

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

مرحانه کاظمی^۱، جعفر امانی^۲، علی هاتف سلمانیان^۳، الهه غیبی^۴

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 شایع ترین علت مرگ در میان زنان جهان می باشد. غدد پستانی طبیعی و کارسینوماهای پستانی باید تحت کنترل عوامل نظارتی، فعال کننده ها و مهار کننده ها در داخل بافت سینه و همچنین یک سری فاکتورهای رشد، گیرنده ها و پروتئین ها در خارج از بافت سینه باشند. سطوح آنتی ژن های مرتبط با تومور می توانند به عنوان شاخص پیش بینی 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 می سازد. هدف از این تحقیق تولید پروتئین نوترکیب MUC-1 به منظور تشخیص 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 تایید 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 تایید 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

مقدمه

سرطان پستان شایعترین سرطان در میان زنان در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۳، بیش از ۵۰۸۰۰۰ 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) تأیید شده است. بیماران در مراحل بالاتر بدون وجود متاستاز نیز با درمانهای کمکی در ۳۰-۵۰ 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 آگهی و عود بیماران مقدر خواهد بود (۴). امروزه استراتژی های جدیدی با استفاده از آنتی بادی های نو ترکیب برای درمان سرطان ایجاد شده است یکی از این استراتژی ها استفاده نو ترکیب از آنتی ژن و دارو ها می باشد. تولید داروهای نو ترکیب یکی از مهمترین پدیده های زیست فناوری در قرن حاضر است. استفاده از قدرت تولید میزبان های پروکاریوتی و یوکاریوتی در بیان داروهای نو ترکیب باعث پیشرفت زیادی در زمینه پزشکی شده است. اکثر پروتئین های دارویی در سلول های یوکاریوتیک تولید می شوند ولی باکتری میزبانی پروکاریوتی نیز بیشترین استفاده را برای تولید پروتئین های نو ترکیب دارا می باشند، خصوصاً برای پروتئین هائی که اصلاحات بعد از ترجمه نیاز ندارند. رشد سریع بازار داروهای نو ترکیب نیاز استفاده از فرآیندهای زیستی را دو چندان کرده است. با استفاده از این استراتژی، با هدف تولید

پروتئین نو ترکیب 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 مهم ترین آن ها *MUC1* است که به طور عمده در سطح سلول های 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 *mucl* کد می گردد. ژن *mucl* در کروموزوم 1q21 قرار دارد. موسین ۱ در ۹۰ درصد کارسینوماها مانند سینه، پروستات، پانکراس، شکم، روده، تخمدان و مجاری تنفسی افزایش بیان می یابد و سبب شده که *MUC1* به یک هدف جذاب در مداخلات درمانی تبدیل شود (۱۰). موسین *MUC1* دارای وزن مولکولی بین ۱۰۰۰ تا ۲۵۰ کیلو دالتونی با احتساب بخش قندی است. این گلیکوپروتئین دارای یک هسته پلی پپتیدی به اضافه زنجیره های کربوهیدراتی است (۱۱). نقش فیزیولوژی اکثر موسین ها حفاظت سطح سلول های اپی تلیال در برابر عوامل میکروبی و پروتئولیز است. با اینکه نقش اصلی *MUC1* به خوبی شناخته نشده است اما احتمال می دهند که در اتصالات سلولی نقش داشته باشد. *MUC1* اتصالات بین سلولی و سلول - خارج سلول را کم می کند زیرا *MUC1* سرطانی عملکرد E Cadherin را که بک مولکول مؤثر در چسبندگی سلولی است و فقدان آن سبب متاستاز می گردد، مختل می کند (۷ و ۹). نشانه های توموری شامل خانواده موسین (CA27.29، CA15-3)، پروتئین های انکو فتال (CEA)، انکو پروتئین ها (C-myc, P53)، c-erbB2 (HER-2)، سیتوکراتین ها (TPA) و آنتی ژن مخصوص پلی پپتید بافتی (TPS) می باشد (۱۲ و ۱۱). از طرف دیگر شاخص های دیگری چون میزان سدیمان تاسیون اریتروسیت (۱۳)، ژن های UPA, PAI, BRCA2, VEGF

پروژه قبل سنتز شده بود استفاده شد (۱۷ و ۱۸) (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 BamHI در بخش ابتدای 5' آن تعبیه شد. پرایمر فرودست شامل توالی

5'CAGCAAAAGCTTTTAATGATGATG ATGATG-3' بود که جایگاه برش آنزیمی

HindIII در ابتدای 5' 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 X10، 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 دناتوراسیون 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 طولیل سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت ۵ دقیقه دمای طولیل 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 شناختیک سازه حاوی قطعات در شکل ۱ ارائه شده است.

BRCA1, Cadherin E , CI , PCNA , CD , CB (۱۲ و ۱۴) 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.

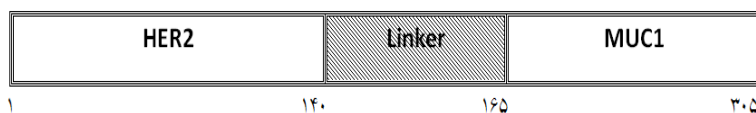
روش بررسی

مواد شیمیایی و آنزیم ها و سوبه های باکتریایی: نوع مطالعه توصیفی = آزمایشگاهی است. آنزیم های مورد استفاده در این تحقیق شامل: Pfu DNA Polymerase ، T4 DNA Ligase و آنزیم های اندونوکلاز 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 BL21 DE3 E.coli 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 کیاژن تهیه شد.

روش ها

تکثیر ژن mucl با استفاده از PCR

برای تکثیر بخشی از ژن mucl، از ژن دو قسمتی her-2-mucl به عنوان آنتی ژن دو گانه (kf 430636) که در



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 بخش‌های ذکر شده قسمت‌های خارج سلولی می‌باشد.

تهیه سازه ژنی pET28a-muc1

برای کلون‌سازی 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 آنزیم‌های محدود کننده *Bam*HI و *Hind*III که محل برش آن‌ها قبلاً 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 آنزیم‌های 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 تأیید انتقال و کنترل نوترکیب با 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* باکتری‌های تراریخت شده با پلاسمید pET28a نوترکیب را در ۵ میلی لیتر محیط LB حاوی $40 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین کشت داده و در حرارت 37°C درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری می‌کنیم. سپس ۳ میلی لیتر از کشت شبانه به 100 ml محیط کشت LB افزوده و در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ انکوبه شد. پس از اینکه تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید OD (0.8 - 0.6) 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 37°C درجه به مدت ۵ ساعت ادامه یافت.

سپس با استفاده از سانتریفوز رسوب باکتری‌ها جمع‌آوری شد و به دو قسمت سوپ رویی و رسوب تفکیک شد. سپس برای بررسی نتیجه القا، نمونه‌های 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 6 ml بافر لیز کننده (3 ml اوره ۸ مولار، 3 ml PBS 1X) حل شده و سپس سونیکاسیون انجام گرفت و سلول سانتریفوز شده محلول رویی از ستون عبور داده شد. پروتئین مورد نظر با استفاده از بافر حاوی ایمیدازول از ستون جداسازی و جمع‌آوری گردید. غلظت پروتئین خالص سازی شده با استفاده از ژل SDS-PAGE ۱۵% مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تأیید پروتئین مورد نظر از وسترن بلائینگ و الایزا با آنتی بادی پلی کلونال ضد *MUC1* استفاده شد.

وسترن بلائینگ به منظور تأیید پروتئین بیان‌شده

برای تأیید صحت پروتئین تولید شده از آزمون وسترن بلائینگ استفاده شد. جهت انجام این تکنیک از آنتی بادی پلی کلونال ضد *MUC1* (قبلاً در آزمایشگاه تولید و تأیید 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 نیتروسولوز انتقال داده شد. مرحله مسدودسازی کاغذ نیتروسولوز با قرار دادن کاغذ در بافر بلائینگ به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس با بافر PBS-

نتایج

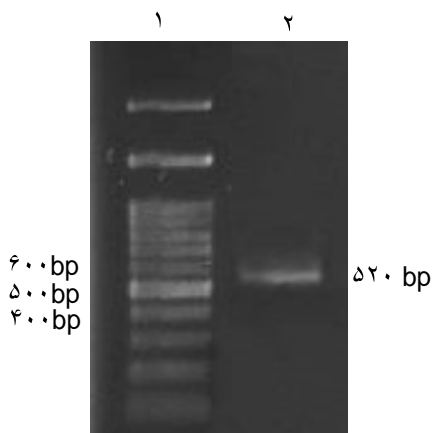
انجام واکنش PCR بر روی بخشی از ژن *mucl* با استفاده از پرایمر اختصاصی که توسط نرم افزار oligo آنالیز شد، صورت گرفته که موجب تکثیر قطعه مورد نظر شد. ژن تکثیر یافته توسط PCR در مقایسه با مارکر به اندازه ی ۵۲۰ جفت باز بود. از جایگاههای GGATTC و AAGCTT که محل اثر آنزیم‌های برش *BamHI* و *HindIII* می باشند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

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

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 دستورالعمل 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

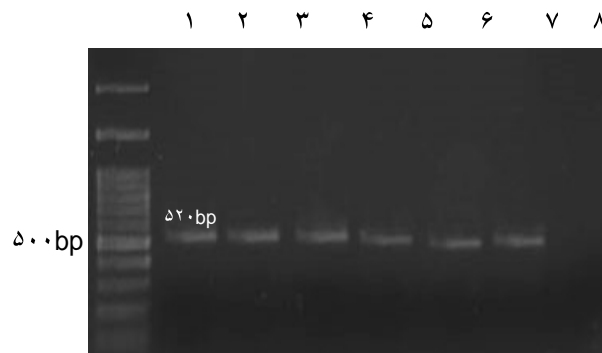
تعیین غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) (سیناژن) به عنوان استاندارد انجام گرفت.



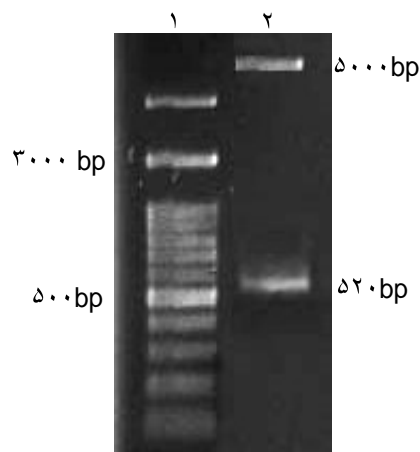
شکل ۲) الکتروفورز ژل آگارز ژن *mucl* حاصل از واکنش PCR (شکل ۱) نشانگر DNA (plus 100 bp)، ستون ۲) محصول PCR ژن *mucl*

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.

پس از انجام واکنش اتصال، محصولات واکنش با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد (*E. coli* BL21-) (DE3) و غربالگری کلونها روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین، کلونها در محیط مایع LB کشت داده شدند و



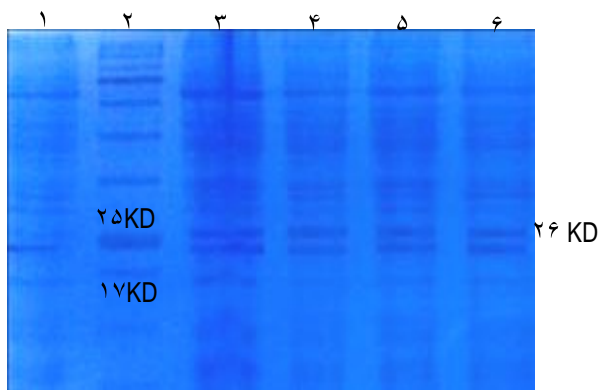
شکل ۳) کلونی PCR وکتور pET28a حاوی ژن *muc I* از چپ به راست: ستون ۱) نشانگر DNA (100bp plus Ladder) ستون ۲ تا ۶) کلنی های مثبت (حاوی ژن *muc I*)، ستون ۷) کنترل مثبت، ستون ۸) کنترل منفی



شکل ۴) نتیجه ی هضم آنزیمی پلاسمید PET28a حاوی ژن *muc I* (ستون ۱) نشانگر DNA، (ستون ۲) پلاسمید هضم شده (با آنزیم *Bam*HI, *Hind*III)

توجه به اینکه وزن پروتئین نوترکیب به همراه His-Tag حدود ۲۶ کیلو دالتون می باشد از ژل ۱۵ درصد استفاده شد (شکل ۵).

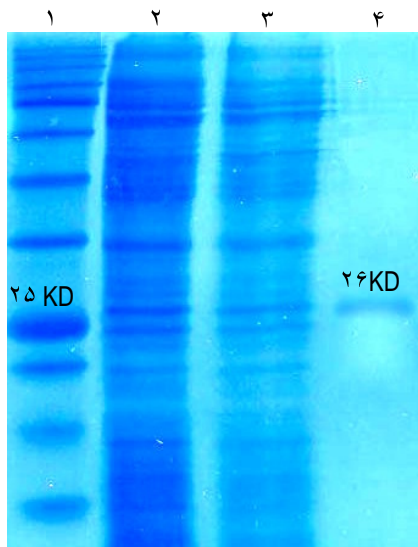
پروتئین *MUC1* پس از ۵ ساعت از القا با IPTG تولید گردید. جداسازی پروتئین به روش دناتور و تعیین نوع پروتئین از لحاظ محلول یا نامحلول بودن، انجام شد و نتیجه بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. با



شکل ۵) 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

ساختار صحیح به دست آمد . میزان غلظت پروتئین محاسبه شده پس از تخلیص ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود (شکل ۶).

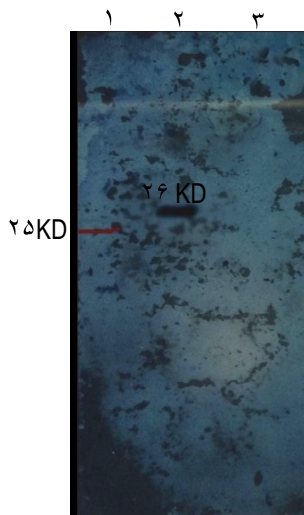
خالص سازی پروتئین نو ترکیب نشان دار شده با 6x His با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA انجام شد. تخلیص پروتئین تحت شرایط دناتور (Denature) (conditions) صورت گرفت و پروتئین خالص دارای



شکل ۶) تخلیص پروتئین *MUC1* به کمک ستون Ni-NTA از چپ به راست: ستون ۱) نشانگر اندازه پروتئین ستون ۲) خروجی ستون ، ستون ۳) شستشوی ستون با بافر حاوی ۲۰ میلی مولار ایمیدازول ، ستون ۴) شستشو با بافر حاوی ۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول (حاوی پروتئین *MUC1*)

نمونه بعد از بیان است یک باند در محدوده ۲۶ KD برای پروتئین *MUC1* (SDS-PAGE ۱۵ درصد) مشاهده می‌شود که در ستون شماره ۳ کنترل باندی مشاهده نمی‌شود.

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 می‌شود. در ستون شماره ۲ که مربوط به



شکل ۷) آزمایش وسترن بلاتینگ جهت تعیین اختصاصیت پروتئین نو ترکیب تولید شده (ستون ۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۲) پروتئین نو ترکیب *MUC1*، ستون ۳) کنترل منفی

تکراری می‌تواند 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 و یا اصلاً گلیکوزیله نمی‌شود که در کشف آنتی بادی *anti-MUC1* موثر است (۱۹). اتو آنتی بادی های مرکب و آزاد بر علیه *MUC1* می‌تواند 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 ۱۹۹۷-۱۹۹۸ تشخیص سه مولکول *HER2/neu* و *CA27.29, MUC1(CA15-3)* به عنوان نشانه توموری، در تعیین عود مجدد بیماران سرطان

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 می‌شود که این کیت می‌تواند برای تشخیص آنتی بادی ایجاد شده بر علیه *MUC1* در سرم بیمار استفاده شود. *MUC1* بخاطر گلیکوسیلیاسیون ناقص بخش های

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 نو ترکیب میزبان *E. coli* می باشد. بنابراین در این مطالعه، برای تولید پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب نشان دار شده با 6x His بوسیله 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 تقریباً 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.

سینه توسط FDA مورد تأیید 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 بقا این بیماران اندازه گیری کردند و اندازه گیری 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 ۱ و ۲ و ۳ و ۴، افراد طبیعی، زنان شیرده، بیماران با تومور خوش خیم سینه و سایر بیماری‌ها در رابطه با نقش *MUC1* و CA27.29 و HER-2 در سرطان سینه صورت گرفته است (۱۹ و ۲۰). 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 نو ترکیب *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 نو ترکیب *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

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.

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.