چه روشهایی در

تحقیقات زیست پزشکی

مورد استفاده قرار می‌گیرند؟

راهنمای انتخاب روش در طراحی پژوهش

شقایق حق‌جوی جوانمرد، مرجان گلشنی.

www.ketab.ir

سرشناسه	:	حق‌جوی جوانمرد، شقایق
عنوان و نام پدیدآور	:	چه روشهایی در تحقیقات زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند؟ : راهنمای انتخاب روش در طراحی پژوهش / شقایق حق‌جوی جوانمرد ، مرجان گلشنی.
مشخصات نشر	:	تهران : سبزآرنگ ؛ اصفهان : دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌درمانی اصفهان ، ۱۳۹۰
مشخصات ظاهری	:	XI ، ۱۶۸ ص. : جدول، نمودار.
شابک	:	۹۷۸-۹۶۴-۵۶۸۳-۴۲-۷
وضعیت فهرست نویسی	:	فیپا
یادداشت	:	کتابنامه.
یادداشت	:	نمایه.
موضوع	:	پزشکی -- تحقیق -- روش‌شناسی
شناسه افزوده	:	گلشنی، مرجان، ۱۳۶۲ -
شناسه افزوده	:	دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان
رده بندی کنگره	:	R۸۵۰/ح۷چ۹ ۱۳۹۰الف
رده بندی دیویی	:	۶۱۰/۷۲۴

www.ketab.ir

نام کتاب: چه روشهایی در تحقیقات زیست پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند؟: راهنمای انتخاب روش در طراحی پژوهش

نویسنده: شقایق حق جوی جوانمرد، مرجان گلشنی

ناشر: سبزآرنگ با همکاری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تیراژ: ۵۰۰ جلد

نوبت چاپ: اول /۱۳۹۰

قیمت: ۶۰۰۰۰ ریال

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۵۶۸۳-۴۲-۷

تلفن: ۶۶۴۰۶۴۷۷-۰۹۱۲۳۵۹۱۴۴۳

مقدمه

دانشجویان بسیاری وقتی مشغول خواندن کتاب‌های درسی خود هستند متوجه نیستند که چه آزمایشات متعدد و پیچیده‌ای انجام شده تا هر یک از این جملات به عنوان یک واقعیت در کتاب نوشته شود. در واقع اینکه بدانیم این دانسته‌ها چگونه تولید می‌شوند، با دانستن آنها موضوعی متفاوت است!

لازمه اینکه بدانیم آنچه می‌دانیم چگونه تولید شده است، دانستن مکانیسم‌های پایه‌ایی است که "مبنای" روش‌های تولید علم است. زندگی حرفه‌ای بسیاری از ما با خواندن مقالات علمی آغاز می‌شود. این اتفاق اولین بار ممکن است حین آماده شدن برای یک جلسه ژورنال کلاب یا حین شروع کار تدوین پایان‌نامه یا پروژه تحقیقاتی اتفاق بیفتد. ضرورت آشنایی با این "روش‌ها" بخصوص وقتی جدی می‌شود که هر کس تصمیم می‌گیرد او هم فعالانه در روند تولید علم نقشی به عهده بگیرد.

بسیاری از دانشجویان از خواندن بخش Method مقالات صرف‌نظر می‌کنند یا از خواندن دقیق آن می‌ترسند چون با تعداد زیادی کلمه و مفهوم ناآشنا برخورد می‌کنند و وقتی مجبورند که بخش Method را با دقت بخوانند چون می‌خواهند برای انجام پروژه خود شیوه‌ای را انتخاب کنند با سردرگمی مواجهند، چون پتانسیل‌ها، امکانات و مشکلات عملی انجام آن روش بخصوص را نمی‌دانند. بیشتر موارد برای انجام پروژه‌های تحقیقاتی با اندازه‌گیری و تعیین وضعیت یک پروتئین یا ژن بخصوص

www.ketab.ir

مواجهیم. بیشتر مواقع دانشجویان نمی‌دانند که برای اندازه‌گیری مثلاً یک پروتئین چند روش وجود دارد. مثلاً الایزا، وسترن بلات و ایمونوهیستروکیمستری و نمی‌دانند این روش‌ها هر کدام چه ویژگی‌هایی دارند، کدام منجر به نتایج دقیق‌تر کمّی می‌شود، هر کدام چه اطلاعاتی را در مورد نحوه توزیع پروتئین موردنظر در بدن به ما می‌دهد و کدام شیوه ما را به پاسخ سوالمان نزدیک‌تر می‌کند.

کتاب‌های راهنمای علمی بسیار خوبی وجود دارد که چگونگی انجام بسیاری از روش‌های معمول در مطالعات زیست پزشکی را آموزش می‌دهد. وب سایت‌های بسیار مفیدی نیز در این زمینه وجود دارد. در انتهای کتاب تعدادی از این منابع معرفی شده‌اند. پس از اینکه تصمیم گرفتیم که چه شیوه‌ای برای انجام پروژه تحقیقاتی موردنظر ما مناسب است استفاده از این منابع بسیار مفید و موثر است.

در بسیاری از این کتاب‌ها و منابع اینترنتی جزئیات بسیار ریز و عملی انجام یک روش بخصوص خاطر نشان شده است، اما معلوم نیست که از هر یک از مواد و اجزای بکار رفته در روش چرا استفاده می‌کنیم. خیلی وقت‌ها این پروتکل‌ها شبیه دستورالعمل کتاب‌های آشپزی است که به شما می‌گوید چقدر از چه چیزهایی را باید با هم مخلوط کنید و چقدر منتظر بمانید تا نتیجه موردنظر بدست آید.

دانستن مکانیسم عملکرد یک روش به ما قدرت مانور می‌دهد و کمک می‌کند که روش موردنظرمان را متناسب با امکانات عملی موجود در آزمایشگاهمان راه‌اندازی کنیم. در ضمن گاهی پروتکل‌هایی که از آنها به عنوان منبع استفاده می‌کنیم در آزمایشگاه ما و روی نمونه موردنظر ما منجر به نتایج مطلوب نمی‌شود. در این صورت با دانستن مکانیسم‌های پایه متد مورد استفاده و ایجاد تغییرات عالمانه و خلاقانه در پروتکل می‌توانیم آنرا برای مقصود مورد نظرمان مطلوب کنیم.

www.ketab.ir

آنچه در این کتاب تقدیم شما می شود حاصل تلاش در حد بضاعت ما برای فراهم کردن زمینه مناسب برای آشنایی با بعضی روشهای رایج مورد استفاده در مطالعات زیست پزشکی است. در تهیه این مطالب از راهنماییهای بسیار ارزنده جناب آقای دکتر نعمت بخش، جناب آقای دکتر میرمحمدصادقی وسرکار خانم دکتر عسگری استفاده بسیار برده ایم و از ایشان سپاسگزاریم.

نویسندگان

www.ketab.ir

فهرست مطالب

فصل اول: وقتی قصد بررسی یک پروتئین را داریم ۱

روش‌های پایه آنالیز پروتئین ۵

تعیین میزان پروتئین ۵

روش لوری (Lowry) ۵

روش برادفورد (Bradford) ٦

اسپکتروسکوپی UV ۷

تخلیص پروتئین ۸

استخراج پروتئین ۹

رسوب دادن و افتراق اولیه ۱۱

ژل‌ها و گرادیان‌های جدا کردن ماکرومولکول‌ها ۱۳

کروماتوگرافی ۱٤

کروماتوگرافی صافی یا فیاتراسیون ژلی ۱٦

کروماتوگرافی تعویضی یونی ۱۸

کروماتوگرافی گرایشی ۱۹

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۲۱

کروماتوگرافی مایع سریع ۲۳

دیالیز و اولترافیلتراسیون ۲٤

الکترفورز ۲٦

تمرکز ایزوالکتریک ۲۹

www.ketab.ir

الکتروفورز دو بعدی..... ۲۹
روش‌های رنگ‌آمیزی پروتئین روی ژل..... ۳۰
رنگ‌آمیزی آبی کوماسی و ایمیدازول..... ۳۰
رنگ پونسای قرمز..... ۳۱
رنگ‌آمیزی نقره..... ۳۱
رنگ‌آمیزی فلئورسانس..... ۳۱
روش‌های مبتنی بر استفاده از آنتی‌بادی..... ۳٤
آنتی‌بادی‌ها، پروب‌های جستجوی منحصر بفرد برای پروتئین‌ها..... ۳۷
آنتی‌بادی‌های نشان دار..... ۳۸
نشان‌دار کردن با ید..... ۳۸
آنتی‌بادی‌های کونژوگه با بیوتین..... ۳۹
آنتی‌بادی‌های کونژوگه با آنزیم..... ۳۹
آنتی‌بادی‌های فلورسنت..... ٤۱
نشان دار کردن آنتی‌بادی‌ها با کلوئید طلا..... ٤۲
آنتی بادی ثانویه..... ٤۳
معرفی روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی..... ٤۳
Radio Immunoassay..... ٤٥
الایزا (ELISA)..... ٤٦
الیسپوت (ELISPOT)..... ٤۷
طبقه‌بندی الیزا..... ٤۸
فلوسایتومتری..... ٥۲
وسترن بلات..... ٥٤

www.ketab.ir

ایمونوهیستوکمیستری..... ۵۹
منابع فصل اول..... ۶۵
فصل دوم: اگر می‌خواهیم DNA و RNA یک سلول را بررسی کنیم..... ۶۹
مقدمه..... ۷۰
جداسازی و تعیین میزان اسیدهای نوکلئیک..... ۷۲
استخراج DNA..... ۷۲
روش‌های شناسایی و تعیین DNA..... ۷۳
جداسازی RNA به روش گواندیوم تیوسیانات – فنل کلروفروم..... ۷۶
ردیابی و شمارش کلی RNA..... ۷۷
Northern Blot..... ۷۷
Rebonuclease Protection Assay..... ۷۸
آنالیز S1..... ۷۹
Reverse Transcriptase..... ۸۰
تکثیر اسیدهای نوکلئیک..... ۸۱
زنجیره واکنشی پلیمراز (PCR)..... ۸۱
Reverse Transcriptase PCR..... ۸۴
Semiquantitative PCR..... ۸۵
Quantitave real-time PCR..... ۸۵
Ligatioin-mediated PCR..... ۸۹
Methylation-Specific PCR..... ۸۹
روش‌های اصلی آنالیز اسیدهای نوکلئیک..... ۹۰
الکتروفورز..... ۹۰

www.ketab.ir

الکتروفورز روی ژل پلی اکریل‌آمید (PAGE)..... ۹۱
الکتروفورز بر روی ژل آگارز..... ۹۲
Pulsed Field electrophoresis..... ۹۳
الکتروفورز بر روی ژل‌های آگارزی قلیایی ۹۳
Restriction enzymes and Restriction fragments..... ۹٤
Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)..... ۹۹
پولی مورفیسم تک نوکلئوتیدی..... ۱۰۰
Southern blotting..... ۱۰۰
Dot blotting and slot blotting..... ۱۰۲
استفاده از پروب‌ها برای شناسایی اسیدهای نوکلئیک روی ممبران‌ها..... ۱۰۲
تعیین توالی DNA..... ۱۰۳
Maxam-Gilbert sequencing..... ۱۰۵
تعیین توالی سانگر..... ۱۰٦
تعیین توالی DNA اتوماتیزه..... ۱۰۹
منابع فصل دوم..... ۱۱۰
فصل سوم: تکنیک‌های DNA نوترکیب: کلون‌کردن و دست‌کاری‌های DNA..... ۱۱۱
پلاسمید و حاملین ویروسی..... ۱۱۳
پلاسمید..... ۱۱۳
ترانسفورماسیون..... ۱۱۵
باکتریوفاژ..... ۱۱۷
حاملین باکتریوفاژ λ..... ۱۱۸
حاملین فاژ M13..... ۱۱۹

www.ketab.ir

Phage Display ۱۲۰
حاملین تخصص یافته ۱۲۱
فاژمیدها ۱۲۱
کاسمیدها ۱۲۱
کروموزوم‌های مصنوعی ۱۲۲
Sequencing vectors ۱۲۳
Reporter plasmids ۱۲۳
Expression vectors ۱۲٤
Eukaryotic expression vectors ۱۲٦
بیان موقت یا دائمی حامل بیان یوکاریوتی ..... ۱۲٦.
حاملین ویروسی ۱۲۷
سیستم‌های بیان کننده باکلوویروسی ..... ۱۲۸.
کتابخانه ..... ۱۲۹.
کتابخانه ژنومیک ۱۲۹
کتابخانه cDNA ۱۲۹
ایجاد موتاسیون در نقاط مشخص ۱۳۰
Oligonucleotide-directed mutagenesis ۱۳۲
PCR-directed mutagenesis ۱۳۲
Linker scanning mutagenesis ۱۳۳
غربالگری برای ژن‌های بیان شده مختلف ۱۳۳
Differential screening ۱۳۳
Subtractive hybridization ۱۳۵

www.ketab.ir

Differential display ۱۳۵
Representation difference analysis ۱۳۶
Serial analysis of gene expression ۱۳۷
DNA microarray ۱۳۸
اثرات متقابل پروتئین‌ها و پروموتور ۱۳۹
Reporter Assays ۱٤۰
Electrophoretic Mobility Shift Assay ۱٤۱
Supershift Assay ۱٤۲
UV-crosslinking and immunoprecipitation ۱٤۳
DNA footprinting ۱٤۳
Chromatin immunoprecipitation ۱٤٤
Biotinylated DNA pulldown assays ۱٤٥
Southwestern blot ۱٤٥
خاموش کردن ژن‌ها ۱٤٦
Antisense RNA ۱٤٦
RNA interference ۱٤٦
قانون و تکنولوژی DNA ۱٤۷
RFLP ۱٤۸
PCR ۱٤۸
Short tandem report ۱٤۸
سایر مارکرها ۱٤۹
منابع فصل سوم ۱٥۰

www.ketab.ir