بسم الله الرحمن الرحیم

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع

بعد از دفاع از حوزه پژوهشی دانشکده دریافت و بعد اسکن نمایید.

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 1– 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 2– 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 3– 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 4– 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 5– این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ 87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب ؟؟؟ دانشجوی رشته ؟؟؟ ورودی سال تحصیلی ؟؟؟ مقطع ؟؟؟ دانشکده **علوم پزشکی** 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 ».

امضا

تاریخ

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 1 : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2 : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته ؟؟؟؟؟؟ است که در سال ؟؟؟؟؟ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی ؟؟؟؟؟؟ ، مشاوره ؟؟؟؟؟؟ از آن دفاع شده است.

ماده 3 : 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 4 : در صورت عدم رعایت ماده 3، 50٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده 5 : 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 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6 : اینجانب ؟؟؟؟؟؟ دانشجوی رشته ؟؟؟؟؟؟ مقطع ؟؟؟؟؟؟ تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته ----

عنوان

نگارش

استاد راهنما

دکتر ------

استاد مشاور

دکتر ---

1391

تقدیم به :

؟؟؟؟؟؟؟؟؟؟

تشکر و قدردانی

؟؟؟؟؟؟؟؟؟؟

چکیده

شروع متن

فهرست مطالب

فهرست جداول

فهرست نمودارها

فهرست شکل ها

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

1-1.سرطان مثانه

سرطان یکی از مشکلات بزرگ تمام جوامع بخصوص کشورهای در حال توسعه می باشد.در میان تمام انواع بدخیمی ها،سرطانهای دستگاه ادراری تناسلی نقش مهمی دارند که در بسیاری از افراد

منجر به مرگ فرد بیمار می شود.علاوه بر این ، الگوهای این سرطانها بسته به زمان ، منطقه و گروه های قومی مختلف متفاوت می باشند.(1)

1-1-1.اپیدمیولوژی

در سطح جهان سرطان مثانه از لحاظ فراوانی در جایگاه نهم قرار دارد.از لحاظ جنسیت نیز چهارمین سرطان شایع در مردان و نهمین سرطان شایع در زنان می باشد که بیشترین هزینه را نسبت به سایر سرطانها از زمان تشخیص تا مرگ برای بیمار در پی دارد(2).همچنین تخمین زده می شود که در آمریکا در سال 2012 ، 73510 مرد و زن مبتلا به سرطان مثانه تشخیص داده شده و 14880 مرد و زن از سرطان مثانه خواهند مرد(3).در سالهای اخیر میزان ابتلای مردان تقریبا روند ثابتی داشته در حالیکه در زنان 0.2٪ افزایش داشته است.در آلمان نیز سالانه حدود 24000 مورد جدید مبتلا به سرطان مثانه تشخیص داده می شود(4).

در یک بررسی جمعیتی در سال 2005 در ایران ، اطلاعات آماری لازم که از طریق آزمایشگاه های پاتولوژی ، کلینیک های سرطان و مراکز درمانی ، مطب پزشکان و سایر مراکز در استانهای مختلف جمع آوری شده بود، فراوانی سرطانهای ادراری تناسلی را به صورت زیر نشان می دهد :

جدول 1-1.توزیع جنسیتی سرطان های مجاری ادراری در ایران

Table 1. Sex Distribution of Urological Cancers in Iran

Type of cancer	Male (%)	Female (%)	Total (%)
Renal cell carcinoma	529 (7.44)	313 (30.2)	842 (10.3)
Renal pelvis/ ureter cancer	40 (0.56)	21 (2.02)	61 (0.75)
Bladder cancer	3,248 (45.7)	689 (66.4)	3,937 (48.3)
Prostate cancer	2,722 (38.3)	0	2,722 (33.4)
Testicular cancer	501 (7.05)	0	501 (6.15)
Penile cancer	12 (0.17)	0	12 (0.15)
Urethral cancer	27 (0.38)	10 (0.96)	37 (0.45)
Other unspecified	31 (0.44)	4 (0.40)	35 (0.43)

همانطور که در جدول فوق مشاهده می شود بیشترین درصد سرطانهای ادراری تناسلی در ایران متعلق به سرطان مثانه است(1).

معمولترین نشانه سرطان مثانه هماتوری متناوب در 85-80٪ از بیماران می باشد.سایر نشانه های مجاری ادراری شامل : افزایش دفعات و نیاز شدید به دفع ادرار و ادرار همراه با سوزش و درد می باشد(20-15٪ ازبیماران)(5).

2-1. سطح بندی بیماری

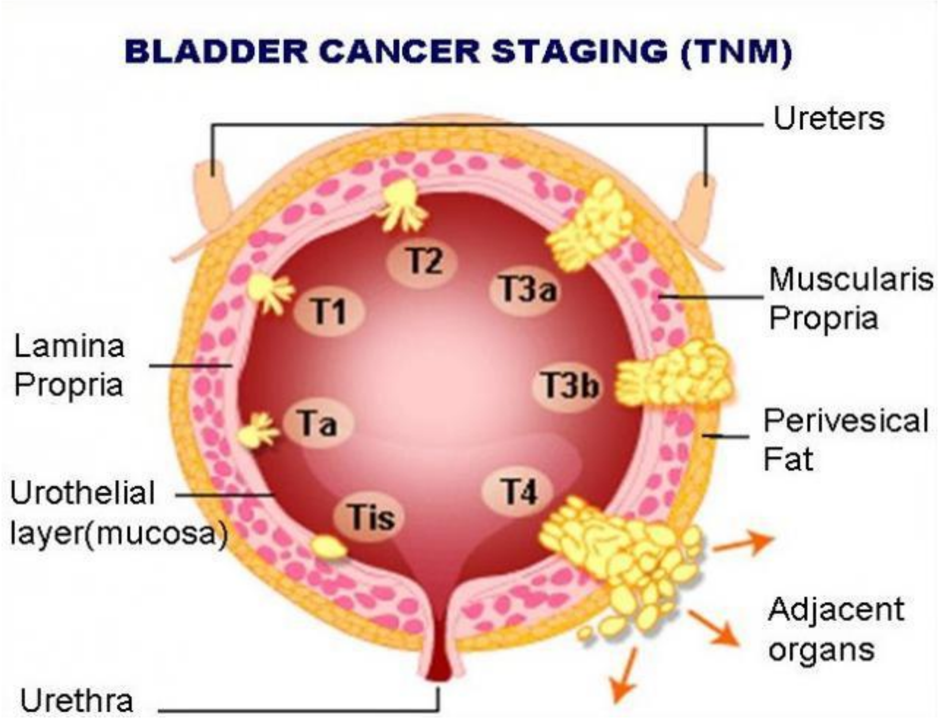
برای بکار گیری استراتژی درمانی صحیح و پیش بینی نتایج درمان ، سطح بندی انواع سرطان مثانه بسیار حائز اهمیت است.آخرین سطح بندی تایید شده، TNM(tumor,node,metastasis) می باشد و پرکاربردترین نوع سطح بندی در انواع سرطانها می باشد که علائم اختصاری و توضیحات مربوط به هر کدام ،در جدول زیر آمده است(6).

جدول 1-2. سطح بندی انواع سرطانها

T - Primary tumour
TX Primary tumour cannot be assessed
T0 No evidence of primary tumour
Ta Non-invasive papillary carcinoma
Tis Carcinoma *in situ*: 'flat tumour'
T1 Tumour invades subepithelial connective tissue
T2 Tumour invades muscle
    T2a Tumour invades superficial muscle (inner half)
    T2b Tumour invades deep muscle (outer half)
T3 Tumour invades perivesical tissue
    T3a Microscopically
T3b Macroscopically (extravesical mass)
T4 Tumour invades any of the following: prostate, uterus, vagina, pelvic wall, abdominal wall
    T4a Tumour invades prostate, uterus or vagina
    T4b Tumour invades pelvic wall or abdominal wall
N - Lymph nodes
NX Regional lymph nodes cannot be assessed
N0 No regional lymph node metastasis
N1 Metastasis in a single lymph node in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac or presacral)
N2 Metastasis in multiple lymph nodes in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac or presacral)
N3 Metastasis in a common iliac lymph node(s)
M - Distant metastasis
M0 No distant metastasis
M1 Distant metastasis

1-2-1.علائم و تعریف سطوح

سرطان مثانه نیز بر اساس میزان و درجه تهاجم تومور به دیواره مثانه سطح بندی می شود.
به طور کلی سطوح Ta ،T1 و Carcinoma *in-situ* (Tis) به علت اینکه به لایه های درونی اپی تلیال مثانه محدود می شوند و دیواره عضلانی مثانه دخالتی ندارد، به عنوان گروه های سطحی سرطان دسته بندی می شوند.از میان تومورهای تهاجمی غیر ماهیچه ای ،تومورهای سطح Ta به موکوز محدود می شوند در حالیکه تومورهای T1 به صورت سطحی به لامیناپروپریا حمله می کنند. تومورهای T1 نسبت به Ta تهاجمی ترند.تومورهای تهاجمی (سطوح T2,T3,T4) به درون ماهیچه (T2)و درون لایه چربی اطراف ماهیچه (T3) گسترش پیدا می کنند و تومورهای متاستاتیک که گره های موضعی یا ارگانهای دورتر را نیز درگیر می کنند در سطح T4 قرار داده می شوند(7–9) .



شکل 1-1. سطح بندی انواع سرطان مثانه بر اساس سیستم TNM

سرطان مثانه در مراحل ابتدایی در بخش داخلی دیواره مثانه رخ می دهد. بطور کلی مثانه از یک لایه عضلانی خارجی و یک دیواره داخلی ساخته شده از سلول های سنگفرشی، سلول های ترانزیشنال و سلول های ترشحی تشکیل شده است.

سلول های ترانزیشنال منعطف بوده و بدون اینکه به ساختار سلول آسیب بزنند تغییر شکل می دهند.

فرم غالب سرطان مثانه ، کارسینومای اوروتلیال است که از سلول های ترانزیشنال منشا می گیرد که 90٪ این نوع سلول ها را به خود اختصاص می دهد.کارسینومای سلول های ترانزیشنال می تواند به دیواره کلیه و مجاری ادرار که دارای سلول های ترانزیشنال می باشد نیز توسعه یابد.

سلول های سنگفرشی سلولهای نازک و صافی هستند که در دیواره مثانه جای دارند و شبیه به سلول های سنگفرشی هستند که در پوست قرار دارند.2٪ از سرطان های مثانه ، کارسینومای سلول های سنگفرشی هستند و معمولا در سطوح آخر بیماری یافت می شود.

سلول های ترشحی نیز در دیواره واقعند و ترشحاتی مثل موکوس تولید می کنند و شبیه به سلول های دیواره روده ای اند. 2-1٪ از سرطان های مثانه آدنوکارسینوما هستند و اغلب در سطوح آخر بیماری مشاهده می شوند.

با وجودیکه آدنوکارسینوما،کارسینومای سلول های سنگفرشی و سارکوما نیز اتفاق می افتد ولی فراوان ترین نوع سرطان مثانه ناشی از کارسینومای سلول های ترانزیشنالاست(3, 10).

1-3. ریسک فاکتور های سرطان مثانه:

1-3-1. مصرف سیگار:

مهم ترین ریسک فاکتور ابتلا به سرطان مثانه ،مصرف سیگار است و به نظر می رسد که علت 50٪ از تومور های مثانه باشد.دود تنباکو شامل آمین های آروماتیک متعدد می باشد که به مجاری ادرار ترشح شده و اثرات کارسینوژنیک بر کل سیستم مجاری ادراری می گذارد.

1-3-2. مشاغل خاص:

افرادی که بنا به شغل خویش با آمین های آروماتیک در ارتباطند. بطور مثال کسانی که در صنعت رنگ،فلزات و محصولات نفتی مشغول به کارند.البته اخیرا به علت بالارفتن سطح آگاهی و رعایت نکات ایمنی این فاکتور اثر کمتری دارد.

1-3-3. پرتودرمانی:

تحقیقات نشان می دهد که درصد کمی از سرطان های مثانه با پرتو درمانی در ناحیه لگنی مرتبط می باشند.به عنوان مثال می توان به سرطانهای دهانه رحم و بیضه اشاره کرد.

البته مردانی با سابقه سرطان پروستات چه با پرتو درمانی و چه بدون پرتودرمانی از ریسک بالاتری برای ابتلا به سرطان مثانه برخوردارند.

1-3-4.شیمی درمانی:

استفاده از سیکلوفسفامید برای درمان بیماری های پرکاری لنفی و سایر امراض غیر سرطانی با ایجاد و پیشرفت بیماری سرطان مثانه از نوع مهاجم به عضله در ارتباط است که البته دوره نهفتگی 6-13 سال را در پی دارد(10-12)

1-3-5.شیستوزوما:

شیستوزومازیس دومین عفونت انگلی شایع پس از مالاریاست که در آفریقا،آسیا و آمریکای جنوبی ششصد میلیون نفر در معرض ابتلا به آن هستند. با اینکه رابطه تعریف شده خوبی بین کارسینومای سلول های سنگفرشی مثانه و شیستوزومازیس وجود دارد، روند بیماری در مناطق بومی مثل مصر در حال تغییر است(13).

1-4.نحوه درمان کنونی سرطان مثانه:

تومورهای سطحی مثانه عمدتا بوسیله برش مجرای پیشاب از مثانه (TRUB) درمان می شوند که ممکن است همراه یا بدون درمانهای ایمونوتراپی BCG و یا شیمی درمانی Intravesicalباشد.

تومورهای مهاجم معمولا با برداشت مثانه یا درمانهای کمک کننده به مثانه-Bladder) (sparing therapiesکه از شیمی درمانی یا پرتوتابی تشکیل شده، درمان می شوند(3,14,15).

بیمارانی که مبتلا به شکل متاستاتیک بیماری هستند نیازمند شیمی درمانی سیستمیک همراه با ترکیبات چند گانه ضد سرطان می باشند.

در بیشتر بیماران تومورهای سطحی سرطان مثانه تشخیص داده می شود.با وجودیکه تومورهای سطحی می توانند کاملا برداشته شوند،همچنان ریسک بالایی برای عود بیماری وجود دارد.حدود 50-70٪ این بیماران ظرف 5 سال و تقریبا 90٪آنها ظرف 15 سال شاهد بازگشت بیماری خواهند بود. با مراقبتهای پزشکی بسیار ، میزان بقای 5 ساله برای این بیماران در سطح Ta تا 95٪ و در سطح T1 تا 75٪ تغییر می کند.

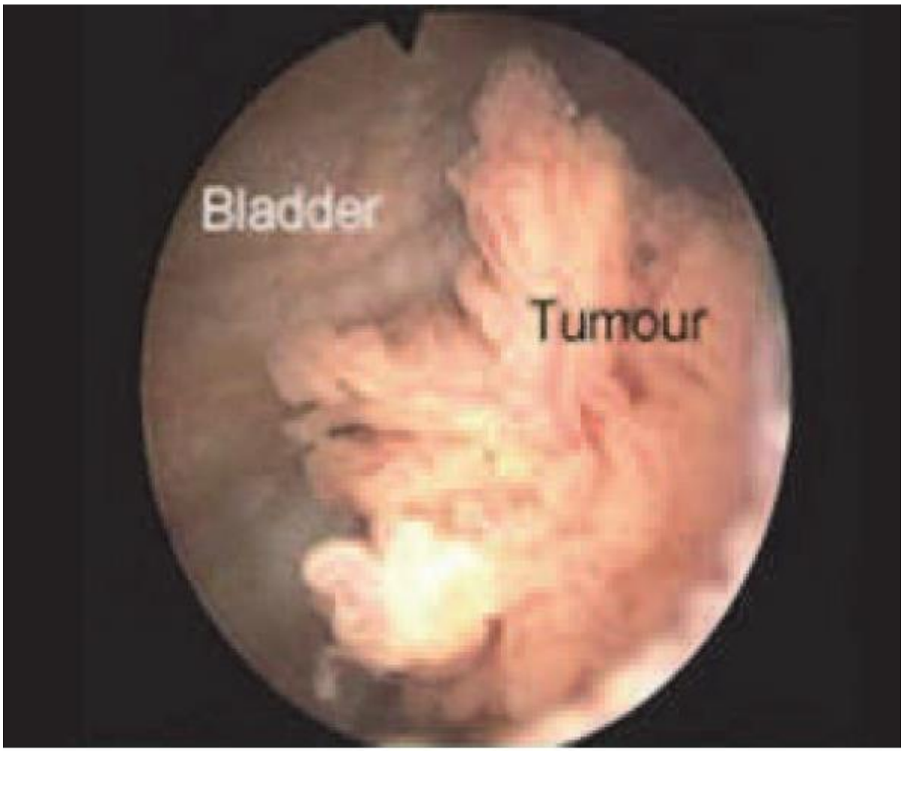
با این وجود،تقریبا در 25٪ بیماران با تومورهای غیرتهاجمی Taو T1 سرانجام فرم تهاجمی بیماری ایجاد می شود.

میزان بقای 5 ساله با تهاجم و متاستاز تومور کاهش پیدا می کند.بیماران با تومورهای سطح T2 حدود 60٪ ظرف 5 سال ادامه حیات دارند،اما فقط 35٪ از بیماران با تومورهای سطح T3 و 10٪ از بیماران با تومورهای سطح T4 تا 5 سال قادر به ادامه حیات خواهند بود(17 ,16).

برای بیمارانی که از ابتدا بیماریشان بصورت غیر تهاجمی تشخیص داده شده است مراقبت مادام العمر ضروری است.تشخیص زودهنگام سرطان مثانه ، پیش بینی مرضی،کیفیت زندگی و ادامه حیات را برای فرد بیمار افزایش می دهد(19 ,18).

1-5. روند کنونی مطالعات تشخیصی و سنجش‌های موجود

در طول 5 تا 10 سال اخیر روش های تشخیصی و همچنین درمان سرطان مثانه پیشرفت چشمگیری کرده است. جالب اینکه در دهه ی اخیر ، در کشور های اروپایی میزان مرگ و میر در اثر این بیماری به طور تقریبی در مردان 16٪ و در زنان 12٪ کاهش داشته است. روش استاندارد و طلایی برای تشخیص سرطان مثانه، سیستوسکوپی است. سیستوسکوپی روش قابل اعتمادی است که نزدیک به همه انواع آسیبهای مثانه را شناسایی می کند (9 ,8).



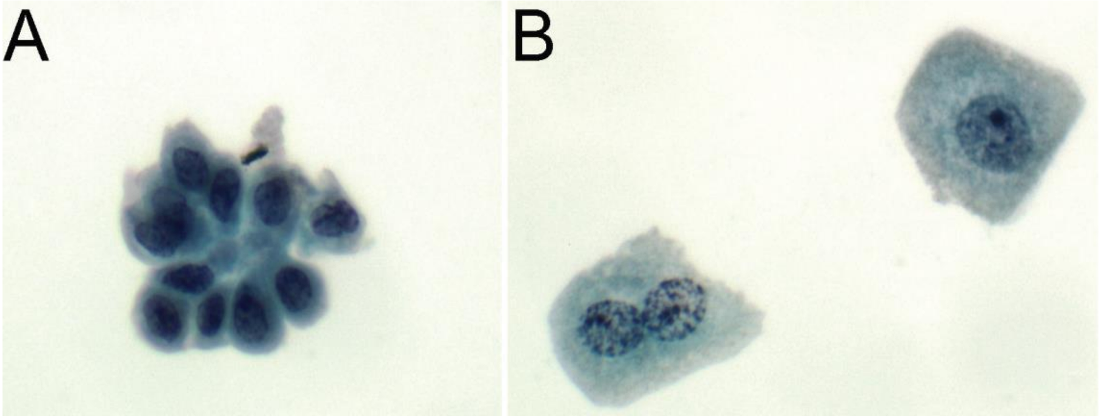
شکل1-2.تصویر سیستوسکوپی تومور مثانه

برای شناسایی زودهنگام سرطان مثانه و هم چنین بررسی پاسخ به درمان و بازگشت تومور وجود مارکرهای تومور مثانه ضروری است.یک تست ایده آل باید غیر تهاجمی ، خیلی حساس و اختصاصی ،ارزان ،قابل انجام و راحت بوده و نتایج بسیار تکرار پذیر ارائه بدهد.یک تومور مارکر مناسب باید بتواند برای پیگیری بیماران مبتلا به سرطان مثانه نیز قابل استفاده باشد.اگر یک تست بر اساس یک تومور مارکر بتواند معیارهای فوق را فراهم کند،می تواند کیفیت زندگی بیماران را بهبود داده و هزینه های مراقبت بعدی را کاهش دهد(20 ,6-23).در سالهای اخیر تستهای تهاجمی متعددی توسط سازمان غذا و داروی امریکا تایید شده است که در زیر به آنها اشاره شده است:

1-5-1.سیتولوژی ادرار (Urine cytology)

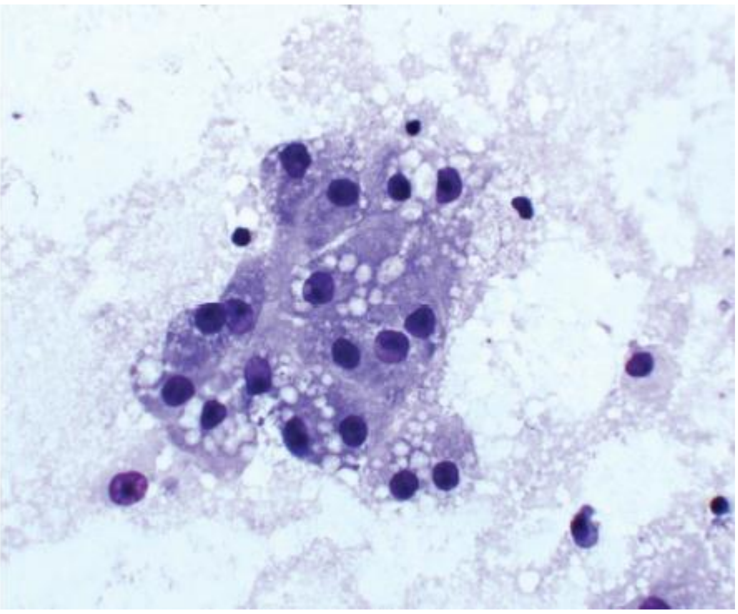
سیتولوژی ادرار یک روش غیر تهاجمی برای تشخیص سرطان مثانه است.که موفقیت این روش به سلولهای رها شده در ادرار و تشخیص صحیح آنها توسط سیتوپاتولوژیست حرفه ای بستگی دارد تا بر اساس مورفولوژی سلول را در یکی از 4 گروه نرمال،غیرطبیعی ،مشکوک و بدخیم طبقه بندی کند(24).

در سطوح پیشرفته بیماری نسبت به سطوح ابتدایی ،سلولهای بیشتری به ادرار رها می کنند. مطالعات انجام شده حساسیت برای سطوح پایین را کم ، ولی برای سطوح پیشرفته حساسیت بالایی را ارزیابی می کنند . اختصاصیت سیتولوژی 99-83٪ و حساسیت کلی آن 53-20٪ است.سیتولوژی به علت حساسیت تشخیصی پایین برای سرطان مثانه سطحی و با درجات پایین مناسب نیست وهمچنین نیازمند سیتوپاتولوژیست حرفه ای می باشد(25 ,9-29).



شکل 1-3.سلولهای نرمال موجود در ادرار

A)سلول های اوروتلیال پایه سیتوپلاسم نسبتا چگال و با مرزهای کاملا مشخص دارند. هسته و هستک کوچک در مرکز قرار دارد. B)سلول های اوروتلیال سطحی سیتوپلاسم دانه های فراوان با مرزهای دالبری شکل دارند:هسته بزرگ ، گرد،چندتایی و با هستک های برجسته و مرزهای هسته ای صاف هستند.



شکل 1-4. کارسینومای سلولهای مجاری ادرار.

سلولهای کارسینومای مجاری ادراری به ندرت به ادرار رها می شوندئاین سلولها سیتوپلاسم با واکوئل های فراوان دارند.هسته ها در مرکز با شکل غیر طبیعی قرار گرفته اندX 600 (رنگ آمیزی Diff-Quik

1-5-2. تست Immunocyt/Ucyt+

در واقع یک سنجش فلورسنت ایمونوسیتولوژیک است که با روش سیتولوژی ادرار ترکیب شده است. این سنجش دو موسین متفاوت و یک آنتی ژن کارسینوامبریوژنیک گلیکوزیله موجود در

سلولهای تومور با منشا اپی تلیوم را شناسایی می کند(19A211وLDQ10،M344). حضور هر کدام از رنگ های سبز یا قرمز به عنوان جواب مثبت تلقی می شود. ارزیابی این سنجش نیازمند سیتوپاتولوژیست مجرب می باشد.این روش حساسیت کلی 73٪ و اختصاصیت 80٪ را دارد(30, 22, 21–32)

3-5-1. تست BTA stat و سنجش BTA TRAK

ایمونو اسی های آنزیمی اند که هدفشان سنجش پروتئین مربوط به فاکتور Hکمپلمان انسانی در ادرار بوسیله آنتی بادی های مونوکلونال X52.1 وX13.2 است.BTA stat یک تست نیمه کمی است و دارای اختصاصیت 92-60٪ و حساسیت 83-57٪ است.

BTA TRAK یک سنجش کمی است و دارای cut off حدود14 U/ml بوده و دارای اختصاصیت 97-24٪ و حساسیت 91-51٪ است و نیازمند کارشناس حرفه ای و آزمایشگاه مرجع می باشد (33, 28–36).

4-5-1. UroVysion test

تستی است که سلولهای سرطانی مثانه را بر اساس آنیوپلوییدی کروموزوم های 1،3،5،7،9،17 بوسیله پروب شناسایی می کند و توسط FDA برای تشخیص بیماری در افراد مبتلا به سرطان مثانه و هم چنین برای پیگیری افراد با سابقه ابتلا به سرطان مثانه تایید شده است.حساسیت این روش 71٪ و اختصاصیت آن 94/5٪ ارزیابی شده است.حساسیت کلی این روش نسبت به سیتولوژی به خصوص در سطوح پیشرفته بیماری بیشتر است .هزینه بالا و نیاز به حجم بالای ادرار و عدم توانایی در شناسایی حذف در کروموزوم 9p21 از جمله محدودیتهای این روش است(37, 31, 30, 22, 21–39)

5-5-1. UBC و CYFRA21-1

مطالعات نشان می دهد که بیان بیش از حد برخی پروتئین های ماتریکس هسته ای در سرطان های مختلفی از جمله سرطان های پستان،پروستات، کولون و مثانه صورت می گیرد. در میان بیومارکرهای شناسایی شده برای تشخیص سرطان مثانه ،برخی از آنها بسیار مفید گزارش شده اند.

تستهای CYFRA 21-1 و UBC سنجشهایی بر اساس اندازه گیری سیتوکراتینها هستند.

سیتوکراتین ها پروتئینهای رشته ای حدواسط هستند.در شرایط بدخیمی مثل کارسینومای سلولهای اوروتلیال ، سیتوکراتین های خاصی بیش از حد بیان می شوند.سنجش CYFRA21-1

اغلب قطعاتی از CK19 را با کمک دو آنتی بادی مونوکلونال شناسایی می کند.کیت UBC نیز CK18 و CK8 را در نمونه های ادراری شناسایی می کند(40).

1-5-6. NMPs

از سوی دیگر تحقیقات متعددی صورت گرفته است که نمایانگر ارتباط بیان یک پروتئین ماتریکس هسته ای و بیماری سرطان مثانه می باشند(41).

بررسی ها نشان می دهد که غلظت درون سلولی پروتئین NuMA یا NMP22 در رده های سلولی سرطان مثانه در مقایسه با رده های سلولی نرمال اوروتلیال ، 25 برابر بیشتر است(42).

هم چنین اطلاعات زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه غلظت درون سلولی NMP22 با سطح تمایز در سرطان مثانه رابطه مستقیم دارد(43). با در نظر گرفتن مطالب ذکر شده در کنار این حقیقت که آنیوپلوییدی و تغییرات کروموزومی از جمله نشانه های سرطان مثانه هستند،می توان سنجش میزان NMP22 را به عنوان یک مارکر بالقوه برای سرطان مثانه در نظر گرفت.

1-6.NMP22 bladder chek

اولین تست تجاری توسط شرکت Matritech Inc. (Newton, MA)طراحی شد که یک ایمونو اسی کمی برای سنجش اشکال مختلف NMP22 موجود در نمونه ادرار با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال بود.

جدیدترین نسل این تست، یک سنجش Point of care است که براساس یک واکنش ایمونوکروموگرافیک، پروتئین را شناسایی می کند. که تنها به 4 قطره از ادرار فرد نیاز دارد و آنتی ژن مورد نظر را با آنتی بادی های Anti-NMP22 شناسایی می کند.این روش حداقل 4 برابر حساس تر از سیتولوژی است و هزینه آن نیز نصف هزینه سیتولوژی است. از مزایای NMP22 Bladder chekمی توان به در دسترس بودن و به صرفه بودن اشاره کرد.از طرفی هم انجام آن برای بیمار هیچگونه ناراحتی ایجاد نمی کند.حساسیت این روش 86٪ و اختصاصیت آن 98٪ است.نتایج مثبت کاذب سیتولوژی 2 برابر نتایج مثبت کاذبNMP22 Bladder chek است(44 , 4-46).

شکل 1-5. NMP22 Bladder chek کاست کوچکی است که با قرار دادن 4 قطره از نمونه ادراری در چاهک S ظرف 50-30 دقیقه، نتیجه آزمایش مشخص می شود(44).

1-6-1. مطالعات بالینی صورت گرفته در مورد NMP22

مطالعات Soloway و همکارانش نشان داد که متوسط میزان NMP22 در نمونه های بیماران با سطوح غیر تهاجمی،CIS و تهاجمی به ترتیب 13/1 U/ml، 26/4 U/ml و35 U/ml می باشد.

همچنین Chahalو همکارانش در یک بررسی دریافتند که میزان NMP22 برای سطح Ta در مقابل سطوح T1-3 و همچنین در حالت تهاجمی بسیار کمتر می باشد.و مقادیر بسیار زیاد (NMP22>20 U/ml) با حالت تهاجمی بیماری و نوع عودکننده آن رابطه مستقیم دارد.معنای این نتایج اینست که NMP22 ، به عنوان یک مارکر تشخیصی و حتی مارکری برای بازگشت بیماری می تواند مفید باشد.با وجود دامنه حساسیت متفاوت (100٪-81٪) سطح NMP22 نمونه ادراری می تواند در جهت درجه بندی مبتلایان از لحاظ بازگشت بیماری استفاده شده و به ارولوژیست ها کمک می کند تا پروسه درمان را در جهت کاهش احتمال بازگشت بیماری ،برای هر فرد اختصاصی کنند(47 ,42 ,33-50).

1-6-2.مزایا و معایب :

اگرچه نسبت به سیتولوژی از حساسیت بیشتری برخوردار است اما بزرگترین مزیت آن، سهولت استفاده از آن است.این تست تنها بر اساس سنجش مقدار کمی پروتئین رها شده در ادرار است و نیازمند تفسیر سیتوپاتولوژیست نمی باشد.همین امر فاکتور خطای آزمایشگر را حذف کرده و تکرار پذیری را بالا برده و زمان و هزینه تشخیص را کاهش می دهد.

نوع جدید این تست که یک سنجش Point of careاست،تاخیر در تشخیص را کاهش داده و پروسه تصمیم گیری برای درمان را تسهیل می کنند.

صرفه اقتصادی NMP22 به مراتب بیشتر از سیتولوژی و سایر سنجش ها است .سایر سنجش های بر اساس ادرار که برای استفاده کلینیکی تایید شده اند مثل Uro Vysion و Immunocyt بسیار گران ترند. چرا که مستلزم آنالیز و پردازش خارج از آزمایشگاه می باشند(51–53)

با وجود این مزایا ، NMP22 هنوز به طور گسترده در آزمایشگاه ها استفاده نمی شود و به علت اینکه حساسیت آن بسیار بالا نیست، در حال حاضر جهت پیگیری عود بیماری استفاده می شود.

از طرفی نیز، برای تومور های کوچک در حال تشکیل مجدد،نسبت به تومور های آغازین حساسیت کمی دارد.همچنین برای این تست یک Cutoff value استاندارد مورد پذیرش همگان وجود ندارد.

NMP22 تا کنون بطور گسترده ای در سطح غربالگری و همچنین پایش بیماری بررسی شده و نتایج کاربردی بهتری نسبت به سیتولوژی ارائه کرده است.البته ویژگی پیش بینی بیماری برای تشخیص سرطان مثانه ،برای اینکه به عنوان یک ابزار پایشی جایگزین سیتولوژی شود به تنهایی کافی نیست و امروزه می تواند نقش بالقوه ای را در فرانگری بازگشت بیماری ایفا کند.

بر اساس اطلاعات موجود،NMP22 در حساسیت کلی و تشخیص تومورهای سطح پایین از سیتولوژی مفیدتر است و در نتیجه می تواند در کنار سیتولوژی بازگشت سرطان مثانه را زودتر و بهتر از سیتولوژی به تنهایی،شناسایی کند.

ترکیب NMP22 با سیتولوژی و یا سایر مارکر های توموری موجود در ادرار نشان می دهد که قدرت پیش بینی بیماری را افزایش می دهد.اما این ترکیب ، پیچیدگی امر و هزینه آن را بالا می برد(31,32,39,45,53,54)

جدول 1-3. مقایسه حساسیت و اختصاصیت سنجیده شده برای NMP22 در بررسی های مختلف(55)

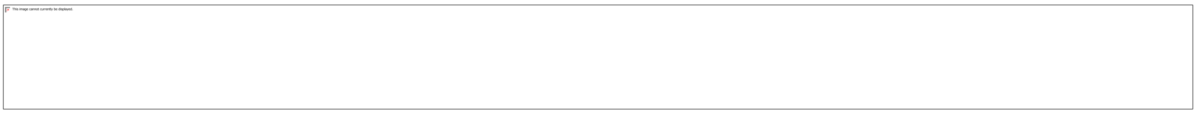
Study	Participants	Sensitivity, %	Specificity, %	Positive Predictive Value, %	Negative Predictive Value, %
Current study	151	75.0	86.7	85.1	77.4
Soloway et al[15]	90	78.5	75.9	57.5	86.1
Shariat et al[16]	209	50.0	50.0	81.0	57.0
Zippe et al[17]	330	100	85.0	29.0	100
Atsu et al[18]	202	78.1	66.0	59.5	82.5
Eissa et al[19]	168	85.0	91.3	89.5	87.5
Stampfer et al[20]	231	48.5	91.8	65.3	84.9

جدول 1-4.حساسیت و اختصاصیت NMP22 در سطوح مختلف سرطان مثانه(55)

Tumor Class	Sensitivity, %	Specificity, %	Positive Predictive Value, %	Negative Predictive Value, %	Accuracy, %
Stage					
Ta	31.3	86.7	33.3	85.5	76.9
T1	90.0	86.7	73.0	95.6	76.6
T2	66.7	86.7	37.5	95.6	84.5
T3	90.0	86.7	64.3	97.0	87.4
Grade					
1	66.7	86.7	72.2	83.3	79.8
2	81.8	86.7	37.5	97.0	86.0
3	84.6	86.6	68.7	94.2	86.1
Superficial TCC	70.2	86.7	76.7	82.3	80.3
TCC (overall)	75.0	86.7	85.1	77.4	80.8

1-7. ویژگیهای مولکولی NMP22

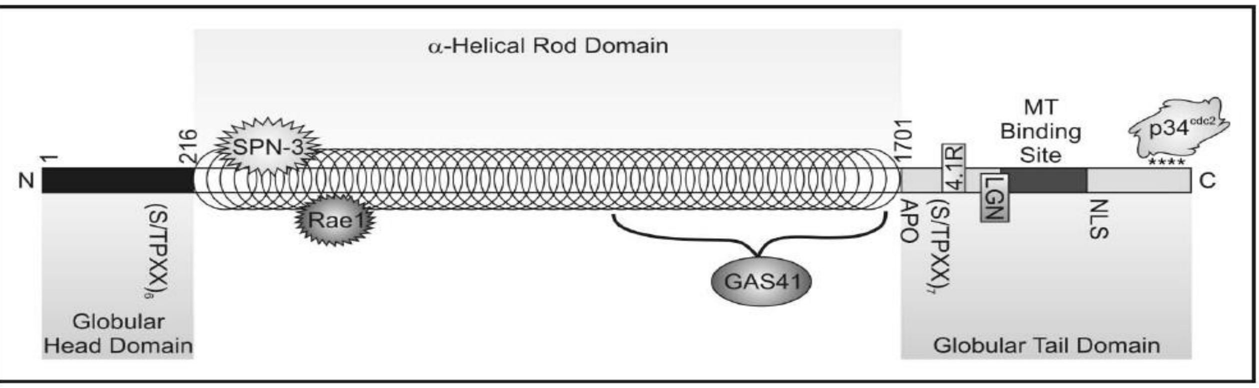
NMP22 یا NuMA1 محصول ژنی به نام NuMA است که در کروموزوم 11q13 واقع شده و77830 bp طول داشته و عمده محصول رونویسی و ترجمه، پروتئینی با 2115 اسید آمینه است(56-58).این ژن در انسان، گاو، مرغ ،موش خانگی ،شامپانزه ودر زبرافیش حفاظت شده است(59). در سالهای نخست، 5 گروه مختلف به طور جداگانه و مستقل این پروتئین را شناسایی کرده و نام های متفاوتی به آن اطلاق کردند: SPN, Centrophilin و SPH که بعدها کلونینگ ثابت کرد که همه آنها در واقع یک پلی پپتید هستند.



شکل 1-6. محل قرارگیری ژن NuMa1 بر کروموزوم شماره

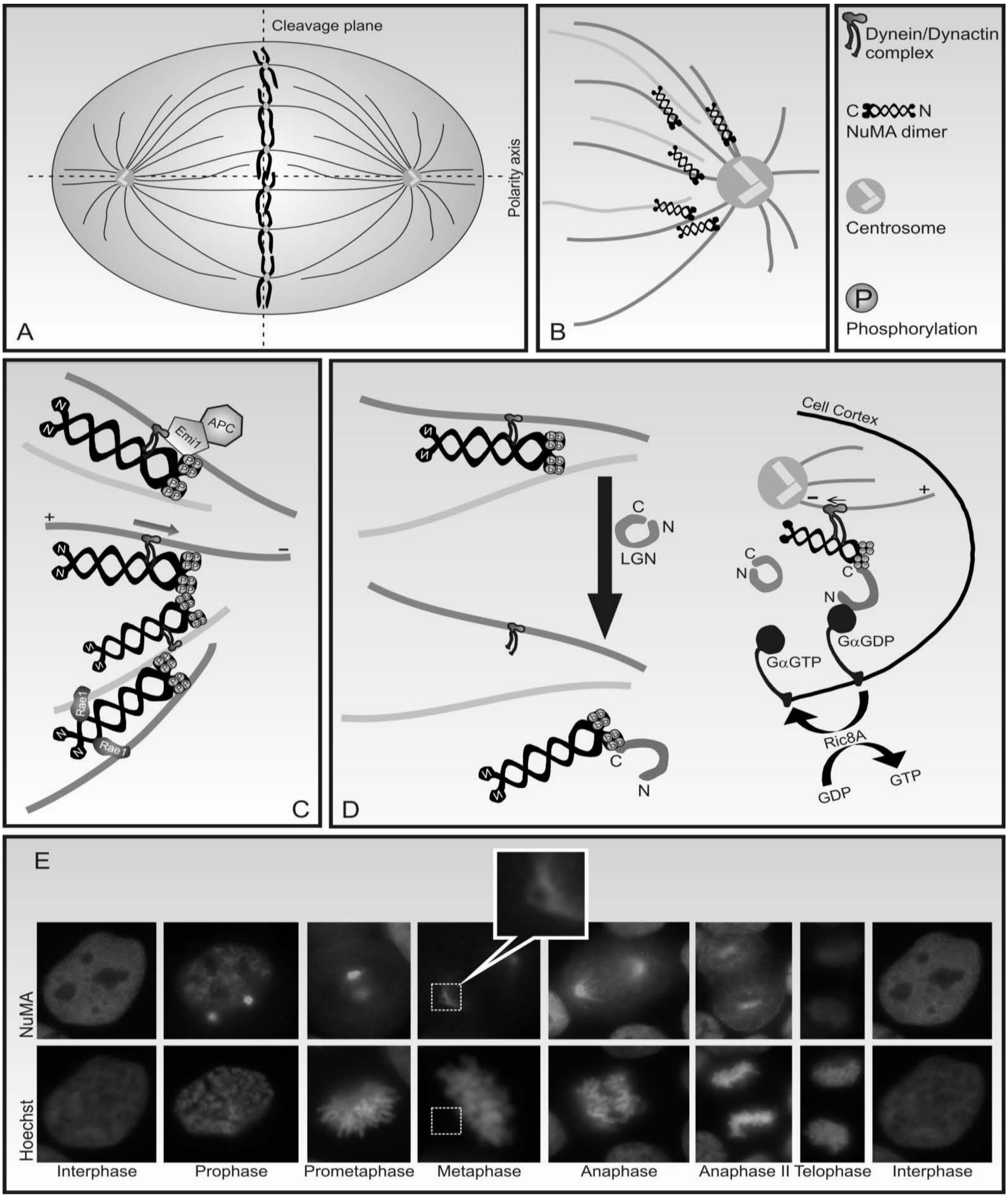
وزن مولکولی این پروتئین 238 kDaاست .پیش بینی ساختار ثانویه این پروتئین نشان می دهد که یک بخش مارپیچ میله ای طویل در ناحیه آمینو اسیدی 216-1700 در میان بخشهای غیر مارپیچ N-terminalوC-terminal واقع شده است. دومین آلفا هلیکس مرکزی شامل تکرارهای هفتایی می باشد که در میان آنها نواحی غنی از پرولین قرار دارد.مطالعات بعدی پیشنهاد داد که این

مولکول بصورت دو رشته ای موازی است که دایمر شده اند.این پروتئین به خانواده پروتئینی خاصی تعلق ندارد ولی به تروپومیوزین، میوزین و فیلامنتهای حد واسط شباهت دارد.NuMA برای قرار گیری در هسته نیاز به سیگنال قرارگیری در هسته (NLS) دارد که این آمینو اسیدها در-C terminal آن واقع شده اند(60).این پروتئین حداقل 3 ایزوفرم مختلف دارد که بر اثر پردازشهای متفاوت حاصل شده اند (NuMA1, NuMA-s, NuMa-m).اختلاف عمده این پروتئینها در C-terminal آنهاست و در سایر نواحی کاملا شباهت دارند(57).



شکل 1-7. تصویری شماتیک از ساختار و میانکنش های NuMa

در طول اینترفاز و میتوز در هسته حضور داشته و در سازماندهی ژنوم و تنظیم بیان ، میتوز و تشکیل دوک شرکت دارد. تشکیل دوک حاصل میانکنش NuMA و میکروتوبول است. بیان بیش از حد آن موجب تشکیل دوکهای چند قطبی می شود.در بیشتر سلولهای بدن این پروتئین بیان می شود.اما استثناهایی از جمله اسپرماتوزوا ، کراتینوسیت ، نوتروفیل ، برخی نورونها ، فیبرو بلاستها و سلولهای عضلات صاف و اسکلتی نیز مشاهده شدند که بیان این ژن در آنها وجود نداشت(61).



شکل 1-8. تصویر شماتیک از تقسیم میتوزسلول و نقش NuMA.

همان طور که در شکل 1-8 نشان داده شد ، NuMA می تواند میانکنش های متعددبا میکروتوبولها داشته باشد.میانکنش با Dynein باعث حرکت میکروتوبولها می شود و کمپلکسی تشکیل می دهد تا بواسطه اتصال APC ، چرخه سلولی را تنظیم کند.

1-7-1بیماری های مرتبط با NuMA

اولین بیماریهای مرتبط با NuMA عمدتا با مشاهده آنتی بادیهای خودی مربوط به بیماریهای خود ایمنی شناسایی شدند.در بیماریهایی چون

(Sjögren´s syndrome , vitiligo , scleroderma , autoimmune thyroiditis)

دخالت دارد.در انواع سرطانها مشاهده شده که لوکوس 11q13 به شدت دچار موتاسیون می شود.انکوژنهای زیادی در این محل واقع شده اند و تغییر در آنها باعث درگیرشدن گره های لنفی می شود.همچنین بر اثر ترانسلوکیشن قطعات کرموزومی، فرم نادری از بیماری APL به صورت فیوژن *NuMA-RAR*$^{\alpha}$ ایجاد می شود.

از سوی دیگر این پروتئین در عمل آپوپتوز نیز نقش دارد.همان طور که می دانیم از ویژگیهای آپوپتوز فشردگی کروماتین،کوچک شدن سلول ، برآمدگی غشا و در نهایت تشکیل وزیکولهای غشایی به نام اجسام آپوپتوزی می باشد.

این امر می تواند توسط مسیرهای متفاوتی با هدف از بین بردن سلولهای آسیب دیده و یا مضر صورت بگیرد.برای تجزیه هسته اهداف متعددی وجود دارد از جمله: لامین ،DNA و NuMA

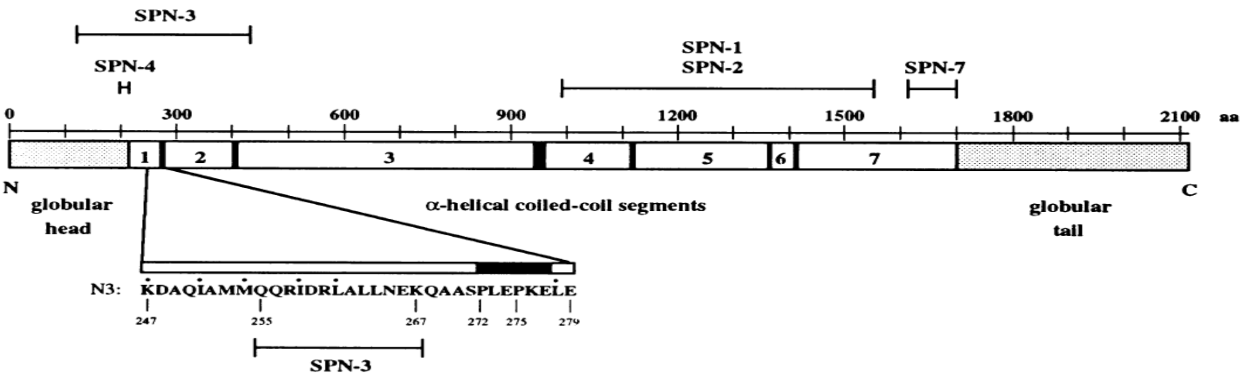
مطالعات نشان می دهد که فسفریله شدن این پروتئین ، تغییرات ساختمانی لازم برای عوامل آپوپتوز و شروع عمل آنها را فراهم می کند و در طی این پروسه به قطعاتی 200 kDa و 48 kDa می شکند.بررسی های انجام شده نشان می دهد که ناحیه ضروری برای آپوپتوز در 1701-1828 واقع شده و حذف آن باعث مهار آپوپتوز می شود(63 , 62).

مطالعات نشان می دهد که آنتی بادی مونوکلونال SPN3 پس از تزریق به درون هسته سلولهای HeLa،در 50٪ سلولها منجر به تشکیل میکرونوکلئی شده و در 50٪ بقیه میتوز را بلوکه و ایجاد دوکهای نا مناسب می کند.این امر تایید کننده اینست که آنتی ژن NuMA/SPN نقش مهم و کلیدی در تقسیم میتوز ایفا می کند(61).

1-8.طراحی آنتی ژن

در تحقیقات انجام شده با تهیه قطعات مختلف و کلونینگ و بیان آنها در E.coli و تست با 6 آنتی بادی موجود (SPN1,SPN2,SPN3,SPN4,SPN5,SPN7) با روش Dot blot، نقشه اپی توپی این پروتئین بدست آمده است.از میان 6 اپی توپ، 5 اپی توپ خطی و 1 اپی توپ غیرخطی می باشند.از 5 اپی توپ خطی شناسایی شده،4 اپی توپ در بخش میله ای واقع شده و فقط اپی توپ SPN4 که در آمینواسید 199 تا 216 قرار دارد دقیقا در C-terminalسر کروی و ابتدای بخش میله ای قرار میگیرد.در میان اپی توپ های خطی موجود ،

2اپی توپ مهم واکنش دهنده با آنتی بادیهای SPN-3 و SPN-4 در 300 اسید آمینه آغازین ناحیه N-Terminal واقع شده اند.آنتی ژن SPN3 در جایگاه 255-267 و جایگاه آنتی ژن SPN4 در جایگاه 199-216 قرار دارد(64).



شکل 1-9.محل تقریبی اپی توپهای4 , 2 , 7SPN1 , و محل دقیق اپی توپ SPN3(64).

با توجه به توضیحات ذکر شده می توان دریافت که با طراحی سنجشی که بر اساس شناسایی آنتی ژن رها شده در ادرار باشد و از طرفی به طور اختصاصی بتواند آنرا از سایر پروتئینهای مشابه متمایز کند می توان در امر تشخیص زودهنگام سرطان مثانه قدم مثبتی برداشت.

با در نظر داشتن اینکه نواحی نزدیک به N-terminal در ایزوفرمهای NuMA کاملا یکسان است و همچنین همه ی پروتئینهای هسته ای نیز در C-terminal خود دارای (NLS) هستند(60) و از طرفی آنتی بادی موجود در بازار قادر است که بخش Head این مولکول را شناسایی کرده (65)و حضور آن را در نمونه ادرار فرد گزارش دهد.لذا با توجه به این موضوع،انتخاب 300 آمینو اسید آغازین این پروتئین که علاوه بر بخش Head دارای بخش هلیکال و یک اپی توپ مهمتر SPN3 می باشد،می تواند آنرا برای کاربرد تشخیصی اختصاصی تر کند و میزان دقت این تست را افزایش دهد.

هدف از انجام این تحقیق، بیان ناحیه ایمونوژنیک انتخاب شده در میزبان پروکاریوتی بوده لذا از باکتریEcoli سویه BL21 جهت بیان استفاده می شود.در میان وکتور های بیانی موجود، وکتور pGS21a به علت دارا بودن پروتئین فیوژن GST و همچنین His tagگزینه مناسبی جهت بیان قطعه 900 نوکلئوتیدی به شمار می رود.

تخلیص پروتئین حاصله بواسطه دارا بودن دنباله هیستیدینی با روش کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA انجام می شود.

پس از بیان و تخلیص پروتئین مورد نظر جهت تایید بیان صورت گرفته از وسترن بلاتینگ استفاده می شود.

سنجش الایزا بر اساس واکنش آنتی ژن بیان شده و همچنین آنتی بادی پلی کلونال تجاری ضد NuMA می تواند تا حدی مشابهت آنتی ژن طراحی شده و بیان شده را با پروتئین طبیعی نشان دهد.

طراحی پروتیین در کامپیوتر :

جهت طراحی

آنتی ژنهای طراحی شده در خصوص NUMA

بیان پروتیین در سیستمهای پروکاریوتی

تخلیص پروتیین با استفاده از سیستمهای جاری

آنتی بادیهای تولید شده بر ضد NUMA

فصل دوم

مواد و روش‌ها

2-1. مواد، وسایل و دستگاه‌ها

2-1-1. قطعه DNA کد کننده آنتی‌ژن مورد نظر

توالی حاصل از بررسی‌های بیوانفورماتیک با تمام تمهیدات لازم برای انجام بیان مناسب و نیز کلون شدن در داخل وکتور بیانی برای سنتز به شرکت Genscript سفارش داده شد.

2-1-2. پرایمرهای اختصاصی وکتور حامل قطعه DNA کد کننده آنتی‌ژن مورد نظر

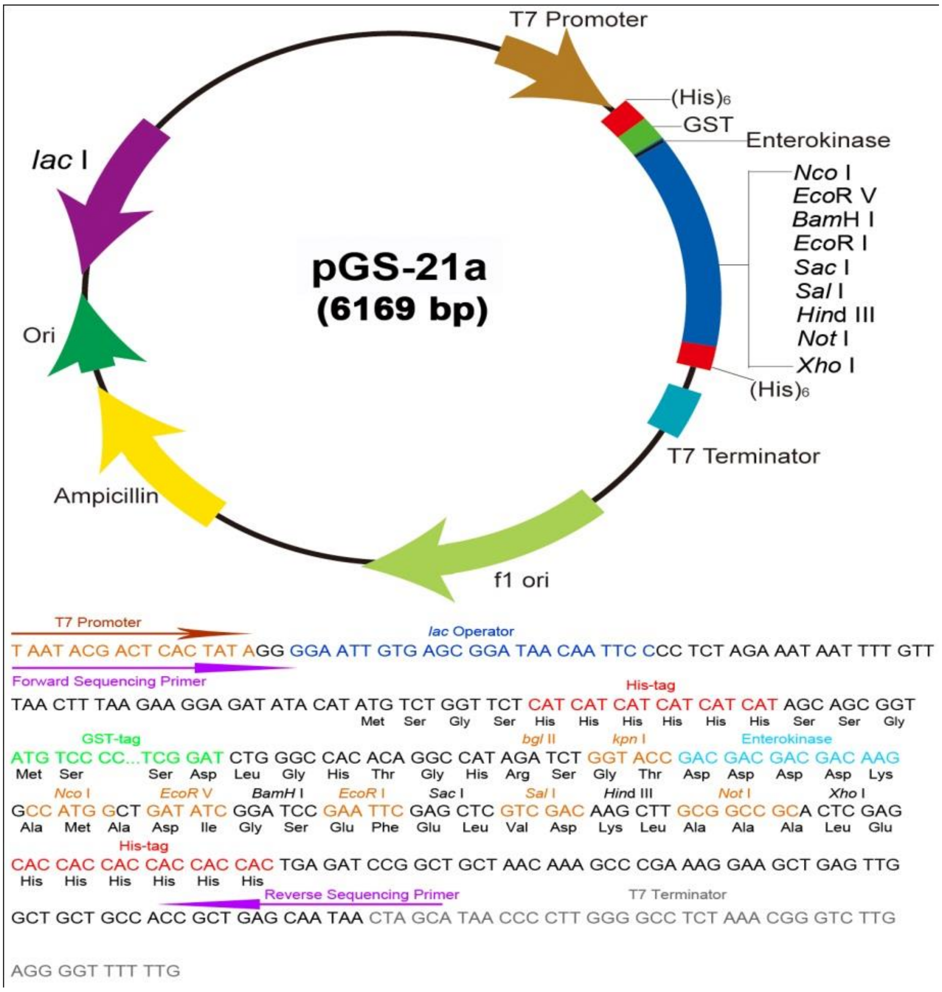
برای تایید وجود قطعه سنتز شده در وکتور بیانی Pgs21a از پرایمرهای اختصاصی وکتور با توالی های زیر استفاده شد.

جدول 2-1. توالی پرایمر های اختصاصی وکتور

T7 promoter primer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	**T7 terminater primer:** 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

2-1-3. وکتور بیانی مورد استفاده

وکتور بیانی استفاده شده در این تحقیق pGS21a بوده که نقشه آن در شکل ؟ نمایش داده شده است.



شکل2-1 نقشه وکتور بیانی pGS21a

2-1-4. کیت‌ها

برای استخراج DNA پلاسمید، از کیت تخلیص پلاسمید خریداری شده از شرکت MN،Bioneer و intronاستفاده شد.همچنین از کیت تخلیص پروتئین با ستون نیکل (GE healthcare) جهت جداسازی پروتئین استفاده شد.

2-1-5. بافرها و محلول‌ها

2-1-5-1. بافرهای الکتروفورز DNA

1) بافر TAE (100X)، روش تهیه:

Tris base 484 gr, Acetic Acid 144/2 ml, EDTA (0/5M) 200ml

با آب دیونیزه به حجم 1000 میلی‌لیتر برسد.

2) بافر نمونه گذاری DNA ،روش تهیه:

glycerol٪50 V/V, Na2EDTA 1mM (pH=8/0), Bromophenol blue ٪0/4 W/V

2-1-5-2. بافرهای SDS-PAGE

محلول استوک اکریل آمید: 30 گرم اکریل آمید و 0/8 گرم بیس اکریل آمید در 100 میلی لیتر آب مقطر حل شده و با کاغذ فیلتر واتمن شماره 1 صاف شد.

بافر ژل پایین: 18/2 گرم تریس باز و 0/4 گرم SDS در 100 میلی لیتر آب مقطر. pH=8/8.

بافر ژل بالا: 6/1 گرم تریس باز و 0/4 گرم SDS در 100 میلی لیتر آب مقطر. pH=6/8.

بافر مخزن: 3 گرم تریس باز، 14/4 گرم گلایسین و 1 گرم SDS در یک لیتر آب مقطر. pH=8/3.

بافر نمونه احیایی 5X: 10 میلی لیتر بافر ژل بالا، 5 میلی لیتر گلیسرول، یک گرم SDS، 0/5 میلی لیتر محلول بروموفنل و 1 میلی لیتر 2-مرکاپتواتانل. حجم نهایی به وسیله آب مقطر به 20 میلی لیتر رسانده شد.

محلول ٪10 TEMED: 100 میکرو لیتر TEMED در 900 میکرولیتر آب مقطر به صورت تازه آماده شد.

محلول ٪10آمونیوم پرسولفات : 100 میلی گرم در 1000 میکرولیتر آب مقطر به صورت تازه تهیه شد.

2-1-6. محلول‌های رنگ آمیزی کوماسی بلو

محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو R250: 0/25 گرم کوماسی بلو R250 در 125 میلی لیتر اتانل حل شده و به آن 25 میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و 100 میلی لیتر آب مقطر اضافه شد.

محلول رنگ بر: 100 میلی لیتر متانول، 100 میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و 800 میلی لیتر آب دیونیزه.

2-1-7. بافرهای وسترن بلات

بافر تانک: 3 گرم تریس باز، 14/4 گرم گلایسین و 150 میلی لیتر متانول با آب مقطر به حجم 1 لیتر رسانده شد.

بافرTBST: تریس باز به میزان 15 میلی مولار و NaCl به میزان 150 میلی مولار حاوی 0/1 درصد Tween-20 و 0/1 درصد Triton X-100.

بافر EIA: PBS 100 میلی مولار حاوی 0/1٪ BSA.

محلول بلاک کننده (بلاکر) : بافر PBS حاوی 5٪ شیر خشک بدون چربی

2-1-8 بافرهای ELISA

2-1-8-1.الایزای پروتئین

بافر PBS: 10 گرم NaCl، 1/44 گرم Na2HPO4، 0/25 گرم KCl، 0/25 گرم KH2PO4 در یک لیتر آب مقطر pH= 7/2.

بافر PBST: بافر PBS حاوی 0/1٪ Tween 20.

بافر EIA: PBS حاوی 0/1٪ BSA.

محلول بلاک کننده (بلاکر) : بافر PBS حاوی 5٪ شیر خشک بدون چربی.

محلول متوقف کننده واکنش الایزا:محلول 2 نرمال اسید کلریدریک

2-1-8-2.معرف برادفورد

100 میلی گرم رنگ کوماسی بریلیانت بلو G250 را در 50ml متانول حل کرده و پس از صاف کردن با فیلتر واتمن شماره 1 به آن 100 ml اسید فسفریک 84٪(w /v)افزوده و با آب مقطر به حجم یک لیتر می رسانیم.

2-1-9 بافرهای ستون نیکل

2-1-9-1.بافرهای تخلیص

بافر اتصال (binding buffer):بافرفسفات160میلی مولار و ایمیدازول 20میلی مولار

بافر شستشو (washing buffer):بافر فسفات 160 میلی مولار و ایمیدازول 40 میلی مولار

بافر (elution buffer):بافر فسفات 160میلی مولار و ایمیدازول 500میلی مولار

2-1-9-2.بافرهای شارژ مجدد ستون نیکل

گوانیدیوم کلراید 6 مولار ، SDS ٪2 ، EDTA 100 میلی مولار با pH=8 ، نیکل سولفات 100 میلی مولار

محلول اتانول ٪25 ، ٪50 ، ٪75 ، ٪100

2-1-10. بافرهای تخلیص آنتی بادی

مواد و محلول های مورد نیاز

- بافر فسفات 17/5 میلی مولار وpH=6/3

برای تهیه این بافر بایستی 1/87 گرم از نمک NaH_2PO_4 و 0/272 گرم از نمکNa_2HPO_4 در آب مقطر حل و به حجم یک لیتر رسانده شود.

- محلول اسید کلریدریک 0/5 نرمال
- محلول هیدروکسید سدیم 0/5 نرمال
- سولفات آمونیوم
- رزین دی اتیل آمینو اتیل سلولز

2-1-11. آنتی بادی‌ها

آنتی‌بادی بر علیه توالی Histag که به HRP متصل می‌باشد، از آن برای شناسایی آنتی‌ژن بیان شده توسط باکتری استفاده می‌شود.

آنتی بادی تجاری پلی کلونال ضد NMP22 از شرکت Abcam تهیه شد.آنتی بادی پلی کلونال تهیه شده از خرگوش های ایمن شده مورد آزمایش نیز مورد استفاده قرار گرفت.

آنتی بادی ضد IgG خرگوشی کونژوگه به HRP به عنوان آنتی بادی ثانویه نیز استفاده شد.

2-1-12. محیط کشت‌های باکتری

محیط کشت LB (pH = 7) : 10 گرم NaCl و 5 گرم Yeast extract و 10 گرم Triptone با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

محیط کشت LB-Agar : به محیط کشت LB مایع 15 گرم در لیتر آگار اضافه شد.

محیط کشت TB:12 گرم تریپتون ،24 گرم Yeast extract و 9 میلی لیتر Glycerol با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

محیط کشت2xYT: 16 گرم باکتو تریپتون ،10 گرم Yeast extract و 5 گرم Nacl با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

- محیط ذخیره سازی باکتری

روش تهیه : گلیسرول اتوکلاو شده به میزان 60٪ به محیط LB استریل اضافه می‌شود و برای هر 5/1 میلی لیتر کشت باکتری ، 0/5 میلی لیتر از این مخلوط می‌افزاییم.

استوک آمپی‌سیلین 100 mg/ml: 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل به یک گرم پودر آمپی‌سیلین اضافه شد.غلظت نهایی مورد استفاده: 100ug/ml.

2-1-13. آنزیم‌ها

آنزیم‌های به کار رفته در این پایان‌نامه عبارتند از:XhoI،EcoRI،NotI که برای بریدن قطعه سنتز شده در وکتور بیانی pGS21a و تایید آن مورد استفاده قرار گرفتند.

آنزیم تریپسین 0/25٪ نیز در بخش کشت سلولی استفاده شد.

2-1-14. ستون های کروماتوگرافی

از ستون Ni^{+2}-NTA شرکت QIAGEN و ستون DEAE Cellulose شرکت Sigma-Aldrich استفاده شد.

2-1-15. وسایل

فلاسک کشت سلولی (25ml، 75ml)، میکروتیوب (0.5 ml ، 1.5 ml)، فالکون (15 ml ، 50 ml)، پیپت مدرج (1 ml، 2 ml، 5 ml)، بشر، استوانه مدرج،پلیت الایزا (از نوع Maxisorp محصول Nunc)، کاغذ صافی، فیلتر 0.2mm مخصوص استریلیزاسیون، سر سمپلر (زرد، آبی، کریستالی)و ...

2-1-14. دستگاه‌ها

دستگاه سانتریفوژ (معمولی)،انکوباتور، فور، اتوکلاو، هود لامینار، میکروسکوپ معکـوس ، یخچـال، فریزر معمولی و 70- درجه، بیوفتـومتر، دسـتگاه الکتروفـورز، سـونیکاتور، دسـتگاهالکتروفور، شـیکر، دستگاه قرائت گر الایزا و ...

2-2. روش‌ها

2-2-1. انتخاب اپیتوپ‌ها

2-2-1-1مطالعات کتابخانه‌ای

مطالعات کتابخانه‌ای وسیعی برای پیدا کردن اپی توپ‌های غالب ایمنی و در عین حال خطی برای پروتئین NuMA1 با استفاده از منابع موجود انجام شد(57,60,63,64,66–71).

2-2-1-2. بررسی‌های بیوانفورماتیکی

2-2-1-2-1. جستجو برای توالی قطعه مورد نظر

جستجو در پایگاه اطلاعاتی www.ncbi.nlm.nih.org/gene صورت گرفت و توالی پروتئین موردنظر (Accession Number:NP_006176) دریافت شد . بر اساس مقالات دو ناحیه ایمونوژنیک غالب برای بیان انتخاب شد که معادل 300 آمینو اسید از N-ترمینال و 900 نوکلئوتید می باشد.

2-2-1-2-2. بررسی‌های ایمنوانفورماتیک

بررسی های ایمونوانفورماتیکی برای پیش بینی اپی توپ های اصلی پروتئین NMP22 نیز انجام شد. سرور online در آدرس www.immunepitope.orgبرای پیش‌بینی beta-turns , antigenicity flexibility, surface accessibilityو hydrophilicity به ترتیب تحت روش‌های Chou and Fasman، Kolaskar and Tongaonkar، Karplus and Schulz، Eminiو Parker استفاده شد.

2-2-1-2-3.پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین مربوط به آنتی‌ژن:

پیش‌بینی ساختار دوم آنتی‌ژن با استفاده از سرورهای online شامل Phyre در آدرسhttp://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyreو SOPMA در انجام شد.

2-2-1-2-4.پیش‌بینی ساختار سه بعدی آنتی‌ژن:

ساختار سه بعدی آنتی‌ژن با استفاده از روش‌های مدل کردن homology، threading و Abinitio modeling پیش‌بینی شد. تعداد زیادی از نرم‌افزارهای موجود که از هر کدام از آنها از روش‌های ذکر شده استفاده می‌کنند برای این امر استفاده شدند از جمله: Swiss-modelدر آدرس http://swissmodel.expasy.org/، LOOPP در آدرس http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx، I-TASSER در آدرس http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER، Phyreدر آدرس http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/index.cgi.

2-2-2.طراحی سازه و سنتز ژن:

قطعه انتخابی دارای دو اپی توپ بارز توسط انواع نرم‌افزارهای online و تجاری برای بیان مناسب در باکتری *E.coli* بهینه شد و در نهایت توالی بهینه شده توسط Gen-Script (NJ, USA) به علت طیف وسیعی از عوامل که برای بهینه‌سازی توالی برای بیان در نظر می‌گیرد به عنوان توالی نهایی انتخاب شد.ویژگی‌ها و پیش‌بینی‌های لازم برای قرار گرفتن ژن مورد نظر در داخل وکتور بیانی pGS21aدر نظر گرفته شد بنابراین قطعه مورد نظر برای سنتز در داخل وکتورpGS21aبا استفاده از جایگاه‌های برش EcoRI و NotIبه شرکت Genscriptسفارش داده شد.

2-2-3.بررسی‌های آزمایشگاهی

2-2-3-1. تایید وجود قطعه با روش PCR

پس از دریافت محصول مورد نظر برای اطمینان اولیه از وجود ژن مورد نظر در داخل وکتوری که فرستاده شده بود یک PCR با استفاده از پرایمرهای T7promoter و T7terminator انجام شد. شرایط واکنش به شرح زیر بود.

جدول 2-2. مقادیر مورد استفاده جهت انجام PCR

مقدار (µl)	مواد
1	Forward primer (10 pmol)
1	Reverse primer (10 pmol)
10	Mastermix
13	deionized H_2O

توالی های پرایمر های موردنظر از شرکت ژن فناوران تهیه شده بود.

جدول 2-3. چرخه دمایی PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
1 سیکل	5 دقیقه	94
30 سیکل	30 ثانیه	94
	30 ثانیه	48
	60 ثانیه	72
1 سیکل	10 دقیقه	72

2-2-3-2. انتقال پلاسمید حاوی ژن سنتتیک به میزبان *BL21* و تایید آن

باکتری *BL21* که میزبان اختصاصی وکتور برای بیان است برای انتقال وکتور به آن انتخاب شد. بدین منظور ابتدا باکتری *BL21* مستعد شده، برای واکنش شیمیایی تهیه شد و سپس طی واکنش شیمیایی پلاسمید به آن ترنسفورم شد.

2-2-3-4.تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش شیمیایی

1- یک تک کلون از باکتری BL21 در 10 میلی‌لیتر محیط LB به مدت 12 ساعت در 37° C به همراه شیک کردن کشت داده شد.

2- 0/5ml از کشت شبانه فوق به 50 ml محیط مایع LB اضافه شده و به مدت 3 الی 4 ساعت (تا زمانی که شدت جذب در OD 600نانومتر به 0/5 برسد) در شیکر انکوباتور 37° C کشت داده شد.

3- کشت باکتری به یک فالکون 50 میلی‌لیتری منتقل شد و در دمای4° C و دور 3500rpm به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد.

4- رسوب حاصل در 50 میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) حل شده و 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد.

5- سانتریفیوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

6- رسوب حاصل در 25 میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) حل شده و 10 دقیقه روی یخ قرار داده شد.

7- سانتریفیوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

8- به رسوب حاصل 12 میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) اضافه شده و سانتریفیوژ انجام شد.

9- رسوب حاصل در 600 میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) حل شده و در حجم‌های 100 میکرولیتری تقسیم شده و از یکی از آنها در همان روز استفاده شد.

به مابقی گلیسرول اضافه و در فریزر 70- ذخیره شدند. برای اطمینان از عدم آلودگی میکروبی باکتری پذیرای (مستعد) تهیه شده 50 µl از آن را روی پلیتهای جامد بدون آنتی بیوتیک و دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده و یک شب در انکوباتور ۳۷°C بطور ساکن قرار دادیم. باکتری BL21 تنها باید روی پلیت بدون آنتی بیوتیک رشدکند چون ژن مقاومت به هیچ یک ازآنتی بیوتیکها را ندارد. با مشاهده هرگونه آلودگی در پلیتهای فوق، باید میکروتیوبهای حاوی سلولهای پذیرا دور ریخته و معدوم شوند.

2-2-3-5.تخلیص پلاسمید

برای تخلیص پلاسمید از کیت شرکت MN استفاده شد. این سیستم بر اساس لیز قلیایی باکتری و اتصال پلاسمید به غشاء سیلیکاژل استوار است. دستور العمل تخلیص پلاسمید در زیر آورده شده است:

1- کشت شبانه باکتری به حجم 5 ml در یک فالکون 50 میلی‌لیتری بمدت 15 دقیقه در rpm 4000 سانتریفوژ شد.

2- پس از خارج نمودن محیط کشت بصورت کامل، رسوب باکتریها در 250 μl محلول resuspension حل شده و به یک میکروتیوب منتقل شد.

3- 250μl محلول لیزکننده به میکروتیوب اضافه شده و 6-4 بار به آرامی بر گردانده شد تا بخوبی مخلوط شود.

4- میکروتیوب به مدت حداکثر 5 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.

5- 350 μl محلول خنثی کننده به میکروتیوب افزوده شده و 10-6 بار به آرامی بر گردانده شده تا به خوبی مخلوط شود.

6- در 4000 rpm و دمای 4°C بمدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به آرامی به یک ستون تخلیص پلاسمید منتقل شده سپس در 13000 rpm بمدت 60 ثانیه سانتویفوژ شده و مایع خارج شده دور ریخته شد.

7- به ستون 700 μl الکل 70٪ اضافه شده مانند مرحله قبل سانتریفوژ انجام شد.

8- ستون بمدت 1 دقیقه جهت خارج شدن کامل الکل سانتریفوژ شد.

9- مقدار 50 μl بافر elutionیا آب مقطر دو بار تقطیر به ستون اضافه شده و بمدت 1 دقیقه در 13000 rpm سانتریفوژ شد ، پلاسمید تخلیص شده در مایع خارج شده قرار دارد.

2-2-3-6. ارزیابی کمی میزان پلاسمیدها

میزان کمی پلاسمید استخراج شده با قرائت جذب نوری (OD) آن در 260nm و محاسبه ضریب رقت و ضریب ثابت 50 برای DNA دو رشته‌ای در بیوفوتومتر مشخص گردید.

2-2-3-7.الکتروفورز پلاسمید تخلیص شده بر ژل آگارز

پس از اتمام مراحل تخلیص یک میکرولیتر از پلاسمید حاصل روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز شد.

2-2-3-8. انتقال پلاسمید حاوی ژن به باکتری با روش شیمیایی با هدف تکثیر پلاسمید

1-ابتدا باکتری مستعد روی یخ قرار داده شد تا کاملاً ذوب گردد.

2- 5ul از محلول حاوی پلاسمید به باکتری اضافه شد و با تکان‌های آرام مخلوط شد.

3-باکتری‌ها به مدت 30 دقیقه روی یخ قرار داده شدند.

4-به باکتری‌ها به مدت 45 ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله به یخ منتقل شدند.

5-پس از دو دقیقه 900 میلی‌لیتر محیط مایع LB به آنها اضافه شده و به مدت یک ساعت در 37°C به همراه شیک کردن کشت داده شد.

6-سپس 200 میکرولیتر از محیط حاوی باکتری‌ها را روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک (آمپی سیلین) به مدت 14 ساعت کشت داده می‌شوند. پس از گذشت این زمان باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید (حاوی ژن) روی محیط تشکیل کلونی خواهند داد.

2-2-3-9. تایید کلنی‌های ترنسفورم شده برای داشتن ژن مورد نظر

برای تایید درست انجام شدن فرآیند ترانسفورماسیون، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که برای وکتورطراحی شده بودند واکنش colony PCR انجام شد که با استفاده از این پرایمرها قطعه‌ای با طول 1880 جفت باز تکثیر خواهد شد و در صورت خطا در ترانسفورماسیون این محصول را تولید نخواهد کرد.

جدول 2-4.مقادیر مورد استفاده جهت انجام Colony PCR

مقدار (µl)	مواد
1	Forward primer (10 pmol)
1	Reverse primer (10 pmol)
10	Mastermix
13	di H_2o

جدول 2-5. چرخه دمایی Colony PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)

1 سیکل	5 دقیقه	94
30 سیکل	30 ثانیه	94
	30 ثانیه	62
	60 ثانیه	72
1 سیکل	10 دقیقه	72

2-2-3-10.بیان ژن سنتتیک و مشاهده آن در ژل SDS

برای انجام بیان ژن مورد نظر در میزبان *BL21* بدین صورت عمل شد:

1. ابتدا از کلون شماره 1، یک تک کلون حاوی وکتور و ژن مورد نظر برداشته در 5 میلی‌لیتر از محیط LB حاوی آمپی سیلین به مدت 8 ساعت و در دمای 30 درجه همراه با شیک کشت شد. در شرایط مشابه باکتری بدون وکتور نیز کشت شد.
2. سپس مقدار 100 میکرولیتر از هرکدام از کلونی‌ها کشت داده شده در مرحله‌ی قبل در دو ظرف حاوی محیط کشت LB و آمپی سیلین در شرایط مشابه کشت شد. در ظرف دیگر نیز باکتری *BL21* فاقد وکتور به عنوان کنترل کشت شد.
3. کشت مورد نظر تا رسیدن به OD حدود 0/6ادامه یافت.
4. پس از رسیدن به OD مورد نظر به یکی از دو کشت مربوطه مقدار 50 میکرولیتر از IPTG با غلظت 100 میلی‌مولار اضافه شد تا به غلظت نهایی 1 میلی‌مولار، برای IPTG برسد. سپس به کشت دادن با شرایط مشابه برای مدت 5 ساعت ادامه داده شد.

2-2-3-11.آماده‌سازی نمونه

1. پس از اتمام 5 ساعت ظروف حاوی کشت‌ها، در داخل ظرف یخ قرار داده شد و درون یخ مقدار 1 میلی‌لیتر از هر کشت به داخل میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری منتقل شد. سپس در دمای چهار درجه سانتریفیوژی با دور 3500rpm و به مدت 5 دقیقه انجام شد.
2. محیط رویی خارج شده و رسوب باکتری در حجم مساوی از بافر فسفات سالین (pH=7.4) مجددا حل شده و در دمای صفر درجه سانتریفیوژی با دور 3500 rpm و به مدت 5 دقیقه انجام شد.
3. رسوب بدست آمده در بافر لیز حل شده و تحت سونیکاسیون قرار گرفت.

4. پس از انجام سونیکاسیون در سه مرحله 30 ثانیه ای و با فاصله زمانی 2 دقیقه صورت گرفت.
محلول بدست آمده مجددا با شرایط ذکر شده قبلی سانتریفیوژ شده و محلول رویی که حاوی پروتئین های محلول می باشد جدا گردید.
5.برای سنجش مقادیر پروتئین از روش برادفورد استفاده شد.
6.مقدار 20 میکرولیتر از نمونه ها برداشته و در بافر نمونه 5X به میزان 5 دقیقه جوشانده شد.

2-2-3-12.به دست آوردن زمان و غلظت بهینه القا کننده بیان:

2-2-3-12-1.برای بدست آوردن غلظت بهینه القا کننده برای بیان:

ابتدا باکتری حامل پلاسمید به صورت شبانه کشت داده شد و میزان 100 میکرولیتر از آن به سه فالکون حاوی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین اضافه شد و مشابه شرایط قبلی کشت داده شد.پس از اینکه OD حدود 0/6 بدست آمد IPTG با غلظت نهایی 0/5، 1، 5/ 1و 2 میلی مولار به محیط ها افزوده شد و به مدت 5 ساعت در دمای 30 درجه کشت داده شد.رسوب باکتری جهت تخلیص پروتئین استفاده شد.

2-2-3-12-2.برای بدست آوردن زمان بهینه :

ابتدا باکتری حامل پلاسمید به صورت شبانه کشت داده شد و میزان 1 میلی لیتر از آن به یک ارلن حاوی100 میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین اضافه شد و مشابه شرایط قبلی کشت داده شد.پس از اینکه OD حدود 0/6 بدست آمد IPTG با غلظت نهایی 1 میلی مولار افزوده شد.و در زمان های 2،4،8 و 24 ساعت پس از القا ، مقادیر مساوی از محیط برداشته،سانتریفیوژ کرده واز رسوب حاصله جهت تخلیص پروتئین استفاده شد.

2-2-3-12-3.برای بدست آوردن دمای بهینه:

ابتدا از باکتری حامل پلاسمید به صورت شبانه کشت داده شد و میزان2/5 میلی لیتر از آن را به یک ارلن حاوی 50 میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین اضافه شد و پس از رسیدن به OD حدود 0/6 IPTG با غلظت نهایی 1 میلی مولار افزوده شد و به اندازه 10 میلی لیتر به 3 فالکون مختلف انتقال داده

شد و هر کدام از آنها در دماهای 23 ، 30 و 37 درجه سانتیگراد به مدت 4 ساعت قرار داده شد.سپس آنها را سانتریفیوژ کرده و از رسوب حاصله جهت تخلیص پروتئین استفاده شد.

2-2-3-13.تهیه ژل‌های SDS-PAGE

برای تهیه ژل تفکیک کننده 12/5٪ مطابق جدول 2-6 عمل شد.

جدول2-6. مواد لازم جهت تهیه ژل تفکیک کننده برای SDS-PAGE

	بافر ژل پایین	محلول اکریل آمید	آب مقطر	محلول TEMED 10٪	محلول آمونیوم پرسولفات 10٪
ژل12/5٪	3	4/9	4/1	0/05	0/05

جدول2-7. مواد لازم جهت تهیه ژل متراکم کننده برای SDS-PAGE

	بافر ژل بالا	محلول اکریل آمید	آب مقطر	محلول TEMED 10٪	محلول آمونیوم پرسولفات 10٪
ژل 4٪	1/25	0/65	3/05	0/05	0/01

2-2-3-14.رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو

1. ژل پس از شست و شو با آب مقطر به مدت 0/5 ساعت در محلول رنگ آمیزی قرار داده شد.
2. محلول رنگ آمیزی تخلیه شده و پس از شست و شو با آب مقطر محلول رنگ بر اضافه شد. محلول رنگ بر چند بار تعویض شد تا زمانی که زمینه ژل کاملاً شفاف شد.

2-2-3-15.تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA

1. ابتدا ستون را تکان داده تا محتویات آن کاملا حل شود.سپس درب ستون را نیمه باز کرده و به مدت 30 ثانیه در 100 g سانتریفیوژ می کنیم.
2. 600 میکرو لیتر از بافر اتصال را به ستون افزوده و مجددا 30 ثانیه سانتریفیوژ می کنیم.
3. 600 میکرولیتر از لیزات باکتریایی را به ستون افزوده و با دور 100g به مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ می کنیم.
4. حجم 600 میکرولیتر از بافر شستشو را به ستون افزوده و مجددا سانتریفیوژ می کنیم.
5. در این مرحله 200میکرولیتر از elution buffer را به ستون می افزاییم و پس از سانتریفیوژ ،محلول رد شده را جمع آوری می کنیم که حاوی پروتئین دارای His tag می باشد.

2-2-3-16. شارژ کردن مجدد ستون نیکل

1. ستون را با 2 حجم از بافر گوانیدیوم کلراید شستشو می دهیم.
2. ستون را با 5 حجم آب مقطر شستشو می دهیم.
3. به ترتیب با یک حجم از اتانول 25٪ ، 50٪ ، 75٪ ، 100٪ ، 75٪ ، 50٪ ،25٪ شستشو می دهیم.
4. ستون را با یک حجم آب مقطر شستشو می دهیم.
5. سپس ستون را با 5 حجم EDTA 100 میلی مولار می شوییم.
6. ستون را با 1 حجم آب مقطر می شوییم.
7. ستون را با 2 حجم نیکل سولفات شستشو می دهیم.
8. در آخرین مرحله ستون را با 2 حجم آب مقطر شستشو می دهیم.

2-2-3-17.وسترن بلات برای بیان انجام شده

1. برای انجام وسترن بلات ابتدا طبق روند قبلی ژل SDS ران می‌شود ولی این بار رنگ‌آمیزی صورت نمی‌گیرد تا در ادامه مراحل وسترن بلات انجام گردد.پروتئین‌ها بر روی ژل SDS-PAGE تفکیک شدند.
2. پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل در شدت جریان 0/5 آمپر به مدت 1/5 ساعت به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد.
3. کاغذ نیتروسلولز در محلول بلاکر به مدت 16 ساعت قرار داده شد.
4. یک بار شست و شو با TBST انجام شد.
5. کاغذ در محلول آنتی‌بادی antiHis-tag در بافر EIA به مدت 1/5 ساعت همراه با تکان قرار داده شد.
6. دو بار شست و شو با TBST و یک بار با PBS انجام شد.
7. کاغذ در محلول سوبسترای TMB قرار داده شد تا زمانی که باندها ظاهر شدند.واکنش با اضافه کردن آب مقطر متوقف شد.

2-2-3-18.الایزای پروتئین

1. پروتئین مورد نظر به بافربی کربنات (pH=9.6) اضافه شده و به هر چاهک الایزا 100 میکرولیتر اضافه شد. پلیت یک شب در 4°C نگهداری شد.
2. محتویات پلیت خالی شده و 3 تا 5 بار شست و شو با PBS یا PBST انجام شد.باقی مانده محتویات چاهک ها با کوباندن بر روی حوله تمیز خالی شد .(Tapping)
3. بافر بلاک کننده به چاهک ها اضافه شد به طوری که چاهک ها کاملا پر شدند.
4. مراحل 2 و 3 تکرار شد.
5. آنتی بادی اولیه با غلظت مورد نظر به مقدار 100 میکرولیتر به صورت دوتایی (Duplicate) اضافه شد.
6. پلیت به مدت 1/5 ساعت در 37°C به آرامی شیک شد.
7. مراحل 2 و 3 تکرار شد.
8. آنتی بادی ثانویه بارقت مورد نظر به میزان 100 میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد.
9. پلیت به مدت 45 دقیقه در 37°C به آرامی شیک شد.
10. مراحل 2 و 3 تکرار شد.

11. سوبسترای TMB به مقدار 100 میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت در 37°C نگهداری شد تا واکنش رنگی به میزان مناسب پیش رود.

12. واکنش با اضافه کردن 100 میکرولیتر از HCl 2 نرمال به هر چاهک متوقف شد.

جذب نوری در 450nm قرائت شد.

2-2-3-19. ایمن کردن خرگوش ها با استفاده از آنتی ژن نوترکیب خالص شده

دو عدد خرگوش از موسسه رازی تهیه شده و به هر یک در 4 نوبت با فاصله دو هفته از آنتی ژن تخلیص شده محلول تزریق شد. مقدار آنتی ژن در تزریق اول 500 میکروگرم و در تزریق های بعدی 250 میکروگرم بود. در تزریق اول از ادجوانت کامل فروند استفاده شد، در تزریق دوم و سوم از ادجونت ناقص فروند استفاده شده و تزریق آخر بدون ادجوانت انجام شد. تزریق اول به صورت زیرپوستی و در ناحیه پشت، نزدیک گردن در چند نقطه انجام شد. آخرین تزریق به صورت ماهیچه ای در ناحیه ران انجام شد. خون گیری در روز قبل از تزریق و یک هفته پسازآخرین تزریق انجام شد. لوله های حاوی خون حیوانات در دمای 37°C به مدت یک ساعت نگهداری شده و سپس با سانتریفوژ دور 4000 به مدت 20 دقیقه سرم جدا شد.

2-2-3-20. تخلیص آنتی بادی پلی کلونال تولید شده بر علیه آنتی ژن نوترکیب

2-2-3-20-1. آماده سازی رزین مبادله کننده آنیون دی اتیل آمینو اتیل سلولز

1 گرم از DEAE سلولز را در یک بشر 250 میلی لیتری ریخته و حدود 100 میلی لیتر آب مقطر به آن افزودیم.آن را به آرامی هم زده و سپس مدتی بی حرکت قرار دادیم تا اینکه ذرات درشت تر ته نشین شده ولی ذرات ریز به صورت معلق باقی ماندند.این ذرات را به دکانته کردن همراه با آب مقطر خارج نمودیم.این کار آنقدر تکرار شد تا اینکه محلول رویی صاف و شفاف ماند و سپس حدود سه برابر حجم ژل به آن 0/5 Hcl نرمال افزوده و برای نیم ساعت آن را به آرامی به هم زدیم و به دنبال آن، آنرا بر روی کاغذ صافی معمولی ریخته و آنقدر با آب مقطر شستشو دادیم تا pH محلول زیر صافی کاملا خنثی شد.

در مرحله بعد ژل را از روی کاغذ صافی به بشر انتقال داده و حدود سه برابر حجم ژل به آن محلول 0/5 NaoH نرمال افزوده و مثل مراحل Hcl عمل شد.ژل روی صافی را در بافر فسفات

17/5 میلی مولار و pH = 6/3 غوطه ور نموده و پس از هم زدن ملایم به مدت نیم ساعت ، آن را بی حرکت قرار دادیم تا ژل ته نشین شود.سپس بافر رویی را تعویض کرده و این عمل را تکرار کردیم تا جایی که pH محلول رویی برابر 6/3 شود.در این حالت ژل آماده استفاده است.

2-2-3-20-2.مراحل تخلیص

1.جداسازی پروتئین ها از سرم

به این منظور از نمک سولفات آمونیوم 33٪ استفاده شد.به ازای هر میلی لیتر سرم 33٪ گرم سولفات آمونیوم وزن کرده و به صورت پودر بسیار نرم در آوردیم.سپس آن را آرام آرام به سرم مورد نظر که بر روی همزن مغناطیسی در حال به هم خوردن بود افزودیم.بعد از آن به منظور کامل شدن عمل رسوب گذاری پروتئین ها ، هم زدن ملایم نمونه به مدت نیم ساعت ادامه یافت.

برای جدا کردن رسوب از محلول رویی آن را در دمای 25 درجه سانتیگراد و سرعت 3000 دور در دقیقه به مدت 30 دقیقه سانتریفوژ کردیم محلول رویی را بیرون ریخته و رسوب را در حداقل مقدار بافر فسفات مذکور حل نمودیم .سپس این محلول را به کیسه دیالیز با اندازه منافذ 12 کیلودالتون انتقال داده و در برابر همین بافر فسفات به مدت 24 ساعت با سه بار تعویض دیالیز کردیم.

2. جداسازی گاماگلوبولین ها از سایر پروتئین ها با استفاده از رزین مبادله کننده یونی:

ابتدا میزان پروتئین محلول دیالیز شده به روش براد فورد اندازه گیری شد.و با توجه به اینکه به ازای هر 75 میلی گرم پروتئین 2 میلی لیتر ژل لازم بود، میزان مورد نیاز ژل را در یک فالکون 15 میلی لیتری قرار داده و کروماتوگرافی به صورت Batch در آن انجام شد. بدین ترتیب که پروتئین دیالیز شده را بر روی ژل قرار داده و چندین مرتبه فالکون را تکان داده و نیم ساعت آنرا بی حرکت گذاشتیم. پس ازته نشین شدن ژل فاز بالایی را که حاوی گاماگلوبولین ها بود را جدا کردیم.

پس از تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد، نمونه تخلیص شده بر روی ژل SDS-PAGE آنالیز شد.

2-2-3-21.تعیین تیتر IgG تخلیص شده بر علیه آنتی ژن نو ترکیب

1. از پروتئین نوترکیب t-NuMA تخلیص شده با مقادیر 0/25، 0/5 ، 1 و 2 میکرو گرم در هر چاهک به عنوان آنتی ژن استفاده شد.
2. مقدار 100 میکرولیتر از سرم حیوانات با غلظت 0/25، 0/5 ، 0/75، 1 ، 1/5 و 2 میکروگرم در هر چاهک به عنوان آنتی بادی اولیه استفاده شد و به چاهک های متناظر افزوده شد.از سرم حیوانات قبل از تزریق، نمونه گیری شده و به عنوان سرم نرمال با همان مقادیر استفاده شد.با احتساب اینکه ایمونوگلوبولین ها 15٪ از پروتئین های سرم را به خود اختصاص می دهند.
3. از پروتکل ذکر شده در 2-2-3-18 استفاده شد.

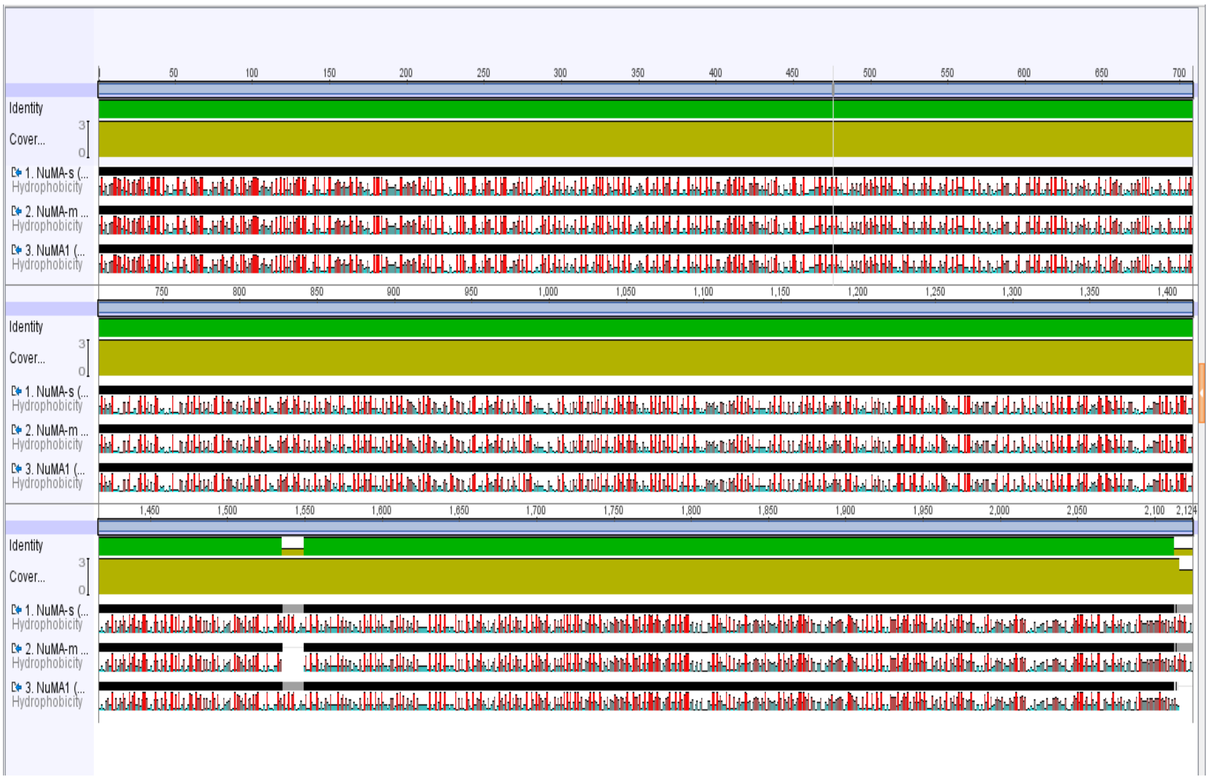
فصل سوم

نتایج و یافته‌ها

3-1. بررسی‌های In silico

3-1-1. بررسی توالی نوکلئوتیدی

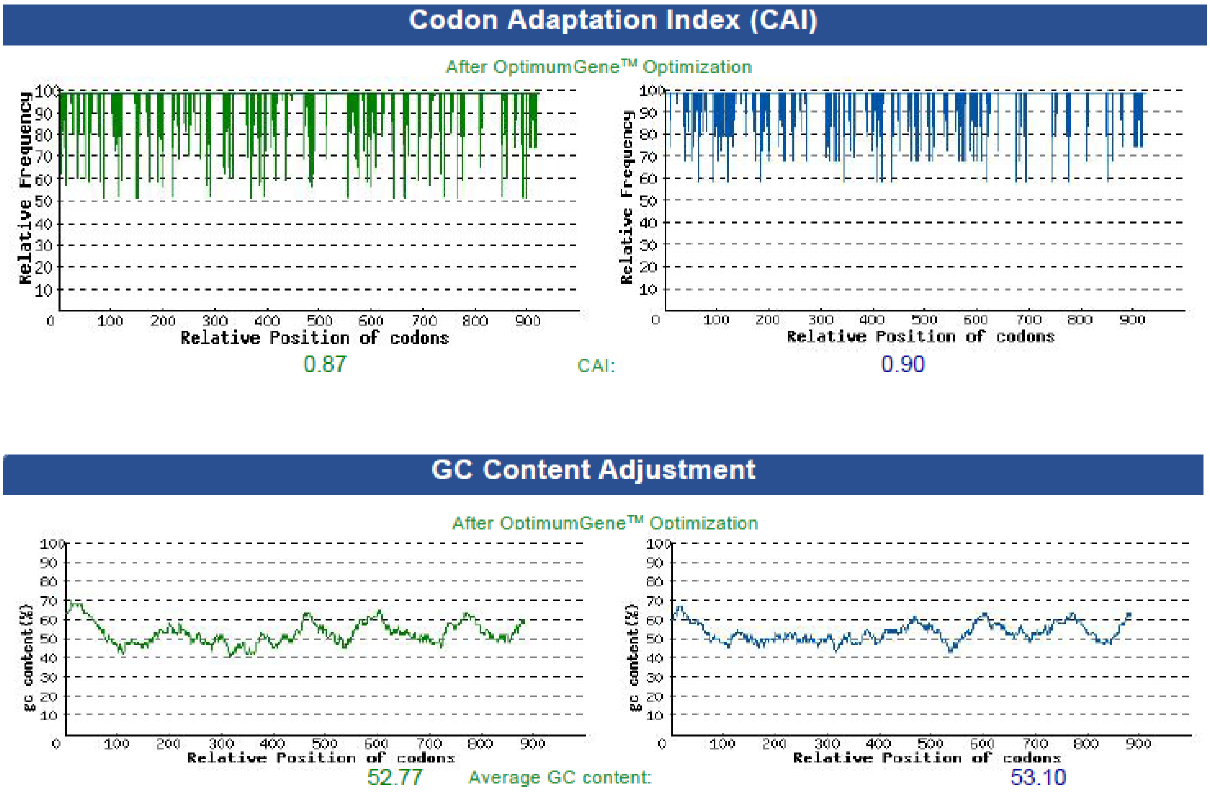
توالی نوکلئوتیدیNuMaدارای 3 ایزوفرم مختلف است به نام های NuMA-m, NuMA-s وNuMA1 که طول آنها 2110، 2124 و 2115 آمینواسید است. برای سنتز توالی مورد نظر با استفاده از نرم افزار Geneious 4.8.5 توالی مشترک این ایزوفرم ها بدست آمد. این ایزوفرم ها 99/2٪ با هم مشابهت داشته و تنها تفاوتشان در آمینو اسید های ناحیه C-terminal بود. از این رو می توان از نواحی مشترک ،300 آمینواسید ابتدایی را انتخاب کرد.بدین ترتیب آنتی بادی نهایی تهیه شده می تواند هر 3 ایزوفرم موجود در ادرار را شناسایی کند.



شکل3-1. بررسی های انجام شده با نرم افزار Geneious تطابق 99/2٪ سه ایزوفرم NuMA1,NuMA-s,NuMA-a را نشان می دهد.تفاوت صرفا در ناحیه پایانه کربوکسیل دیده میشود .

ژن سنتتیک کد کننده آنتی ژن مناسب تشخیص،با توجه بـه تـرجیح کـدونی بـاکتری E.coli سـویه BL21 عوامل متعددی در راستای بیان مناسب پروکاریوتی بهبود یافت.

شاخص Codon Adaptation Index (CAI) کـه نشـان دهنـده میـزان بهبـود اسـتفاده از کـدون‌هـای ترجیحی برای سیستم پروکاریوت می‌باشد،از 0/90 به 0/87 کاهش یافت.محتوای GC٪ بـه 52/77٪ رسید و درصد پراکنش کدون‌ها، به نفع کدون‌های دارای بیشترین بسامد استفاده، افزایش یافت. شکل ؟ تغییرات صورت گرفته در جهت بهترین بیان را نشان می دهد.

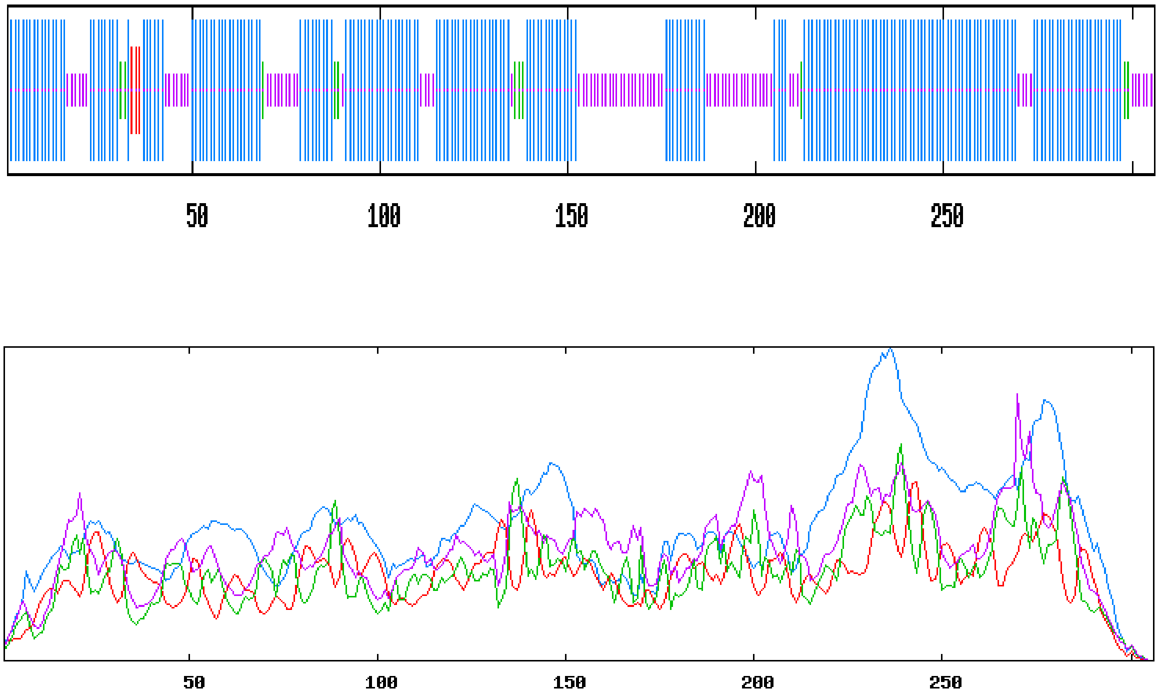


شکل 3-2. تغییرات لازم انجام شده در جهت بهینه‌سازی توالی اولیه برای بیان در سیستم *E.coli*

3-1-2.پیش‌بینی‌های ساختارهای پروتئینی

بررسی که در ساختارهای دوم احتمالی آنتی‌ژن صورت گرفت نشان داد که این آنتی‌ژن بیشتر دارای ساختارهای alpha helix، random coil و beta turn و به مقدار کمتری extended strandمی باشد.

در بررسی کلی بیش از 68٪ ساختار دوم مربوط به alpha helix، 26٪ مربوط به random coil وکمتراز 1٪مربوط به extended strand می باشد.



شکل3-3. ساختارهای دوم پیش‌بینی شده برای آنتی‌ژن تشخیصی با استفاده از پایگاه اطلاعاتی SOPMA

شکل3-4.ساختار سوم پیش بینی شده توسط نرم افزار I-TASSER

3-1-3.بررسی در توالی اولیه آنتی ژن بدست آمده در پایگاه اطلاعاتی

http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam نشان دهنده ی مقدار pI پیش بینی شده ی 5/26 و مقدار وزن مولکولی 37 کیلودالتون می باشد.پس از بیان در وکتور و میزبان بیانی، پروتئین فیوزن GST نیز به آن اضافه شده و انتظار می رود که پروتئین 63 کیلو دالتونی در ژل SDS-PAGE مشاهده شود ، نیمه عمر این پروتئین در میزبان باکتریایی بیش از 10 ساعت بوده و پایگاه اطلاعاتی http://biotech.ou.edu/ میزان حلالیت این پروتئین را پس از بیان در E.coli ، 78/4% پیش بینی می کند که 21/6٪ آن وارد فاز نامحلول می شود.

3-2.بررسی‌های آزمایشگاهی

3-2-1. سنتز ژن

پس از انجام بررسی‌های مورد نیاز در محیط مجازی و با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف، توالی نهایی ژن مربوط به آنتی‌ژن مشخص گشت و برای سنتز شدن سفارش شد.

در این ژن توالی دومین های مربوطه همراه با سه جایگاه NotI،XhoIوEcoRI قرار داده شده است تا درصورت نیاز قطعه مورد نظر در وکتورهای دیگر سابکلون شود.

GAATTC

ATGACGCTGCACGCTACCCGTGGTGCCGCCCTGCTGTCCTGGGTGAACTCCCTGCATGTCGCCGATCCGGTGGAA

GCCGTCCTGCAACTGCAGGATTGCAGCATCTTCATCAAGATCATCGACCGTATTCATGGCACCGAAGAAGGTCAA

CAAATCCTGAAACAGCCGGTTTCAGAACGTCTGGATTTTGTCTGCTCGTTCCTGCAGAAAAACCGCAAGCACCCG

AGCTCTCCGGAATGTCTGGTTAGCGCACAGAAAGTTCTGGAAGGCTCTGAACTGGAACTGGCTAAGATGACCATG

CTGCTGCTGTATCATAGTACGATGAGTTCCAAATCCCCGCGCGATTGGGAACAGTTTGAATACAAAATTCAAGCA

GAACTGGCTGTCATCCTGAAGTTCGTGCTGGATCACGAAGACGGTCTGAACCTGAATGAAGACCTGGAAAATTTT

CTGCAGAAAGCGCCGGTGCCGTCTACCTGTTCATCGACGTTCCCGGAAGAACTGAGCCCGCCGTCTCATCAGGCG

AAACGTGAAATTCGCTTTCTGGAACTGCAAAAGGTTGCCAGCTCTAGTTCCGGCAACAATTTCCTGTCAGGTTCG

CCGGCCAGTCCGATGGGCGATATCCTGCAGACCCCGCAGTTCCAAATGCGTCGCCTGAAAAAGCAACTGGCAGAT

GAACGTAGCAACCGCGACGAACTGGAACTGGAACTGGCTGAAAATCGTAAACTGCTGACGGAAAAGGATGCGCAG

ATTGCCATGATGCAGCAACGTATCGACCGCCTGGCGCTGCTGAACGAAAAACAGGCGGCCAGTCCGCTGGAACCG

AAAGAACTGGAAGAACTGCGCGATAAGAATGAATCCCTGACCATGCGTCTGCACGAAACCCTGAAGCAATGCCAA

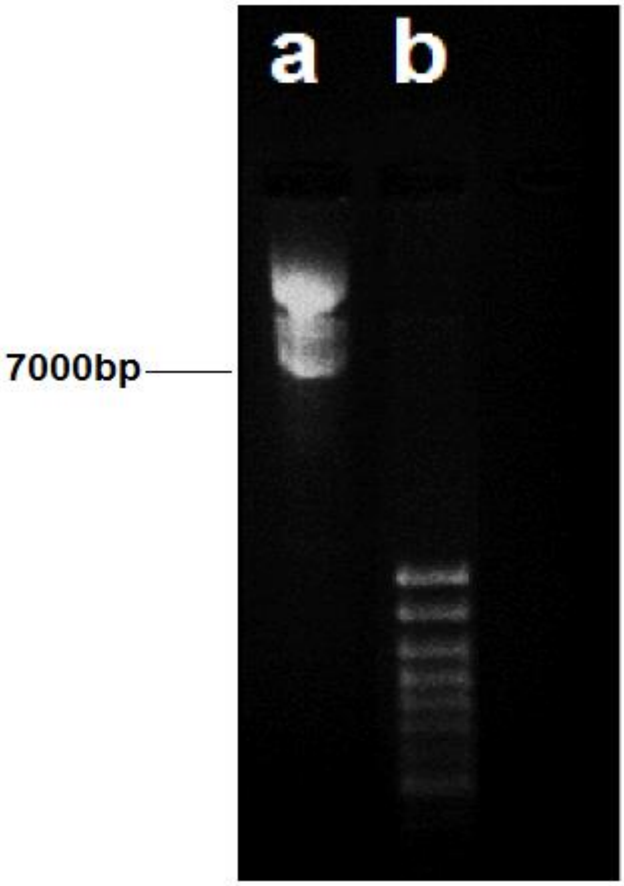
CATCACCACCACCACCACTAA

GCGGCCGCCTCGAG

شکل3-5.توالی نهایی ژن برای سنتز شدن که دارای جایگاه های برش آنزیم های محدودکننده EcoRI و NotI می باشد.

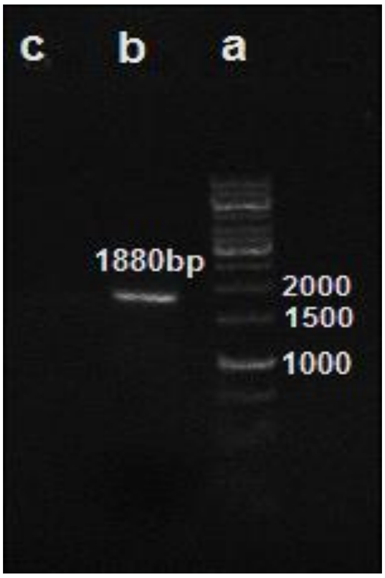
3-2-2. تخلیص پلاسمید

توالی ژن در داخل وکتور بیانی pGS21a سنتز شد و به صورت پودر حاوی 4-2میکروگـرم از ژن به آزمایشگاه فرستاده شد. برای اثبات اولیه اینکـه تـوالی مـورد نظـر مـا در داخـل وکتـور قـرار دارد ،پلاسمید با استفاده از کیت استخراج شد و کیفیت آن روی ژل آگارز بررسی شد.



شکل3-6. تخلیص پلاسمید a.پلاسمیدpGS21a تخلیص شده از سویه Top10b.مارکر استاندارد DNA

جهت تایید وجود قطعه در وکتور ، با استفاده از پرایمرهای وکتـور PCR صـورت گرفـت، کـه وجود ژن را با بدست آمدن یک باند حدود 1880 جفت بازی اثبات کرد .



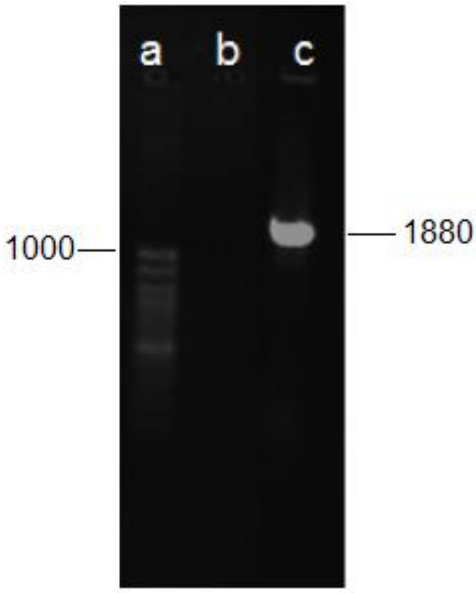
شکل3-7. واکنش PCR برای اطمینان از وجود قطعه در محصول فرستاده شده از شرکت. a .مارکر بر حسب جفت باز b. محصول PCR.c کنترل منفی

3-2-3. انتقال پلاسمید حاوی ژن سنتتیک به میزبان *BL21* و تایید آن

وکتور حاوی ژن برای اینکه بیان شود باید وارد میزبان اختصاصی بیان خود شود بدین منظور فرآیند انتقال ژن به باکتری *E.coli* سویه‌ی *BL21-DE3*صورت گرفت. ابتدا سلول‌های مستعد با استفاده از کلسیم کلراید تهیه شد. کشت سلول‌های حاصل در پلیت‌های چند آنتی‌بیوتیک هیچ رشدی را نشان نداد که این امر بیان‌گر عدم آلودگی سلول‌های مستعد با سایر باکتری‌ها یا آلودگی‌های دیگر می‌باشد.

پس از تهیه شدن سلول مستعد فرآیند انتقال پلاسمید حاوی ژن سنتتیک انجام شد که در نهایت با کشت سلول‌هایحاصل درپلیت حاوی آمپی سیلین کلنی های مورد نظر مشاهده شد. که بیان‌گر انتقال وکتور به سلول‌های مستعد شده و در عین حال عدم آلودگی سلول‌ها می‌باشد.

3-2-4.تایید کلنی های ترانسفرم شده به روش Colony PCR

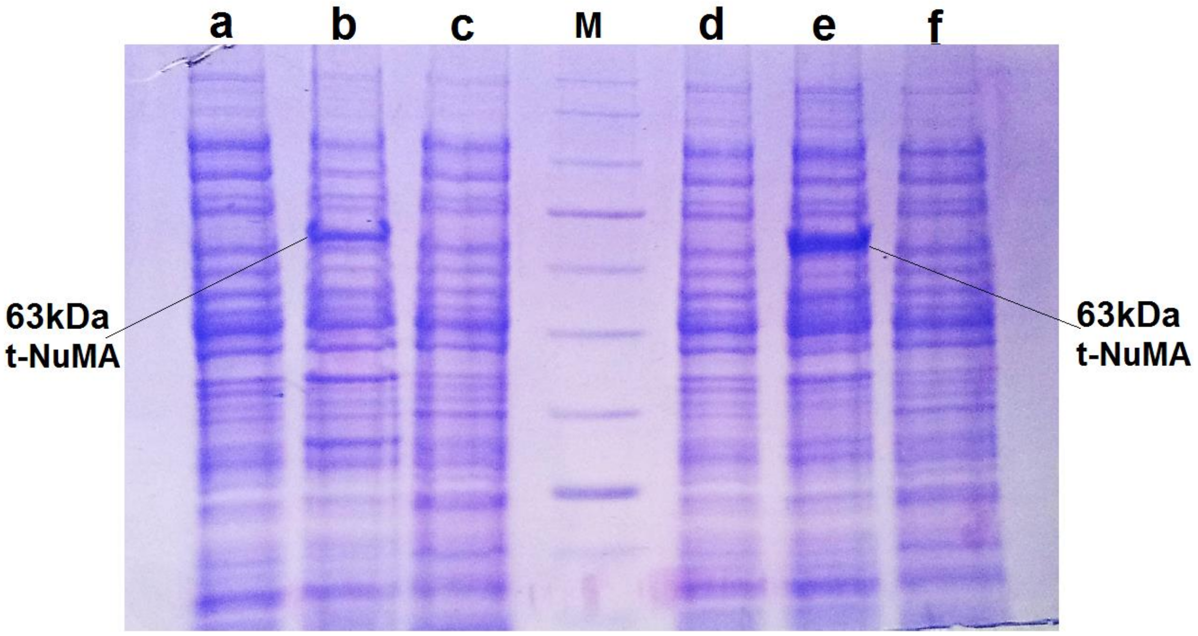


شکل3-8. colony PCR

a.مارکر بر حسب جفت باز b.کنترل منفی c.کلنی شماره 1

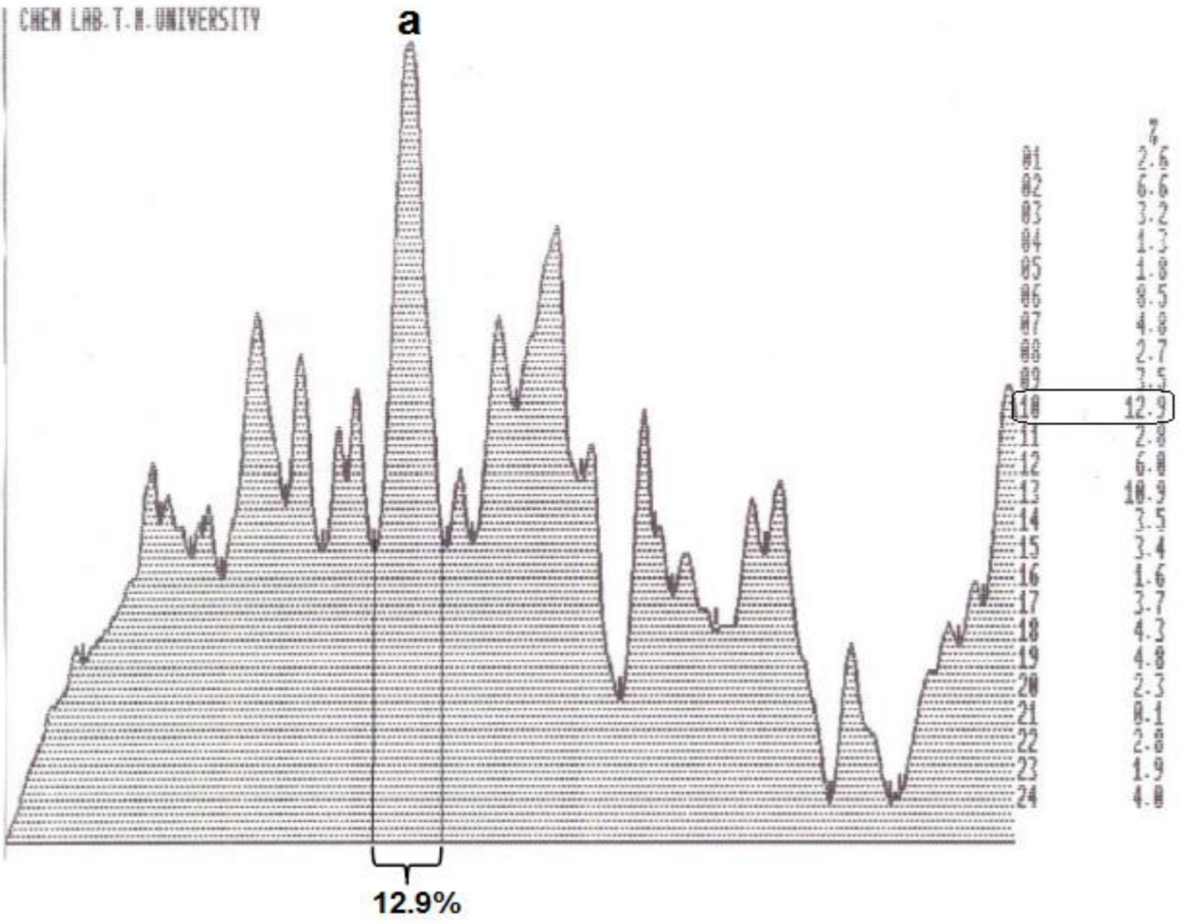
3-2-5. بیان ژن در وکتور pGS21a

بیان ژن در شرایط ذکر شده انجام شد پس از آماده‌سازی نمونه ،همسان سازی غلظت به میزان 5 میکروگرم پروتئین در هر چاهک و بردن رویژل SDS-PAGE باند 63 کیلودالتونی مشاهده شد.این در حالی بود که در نمونه باکتری فاقد پلاسمید و هم چنین باکتری حامل پلاسمید القا نشده،باند مورد نظر مشاهده نشد.

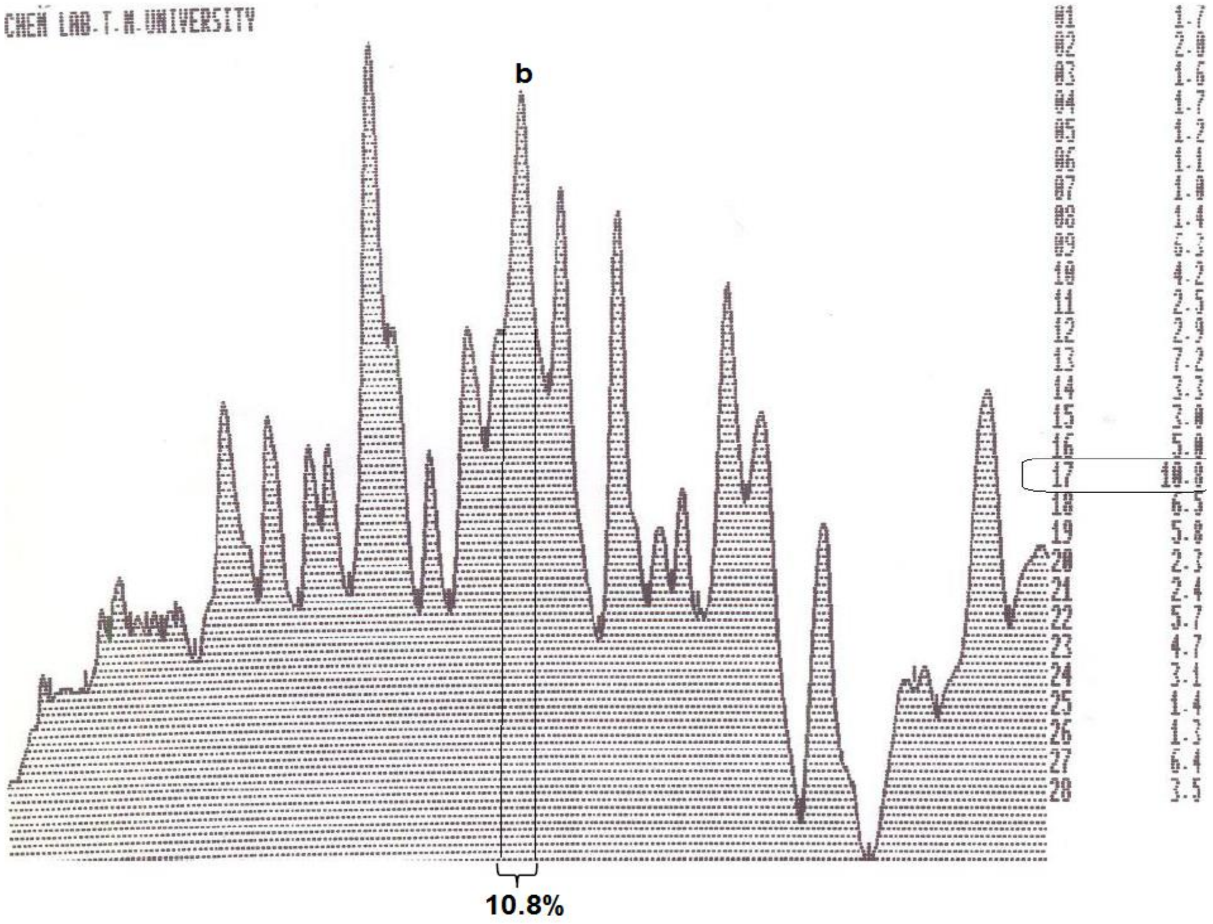


شکل3-9 .ژل SDS حاصل از بیان ژن در وکتور a.pGS21a.باکتری القا نشده حاوی وکتور b. رسوب باکتری القا شده حاوی وکتور بیانی c. باکتری BL21 فاقد وکتور M..مارکر پروتئینی استاندارد بر حسب کیلو دالتون d. باکتری القا نشده حاوی وکتور e. سوپرناتانت باکتری القا شده حاوی وکتور بیانی f. باکتری BL21 فاقد وکتور

جهت بررسی اینکه پروتئین بیان شده در سویه مورد نظر ، چه درصدی از پروتئین های میزبان را در دو فاز محلول و نا محلول به خود اختصاص می دهد از دستگاه دانسیتومتر- اسکنر Helena 24 process استفاده شد. بدین منظور ژل SDS-PAGE بیان ، در دستگاه قرار داده شد و نمودار غلظت و دانسیته پروتئین های موجود در نمونه سوپر ناتانت لیزات باکتری القا شده، رسوب باکتری القا شده ، پروتئین های باکتری فاقد پلاسمید و باکتری حاوی پلاسمید القا نشده رسم شد که نشان می دهد پروتئین نوترکیب t-NuMA 12/9٪ از پروتئین های فاز محلول و 10/8٪ از فاز غیر محلول را تشکیل می دهد.

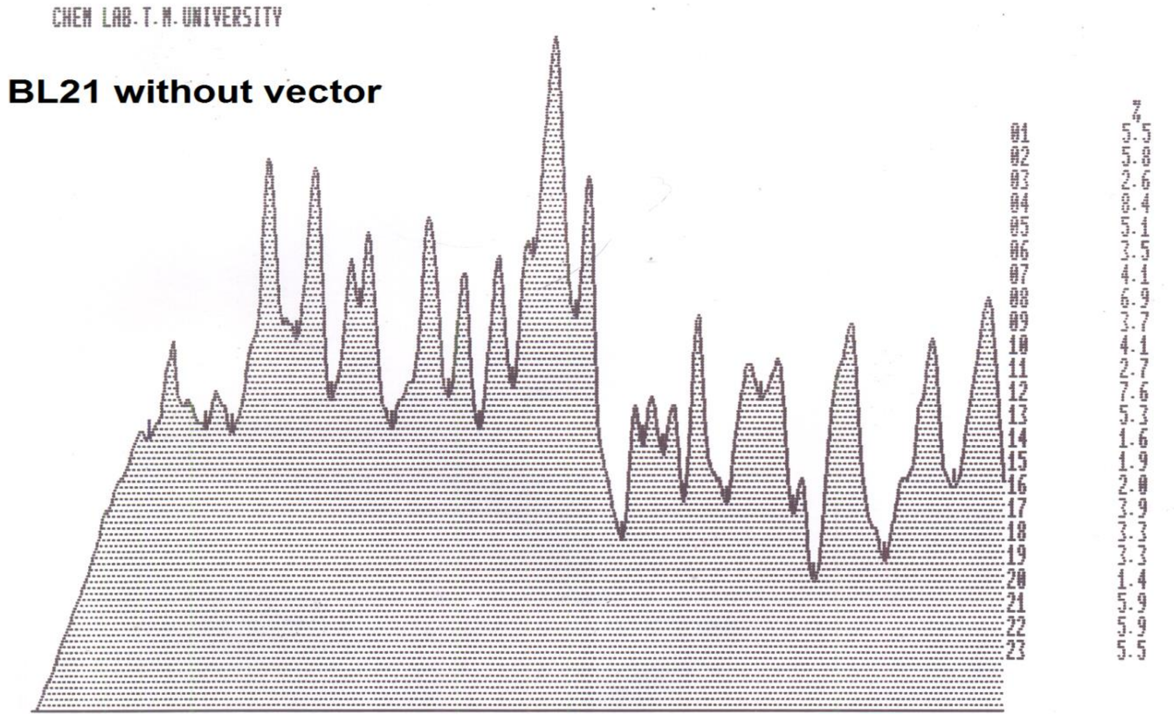


شکل3-10.نمودار غلظت پروتئین های سیتوزولی مختلف موجود در لیزات باکتری بر حسب درصد.
a.پروتئین نوترکیب t-NuMA که9 /12 ٪ از پروتئین های محلول در سیتوپلاسم را به خود اختصاص می دهد.

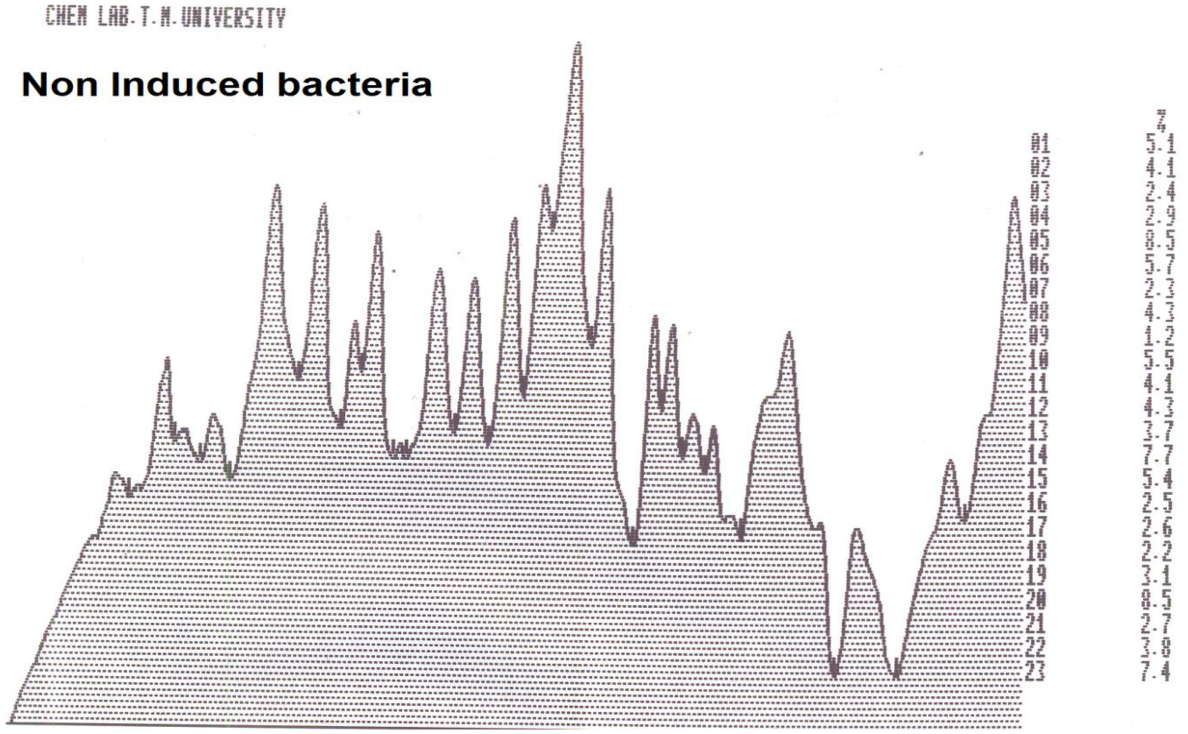


شکل3-11.نمودار غلظت پروتئین های موجود در رسوب باکتری القا شده.

b. پروتئین نوترکیب t-NuMA که 10/8٪ از پروتئین های رسوب باکتری را به خود اختصاص می دهد.



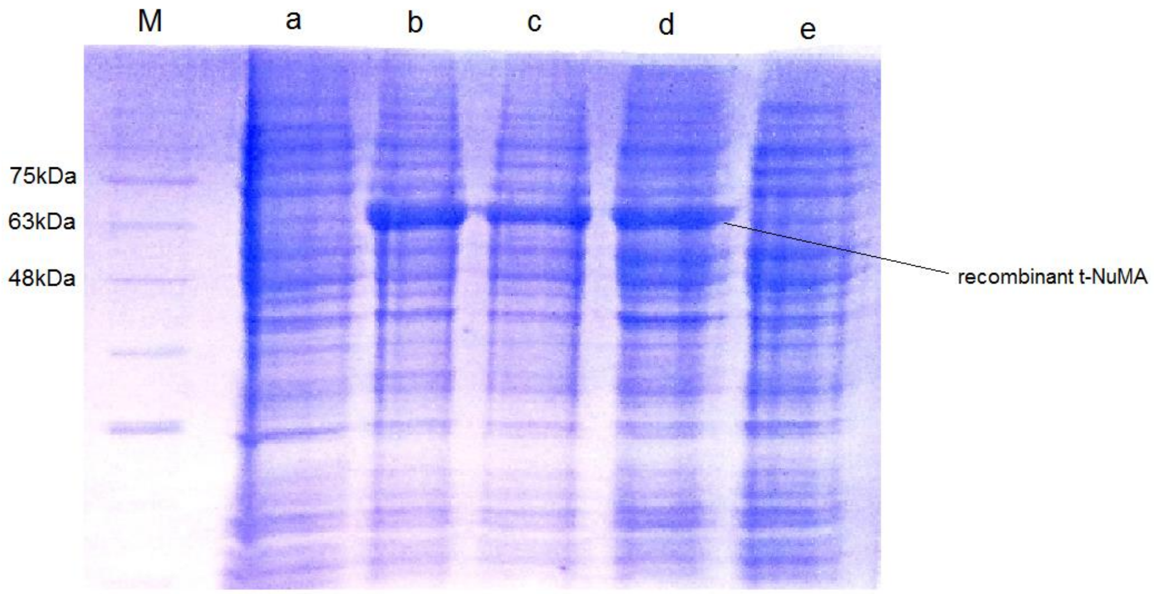
شکل3-12.نمودار پروتئین های محلول موجود در باکتری میزبان فاقد وکتور بیانی



شکل3-13.نمودار پروتئین های محلول موجود در باکتری حاوی وکتور بیانی القا نشده

3-2-6. بهینه سازی زمان القای باکتری

از کشت القا شده در دمای 30 درجه سانتی گراد و با غلظت IPTG در زمان های مختلف پس از القا نمونه های هم حجم برداشته شد .پس از سونیکاسیون و جدا سازی پروتئین های فاز محلول ،نمونه ها بر روی ژل SDS-PAGE آنالیز شدند.نتایج نشان می دهد که بیان پروتئین نوترکیب NuMAt- در 2، 4و 8 ساعت پس از القا تفاوت چندانی نداشته ،اما در زمان 24 ساعت پس از القا این پروتئین غلظتش در محیط بسیار کاهش یافته و حتی به صفر می رسد.

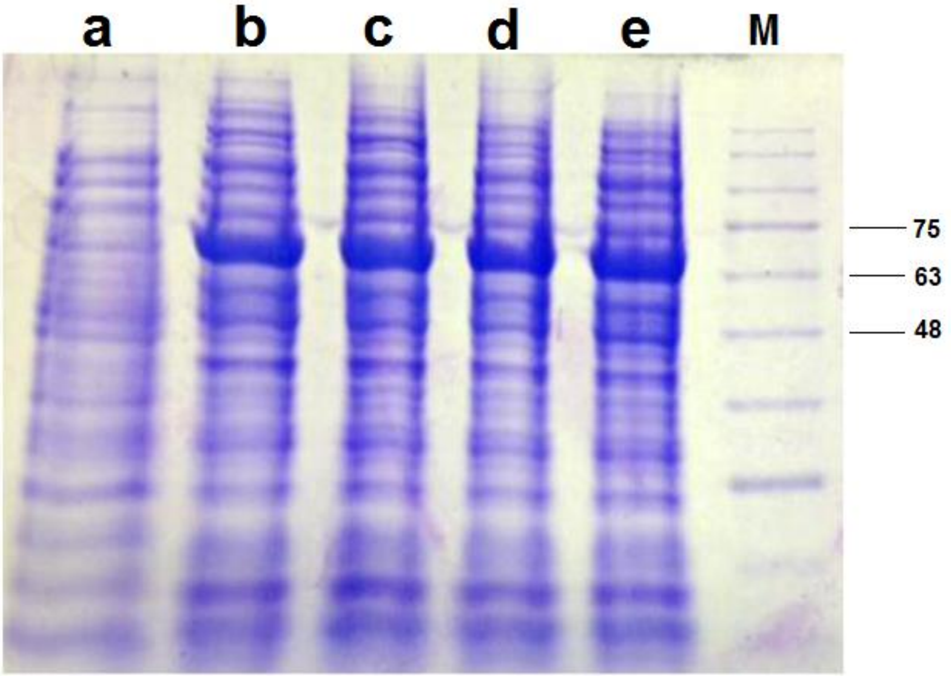


شکل3-14.بهینه سازی زمان القای باکتری سویه Bl21 .M.مارکر استاندارد پروتئین.a.24 ساعت پس ازالقا

b: 8 ساعت پس از القا c: 4 ساعت پس از القا d:2 ساعت پس از القا e : باکتری القا نشده

3-2-7. بهینه سازی غلظت IPTG :

زمانی که محیط کشت باکتری به OD~ 0.6 رسید به میزان 10 میلی لیتر از هر کشت برداشته شد و به ترتیب به هر کدام مقادیرمتفاوتی از IPTG 100 میلی مولار اضافه شد تا نهایتا محیط هایی با غلظت 0/5، 1، 1/5 و 2 میلی مولار بدست آمد و به مدت 4 ساعت در دمای 30 درجه در انکوباتور شیکر دار قرار داده شد.پروتئین های حاصله بر روی ژل SDS-PAGE به صورت زیر آنالیز شدند.



شکل3-15.بهینه سازی غلظت IPTG.

a.باکتری القا نشده. b. باکتری القا شده با IPTG 0/5 میلی مولار c. باکتری القا شده با IPTG 1میلی مولار

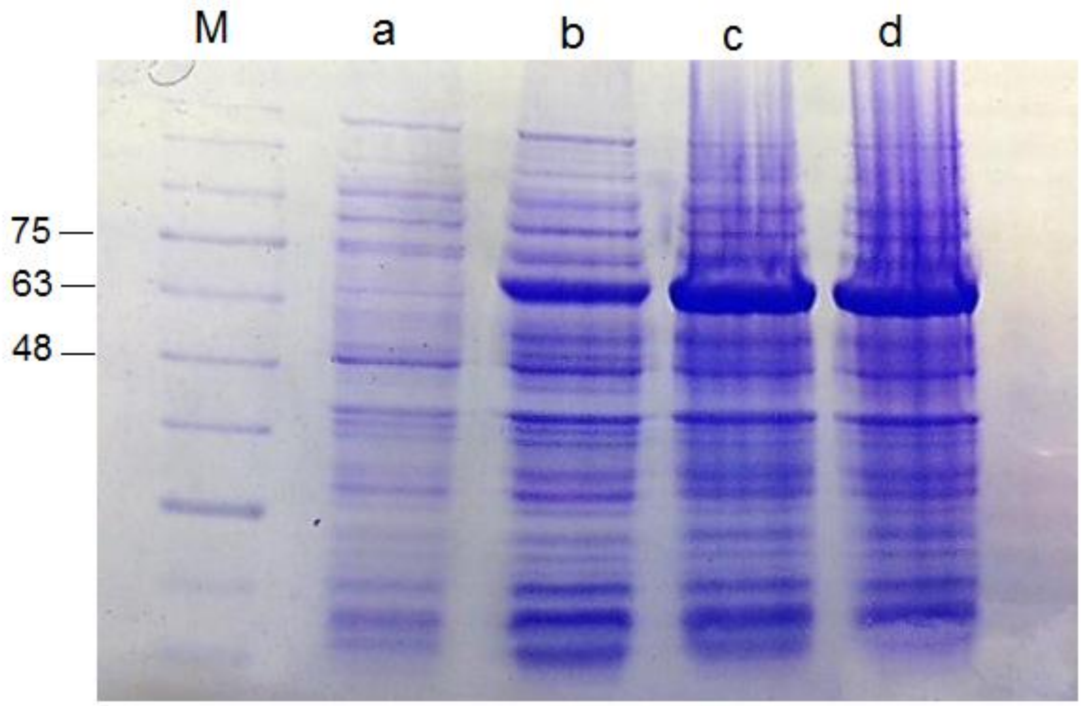
d.باکتری القا شده با IPTG 1/5میلی مولارe. باکتری القا شده با IPTG 2 میلی مولار

M.مارکر پروتئینی استاندارد بر حسب کیلودالتون

3-2-8. بهینه سازی دمای القا

پس از اینکه کشت باکتری مورد نظر به OD مناسب رسید با IPTG با غلظت نهایی 1 میلی مولار القا صورت گرفت و در 3 فالکون با حجم 10 میلی لیتر توزیع شده و در دماهای 23، 30 و 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

آنالیز پروتئین های این سه نمونه پس از همسان سازی غلظت آنها به اندازه 5 میکروگرم در هر چاهک، بر روی ژل SDS-PAGE به صورت زیر می باشد.



شکل 3-16.بهینه سازی دمای القای بیان باکتری

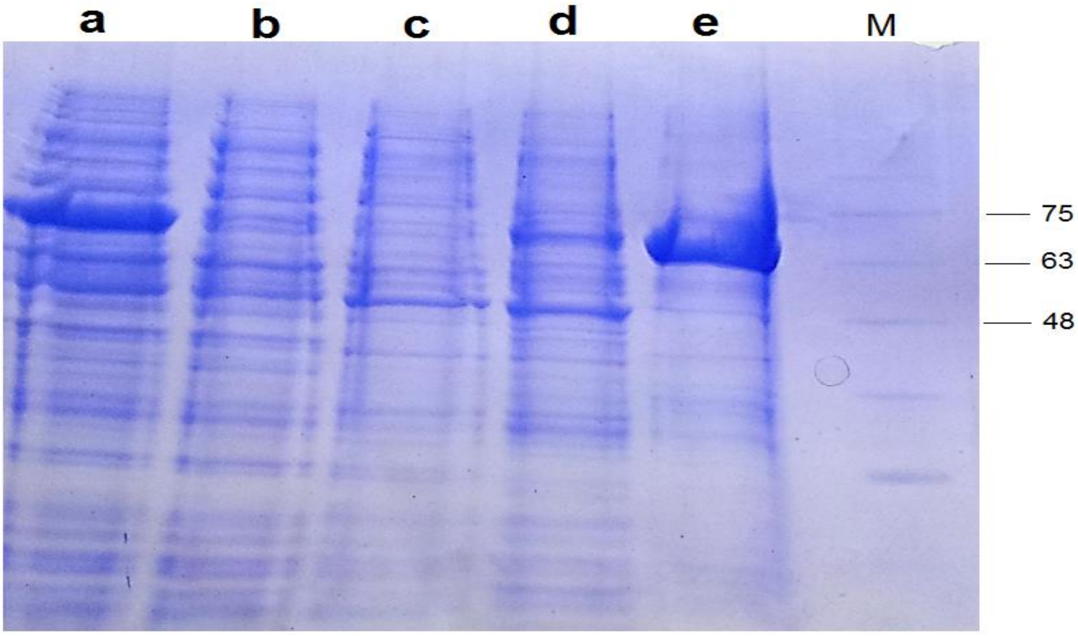
M. مارکر پروتئینی استاندارد بر حسب کیلودالتون.a. باکتری القا نشده b. باکتری القا شده در دمای 23 درجه

c. باکتری القا شده در دمای 30 درجهd. باکتری القا شده در دمای 37 درجه

3-2-9. تخلیص پروتئین با استفاده از ستون Ni-NTA:

برای تخلیص پروتئین دارای His tag از ستون Ni-NTA و بافر های دارای ایمیدازول با غلظت های متفاوت استفاده شد تا باند 63 کیلو دالتونی مورد نظر بصورت کاملا خالص مشاهده شود.به

منظور کاهش باند های غیر اختصاصی از بافر شستشوی 40 میلی مولار ایمیدازول و بافر elution در دو مرحله 200 میلی مولار ایمیدازول و 500 میلی مولار ایمیدازول استفاده شد.پروتئین مورد نظر در غلظت 500 میلی مولار ایمیدازول به صورت خالص ، کاملا از ستون جدا شد.



شکل3-17.تخلیص با استفاده از ستون Ni^{2+}-NTA.

a.لیزات باکتری القا شده قبل از تخلیص . b. پروتئین های خارج شده از ستون پس از اتصال

c. پروتئین های خارج شده پس از مرحله شستشو با بافر شستشوی حاوی ایمیدازول 40 میلی مولار

d.پروتئین های خارج شده پس از مرحله elution با بافر جدا کننده حاوی ایمیدازول 200 میلی مولار

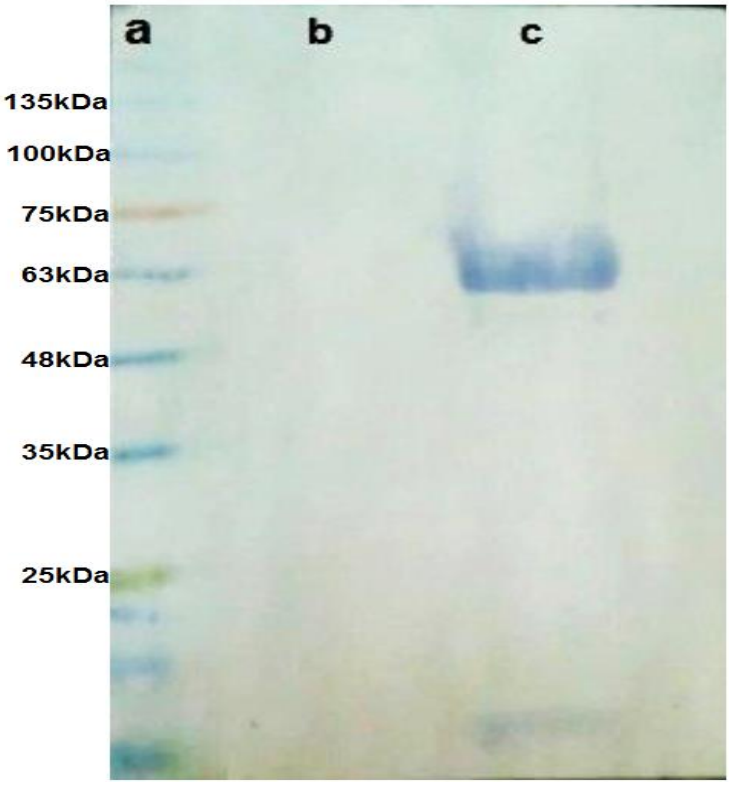
e. پروتئین تخلیص شده با بافر جدا کننده حاوی ایمیدازول 500 میلی مولار

M. مارکر پروتئینی استاندارد بر حسب کیلو دالتون

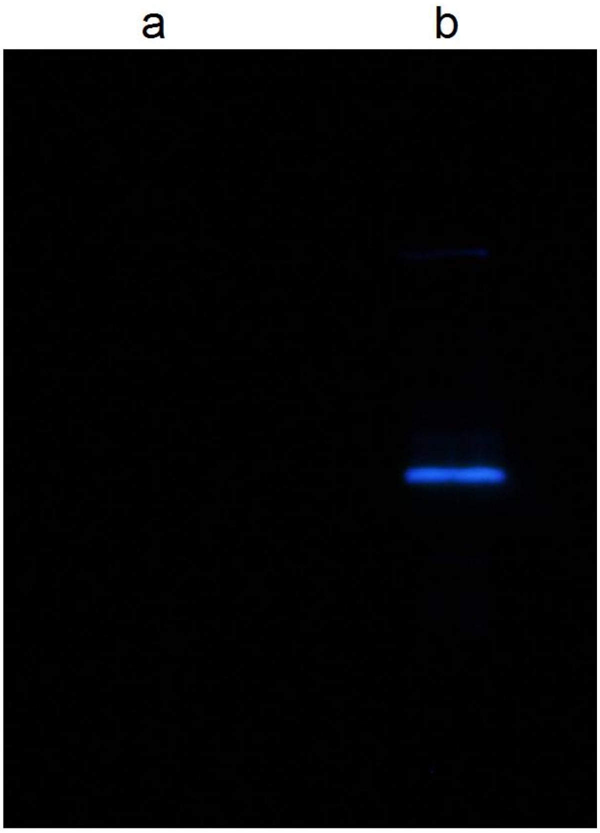
3-2-10. وسترن بلات برای نشان دادن بیان انجام شده

پروتئین های تفکیک شده بر روی ژل12/5 ٪ پلی آکریلامید با استفاده از دستگاه الکتروترانسفر به غشای نیتروسلولز منتقل شد.بیان پروتئین NMP22 truncated recombinant با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین کونژوگه با HRP با نسبت 1/5000 در بافر TBSTو با سوبسترای آنزیمی TMB تهیه شده از شرکت Sigma و هم چنین با سوبسترای ECL مورد بررسی قرار گرفت.همانطورکه در شکل مشاهده می شود لکه باند مورد نظر در محل مارکر 63 کیلو دالتونی ظاهر

شده که نشان می دهد پروتئین مورد نظر به خوبی بیان شده و آنتی بادی علیه دنباله هیستیدینی پروتئین ،می تواند پروتئین نوترکیب بیان شده را شناسایی کند.



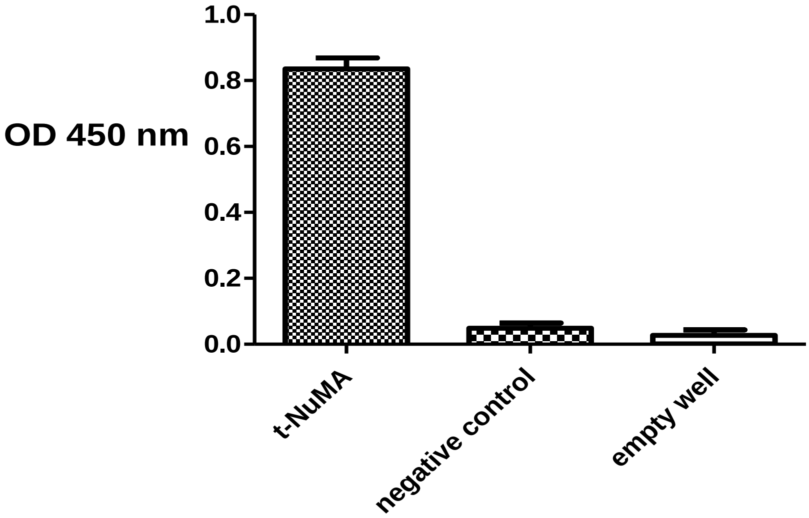
شکل3-18.وسترن بلات برای تایید بیان در BL21 با استفاده از انتی بادی ضد برچسب هیستیدینی و سوبسترای TMB. a.مارکر وزنی بر حسب کیلودالتون b.کنترل منفیc. پروتئین نوترکیب t-NuMA



شکل3-19.وسترن بلات برای تایید بیان با استفاده از سوبسترای ECL

3-2-11. الایزای آنتی ژن تخلیص شده

برای بررسی ویژگی پروتئین نوترکیب t-NuMA بیان شده در میزبان پروکاریوتی نسبت به آنتی بادی تجاری ضد NuMa1 تهیه شده از شرکت abcam ،از الایزای غیرمستقیم پروتئین با استفاده از آنتی بادی ثانویه ضد IgG خرگوشی کونژوگه به HRP استفاده شد.نتایج در شکل ؟ ارائه شده است. نتایج نشان می دهد که پروتئین نوترکیب تخلیص شده برای آنتی بادی تجاری NuMa اختصاصی می باشد.



شکل3-20.نتایج حاصل از تست الایزا جهت بررسی اختصاصی بودن پروتئین نوترکیب t-NuMA برای آنتی بادی تجاری NuMa1 در مقایسه با BSA به عنوان کنترل منفی.

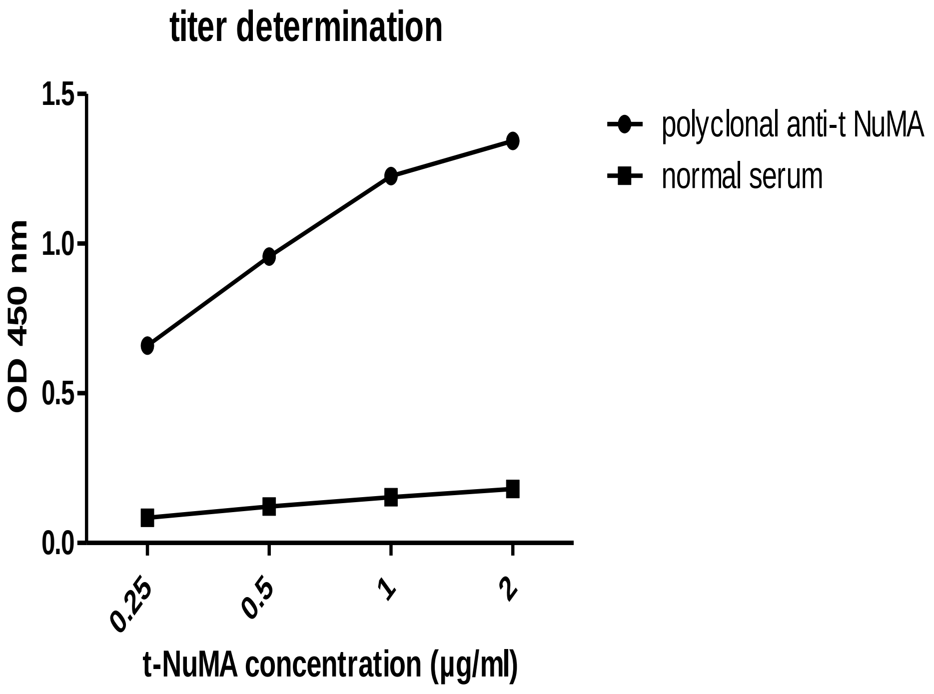
t–NuMA: پروتئین نوترکیب t–NuMA به میزان 2 میکروگرم درهر چاهک استفاده شد.

BSA: Negative control به میزان 2میکروگرم به عنوان کنترل منفی درهر چاهک استفاده شد

.

Empty well: چاهک فاقد هر گونه پروتئین اولیه و صرفا بلاک شده با شیر خشک بدون چربی می باشد.

بررسی تیتر آنتی بادی پلی کلونال

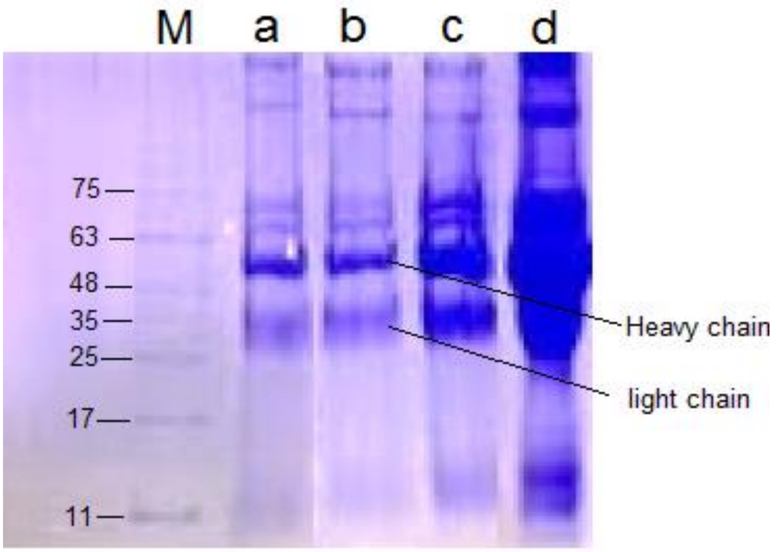


3-2-12. تخلیص ایمونوگلوبولین های سرم با ترسیب پروتئین ها با استفاده از آمونیوم سولفات و کروماتوگرافی تعویض یونی:

برای داشتن آنتی بادی پلی کلونال نسبتا خالص پروتئین های سرم با استفاده از آمونیوم سولفات 33٪ رسوب داده شدند و به مدت 24 ساعت در مقابل بافر فسفات اسیدی pH=6/3 دیالیز انجام شد.

محتویات کیسه دیالیز را خارج کرده و از ستون DEAE cellulose باردار شده به صورت Batch جهت کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد. غلظت پروتئین های سرم با روش برادفورد قبل از تخلیص 12میلی گرم در میلی لیتر ارزیابی شد. با توجه به اینکه 15٪ از پروتئین های سرم را ایمونوگلوبولین ها تشکیل می دهند، پس از تخلیص در صورت 100 ٪ بودن بازده باید 1680

میکروگرم ایمونوگلوبولین داشته باشیم. غلظت پـروتئین تخلـیص شـده 2500 میلـی گـرم سـنجیده شد.در تصویر زیر فرکشن های مختلف پس از تخلیص مشاهده می شود.



شکل3-21. تخلیص ایمونوگلوبولینهای سرم خرگوشی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی

M. مارکر استاندارد پروتئینی بر حسب کیلو دالتون. a ایمونوگلوبولین تخلیص شده در اولین فرکشن

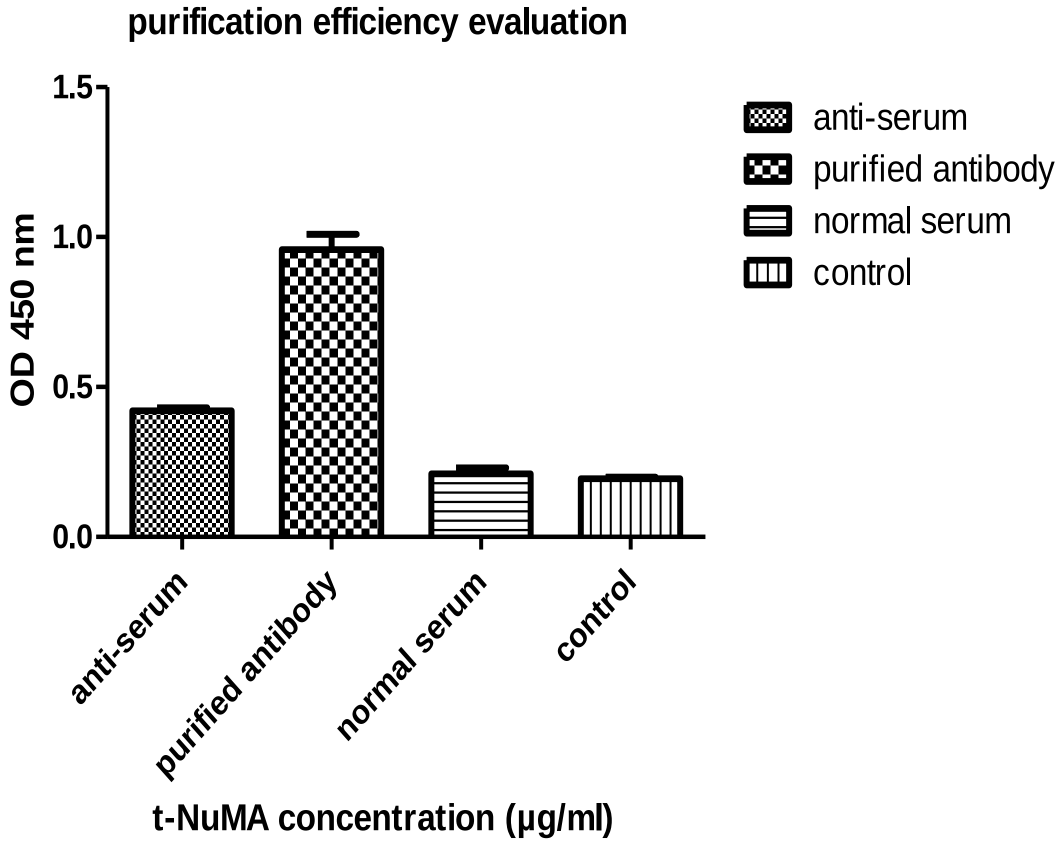
b.ایمونوگلوبولین تخلیص شده در دومین فرکشن

c. ایمونوگلوبولین تخلیص شده در سومین فرکشن

d. سرم خرگوش ایمن شده قبل از تخلیص

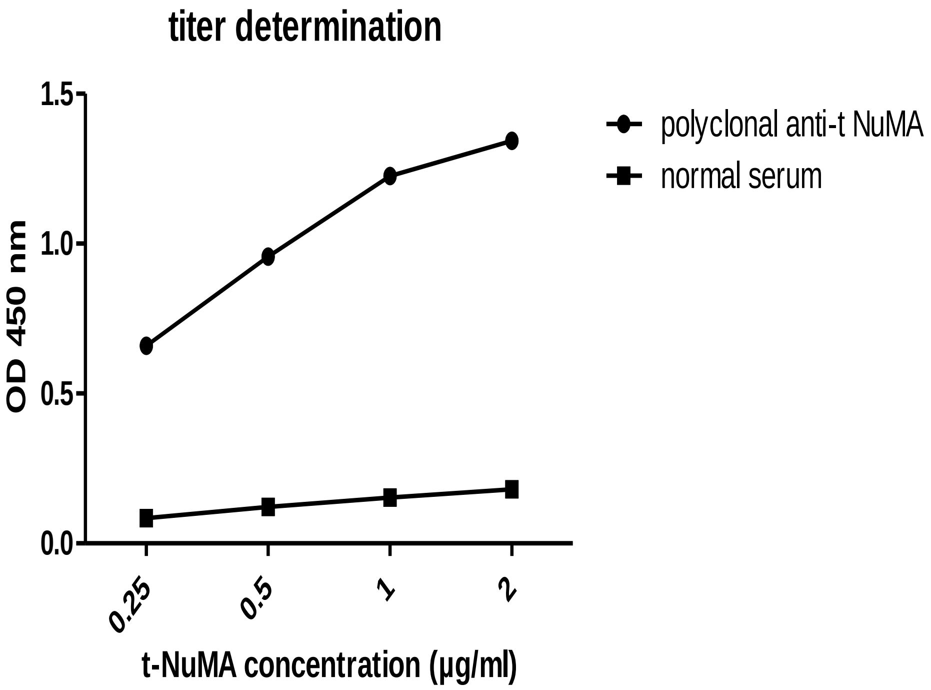
3-2-12. بررسی و مقایسه واکنش آنتی بادی تخلیص شده و آنتی سرم تخلیص نشده:

پس از تخلیص آنتی بادی پلی کلونال ، جهت بررسی اینکه تا چـه حـد بـا آنتـی ژن t-NuMA قابـل واکنش می باشد الایزا انجام شد.



3-2-13. نتایج تعیین تیتر IgG خرگوشی تخلیص شـده بـر علیـه t-NuMA تزریق شده:

برای تعیین تیتر آنتی بادی تخلیص شده از تست الایزا و مقادیر مختلف آنتی بادی استفاده شـد. از آنتی بادی سرم قبل از ایمن کردن نیز استفاده شد.



نمودار تعیین تیتر آنتی بادی پلی کلونال تخلیص شده

~~آیا نمودار تعیین تیتر صحیح است؟~~

3-2-14.وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال تخلیص شده

~~(آیا لازم است اضافه شود ؟)~~

فصل چهارم

بحث، نتیجه گیری و

پیشنهادها

4-1.بحث

سرطان مثانه یکی از شایع ترین بدخیمی های مجاری ادرار می باشد که بسیار تهاجمی و هتروزن است. شیوع جهانی در سال 2012 تقریبا معادل 375000 مورد بود(72). هزینه بالای درمان و همچنین احتمال بسیار بالای بازگشت و عود بیماری ، آنرا به یک مشکل بزرگ برای جوامع تبدیل کرده است.در حال حاضر تخمین زده می شود که در کشور های غربی 2/7 میلیون نفر مبتلا به سرطان مثانه تشخیص داده می شوند(8).

بیشتر سرطان های مثانه (85٪- 75٪) در اولین تشخیص به صورت غیر تهاجمی به بافت عضلانی (Non-Muscle invasive bladder cancer)و در مراحل Ta ، T1 و CIS شناسایی می شوند که حدود 70٪ در سطح Ta ، 20٪ در سطح T1 و 10٪ در سطح CIS تشخیص داده می شوند. بازگشت بیماری تقریبا در 80٪ بیماران Ta مشاهده می شود(73).

بیماران NMIBC نسبت به تغییرات جزیی در مراقبت و درمان بسیار حساس بوده و هر گونه تداخل ، باعث تغییر رفتار بیولوژیکی و بالینی بیماری می شود. ازین رو شناخت صحیح از ریسک فاکتور ها و مدیریت بیماری جهت بهبود روند درمان بیماران NMIBC ضروری است(74).

از آنجایی که این بیماری فاقد علائم است، تشخیص و پیگیری سرطان مثانه همچنان به عنوان یک چالش باقی مانده است.

همان طور که در فصل 1 اشاره شد، سیستوسکوپی که یک روش استاندارد طلایی برای تشخیص است دارای نقاط ضعفی است ، از جمله اینکه تهاجمی و نسبتا گران است.همچنین برای بیماران ایجاد ناراحتی کرده و عوارض جانبی همچون خونریزی ،آسیب دیواره مثانه و عفونت در پی دارد(75).

سیتولوژی نمونه ادراری نیز یک روش خیلی اختصاصی است و بر خلاف سیستوسکوپی غیر تهاجمی است.این روش برای شناسایی درجات بالای سرطان مثانه حساسیت خوبی دارد ولی برای سطوح پایین سرطان مثانه تنها 4٪ حساسیت دارد(76). علاوه بر این کارایی سیتولوژی بستگی به تجربه و مهارت سیتوپاتولوژیست دارد و از طرفی هزینه بسیار بالایی دارد و در بسیاری از کشور ها نیز امکان پذیر نیست(77).

بدین ترتیب وجود یک مارکر اختصاصی، غیر تهاجمی و خیلی حساس برای تشخیص سرطان مثانه می تواند ضعف روشهایی همچون سیستوسکوپی را کاسته، کیفیت زندگی بیماران را بهبود بخشیده و از پرداخت هزینه های اضافی جلوگیری کند.یکی از مزایای این تست ها برای تشخیص سرطان مثانه

میتواند در دسترس بودن سوبسترای آنها باشد.ادرار سوبسترایی است که بر خلاف خون با ارگان های کمتری در تماس است لذا پروتئین های مزاحم کمتری را با خود حمل می کند(78). همچنین pHپایین ادرار پروتئازها را غیرفعال می کند و به پروتئینهای سلولهای اوروتلیالی آسیب نمی زند. تا کنون بیومارکرهای متعددی برای سرطان مثانه شناسایی شده است و از میان آنها نیز تعدادی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا جهت استفاده بالینی مورد تایید قرار گرفته اند که می توان به پروتئین ماتریکس هسته ای 22 (NMP22) اشاره کرد.

پروتئین های ماتریکس هسته ای که ابتدا توسط Berezney و Coffey در سال 1974 شناسایی شدند، اسکلت ساختمان درونی هسته را تشکیل می دهند و در عملکرد هایی همچون همانند سازی DNA ، رونویسی، اتصال به هورمونها و بیان ژن دخالت دارند. تحقیقات نشان می دهد که این پروتئینها برای بافت و تومور اختصاصی هستند. در کارسینومای ترانزیشنال مثانه ، نوع اختصاصی NMP22 وجود دارد. در ادرار افراد نرمال مقدار کمی از این پروتئین وجود دارد در حالیکه در ادرار افراد مبتلا به سرطان مثانه حداقل 25 برابر بیشتر است(55). همین موضوع موجب طراحی تستی چون NMP22 BladderChekو تست کمی NMP22 شده است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا نیز جهت استفاده بالینی به تایید رسیده است.

اساس تست کیفی NMP22 BladderChekو تست کمی NMP22شناسایی NMP22رها شده از سلول های مرده رها شده در ادرار افراد می باشد. تست کیفی دارای Cut off معادل 10 U/ml است که ظرف 1 ساعت نتیجه تست مشخص می شود در حالیکه تست کمی میزان پروتئین را در نمونه ادرار تثبیت شده را به صورت دقیق تر نشان می دهد(45).

حساسیت ایمونواسی NMP22 بسته به میزان Cut off از 100٪-47٪و اختصاصیت آن از 90٪ -60٪ متغیر است. همچون سایر تومور مارکر ها این سوال مطرح می شود که آیا مارکر مورد نظر در مرحله تشخیص اولیه فقط کارایی دارد و یا در پیگیری و پایش بیماری نیز قابل استفاده است؟

Carpinito و همکارانش در یک بررسی بالینی نشان دادند که در بیماران فعال میزان NMP22 به طور میانگین معادل 6.04 U/ml و در افراد نرمال معادل2.86 U/ml می باشد.

Soloway و همکارانش بازگشت بیماری را پس از برداشت تومور در مبتلایان به سرطان مثانه بررسی کردند. آنها مقادیر NMP22 را در ادرار افراد از 5 روز بعد از جراحی و حتی به دنبال سیستوسکوپی اندازه گیری کردند. با مقایسه مقادیر بدست آمده دریافتند که در بیماران با مقادیر کمتر از 10 U/ml نسبت به بیماران با مقادیر کمتر از 10 U/ml احتمال عود بیماری بیشتر است و افرادی که پس از برداشت تومور مقادیر بالای 20U/ml دارند به شدت در معرض ابتلا به سرطان مثانه قرار دارند.

از سوی دیگر با توجه به بزرگی تومور و پیشروی آن در مرحله تشخیص در مقایسه با وضعیت عود کننده بیماری ،حساسیت تست در تشخیص به مراتب بیشتر از حساسیت آن در حالت عودکننده می باشد(19).

با این حال سنجش مورد نظر در هر دو زمینه قابلیت تشخیصی داشته و می توان در هر دو جهت از آن استفاده کرد.

با بررسی مطالعاتی که در زمینه‌ی تشخیص وجود دارد می‌توان، رویکرد تشخیص با استفاده از آنتیژن‌های چند اپی‌توپی را به عنوان روشی جدید در تشخیص، مشاهده کرد. در این گونه مطالعات با استفاده از نرم افزار های بیو انفورماتیکی و همچنین با توجه به تحقیقات پیشین صورت گرفته در زمینه نقشه یابی اپیتوپی ، جایگاه های ایمونوژنیک شناسایی شده و آنتی ژنی طراحی می شود که بتواند در تستهای تشخیصی از اختصاصیت بالایی برخوردار باشد.

در مورد پروتئین NuMA ، سه ایزوفرم مختلف وجود دارد که تفاوتشان در آمینو اسید های ناحیه C ترمینال بوده و ابزار های بیوانفورماتیکی بخش N ترمینال آنها را کاملا حفاظت شده نشان می دهند.

با توجه به اینکه سیگنال قرارگیری در هسته که در بخش C ترمینال همه پروتئین های هسته ای واقع است لذا آمینو اسید های واقع در N ترمینال و بخش مرکزی پروتئین گزینه های مناسبی برای استفاده به عنوان آنتی ژن اختصاصی هستند(57).

بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط Harborth و همکاران ،پروتئین NuMA دارای 6 اپی توپ شناسایی شده است که 5 اپی توپ آن خطی و 1 اپی توپ آن غیر خطی می باشد(64).

هدف از این تحقیق بیان پروتئین نوترکیب NMP22 بود که بتواند جهت تولید آنتی بادی پلی کلونال مورد استفاده قرار بگیرد و آنتی بادی تولید شده نیز جهت کاربرد تشخیصی قابل استفاده باشد.

در این مطالعه آنتی ژن چند اپی توپی طراحی شده است که دارای تعدادی از نواحی ایمونوژنیک پروتئین NuMA در 300 آمینواسید آغازین می باشد.برای بدست آوردن ژنی مناسب که قادر به بیان مناسب این آنتی‌ژن باشد توالی اولیه ژن به وسیله‌ی نرم‌افزارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت، در این روند عوامل متعددی برای بهینه کردن ژن و برای بیان در Ecoli سویه BL21 مد نظر قرار داده شد و همگی در جهت بهبود توالی اعمال شدند. این توالی در وکتور بیانی pGS21a بین دو جایگاه Not1 و EcoR1 طراحی شد و جهت سنتز به شرکت Genscript سفارش داده شد. پس از دریافت وکتور بیانی مورد نظر در باکتری Ecoli سویه Top10 ، استخراج پلاسمید صورت گرفت و در نهایت به سویه BL21 جهت بیان انتقال یافت. وکتور pGS21a دارای پروتئین فیوژن His Tag و GST در ناحیه N ترمینال بوده و پس از بیان به پروتئین بیان شده 26 کیلودالتون افزوده و در نهایت باید باند 63 کیلودالتونی

مشاهده می شد. در این راستا القا با استفاده از القا کننده IPTG انجام شد و باند مورد نظر در محل مارکر 63 کیلو دالتون دیده شد.

مرحله بعدی بهینه سازی بیان با در نظر گرفتن پارامتر هایی همچون محیطهای کشت مختلف، غلظت های متفاوت IPTG و دماها و زمان های متفاوت بود. بدین منظور محیط های کشت LB براث ، 2xYT و TB مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در محیط LB براث بیان بیشتری نسبت به محیط 2xYT صورت می گیرد . و با وجود اینکه بطور کلی میزان تولید سایر پروتئینهای باکتری تقریبا دو برابر شده بود ولی در محیط TB پروتئین 63 کیلودالتونی t-NuMA مشاهده نشد.

برای بهینه سازی غلظت IPTG از مقادیر 5/. ، 1 ، 1/5 و 2 میلی مولار IPTG استفاده شد و آنالیز پروتئین های هم غلظت (5 میکروگرم در هر چاهک) روی ژل SDS-PAGE نشان داد که در تمام غلظت ها میزان بیان پروتئین موردنظر یکسان می باشد.

در بهینه سازی زمان القا ، در زمان های 2 ، 4 ، 8 و 24 ساعت پس از القا از کشت ارلن نمونه برداری شد و آنالیز پروتئین ها نشان داد که تا زمان 8 ساعت پس از القا غلظت های مشابهی از پروتئین t-NuMA بدست می آید اما 24 ساعت پس از القا غلظت پروتئین حاصله بسیار کاهش می یابد که می تواند به دلایل متعددی از جمله نیمه عمر پایین پروتئین، وجود پروتئاز های محیط و هم چنین از بین رفتن اثر آنتی بیوتیک آمپی سیلین در محیط و در نتیجه رشد سایر باکتری ها و همچنین کاهش بازده پروتئین مورد نظر باشد.

در مرحله تخلیص به واسطه پروتئین فیوژن هگزاهیستیدینی که در انتهای آمینی پروتئین وجود داشت و با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی ستون Ni-NTA پروتئین t-NuMA از سایر پروتئین ها با غلظت 1/5mg/ml جدا شد. در این راستا برای جدا شدن آن از ستون از گرادیان غلظت ایمیدازول استفاده شد که در نهایت با غلظت ایمیدازول 500 میلی مولار با کمترین باند غیراختصاصی تخلیص صورت گرفت.

جهت تایید بیان و تخلیص ، وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد دنباله هیستیدینی کونژوگه با پراکسیداز انجام شد که در نتیجه باند 63 کیلودالتونی در غشا پدیدار شد که نشان دهنده صحت بیان و تخلیص انجام شده بود.

برای بررسی آنتی ژنیسیته پروتئین بیان و تخلیص شده، از الایزای غیرمستقیم و با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال تجاری علیه NuMA استفاده شد. در مقایسه با کنترل منفی که BSA بود، اختلاف OD معناداری مشاهده شد که نشان می دهد پروتئین تولید شده دارای خاصیت آنتی ژنیسیته مناسب

می باشد و اپی توپ های در نظر گرفته شده می توانند توسط آنتی بادی تجاری به خوبی شناسایی شوند .پس از تایید تمایل آنتی بادی و آنتی ژن ، کشت باکتری در مقادیر 1 لیتری به منظور تولید کافی پروتئین نوترکیب

t-NuMA جهت تزریق به خرگوش انجام شد. در مرحله بعدی ایمن سازی دو خرگوش صورت گرفت. در مرحله اول برای اطمینان از تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن تزریق شده از تست الایزا با رقت های1:100 تا 1:5000 سرم استفاده شد. نتایج نشان داد که در مقایسه با سرم حیوان قبل از تزریق ، مقدار قابل توجهی آنتی بادی تولید شده است که با توجه با اندازه مناسب پروتئین تزریق شده (63 کیلودالتون) قابل پیش بینی بود.

پس از این مرحله تخلیص آنتی بادی با روش ترسیب پروتئینهای سرم با آمونیوم سولفات، دیالیز و در نهایت با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی صورت گرفت و کیفیت آنتی بادی پلی کلونال حاصله با آنالیز روی ژل SDS-PAGE و به دنبال آن الایزای غیر مستقیم با آنتی ژن تایید شد و الایزا میزان تمایل آنتی بادی بعد از تخلیص را دو برابر بیشتر از سرم نشان داد.

قدم بعدی تعیین تیتر آنتی بادی تخلیص شده علیه آنتی ژن t-NuMA بود. نتایج الایزای غیرمستقیم با استفاده از مقادیر مختلف آنتی ژن و آنتی بادی، تیترآنتی بادی را ؟ نشان داد.

حال با در دست داشتن آنتی بادی خالص علیه پروتئین نوترکیب t-NuMA باید میزان تمایل آنرا به پروتئین NuMA طبیعی موجود در سلول می سنجیدیم. برای این کار باید رده های سلولی استفاده می شد که تا اندازه زیادی دارای پروتئین مورد نظر ما باشد. از طرفی برای کنترل منفی نیز رده ای مورد نیاز بود که فاقد NuMA باشد. مشکلی که اینجا پیش می آمد این بود که این پروتئین از جمله پروتئین های همیشه حاضر و شرکت کننده در تقسیمات سلولی اکثر سلول هاست و فقط در موارد نادری برخی سلول ها فاقد آن می باشند.

با مطالعه مقالات متعدد و همچنین بررسی پروفایل بیانی رده های سلولی مختلف ، رده های سلولی MCF7 و MDA با منشا سلول های سرطان پستان، HEK 293T با منشا سلول های کلیه و 5637 با منشا سلول های سرطان مثانه به عنوان رده های بیان کننده NuMA استفاده شدند.

آیا از پاراگراف قبلی لازم است یا خیر؟

چگونه این مبحث را خاتمه دهم؟

فهرست منابع

1. Akbari ME, Hosseini SJ, Rezaee A, Hosseini MM, Rezaee I, Sheikhvatan M. Incidence of genitourinary cancers in the Islamic Republic of Iran: a survey in 2005. Asian Pac. J. Cancer Prev. [Internet]. 2008;9(4):549–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19256736

2. Morgan R, Bryan RT, Javed S, Launchbury F, Zeegers MP, Cheng KK, et al. Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker. Eur. J. Cancer [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;49(9):2214–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.01.019

3. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-redorta J. SPECIAL ARTICLE EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder , the 2011 update ☆ , ☆☆. Actas Urológicas Españolas (English Ed. [Internet]. AEU; 2012;36(7):389–402. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.acuroe.2011.12.007

4. Ritter R, Hennenlotter J, Sc B, Kühs U, Hofmann U, Aufderklamm S, et al. Evaluation of a new quantitative point-of-care test platform for urine-based detection of bladder cancer. Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig. [Internet]. Elsevier; 2013;1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.09.024

5. Bladdertumors S, Chopin DK, Gattegno B. European Urology. 2002;42.

6. Sternberg CN. A critical review of the management of bladder cancer. 1999;31:193–207.

7. Staging RN, Cancers R, Staging ST, Descriptors O. GENERAL CANCER CLASSIFICATION , STAGING , Specific Cancers , Staging And Classification. :122–7.

8. Pang KH. Bladder cancer. Surgery [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;31(10):523–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2013.08.002

9. Manuscript A, Cancer B. NIH Public Access. 2013;(1):1–17.

10. Amling CL. Current Problems in Cancer Current Problems in Cancer. 2001;25(4).

11. Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. 2010;193:131–7.

12. Kiriluk KJ, Prasad SM, Phil M, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. URO [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;30(2):199–211. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.10.010

13. Zaghloul MS. Bladder cancer and schistosomiasis. J. Egypt. Natl. Canc. Inst. [Internet]. National Cancer Institute, Cairo University; 2012;24(4):151–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2012.08.002

14. Barlow LJ, Seager CM, Benson MC, Mckiernan JM. Novel intravesical therapies for non-muscle-invasive bladder cancer refractory to BCG . URO [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;28(1):108–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.03.029

15. Cheung G, Sahai A, Billia M, Dasgupta P, Khan MS. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. 2013;1–8.

16. Yates DR, Brausi MA, Catto JWF, Dalbagni G, Roupre M, Shariat SF, et al. Treatment Options Available for Bacillus Calmette-Gue Failure in Non – muscle-invasive Bladder Cancer. 2012;62:1088–96.

17. Stenzl A, Cowan NC, Santis M De, Kuczyk MA, Merseburger AS, Jose M. Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer : Update of the EAU Guidelines. 2011;59:1009–18.

18. Soukup V, Babjuk M, Bellmunt J, Dalbagni G, Giannarini G, Hakenberg OW, et al. Follow-up After Surgical Treatment of Bladder Cancer : A Critical Analysis of the Literature. 2012;62:290–302.

19. Hwang EC, Choi HS, Jung SI, Kwon DD, Park K, Ryu SB. Use of the NMP22 BladderChek Test in the Diagnosis and Follow-Up of Urothelial Cancer: A Cross-sectional Study. URL [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;77(1):154–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2010.04.059

20. Pesch B, Brüning T, Johnen G, Casjens S, Bonberg N, Taeger D, et al. Biomarker research with prospective study designs for the early detection of cancer. BBA - Proteins Proteomics [Internet]. Elsevier B.V.; 2013; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.12.007

21. Sanchez-carbayo M. Recent advances in bladder cancer diagnostics. 2004;37:562–71.

22. Universitatis F. BIOMARKERS FOR DETECTION , TREATMENT DECISION AND PROGNOSIS Ontogeneses Telomerase Tumor suppressor genes Genomic studies in bladder cancer. 2007;14(1):1–5.

23. Volpe A, D M, Racioppi M, Ph D, Agostino DD, Addessi AD, et al. Advanced bladder cancer : New agents and new approaches . A review. URO [Internet]. Elsevier Inc.; 2010; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2010.03.022

24. Urology A. Consecutive quantitative cytology in bladder cancer. 4295(00).

25. Sullivan PS, Chan JB, Levin MR, Rao J. Urine cytology and adjunct markers for detection and surveillance of bladder cancer. 2010;2(4):412–40.

26. Rhijn BWG Van, Poel HG Van Der, Kwast TH Van Der. Cytology and Urinary Markers for the Diagnosis of Bladder Cancer. 2009;8:536–41.

27. Planz B, Jochims E, Deix T, Caspers HP, Jakse G, Boecking A. The role of urinary cytology for detection of bladder cancer. 2005;304–8.

28. Kos M, Drncová E, Smolová H, Szakacsová M, Getzenberg R, Pavlík I, et al. Urinary Cytology and Quantitative BTA and pTapT1 Bladder Urothelial Carcinoma. 2008;718–22.

29. Hughes JH, Raab SS, Cohen MB. The Cytologic Diagnosis of Low-Grade Transitional Cell Carcinoma. 2000;114(Suppl 1):59–67.

30. Xylinas E, D M, Kluth LA, Rieken M, Karakiewicz PI, Lotan Y, et al. Urine markers for detection and surveillance of bladder cancer. Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig. [Internet]. Elsevier; 2013;1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.06.001

31. Tinzl M, Marberger M. Urinary Markers for Detecting Bladder Cancer. 2003;1:64–70.

32. Shariat SF, Casella R, Wians FH, Ashfaq R, Balko J, Sulser T, et al. European Urology Risk Stratification for BladderTumor Recurrence , Stage and Grade by Urinary Nuclear Matrix Protein 22 and Cytology. 2004;45:304–13.

33. Dey P. Urinary markers of bladder carcinoma. 2004;340:57–65.

34. Kibar Y, Goktas S, Kilic S, Yaman H, Onguru O, Peker AF. Prognostic Value of Cytology , Nuclear Matrix Protein 22 (NMP22) Test , and Urinary Bladder Cancer II (UBC II) Test in Early Recurrent Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. 2006;36(1):31–8.

35. Moussa HS, Nasr MI, Masooud AMRM, Ibrahim IK. Comparative Study of NMP-22 , Telomerase , and BTA in the Detection of Bladder Cancer. 2005;17(3):193–202.

36. Urology A. ANALYSIS OF FALSE-POSITIVE BTA stat TEST RESULTS IN. 4295(00):680–4.

37. Rhijn BWG Van, Poel HG Van Der, Kwast TH Van Der. European Urology Urine Markers for Bladder Cancer Surveillance : A Systematic Review. 2005;47:736–48.

38. Section R. Proteomics-derived Biomarkers for Early Detection of Bladder Cancer Proteomics Derived Biomarkers for Early Detection of Bladder Cancer. 2005;163(August 2003):2003–6.

39. Shariat SF, Karam JA, Lotan Y, Karakiewizc PI. Critical Evaluation of Urinary Markers for Bladder Cancer Detection and Monitoring. 2008;10(2).

40. Jeong S, Park Y, Cho Y, Kim YR, Kim H. Clinica Chimica Acta Diagnostic values of urine CYFRA21-1 , NMP22 , UBC , and FDP for the detection of bladder cancer. Clin. Chim. Acta [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;414:93–100. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.018

41. Sjakste N, Sjakste T, Vikmanis U. ROLE OF THE NUCLEAR MATRIX PROTEINS IN MALIGNANT. 2004;2004:170–8.

42. Hosseini J, Golshan AR, Mazloomfard MM, Mehrsai A. Detection of Recurrent Bladder Cancer. 2012;9(1):367–72.

43. Nguyen CT, Jones JS. De W ning the role of NMP22 in bladder cancer surveillance. 2008;51–8.

44. Horizon Scanning Technology Prioritising Summary NMP22 BladderChek Diagnostic test for bladder cancer Update : November 2009. 2009;(November).

45. Urology A. VALUE OF URINARY NMP-22 IN PATIENTS WITH RENAL. 1994;4295(02):593–7.

46. Surveillance HE, Hb G. NMP22 - Differential Diagnostic Algorithm - Differential Diagnostic Algorithm - UROLOGIST. 2007;69(2):3–4.

47. Agarwal A. NMP22 IS A SENSITIVE , COST-EFFECTIVE TEST IN PATIENTS AT RISK FOR BLADDER CANCER. 1999;161(January):62–5.

48. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, Taille AD La, Benson MC, Sawczuk I. Current Concepts in Biomarker Technology for Bladder Cancers. 2000;605:595–605.

49. Hospital L. A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine. 2002;369–73.

50. Hwang TIS, Tsai T, Juang G, Yeh C, Cheng Y, Chou K, et al. Application of the NMP22 Test in the Diagnosis of Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. 2005;(95):1–5.

51. The role of nuclear matrix protein 22 in the detection of persistent or recurrent transitional-cell cancer of the bladder. 1997;016960.

52. Urology A. URINARY NMP22 AND RENAL CELL CARCINOMA. 4295(99):20–3.

53. Urology A. URINARY LEVELS OF NUCLEAR MATRIX PROTEIN 22 IN. 4295(01):940–2.

54. Todenhöfer T, Hennenlotter J, Sc B, Tews V, Gakis G, Aufderklamm S, et al. Impact of different grades of microscopic hematuria on the performance of urine-based markers for the detection of urothelial carcinoma. URO [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;31(7):1148–54. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.10.011

55. Jamshidian H, Kor K, Djalali M. Urine concentration of nuclear matrix protein 22 for diagnosis of transitional cell carcinoma of bladder. Urol. J. [Internet]. 2008 Jan;5(4):243–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19101898

56. At LOTFIFERH. The nuclear / mitotic apparatus protein NuMA is a component of the somatodendritic microtubule arrays of the neuron. 1998;899:887–99.

57. Tang TK, Tang CC, Chao Y, Wu C. Nuclear mitotic apparatus protein (NuMA): spindle association , nuclear targeting and differential subcellular localization of various NuMA isoforms. 1994;1402:1389–402.

58. Zeng C, He D, Bergett SM. Nuclear-mitotic apparatus protein : A structural protein interface between the nucleoskeleton and RNA splicing. 1994;91(February):1505–9.

59. Hu CCTH, Tang TK. NuMA Expression and Function in Mouse Oocytes and Early Embryos. 2004;11529(128):370–6.

60. Abad PC, Mian IS, Plachot C, Nelpurackal A, Bator-kelly C, Lelièvre SA. The C terminus of the nuclear protein NuMA : Phylogenetic distribution and structure. 2004;2573–7.

61. Protein AN. NUCLEAR MATRIX AND CELL PROLIFERATION The role of Nuclear Mitotic. 2011.

62. Lin H, Hsu H, Yeh N. Apoptotic cleavage of NuMA at the C-terminal end is related to nuclear disruption and death amplification. 2007;681–94.

63. Taimen P, Kallajoki M. NuMA and nuclear lamins behave differently in Fas-mediated apoptosis. 2003;

64. Harborth J, Weber K, Osborn M. Epitope mapping and direct visualization of the parallel , in-register arrangement of the double- stranded coiled-coil in the NuMA protein. 1995;14(11):2447–60.

65. Square K. Anti-NuMA antibody (ab36999) 6. 44(0).

66. Abad PC, Lewis J, Mian IS, Knowles DW, Sturgis J, Badve S, et al. in Human Mammary Epithelium. 2007;18(February):348–61.

67. Muralikrishna B, Thanumalayan S, Jagatheesan G, Rangaraj N, Karande AA, Parnaik VK. Immunolocalization of Detergent-Susceptible Nucleoplasmic Lamin A / C Foci by a Novel Monoclonal Antibody. 2004;739:730–9.

68. Na CN. Anti-NuMA (Ab-1), Human (Mouse) Cat. No. NA08. 1980;

69. Sparks CA. Cloning and Cell Cycle Analysis of NuMA , a Phosphoprotein That Oscillates Between the Nucleus and the Mitotic Spindle. 1995;

70. Todorov IT, Philipova PN, Zhelev NZ, Hadjiolov AA. Changes in a nuclear matrix antigen during the cell cycle : interphase and mitotic cells. 1988;62:105–10.

71. Words K. NuMA Expression and Function in Mouse Oocytes and Early Embryos. 2004;1529(128).

72. Witjes JA, Compérat E, Cowan NC, De Santis M, Gakis G, Lebret T, et al. EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2013 Guidelines. Eur. Urol. [Internet]. 2013 Dec [cited 2013 Dec 28];1–15. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283813013109

73. Leow JJ, Martin-Doyle W, Rajagopal PS, Patel CG, Anderson EM, Rothman AT, et al. Adjuvant Chemotherapy for Invasive Bladder Cancer: A 2013 Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. Eur. Urol. [Internet]. European Association of Urology; 2013 Aug 28 [cited 2013 Dec 28]; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24018020

74. Xylinas E, Kluth L a, Lotan Y, Daneshmand S, Rieken M, Karakiewicz PI, et al. Blood- and tissue-based biomarkers for prediction of outcomes in urothelial carcinoma of the bladder. Urol. Oncol. [Internet]. Elsevier; 2013 Dec 11 [cited 2013 Dec 28];1–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332648

75. Qu X, Huang X, Wu L, Huang G, Ping X, Yan W. Comparison of virtual cystoscopy and ultrasonography for bladder cancer detection: a meta-analysis. Eur. J. Radiol. [Internet]. 2011 Nov [cited 2013 Dec 28];80(2):188–97. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452159

76. Koga F, Kobayashi S, Fujii Y, Ishioka J, Yokoyama M, Nakanishi Y, et al. Significance of Positive Urine Cytology on Progression and Cancer-Specific Mortality of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. Clin. Genitourin. Cancer [Internet]. Elsevier Inc; 2013 Oct 26 [cited 2013 Dec 28]; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24169493

77. Thomas F, Noon AP, Rubin N, Goepel JR, Catto JWF. Comparative outcomes of primary, recurrent, and progressive high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. Eur. Urol. [Internet]. 2013 Jan;63(1):145–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985746

78. Bakar SM. Urinary Tumor Markers Could Predict Survival in Bladder Carcinoma. 2012;

ضمائم

ضمائم

ضمیمه الف

Abstract

In the

T.M.U.

Title

A Thesis
Presented for the
Degree of Master of Sciences
In --------

By: -----

Supervisor: Dr. -----

Advisor: Dr. -----

TarbiatModaresUniversity
Faculty of Medical Sciences

2012