان گلوکز محیط کشت ۳۲
۱-۱۱-۳- میزان گلوتامین محیط کشت ۳۴
۱-۱۱-۴- اسمولالیته ۳۶
۱-۱۲- میزان سرم محیط کشت ۳۷
***فصل دوم*** **- مواد و روش‌ها** ۳۹
۲-۱- دستگاه‌های مورد استفاده ۴۰
۲-۲- تجهیزات مورد استفاده ۴۲
۲-۳- مواد مورد استفاده ۴۳
۲-۳-۱- سلول میزبان ۴۳
۲-۳-۲- آنزیم ۴۳
۲-۳-۳-نشانگرهای وزن مولکولی DNA و پروتئین ۴۳
۲-۳-۴- آنتی‌بادی‌های مورد استفاده ۴۴
۲-۳-۵- کیت‌های آزمایشگاهی مورد استفاده ۴۵
۲-۳-۶- مواد آزمایشگاهی مورد استفاده مورد استفاده در کشت سلول ۴۶
۲-۳-۷- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش ۴۷
۲-۳-۷-۱- پرایمرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR ۴۷
۲-۳-۷-۲- پرایمرهای مورد استفاده برای انجام واکنش Real-Time PCR ۴۹
۲-۴- روش‌ها ۵۰
۲-۴-۱- تایید ورود ژن‌های زیرواحدهای β و α هورمون FSH انسانی، به ژنوم CHO ۵۰
۲-۴-۱-۱- استخراج DNA ژنومی سلولCHO ۵۱
۲-۴-۱-۲- الکتروفورز، رنگ آمیزی و مشاهده DNA بر روی ژل آگارز ۵۲
۲-۴-۱-۳- نحوه‌ی ساخت TAE ۱X از TAE ۵۰X ۵۲
۲-۴-۱-۴- تهیه ژل آگارز و مشاهده DNA ۵۲
۲-۴-۱-۵- واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR زیرواحد آلفا ۵۳
۲-۴-۱-۶- واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR زیرواحد بتا ۵۴
۲-۴-۲- بررسی رشد سلول‌ها در محیط کشت با میزان FBS متفاوت ۵۵
۲-۴-۲-۱- تهیه محیط کشت DMEM برای سلول‌هایCHO ۵۶
۲-۴-۲- ۲- ساخت محیط کشت با درصد FBS متفاوت ۵۷

۲-۴-۲-۳- دفریز کردن ۵۸
۲-۴-۲-۳-۱- روش اول ۵۸
۲-۴-۲-۳-۲- روش دوم ۵۸
۲-۴-۲-۴- پاساژ سلولی ۵۸
۲-۴-۲-۵- نحوه‌ی ساخت محیط خنثی ۵۹
۲-۴-۲-۶- نحوه‌ی ساخت PBS ۵۹
۲-۴-۲-۷- مراحل انجام پاساژ سلولی ۶۰
۲-۴-۲-۸- فریز کردن سلول‌ها و آماده‌سازی آنها برای قرار گیری در تانک ازت ۶۰
۲-۴-۲-۹- بررسی تاثیر کاهش میزان FBS محیط کشت بر رشد سلول‌ها و بیان هورمونFSH ۶۲
۲-۴-۲-۱۰- سنجش میزان لاکتات تولیدی در محیط کشت ۶۲
۲-۴-۲-۱۱- سنجش میزان گلوکز در محیط کشت ۶۳
۲-۴-۲-۱۲- بررسی شکل ظاهری سلول‌ها و ترسیم نمودار رشد ۶۳
۲-۴-۵- اعمال تغییر دمای محیط کشت ۶۴
۲-۴-۶- اعمال تغییرات pH در محیط کشت ۶۵
۲-۴-۷- تایید بیان پروتئین FSH در شرایط مختلف ۶۵
۲-۴-۷-۱- استخراج پروتئین ۶۵
۲-۴-۷-۲- SDS-page ۶۷
۲-۴-۷-۳- نحوه‌ی تهیه نمونه ها ۶۷
۲-۴-۷-۴- مراحل ساخت ژلSDS-Page ۶۷
۲-۴-۷-۵- رنگ آمیزیژل SDS-Page با نیترات نقره ۶۹
۲-۴-۷-۶- رنگ آمیزی ژل SDS-Page با رنگ کماسی بلو ۷۱
۲-۴-۸- وسترن بلاتینگ ۷۲
۲-۴-۸-۱- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز جهت وسترن بلاتینگ ۷۲
۲-۴-۹- واکنش Real-time PCR ۷۵
۲-۴-۹-۱- استخراج RNA توسط کیت NucleoSpin® RNA I ۷۵
۲-۴-۹-۲- سنتز cDNA ۷۶
۲-۴-۹-۳- انجام واکنش PCR بر روی cDNA سنتز شده ۷۸
۲-۴-۹-۴-انجام واکنش Real-time PCR ۸۰
۲-۴-۱۰- تعیین غلظت پروتئین به روش بردفورد ۸۱

۲-۴-۱۱-.کمی کردن وسترن بلات ..... ۸۱
۲-۴-۱۲- روش تاگوچی ..... ۸۲
۲-۴-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری ..... ۸۳
**فصل سوم - نتایج** ..... ۸۴
۳-۱- واکنش PCR برای تایید سازه نوترکیب pVITRO-hFSHα/β درژنوم سلول CHO ..... ۸۵
۳-۲- بررسی رشد سلول‌ها در درصدهای مختلفFBS ..... ۸۶
۳-۳- نتایج حاصل از بررسی رشد سلول‌ها و فاکتورهای موثر بر آن در محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS ..... ۸۶
۳-۳-۱-بررسی تعداد سلول‌های زنده در محیط کشت حاوی ۱۰٪FBS ..... ۸۶
۳-۳-۲- بررسی میزان لاکتات تولیدی در محیط کشت حاوی ۱۰٪FBS ..... ۸۷
۳-۳-۳- بررسی تغییرات میزان گلوکز در محیط کشت حاوی ۱۰٪FBS ..... ۸۸
۳-۴- نتایج حاصل از بررسی رشد سلول‌ها و فاکتورهای موثر بر آن در محیط کشت حاوی ۵٪FBS ..... ۸۹
۳-۴-۱- بررسی تعداد سلول‌های زنده در محیط کشت حاوی ۵٪FBS ..... ۸۹
۳-۴-۲- بررسی میزان لاکتات تولیدی در محیط کشت حاوی ۵٪FBS ..... ۹۰
۳-۴-۳- بررسی تغییرات میزان گلوکز در محیط کشت حاوی ۵٪FBS ..... ۹۱
۳-۵- نتایج حاصل از بررسی رشد سلول‌ها و فاکتورهای موثر بر آن در محیط کشت حاوی ۳٪FBS ..... ۹۳
۳-۵-۱- بررسی تعداد سلول‌های زنده در محیط کشت حاوی ۳٪FBS ..... ۹۳
۳-۵-۲- بررسی میزان لاکتات تولیدی در محیط کشت حاوی ۳٪FBS ..... ۹۴
۳-۵-۳- بررسی تغییرات میزان گلوکز در محیط کشت حاوی ۳٪FBS ..... ۹۵
۳-۶- نمودار زنده‌مانی سلول‌ها در درصدهای مختلف FBS ..... ۹۶
۳-۷- نمودار طول مدت زنده‌مانی سلول‌ها در درصدهای مختلف FBS ..... ۹۷
۳-۸- بررسی میزان بیان mRNA هورمون FSH انسانی در سلول‌های CHO ترنسفکت‌شده ..... ۹۸
۳-۸-۱- استخراج RNA ..... ۹۹
۳-۸-۲- نتایج حاصل از RT-PCR برای حصول اطمینان از صحت سنتز cDNA ..... ۹۹
۳-۸-۳-Real-time PCR ..... ۱۰۰
۳-۸-۳-۱- منحنی ذوب (Melt curve) محصول Real tima PCR ژن‌های کدکننده‌ی دو زیرواحد آلفا و بتای هورمون FSH انسانی ..... ۱۰۰
۳-۸-۳-۲- نتایج کمی حاصل از بررسی بیان ژن‌های زیر واحدهای آلفا و بتای هورمون FSH انسانی در درصدهای مختلف FBS ..... ۱۰۲
۳-۹- بررسی میزان بیان هورمون FSH در سطح پروتئین بصورت کمی و کیفی ..... ۱۰۳

۳-۹-۱- SDS-Page ..... ۱۰۳
۳-۹-۲-وسترن بلاتینگ ..... ۱۰۴
۳-۱۰- نتایج حاصل از تغییر دما بر رشد سلول‌ها و میزان تولید FSH ..... ۱۰۶
۳-۱۰-۱- بررسی رشد سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۰۶
۳-۱۰-۱-۱- نمودار تعداد سلول زنده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۰۷
۳-۱۰-۱-۲- نمودار زنده‌مانی سلول‌ها دردمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۰۸
۳-۱۰-۲-تایید بیان هورمونFSH انسانی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ..... ۱۰۸
۳-۱۰-۲-۱- SDS-Page ..... ۱۰۸
۳-۱۰-۲-۲- وسترن بلاتینگ ..... ۱۰۹
۳-۱۰-۳- بررسی رشد سلول‌ها در دمای ۳۴ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۰
۳-۱۰-۳-۱- نمودار تعداد سلول زنده برای سلول‌های رشدیافته در دمای۳۴ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۰
۳-۱۰-۳-۲-نمودار زنده‌مانی ..... ۱۱۱
۳-۱۰-۴- تایید بیان هورمونFSH انسانی در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد ..... ۱۱۲
۳-۱۰-۴-۱- SDS-Page ..... ۱۱۲
۳-۱۰-۴-۲- وسترن بلاتینگ ..... ۱۱۳
۳-۱۰-۵- بررسی رشد سلول‌ها در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۴
۳-۱۰-۵-۱- نمودار تعداد سلول زنده در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۴
۳-۱۰-۵-۲- نمودار زنده‌مانی سلول‌ها دردمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۵
۳-۱۰-۶- تایید بیان هورمونFSH انسانی در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد ..... ۱۱۶
۳-۱۰-۶-۱- SDS-Page ..... ۱۱۶
۳-۱۰-۶-۲- وسترن بلاتینگ ..... ۱۱۷
۳-۱۰-۷- بررسی رشد سلول‌ها در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۷
۳-۱۰-۷-۱- نمودار تعداد سلول زنده در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۷
۳-۱۰-۷-۲- نمودار زنده‌مانی سلول‌ها دردمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۱۸
۳-۱۰-۸- تایید بیان هورمونFSH انسانی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ..... ۱۱۹
۳-۱۰-۸-۱- SDS-Page ..... ۱۱۹
۳-۱۰-۸-۲- وسترن بلاتینگ ..... ۱۲۰
۳-۱۰-۹- بررسی رشد سلول‌ها در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۲۰
۳-۱۰-۹-۱- تعداد سلول زنده در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد ..... ۱۲۰

۳-۱۰-۹-۲- زنده‌مانی سلول‌ها دردمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد ۱۲۱
۳-۱۰-۱۰-تایید بیان هورمونFSH انسانی در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد ۱۲۲
۳-۱۰-۱۰-۱-SDS-Page ۱۲۲
۳-۱۰-۱۰-۲- وسترن بلاتینگ ۱۲۳
۳-۱۱-نتایج حاصل از مقایسه‌ی زنده‌مانی سلول‌ها در دماهای مختلف ۱۲۴
۳-۱۲- بررسی میزان بیان mRNA هورمون FSH انسانی در سلول‌های CHO ترنسفکت‌شده در دماهای مختلف ۱۲۵
۳-۱۲-۱- استخراجRNA ۱۲۶
۳-۱۲-۲-نتایج حاصل از RT-PCR برای حصول اطمینان از صحت سنتز cDNA ۱۲۷
۳-۱۲-۳- نتایج کمی حاصل از بررسی میزان بیان mRNA زیر واحد بتای هورمون FSH انسانی در دماهای مختلف ۱۲۸
۳-۱۳- بررسی میزان بیان هورمون FSH در سطح پروتئین بصورت کمی ۱۲۹
۳-۱۴- نتایج حاصل از تغییر pH بر رشد سلول‌ها و میزان تولید FSH ۱۳۰
۳-۱۴-۱- بررسی تعداد و زنده‌مانی سلول‌ها درpHهای مختلف ۱۳۰
۳-۱۴-۲- SDS-Page ۱۳۱
۳-۱۴-۳- وسترن بلاتینگ ۱۳۲
۳-۱۵- بررسی کمی میزان بیان هورمون FSH انسانی در pHهای مختلف ۱۳۲
۳-۱۵-۱- بررسی میزان بیان mRNA هورمون FSH انسانی در سلول‌های CHO ترنسفکت شده در pHمختلف ۱۳۲
۳-۱۵-۲- Real-time PCR ۱۳۳
۳-۱۵-۳-کمی کردن وسترن بلاتینگ ۱۳۴
۳-۱۶- اندازه‌گیری غلظت پروتئین با استفاده از روش برد فورد ۱۳۵
۳-۱۶-۱- غلظت کلی پروتئین‌ها در درصدهای مختلف FBS ۱۳۶
۳-۱۶-۲-غلظت کلی پروتئین‌ها در دماهای‌های مختلف ۱۳۷
۳-۱۶-۳- غلظت کلی پروتئین‌ها در pH های مختلف ۱۳۸
۳-۱۷- بررسی دما و pH بهینه بطور همزمان ۱۳۸
۳-۱۸- نتایج حاصل از روش تاگوچی ۱۴۱
**فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری کلی** ۱۴۳
۴-۱- بحث ۱۴۴

۴-۲- نتیجه‌گیری کلی ..... ۱۴۸
۴-۳- ارائه‌ی پیشنهادات ..... ۱۴۹
فهرست منابع ..... ۱۴۹

**فهرست جداول**

**عنوان** **صفحه**


جدول(۲-۱): دستگاه‌های مورد استفاده ۴۰

جدول(۲-۲):آنزیم مورد استفاده در این پژوهش ۴۳

جدول(۲-۳): نشانگرهای وزن مولکولی DNA ۴۴

جدول(۲-۴):نشانگرهای وزن مولکولی پروتئین ۴۴

جدول(۲-۵): آنتی‌بادی‌های مورد استفاده برای انجام وسترن بلاتینگ ۴۴

جدول(۲-۶): کیت‌های آزمایشگاهی ۴۵

جدول(۲-۷): مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در کشت سلول CHO ۴۶

جدول(۲-۸): پرایمرهای طراحی شده برای واکنش PCR زیر واحد آلفا ۴۸

جدول(۲-۹): پرایمرهای طراحی شده برای واکنش PCR زیر واحد بتا ۴۸

جدول(۲-۱۰): پرایمرهای طراحی شده برای واکنش Real-Time PCR زیر واحد آلفا ۴۹

جدول(۲-۱۱): پرایمرهای طراحی شده برای واکنش Real-Time PCR زیر واحد بتا ۵۰

جدول(۲-۱۲):: نوع و مقدار ترکیبات موجود در بافر TAE ۵۰X ۵۲

جدول (۲-۱۳): مواد لازم برای انجام واکنش PCR زیرواحد آلفای هورمون FSH انسانی ۵۳

جدول (۲-۱۴): برنامه دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR زیرواحد آلفای هورمون FSH انسانی ۵۴

جدول(۲-۱۵): مواد لازم برای انجام واکنش PCR زیرواحد بتای هورمون FSH انسانی ۵۴

جدول(۲-۱۶): برنامه دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR زیرواحدبتایی هورمون FSH انسانی ۵۵

جدول(۲-۱۷): مواد لازم برای ساخت محیط کشت ۵۶

جدول(۲-۱۸): مواد مورد نیاز برای ساخت محیط با درصدهای مختلف FBS ۵۷

جدول(۲-۱۹): مواد لازم برای پاساژ سلولی ۵۹

جدول(۲-۲۰): مواد لازم برای فریز کردن ۶۱

جدول(۲-۲۱)مواد موجود در کیت استخراج ۶۶

جدول(۲-۲۲) مواد لازم براس ساخت ۵ میلی لیتر ژل تفکیک‌کننده ۶۸

جدول(۲-۲۳): مواد لازم براس ساخت ۳ میلی لیتر ژل تغلیظ‌کننده ۶۸

جدول(۲-۲۴): مواد لازم بری ساخت رانینگ‌بافر ۶۹

جدول(۲-۲۵):مواد لازم برای ساخت ۱۰۰میلی لیتر محلول تثبیت کننده‌ی نوع یک در رنگ آمیزی نیترات نقره ۷۰

جدول(۲-۲۶):مواد لازم برای ساخت ۱۰۰میلی لیتر محلول تثبیت کننده‌ی نوع دو در رنگ آمیزی نیترات نقره ۷۰

جدول(۲-۲۷): طرز تهیه‌ی محلول نیترات نقره ۷۱

جدول(۲-۲۸): طرز تهیه‌ی رنگ کماسی بلو ۷۲
جدول(۲-۲۹): طرز تهیه‌ی رنگ‌بر رنگ کماسی بلو ۷۲
جدول(۲-۳۰):نوع و مواد مورد نیاز برای ساخت بافر انتقال ۷۳
جدول(۲-۳۱):ترکیب مواد موجود در محلول شستشو ۷۳
جدول(۲-۳۲):مواد تشکیل دهنده‌ی محلول بلوکه کننده ۷۴
جدول(۲-۳۳): مواد لازم برای سنتز مرحله‌ی اول cDNA ۷۷
جدول(۲-۳۴): مواد لازم برای سنتز مرحله‌ی دوم cDNA ۷۷
جدول(۲-۳۵):برنامه‌ی دمایی مورد استفاده برای سنتز cDNA ۷۸
جدول(۲-۳۶): مواد مورد استفاده برای واکنش PCR ژن *β-actin* بر روی cDNA سنتز شده ۷۹
جدول(۲-۳۷): برنامه دمایی مورد استفاده برای واکنش PCR ژن ***β-actin*** بر روی cDNA سنتز شده ۷۹
جدول(۲-۳۸): برنامه دمایی مورد استفاده برای انجام واکنش Real-time PCR ۸۰
جدول(۲-۳۹): شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده برای روش تاگوچی ۸۲
جدول(۴-۱): نتایج حاصل از محاسبه‌ی $SN_I$ در آزمایش‌های مختلف ۱۴۱
جدول(۴-۲): بررسی تاثیر هر یک از پارامترها بر افزایش بیان ۱۴۱

## فهرست نمودارها

**عنوان** **صفحه**


نمودار(۳-۱): نمودار تعداد سلول زنده در محیط حاوی ۱۰٪FBS ۸۶

نمودار(۳-۲): جذب خوانده شده متناسب با لاکتات تولیدی در محیط کشت حاوی ۱۰٪FBS ۸۷

نمودار(۳-۳): جذب خوانده شده متناسب با گلوکز موجود در محیط کشت حاوی ۱۰٪FBS ۸۸

نمودار(۳-۴): نمودار تعداد سلول زنده در محیط حاوی ۵٪FBS ۸۹

نمودار(۳-۵): جذب خوانده شده متناسب با لاکتات تولیدی در محیط کشت حاوی ۵٪FBS ۹۰

نمودار(۳-۶): جذب خوانده شده متناسب با گلوکز موجود در محیط کشت حاوی ۵٪FBS ۹۱

نمودار(۳-۷):تعداد سلول زنده در محیط حاوی ۳٪FBS ۹۲

نمودار(۳-۸): جذب خوانده شده متناسب با لاکتات تولیدی در محیط کشت حاوی ۳٪FBS ۹۳

نمودار(۳-۹): جذب خوانده شده متناسب با گلوکز موجود در محیط کشت حاوی ۳٪FBS ۹۴

نمودار(۳-۱۰):مقایسه‌ایتعدادسلول‌هایزندهدرمحیطکشت‌هایحاویدرصدهایمختلفFBS ۹۵

نمودار(۳-۱۱): نمودارمقایسه‌ایدرصدزنده‌مانیسلول‌هادرمحیطکشت‌هایحاویدرصدهایمختلفFBS ۹۶

نمودار(۳-۱۲): مقایسه‌ی طول مدت زنده‌مانیسلول‌هادرمحیطکشت‌هایحاویدرصدهایمختلفFBS ۹۶

نمودار(۳-۱۳): منحنی ذوب محصول Real time PCR ژن‌های کدکننده‌ی دو زیرواحد آلفا و بتای هورمون FSH انسانی ۹۹

نمودار(۳-۱۴): میزان mRNA نسبت داده به سلول‌های کشت داده شده در محیطکشت‌هایی با درصدهای مختلفFBS ۱۰۱

نمودار(۳-۱۵): مقایسه‌ی میزان بیان هورمون FSH انسانی در سلول‌های رشدیافته در محیطکشت‌هایی با درصدهای مختلفFBS ۱۰۴

نمودار(۳-۱۶):رشد سلول‌ها در دمای ۳۷درجه سانتیگراد ۱۰۵

نمودار(۳-۱۷): زنده‌مانی در دمای ۳۷درجه سانتیگراد ۱۰۶

نمودار(۳-۱۸): رشد سلول‌ها در دمای ۳۴درجه سانتیگراد ۱۰۹

نمودار(۳-۱۹): زنده‌مانی در دمای ۳۴درجه سانتیگراد ۱۱۰

نمودار(۳-۲۰): رشد سلول‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد ۱۱۳

نمودار(۳-۲۱): زنده‌مانی در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد ۱۱۴

نمودار(۳-۲۲): رشد سلول‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ۱۱۷

نمودار(۳-۲۳): زنده‌مانی در دمای ۳۰درجه سانتیگراد ۱۱۷

نمودار(۳-۲۴) : رشد سلول‌ها در دمای ۲۸درجه سانتیگراد..... ۱۲۰
نمودار(۳-۲۵): زنده‌مانی در دمای ۲۸درجه سانتیگراد..... ۱۲۰
نمودار(۳-۲۶): نمودار مقایسه‌ای تعداد سلول‌های زنده در دماهای مختلف..... ۱۲۳
نمودار(۳-۲۷): نمودار مقایسه‌ای زنده‌مانی در دماهای مختلف..... ۱۲۴
نمودار(۳-۲۸): مقایسه‌ی میزان mRNA نسبت داده شده در دماهای مختلف، طی چهار استخراج..... ۱۲۷
نمودار(۳-۲۹): نمودار میانگین میزان بیان هورمون FSH انسانی (به نانوگرم) در هر فلاسک ۷۵ T ، در دماهای مختلف..... ۱۲۸
نمودار(۳-۳۰): مقایسه‌ی تعداد سلول زنده در ابتدای فاز سکون سلول‌ها در pH های مختلف..... ۱۲۹
نمودار(۳-۳۱): مقایسه‌ی زنده‌مانی سلول‌ها در ابتدای فاز سکون سلول‌ها در pH های مختلف..... ۱۳۰
نمودار(۳-۳۲): مقایسه‌ی میزان mRNA نسبت داده شده در ابتدای فاز سکون سلول‌ها در pH های مختلف..... ۱۳۳
نمودار(۳-۳۳): مقایسه‌ی میزان بیان هورمون FSH (نانوگرم)در ابتدای فاز سکون سلول‌ها در pH های مختلف..۱۳۴
نمودار (۳-۳۴):نمودار استاندارد بدست‌آمده مربوط به تکنیک برد فورد..... ۱۳۵
نمودار (۳-۳۵):میزان غلظت کلی پروتئین تولید شده از سلول‌های رشد یافته در غلظت‌های مختلف FBS..... ۱۳۵
نمودار (۳-۳۶):میزان غلظت کلی پروتئین تولید شده از سلول‌های رشد یافته در دماهای مختلف..... ۱۳۶
نمودار (۳-۳۷):میزان غلظت کلی پروتئین تولید شده از سلول‌های رشد یافته در pHهای مختلف..... ۱۳۷
نمودار(۳-۳۸): مقایسه‌ی میزان بیان هورمونFSH انسانی (نانوگرم)در ابتدای فاز سکون در شرایط بهینه و کنترلی ..... ۱۳۹
نمودار(۳-۳۹): مقایسه‌ی زنده‌مانی در ابتدای فاز سکون در شرایط بهینه و کنترلی..... ۱۳۹
نمودار(۳-۴۰): مقایسه‌ی تعداد سلول زنده در ابتدای فاز سکون در شرایط بهینه و کنترل..... ۱۴۰

## فهرست تصاویر

**عنوان** **صفحه**


تصویر(۱-۲): هورمون FSH انسانی ۸

تصویر (۱-۲) : توالی زیرواحد آلفای هورمون FSH انسانی ۱۰

تصویر (۱-۳) : توالی زیرواحد بتای هورمون FSH انسانی ۱۱

تصویر(۱-۴): تغییرات میزان هورمون FSH به همراه تغییرات در میزان هورمون LH ۱۵

تصویر(۱-۵): توالی اسیدآمینه‌ای گیرنده‌ی هورمون FSH ۱۷

تصویر(۱-۶): نحوه‌ی اتصال هورمون FSH به گیرنده‌اش ۱۸

تصویر(۱-۷): سلول‌های رده‌ی سلولیCHO ۲۶

تصویر(۳-۱): نتایج حاصل از واکنش PCR ۸۴

تصویر(۳-۲): RNA استخراجی از سلول‌های رشد یافته درمحیط کشت‌های حاوی درصدهای مختلفFBS. ۹۷

تصویر(۳-۳): واکنش PCR ژن *actβ*بر روی cDNAسنتز شده از mRNA استخراج شده از سلول‌های استخراج شده در محیط کشت‌های مختلف ۹۸

تصویر(۳-۴): محصول حاصل ازReal-time PCR ۱۰۰

تصویر(۳-۵):SDS-Page از پروتئین استخراجی سلول‌های کشت داده شده در درصدهای مختلف FBS. ۱۰۲

تصویر(۳-۶): تصاویر وسترن بلانینگ از دو زیرواحد آلفا و بتا ۱۰۳

تصویر(۳-۷)SDS-Page بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۷درجه سانتیگراد ۱۰۷

تصویر(۳-۸): وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۱۰۸

تصویر(۳-۹)SDS-Page بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۴درجه سانتیگراد ۱۱۱

تصویر(۳-۱۰): وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد ۱۱۲

تصویر(۳-۱۱)SDS-Page بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۲درجه سانتیگراد ۱۱۵

تصویر(۳-۱۲): وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد ۱۱۶

تصویر(۳-۱۳)SDS-Page بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۰درجه سانتیگراد ۱۱۸

تصویر(۳-۱۴): وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ۱۱۹

تصویر(۳-۱۵)SDS-Page بر روی پروتئین استخراجی در دمای ۲۸درجه سانتیگراد ۱۲۱

تصویر(۳-۱۶): وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین استخراجی در دمای۲۸ درجه سانتیگراد ۱۲۲

تصویر(۳-۱۷): گروه اول RNA استخراجی از سلول رشد یافته در دماهای مختلف ۱۲۵

تصویر(۳-۱۸): گروه دوم RNA استخراجی از سلول رشد یافته در دماهای مختلف ۱۲۵

تصویر(۳-۱۹): واکنش PCR ژن *actβ* بر روی cDNAسنتز شده از mRNA استخراج شده در دماهای مختلف ..... ۱۲۶
تصویر(۳-۲۰): SDS-Page بر روی پروتئین استخراجی درpHهای مختلف..... ۱۲۸
تصویر(۳-۲۱):وسترن بلاتینگ بر روی پروتئین استخراجی در pHهای مختلف..... ۱۲۹
تصویر(۳-۲۲) : RNA استخراج شده در pH های مختلف..... ۱۳۳
تصویر(۳-۲۳): واکنش PCR ژن *actβ* بر روی cDNAسنتز شده از mRNA استخراج شده از سلول‌هایدر pH های مختلف..... ۱۳۳
تصویر(۳-۲۴): وسترن بلاتینگ فاز نهایی..... ۱۳۸

# مقدمه و
# کلیات