کلونینگ و بیان ژن *muc1* در میزبان پروکاریوتی به منظور بکار گیری در تشخیص زود هنگام سرطان سینه

مرجانه کاظمی[۱و۲]، جعفر امانی[۳]، علی هاتف سلمانیان[۴]، الهه غیبی[۵]

۱. کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) ، تهران ، ایران.

۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، گروه زیست شناسی، دامغان ، ایران.

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران، تلفن ثابت: ۰۲۱-۸۲۴۸۲۵۴۹، jafar.amani@gmail.com

۴. استاد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

۵.کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه دومین و شایع‌ترین علت مرگ در میان زنان جهان می‌باشد. غدد پستانی طبیعی و کارسینوماهای پستانی باید تحت کنترل عوامل نظارتی، فعال‌کننده‌ها و مهارکننده‌ها در داخل بافت سینه و همچنین یک سری فاکتورهای رشد، گیرنده‌ها و پروتئین‌ها در خارج از بافت سینه باشند. سطوح آنتی ژن‌های مرتبط با تومور می‌توانند به عنوان شاخص پیش‌بینی در درمان این بیماری استفاده شوند. از روش های نوین درمانی استفاده از آنتی بادی بر علیه آنتی ژن *MUC1* است که در ۹۰٪ سرطان های سینه دارای افزایش بیان می باشد. *MUC1* سرطانی عملکرد Cadherin E را که یک مولکول موثر در چسبندگی سلولی است، مختل می‌سازد. هدف از این تحقیق تولید پروتئین نوترکیب MUC-1 به منظورتشخیص زود هنگام سرطان سینه می باشد.

روش بررسی: بخشی از ژن *muc-1* با طراحی پرایمر مناسب بوسیله ی PCR تکثیر شده و سپس درون ناقل پلاسمیدی pET28a جهت بیان در سیستم پروکاریوت کلون شد. پلاسمید pET28a به روش شوک حرارتی وارد *E.coli* BL21DE3 گردید و فرآیند کلونینگ با روش های هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تائید قرار گرفت. باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب با استفاده از IPTG القا شده و سپس بیان پروتئین توسط ژل SDS-PAGE بررسی شد.

یافته ها: بخشی از ژن *muc-1* در پلاسمید مذکور کلون گردید و با روش های هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید گردید. بیان ژن مورد نظر با استفاده از وسترن بلاتینگ تائید گردید.

نتیجه گیری: بخشی از ژن *muc-1* انسانی به صورت نوترکیب در باکتری *E.coli* تولید و تخلیص گردید که کاندید مناسبی برای تشخیص سرطان می باشد.

واژگان کلیدی: کلونینگ ، *muc1* ، بیان ژن، سرطان

وصول مقاله:۹۳/۳/۱۷ اصلاحیه نهایی:۹۴/۳/۲۴ پذیرش:۹۴/۴/۸

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]

مقدمه

سرطان پستان شایعترین سرطان در میان زنان در کشورهای توسعه یافته و درحال توسعه است. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۳، بیش از۵۰۸۰۰۰ زن در سراسر جهان به علت سرطان پستان درگذشته اند (۱). این بیماری پس از سرطان ریه، شایع ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان محسوب می شود (۲). در ایران نیز این بیماری از شیوع بسیار بالایی برخوردار است اما به دلایل نامشخصی سن ابتلا به این نوع سرطان در ایران، یک دهه کاهش یافته است (۳). درصد بالایی از مبتلایان به سرطان سینه (۸۰-۷۰ درصد) در مراحل ابتدایی قابل درمان هستند، در این بیماران نقش درمان های کمکی (شیمی درمانی و هورمون درمانی) تائید شده است. بیماران در مراحل بالاتر بدون وجود متاستاز نیز با درمانهای کمکی در ۵۰-۳۰ درصد موارد درمان قطعی می یابند. بسیاری از بیماران به دلیل بازگشت و عود ناشی از سرطان فوت می کنند، لذا استفاده از روش ها و داروهای جدیدتر در این بیماران بسیار ضروری است و این امر تنها با شناخت بیشتر عوامل جدید و موثر در پیش اگهی و عود بیماران مقدور خواهد بود (۴). امروزه استراتژی های جدیدی با استفاده از آنتی بادی های نوترکیب برای درمان سرطان ایجاد شده است یکی از این استراتژی ها استفاده نوترکیب از آنتی ژن و داروها می باشد. تولید داروهای نوترکیب یکی از مهمترین پدیده های زیست فناوری در قرن حاضر است. استفاده از قدرت تولید میزبان های پروکاریوتی و یوکاریوتی در بیان داروهای نوترکیب باعث پیشرفت زیادی در زمینه پزشکی شده است. اکثر پروتئین‌های دارویی در سلول‌های یوکاریوتیک تولید می‌شوند ولی باکتری میزبانی پروکاریوتی نیز بیشترین استفاده را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دارا می باشند، خصوصا برای پروتئین هائی که اصلاحات بعد از ترجمه نیاز ندارند. رشد سریع بازار داروهای نوترکیب نیاز استفاده از فرآیندهای زیستی را دو چندان کرده است. با استفاده از این استراتژی، با هدف تولید پروتئین نوترکیب با استفاده از تکنیک کلونینگ و بیان ژن صورت گرفته است نتایجی که در ادامه ذکر خواهد شد بدست آمده است.

MUC1 تا *MUC19* در بافتهای مختلف توزیع متنوعی دارند، از جمله مهم‌ترین آن‌ها *MUC1* است که به طور عمده در سطح سلول‌های اپی تلیال سینه وجود دارد. علاوه بر سینه، چندین بافت دیگر از جمله ریه، پانکراس، تخمدان و رحم نیز این پروتئین را دارند (۸-۵). موسین های پلی مورفیک اپیتلیال (PEM) یک نام عمومی برای گلیکوپروتئین های بزرگی است که توسط ژن *muc1* کد می‌گردد. ژن *muc1* در کروموزوم 1q21 قرار دارد. موسین ۱ در ۹۰ درصد کارسینوماها مانند سینه، پروستات، پانکراس، شکم، روده، تخمدان و مجاری تنفسی افزایش بیان می‌یابد و سبب شده که *MUC1* به یک هدف جذاب در مداخلات درمانی تبدیل شود (۱۰). موسین *MUC1* دارای وزن مولکولی بین ۱۰۰۰ ۲۵۰ کیلو دالتونی با احتساب بخش قندی است. این گلیکوپروتئین دارای یک هسته پلی پپتیدی به اضافه زنجیره‌های کربوهیدراتی است (۱۱). نقش فیزیولوژی اکثر موسین ها حفاظت سطح سلول‌های اپی تلیال در برابر عوامل میکروبی و پروتئولیز است. با اینکه نقش اصلی *MUC1* به خوبی شناخته نشده است اما احتمال می‌دهند که در اتصالات سلولی نقش داشته باشد. *MUC1* اتصالات بین سلولی و سلول - خارج سلول را کم می‌کند زیرا *MUC1* سرطانی عملکرد E Cadherin را که یک مولکول مؤثر در چسبندگی سلولی است و فقدان آن سبب متاستاز می‌گردد، مختل می‌کند (۹و۷). نشانه‌های توموری شامل خانواده موسین (CA27.29، CA15-3)، پروتئین‌های انکوفتال (CEA)، انکوپروتئین ها (C-myc , P53)، c-erbB2 (HER-2) ، سیتوکراتین ها (TPA) و آنتی ژن مخصوص پلی پپتید بافتی (TPS) می باشد (۱۲و۱۱). از طرف دیگر شاخص های دیگری چون میزان سدیمانتاسیون اریتروسیت (۱۳)، ژن‌های VEGF , BRCA2 , PAI , UPA

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]

BRCA1, CadherinE , CI , PCNA , CD , CB (۱۴و۱۲) گیرنده‌های استروژن و پروژسترون و ماماگلوبین (۱۵) هستند که به دلیل حساسیت کم در تعیین اولیه سرطان (۲۵-۱۵ درصد) نمی توانند برای اهداف تشخیصی مفید واقع شوند. به عبارت دیگر وجود مقادیر زیاد نشانه‌های توموری حاکی از وجود متاستاز در مبتلایان به سرطان سینه است (۱۶). آنتی ژن *MUC1* در ٪۹۰ سرطان های سینه افزایش بیان پیدا می کند و هدف این تحقیق نیز بر همین اساس پایه گذاری شده است. هدف این مطالعه تولید پروتئین نوترکیب *MUC1* از یک ژن طراحی شده به عنوان یک آنتی ژن شاخص در سرطان سینه می باشد که می توان از آن در الایزا به عنوان تشخیص زود هنگام سرطان سینه استفاده کرد.

روش بررسی

مواد شیمیایی و آنزیم ها و سویه های باکتریایی:

نوع مطالعه توصیفی = آزمایشگاهی است. آنزیم های مورد استفاده در این تحقیق شامل: *Pfu* DNA Polymerase ، T4 DNA Ligase و آنزیم های اندونوکلئاز محدود کننده از شرکت سیناکلون تهیه گردید. پرایمرهای هدف برای سنتز به شرکت ژن فناوران سفارش داده شد. کیت جداسازی DNA از ژل و کیت تخلیص پلاسمید از شرکت Bioneer کره جنوبی تهیه و باکتری *E.coli DH5α* برای اهداف کلون سازی و تکثیر و باکتری *E.coli BL21 DE3* به عنوان میزبان بیانی و هم چنین پلاسمید pET28a که از شرکت Life Science Research تهیه شده بود، به عنوان وکتور بیانی استفاده شد. ستون Ni-NTA Agarose برای خالص سازی پروتئین، از شرکت کیا ژن تهیه شد.

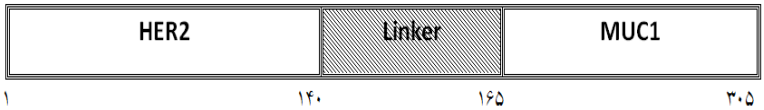
روش ها

تکثیر ژن *muc1* با استفاده از PCR

برای تکثیر بخشی از ژن *muc1*، از ژن دو قسمتی *her-2-muc1* به عنوان آنتی ژن دوگانه (kf 430636) که در پروژه قبل سنتز شده بود استفاده شد (۱۸و۱۷) (شکل ۱)، این بخش از ژن با کمک پرایمرهای مناسب طراحی شده با استفاده از نرم افزارهای Oligo و DNASIS توسط واکنش PCR تکثیر شد. توالی پرایمر فرادست 5'- TAT ATA GAA TTC ATG CCG ATT TGG AAA TTC -3' طراحی گردید که جایگاه برش آنزیمی *Bam*HI در بخش ابتدای '۵ آن تعبیه شد. پرایمر فرودست شامل توالی 5'CAGCAAAAGCTTTTAATGATGATG ATGATG-3' - بود که جایگاه برش آنزیمی *Hind*III در ابتدای'۵ آن طراحی گردید. میزان و مواد لازم جهت انجام واکنش PCR شامل: ۱ میکرولیتر DNA الگو (پلاسمید حاوی ژن دو قسمتی قبلا سنتز شده)، ۰/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر X۱۰، ۰/۷ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر پرایمر فرادست، ۱ میکرولیتر پرایمر فرودست، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم امپلیکان (PFU) و در نهایت ۱۸/۱ میکرولیتر آب مقطر. برنامه PCR برای ازدیاد قطعه مورد نظر به شرح زیر انجام گرفت، ۵ دقیقه دناتوره سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد سپس ۳۵ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل: ۱ دقیقه دمای واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه دمای اتصال در ۵۹ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه دمای طویل سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۵ دقیقه دمای طویل سازی انتهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ذکر شده و آنزیم *Pfu* DNA Polymerase و با استفاده از ۱۰ نانوگرم DNA الگو (پلاسمید حاوی ژن دو قسمتی قبلا سنتز شده) در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. پس از تکثیر قطعه ژنی، توالی حدود ۵۲۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز برده و تائید و بررسی شد. مدل شناتیک سازه حاوی قطعات در شکل ۱ ارائه شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]



شکل ۱) مدل شماتیک نشان‌دهنده سازه حاوی قطعات $HER2^{480-620}$ و $MUC1^{220-360}$ که به یکدیگر به وسیله لینکر متصل شده‌اند. قابل ذکر است که بخش های ذکر شده قسمت های خارج سلولی می باشد.

تهیه سازه ژنی pET28a-*muc1*

برای کلون سازی بخشی از ژن تکثیر یافته *muc1* در پلاسمید pET28a به ترتیب زیر عمل گردید. ابتدا محصول PCR با استفاده از کیت از ژل تخلیص شد و سپس توسط آنزیم های محدود کننده *Bam*HI و *Hin*dIII که محل برش آن ها قبلا بر روی پرایمرهای سنتز شده طراحی شده بود برش داده شد و در ناقل ذکر شده وارد شد. لازم به ذکر است که برش پلاسمید فوق نیز با آنزیم های مشابه صورت گرفت. عمل اتصال بخشی از ژن *muc1* در پلاسمید هدف با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase صورت گرفت. سپس محصول واکنش اتصال، به سویه باکتریایی *E.coli BL21DE3* با روش شوک حرارتی انتقال داده شد. جهت تائید انتقال وکتور نوترکیب به باکتری، PCR و سپس هضم آنزیمی انجام شد. در نهایت پلاسمید حاوی ژن مذکور تعیین توالی شد.

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب *MUC1*

برای تولید پروتئین *MUC1*، باکتری های تراریخت شده با پلاسمید pET28a نوترکیب را در ۵ میلی لیتر محیط LB حاوی ۴۰µg/ml کانامایسین کشت داده و در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب نگهداری می کنیم. سپس ۳ میلی لیتر از کشت شبانه به ۱۰۰ml محیط کشت LB افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با دور ۱۸۰ انکوبه شد. پس از اینکه تعداد باکتری ها به حد مناسب رسید OD (۰/۸ -۰/۶) جهت القا بیان ژن، از محلول IPTG (ایزو پروپیل بتا دی گالاکتو پیرانوزید) با غلظت نهایی یک میلی مولار به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید و کشت باکتری در ۳۷ درجه به مدت ۵ ساعت ادامه یافت. سپس با استفاده از سانتریفوز رسوب باکتری ها جمع آوری شد و به دو قسمت سوپ رویی و رسوب تفکیک شد. سپس برای بررسی نتیجه القا، نمونه های تهیه شده قبل و بعد از القا در ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد الکتروفورز و با رنگ آبی کوماسی رنگ آمیزی شد. با توجه به اینکه پروتئین نوترکیب با نشانه His-Tag بیان شده بود، برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA استفاده گردید. برای این منظور رسوب باکتریایی در ۶ ml بافر لیز کننده (۳ml اوره ۸ مولار، ۳ ml PBS 1X) حل شده و سپس سونیکاسیون انجام گرفت و سلول سانتریفوژ شده محلول رویی از ستون عبور داده شد. پروتئین مورد نظر با استفاده از بافر حاوی ایمیدازول از ستون جداسازی و جمع آوری گردید. غلظت پروتئین خالص سازی شده با استفاده از ژل ۱۵%SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تائید پروتئین مورد نظر از وسترن بلاتینگ و الایزا با آنتی بادی پلی کلونال ضد *MUC1* استفاده شد.

وسترن بلاتینگ به منظور تأیید پروتئین بیان‌شده

برای تائید صحت پروتئین تولید شده از آزمون وسترن بلات استفاده شد. جهت انجام این تکنیک از آنتی بادی پلی کلونال ضد *MUC1* (قبلا در آزمایشگاه تولید و تایید شده است) به صورت زیر استفاده شد. یکی از نمونه‌های بعد از بیان و نمونه بدون القاء مربوط به بیان پروتئین نوترکیب انتخاب شد و بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد الکتروفورز شد. سپس باندهای به دست آمده بر روی ژل آکریل آمید به کاغذ نیتروسلولز انتقال داده شد. مرحله مسدودسازی کاغذ نیتروسلولز با قرار دادن کاغذ در بافر بلاکینگ به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس با بافر PBS-

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]

Tween شستشو داده شد. آنتی بادی Anti-His tag با رقت ۱:۲۰۰ در داخل بافر PBS-T تهیه شد و کاغذ نیتروسلولز درون آن غوطه ور شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شد. سپس سه بار با PBS-T و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد. آنتی بادی ثانویه علیه آنتی بادی موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ در داخل بافر PBS-T تهیه شد دستورالعل فوق اجرا شد. در نهایت پس از شستشوی نمونه ها با بافر PBS-T، برای مشاهده باندهای مربوط به واکنش آنتی بادی با آنتی ژن در کاغذ نیتروسلولز، کاغذ مزبور در محلول دی آمینو بنزیدین (DAB) قرار گرفت پس از ظهور باندها با آب مقطر واکنش مهار شد.

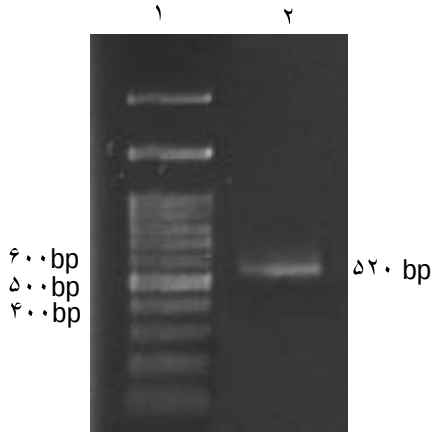
تعیین غلظت پروتئین

تعیین غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفو رد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) (سیناژن) به عنوان استاندارد انجام گرفت.

نتایج

انجام واکنش PCR بر روی بخشی از ژن *muc1* با استفاده از پرایمر اختصاصی که توسط نرم افزار oligo آنالیز شد، صورت گرفته که موجب تکثیر قطعه مورد نظر شد. ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر به اندازه ی ۵۲۰ جفت باز بود. از جایگاههای GGATTC و AAGCTT که محل اثر آنزیم‌های برش *Bam*HI و *Hind*III می باشند جهت انجام استفاده شد، همین واکنش برای هضم آنزیمی بر روی ناقل Pet28a نیز صورت پذیرفت.

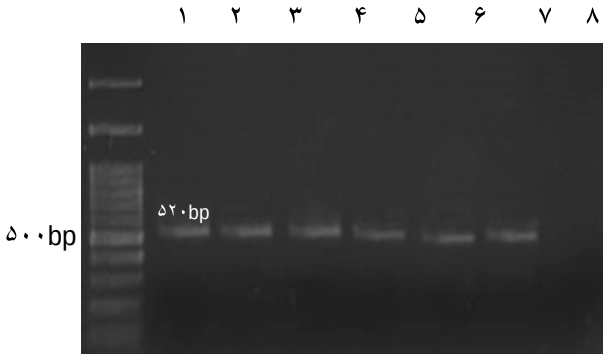
جهت تائید تکثیر ژن، محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. وجود باند نشان دهنده تکثیر ژن هدف بود (شکل ۲).



شکل۲) الکتروفورز ژل آگارز ژن *muc1* حاصل از واکنش PCR
ستون ۱) نشانگر DNA(۱۰۰ bp plus) ، ستون ۲) محصول PCR ژن *muc1*

پس از انجام واکنش اتصال، محصولات واکنش با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعدِ (*E. coli* BL21-DE3) و غربالگری کلونها روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین، کلونها در محیط مایع LB کشت داده شدند و از آن‌ها عمل تخلیص پلاسمید صورت گرفت و با استفاده از PCR (شکل ۳) و هضم آنزیمی (شکل ۴) ژن مورد نظر تایید گردید در نهایت سازه مورد نظر جهت تعیین توالی ارسال و با بررسی نتایج، تایید گردید.

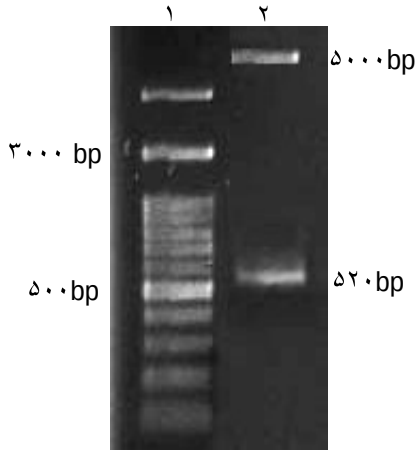
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]
[DOI: 10.22102/20.4.1]



شکل۳) کلونی PCR وکتور pET28a حاوی ژن *muc 1*

از چپ به راست: ستون ۱) نشانگر DNA (100bp plus Ladder) ستون ۲ تا ۶) کلنی های مثبت(حاوی ژن *muc 1*)،

ستون ۷) کنترل مثبت ، ستون ۸) کنترل منفی



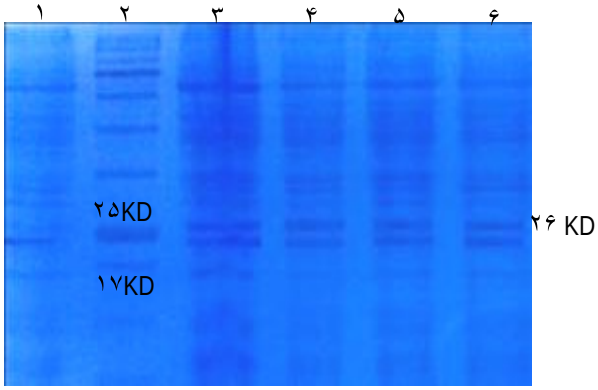
شکل ۴) نتیجه ی هضم آنزیمی پلاسمید PET28a حاوی ژن *muc1*

ستون ۱) نشانگر DNA ، ستون۲) پلاسمید هضم شده (با آنزیم *Bam*HI, *Hind*III)

پروتئین *MUC1* پس از ۵ ساعت از القا با IPTG تولید گردید. جداسازی پروتئین به روش دناتوره و تعیین نوع پروتئین از لحاظ محلول یا نامحلول بودن، انجام شد و نتیجه بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه وزن پروتئین نوترکیب به همراه His-Tag حدود ۲۶ کیلو دالتون می‌باشد از ژل ۱۵ درصد استفاده شد (شکل ۵).

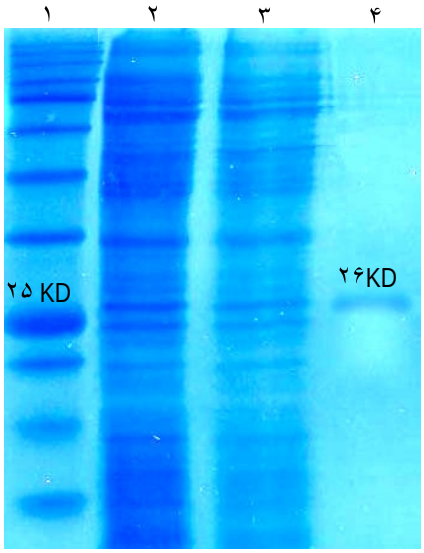
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]



شکل۵) از چپ به راست: ستون ۱) رسوب کشت باکتری *E.coli* BL21(DE3) حاوی وکتور pET28a همراه ژن *muc 1* قبل از اضافه نمودن IPTG به عنوان کنترل ، ستون ۲) نشانگر اندازه پروتئین ، ستون ۳ تا ۶) رسوب کشت باکتری *E.coli* BL21(DE3) حاوی وکتور pET28a همراه ژن *muc 1* ، ۵ ساعت پس از اضافه نمودن IPTG

خالص سازی پروتئین نوترکیب نشان‌دار شده با 6x His با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA انجام شد. تخلیص پروتئین تحت شرایط دناتوره (Denature conditions) صورت گرفت و پروتئین خالص دارای ساختار صحیح به دست آمد . میزان غلظت پروتئین محاسبه شده پس از تخلیص ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود (شکل ۶).



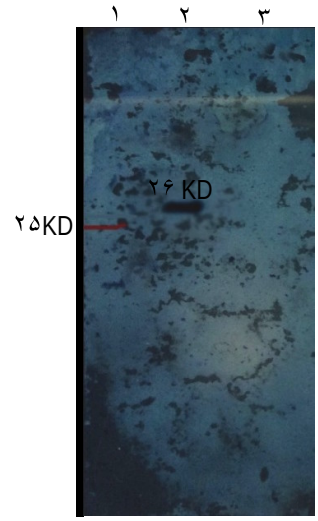
شکل۶) تخلیص پروتئین *MUC1* به کمک ستون Ni-NTA

از چپ به راست: ستون۱) نشانگر اندازه پروتئین ستون۲) خروجی ستون، ستون۳) شستشوی ستون با بافر حاوی ۲۰ میلی مولار ایمیدازول ، ستون۴) شستشو با بافر حاوی ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول(حاوی پروتئین *MUC1*)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]

به منظور تأیید محصول پروتئینی از تکنیک Western Blotting استفاده شد. در این روش از آنتی بادی تولید شده در موش (آنتی بادی پلی کلونال) استفاده شد که در شکل (۷) مشاهده می شود. در ستون شماره ۲ که مربوط به نمونهٔ بعد از بیان است یک باند در محدوده KD ۲۶ برای پروتئین *MUC1* (SDS-PAGE ۱۵ درصد) مشاهده می‌شود که در ستون شماره ۳ کنترل باندی مشاهده نمی‌شود.



شکل ۷) آزمایش وسترن بلاتینگ جهت تعیین اختصاصیت پروتئین نوترکیب تولید شده
ستون۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون۲) پروتئین نوترکیب *MUC1*، ستون۳) کنترل منفی

بحث

روشهای مرسوم در درمان و کنترل این بیماری، استفاده از داروهای ضد تومور، رادیوتراپی و جراحی است اما در خصوص استفاده از داروهای شیمیایی متأسفانه مقاومت های گسترده ای ظاهر شده است و پس از بروز متاستاز، جراحی و پرتو درمانی نیز کارایی لازم را ندارند به همین دلیل، رویکردهای جدید نظیر شناسایی زودهنگام سرطان سینه به کمک آنتی ژنهای وابسته به تومور مطرح شده است به منظور اینکه نتایج بهتری از روشهای مختلف درمانی حاصل آید تا درمان مؤثرتری صورت بگیرد و امروزه برخی از آنها به صورت بالینی نیز توسعه یافته است مانند *MUC1* ELISA Kit که برای تشخیص زود هنگام سرطان استفاده می شود که این کیت می تواند برای تشخیص آنتی بادی ایجاد شده بر علیه *MUC1* در سرم بیمار استفاده شود. *MUC1* بخاطر گلیکوسیلاسیون ناقص بخش های تکراری می تواند در سطح سلولهای سرطانی قرار گرفته و بصورت یک آنتی ژن برای تحریک سیستم ایمنی عمل کند. همچنین ثابت شده است *MUC1* در هنگام بیان در سلولهای تومور کمتر گلیکوزیله شده ویا اصلاً گلیکوزیله نمی شود که در کشف آنتی بادی anti-*MUC1* موثر است (۱۹). اتو آنتی بادی های مرکب و آزاد بر علیه *MUC1* می تواند هم در بیماران مبتلا به تومورهای بدخیم و هم در افراد سالم کشف شود. مطالعات ثابت کرده است که جریان آنتی بادی های anti-*MUC1* ممکن است به عنوان یک فاکتور تشخیصی مطلوب برای بیماران مبتلا به سرطان سینه در مراحل اولیه قبل از درمان مورد استفاده قرار گیرند (۲۰ و ۱۹).

در سال‌های ۱۹۹۸-۱۹۹۷ تشخیص سه مولکول CA27.29, *MUC1*(CA15-3) و HER2 /neu به عنوان نشانه توموری، در تعیین عود مجدد بیماران سرطان

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]
[DOI: 10.22102/20.4.1]

سینه توسط FDA مورد تائید قرار گرفته است (۲۱). Berruti و همکاران در سال ۱۹۹۴ اهمیت *MUC1* را در ۱۱۵ بیمار سرطان سینه بررسی و از *MUC1* به عنوان یک نشانه مطلوب در پیش آگهی بیماری یاد کرده است (۲۲). Kumpulainen و همکاران در سال ۲۰۰۲ غلظت *MUC1* را در ۲۷۲ بیمار سرطانی به منظور بررسی میزان بقاء این بیماران اندازه‌گیری کردند و اندازه‌گیری آن را به همراه سایر نشانه‌ها مثل حالت گره‌ها، مراحل و درجه تومور به منظور تعیین عمر این بیماران مفید دانسته‌اند (۲۳). در مطالعه Scott Wilkie و همکاران در سال ۲۰۱۲ به هم بیانی *MUC1* و Her-2 و ارتباط سیگنالینگ آن‌ها اشاره شده است (۲۴). مطالعات متعدد دیگری نیز با استفاده از کیت‌های مختلف و در مراحل مختلف این سرطان یعنی مراحل ۱و۲و۳ و۴، افراد طبیعی، زنان شیرده، بیماران با تومور خوش‌خیم سینه و سایر بیماری‌ها در رابطه با نقش *MUC1* وCA27.29 و HER-2 در سرطان سینه صورت گرفته است (۲۰و۱۹). بطور کلی در اکثر روش های تشخیصی و درمانی نیاز به مقادیر قابل توجهی از پروتئین می باشد و با توجه به هزینه بر بودن خالص سازی پروتئین از سلول های سینه و بهره وری کم آن ، بایستی از روش های دیگری مانند مهندسی ژنتیک برای دستیابی به پروتئین مورد نظر بهره گرفت. از این رو هدف از این تحقیق تولید پروتئین نوترکیب *MUC1* به عنوان یک آنتی ژن شاخص در سرطان سینه می باشد که می توان از آن در الایزا به عنوان تشخیص زود هنگام سرطان سینه استفاده کرد.

در این تحقیق بخشی از پروتئین نوترکیب *MUC1* را در *E.coli* بیان کردیم که می تواند به عنوان عامل شناسایی دهنده آنتی بادی های موجود در سرم بر ضد *MUC1* باشد، این بخش شامل توالی تکراری (VNTR) بخش خارج سلولی آنتی ژن *MUC1* است که بیشتر در معرض بوده و کمترین تغییرات پس از ترجمه را داشته است و از آمینو اسید ۲۲۰ تا ۳۶۰ را در بر می گیرد. به علاوه بخش انتخابی به دلیل آنتی ژنیسیته و اختصاصیت بالا، ویژگی تعیین کننده ای برای یک آنتی ژن پوششی جهت تشخیص آنتی بادی های anti-*MUC1* در نمونه های بالینی را داشته باشد.

یکی از رایج ترین و کم هزینه ترین میزبان ها جهت تولید پروتئین های نوترکیب میزبان *E. coli* می باشد. بنابراین در این مطالعه، برای تولید پروتئین نوترکیب و از میزبان *E. coli* استفاده شد. بدیهی است که انتخاب یک میزبان مناسب برای بیان و تولید پروتئین بایستی تولید پروتئین مورد نظر را سهل الوصول خواهد کرد. برای افزایش بیان پروتئین در سیستم پروکاریوتی تغییر کدونهای این ژن با کدون های رایج در *E.coli* (۲۵) صورت گرفت پس از بیان سپس خالص سازی پروتئین نوترکیب نشان دار شده با 6x His بوسیلهٔ کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA انجام شد. نتایج ایمونوبلات نمایانگر وجود یک باند در محدوده ۲۶ کیلو دالتونی است که هم اندازه با وزن ملکولی پیش بینی شده برای پروتئین *MUC1* بوده و وزن مولکولی آن با پروتئین بیان شده در سیستم پروکاریوتی تقریبا یکسان می باشد. این مساله حاکی از آن است که ماشین سنتز پروتئین در باکتری، از روی mRNA یک پروتئین بالغ را ترجمه کرده است و هیچگونه حذف یا تخریبی در پروتئین مورد نظر صورت نگرفته است. با توجه به بهینه سازی کدون های ژن مورد نظر در مقایسه با Zrihan و همکاران (۲۶) بیان بالاتر و پروتئین بیشتری را حاصل کرد.

نتیجه گیری

پروتئین هدف در این تحقیق با توجه به بخش تکراری و خارج سلولی انتخاب شده، می تواند به عنوان یکی از عوامل تشخیصی مناسب در سرطان سینه استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) بوده که بدینوسیله سپاس خود را اعلام میداریم.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. Int J Cancer 2010; 127: 2893-2917.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics. CA cancer J Clin 2008; 58: 71-96.
3.Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. Public health 2000; 114: 143-145.
4. Rosenberg SA, Hellman S, DeVita VT. Principles & Practice of Gynecologic Oncology. 4th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 845-856
5.Thie H, Toleikis L, Li J, Von Wasielewski R, Bastert G, Schirrmann , et al. Rise and fall of an anti-*MUC1* specific antibody. PloS one 2011; 6: e15921.
6. Hanisch FG, Müller S. *MUC1*: the polymorphic appearance of a human mucin. Glycobiology 2000; 10: 439-449.
7. Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM, Plunkett T, Graham R, Correa I, Miles D, et al. *MUC1* and the immunobiology of cancer. J Mammary Gland Biology Neoplasia 2002; 7: 209-221.
8. Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Ponnusamy MP, Lakshmanan I, Jain M, Batra SK. Mucins in the pathogenesis of breast cancer. Implications in diagnosis, prognosis and therapy. Biochim Biophys Acta 2011; 1815: 224-240.
9. Brayman M, Thathiah A, Carson DD. *MUC1*: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. Reprod Biol Endocrinol 2004; 2: 4.
10. Mushenkova N, Moiseeva E, Chaadaeva A, Den Otter william, Svirshchevskaya E. Antitumor effect of double immunization of mice with mucin 1 and its coding DNA. Anticancer Res 2005; 25: 3893-3898.
11. Bjerner J, Norum LF, Nilsson O, Nustad K. *MUC1* serum assays in breast cancer: tumor specificities and reference levels. Tumor Biol 2001; 23: 315-323.
12. Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. J Surg Oncol 1999; 71: 130-135.
13. Cheung KL, Graves CRL, Robertson JFR. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. Cancer Treat Rev 2000; 26: 91-102.
14. Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. Clin Chem 2002; 48: 1194-1197.
15. O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill AD, McDermott EW, et al. Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer. Clin Chem 2002; 48: 1362-1364.
16. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235: 177-82.
17. Kesisis G, Kontovinis LF, Gennatas K, Kortsaris AH. Biological markers in breast cancer prognosis and treatment. J BUON 2009; 15: 447-454.
18. Gheybi E, Amani J, Salmanian AH, Mashayekhi F, Khodi S. Designing a recombinant chimeric construct contain *MUC1* and HER2 extracellular domain for prediagnostic breast cancer. Tumor Biol 2014; 35: 11489-97.
19. Daniele L, Sapino A. Anti-HER2 treatment and breast cancer: state of the art, recent patents, and new strategies. Recent Pat Anticancer Drug Discov 2008; 4: 9-18.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]

20. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 2001; 19: 1865-1878.
21. Berruti A, Tampellini M, Torta M, Buniva T, Gorzegno G, Dogliotti L. Prognostic value in predicting overall survival of two mucinous markers: CA 15-3 and CA 125 in breast cancer patients at first relapse of disease. Eur J Cancer 1994; 30: 2082-2084.
22. Kumpulainen EJ, Keskikuru RJ, Johansson RT. Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2002; 76: 95-102.
23. Wilkie S, Van Schalkwyk MC, Hobbs S, Davies DM, Van der Stegen SJ, Pereira ACP, et al. Dual targeting of ErbB2 and *MUC1* in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. J Clin Immunol 2012; 32: 1059-1070.
24. Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia Coli. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 67: 289-298.
25. Cooke T, Reeves J, Lanigan A, Stanton P. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. Ann Oncol 2001; 12: 23-28.
26. Zrihan-Licht S, Vos HL, Baruch A, Elroy-Stein O, Sagiv D, Keydar I, et al. Characterization and molecular cloning of a novel *MUC1* protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue. Eur J Biochem 1994; 224: 787-95.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-10-22]

[DOI: 10.22102/20.4.1]