

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم  
پزشکی رفسنجان  
سال اول - جلد ۲ - شماره اول

## تعیین جهش در اگزونهای شماره ۵ و ۸ در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی با روش غیر رادیواکتیو PCR-SSCP

محمد رضا میرزایی (۱) (MSPH)، پروین مهدی پور (۲) (Ph.D)، مرتضی عطی (۳) (MD)، حسین تیموری (۴) (Ph.D) غلام رضا اسدی (۱) (MSPH)

- ۱- دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان - دانشکده پزشکی - گروه بیوشیمی - ژنتیک
- ۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده بهداشت - گروه ژنتیک
- ۳- بیمارستان امام خمینی تهران - مؤسسه سرطان (انستیتو کنسر)
- ۴- دانشگاه علوم پزشکی گرگان - دانشکده پزشکی - گروه بیوشیمی - ژنتیک

## چکیده :

زمینه و هدف: سرطان پستان شایعترین سرطان زنان در دنیا میباشد و تغییرات ژنتیکی متنوعی را میتوان در آن مشاهده کرد یکی از شایعترین این تغییرات جهش در ژن  $P53$  است. این ژن یکی از مهمترین مهارکنندهای تومور میباشد و پروتئین مزبور ( $P53$ ) در بسیاری از اعمال سلول نقش دارد. این ژن شامل ۱۱ اگزون است که اگزون‌های چهارگانه ۵ تا ۸ نواحی مرکزی پروتئین که عملکرد  $P53$  را بعده دارد راکد میکند لذا جهش‌های این اگزونها از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و باعث غیرفعال شدن یا سوء عملکرد این پروتئین میگردند.

تعیین جهش‌های این ژن کمک بزرگی در شناخت مکانیسم ژنتیکی شروع و پیشرفت سرطان پستان و در نتیجه تشخیص و درمان به موقع این سرطان میباشد. که هدف این مطالعه نیز تعیین جهش‌های  $P53$  در دو اگزون شماره ۵ و ۸ این ژن بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی که تحت عمل بیوپسی پستان قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم، انجام و پس از تعیین درجه خلوص با روش اسپکتروفوتومتری، جهت تکثیر اگزونهای شماره ۵ و ۸ از روش (PCR) استفاده گردید، با روش (SSCP)، (single strand conformation polymorphism) که روش معمول تعیین جهش برای ژن  $P53$  میباشد محصولات تک رشته‌ای (Single strand) اگزونهای مزبور در ژل پلی‌اکریل آمید الکتروفورز و توسط روش نیترات نقره

رنگ‌آمیزی گردید نهایتاً تغییرات حرکتی باندهای حاصله با نمونه کنترل (طبیعی) مقایسه و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یافته‌ها: پس از آنالیز ژلهای SSCP و مقایسه حرکت باندهای حاصله در ژل با نمونه کنترل، در اگزون شماره ۵ دو مورد و در اگزون شماره ۸ چهار مورد جهش تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه به علت محدود بودن تعداد بیماران و محدودیت زمان انجام تحقیق تنها جهش‌های ژن ۵۳ P در دو اگزون شماره ۵ و ۸ بیماران مبتلا به سرطان پستان فامیلی بررسی شد لذا پیشنهاد می‌گردد، این جهش‌ها در دیگر اگزونها و در مقیاس بزرگتر بررسی گردد تا اولاً کدونهایی که بیشترین درصد جهش را دارا هستند شناسایی شوند و ثانیاً ارتباط این جهش‌ها و مراحل مختلف سرطان پستان و به دنبال آن استفاده کلینیکی نتایج حاصل گردد.

**واژه‌های کلیدی:** سرطان پستان، جهش، ژن ۵۳ P، PCR-SSCP

#### مقدمه :

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان زنان است که شیوعی بین ۸-۱۲٪ در مناطق مختلف جغرافیایی دارد [۱].

در این سرطان تغییرات مختلف سیتوژنتیکی و جهش‌های ژنی را می‌توان مشاهده کرد که بازترین اختلال مشاهده شده در سطح سیتوژنتیکی حذف منطقه کروموزومی ۱۷ P است که این جایگاه، محل فیزیکی ژن مهار کننده تومور P ۵۳ است [۲، ۸، ۱۷]. مولکول P ۵۳ در بسیاری از اعمال حیاتی سلول از جمله تنظیم کپیبرداری، تنظیم همانند سازی، تنظیم سیکل سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش اساسی دارد. [۵، ۱۶]

ژن ۵۳ P با طول kbp ۲۰ در جایگاه ۱۳/۱ p ۱۷ (بازوی کوتاه کروموزم شماره ۱۷) قرار داشته که شامل ۱۱ اگزون بوده و mRNA آن پس از ترجمه پروتئینی با وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون شامل ۳۹۳ اسید آمینه راکد می‌کند.

اگزون شماره ۱ و قسمت اعظم اگزون شماره ۱۱ کدننده نمی‌باشد. ۵ منطقه حفاظت شده در این ژن قرار دارد که مناطق II-V اگزونهای شماره ۵ تا ۸ را شامل شده و بیش از ۹۰٪ جهش‌های این ژن در این مناطق رخ می‌دهند [۱۲]. تعدادی از کدونها بطور شاخص در سرطانهای مختلف بیشتر متحمل جهش می‌شوند که این کدونها را مناطق داغ جهشزا (Hot spots) می‌گویند. علاوه بر جهش نقطه‌ای، حذف آللی P ۵۳ نیز در برخی موارد سرطان پستان گزارش شده است بطوریکه افراد مبتلا به سندروم لی - فرامنی که یکی از آلل‌های P ۵۳ در این افراد بطور زایشی جهش یافته یا حذف شده است چندین برابر افراد طبیعی مستعد ابتلاء به سرطانهای مختلف خصوصاً سرطان پستان می‌باشند [۱۹].

جهش در ژن ۵۳ P به عنوان کلید شروع سرطان پستان (بویژه نوع فامیلی آن) قلمداد می‌گردد [۲]. این جهش‌ها توزیع جغرافیایی خاصی داشته به طوریکه در بعضی مناطق تا ۸۰٪ موارد سرطان پستان با جهش در این ژن همراه است [۲]. با توجه به اهمیت موضوع و اینکه شناخت مکانیسم ژنتیکی سرطان پستان می‌تواند در طراحی تست‌های غربالگری، تشخیص‌های کلینیکی و ارائه الگوی توارثی این سرطان راهگشا باشد، در این مطالعه جهش‌های ژن ۵۳ P در دو اگزون با اهمیت این ژن (اگزونهای شماره ۵ و ۸) در ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی تعداد ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان با سابقه فامیلی ابتلاء به سرطان در شجره‌نامه که به مؤسسه سرطان (انستیتو کانسر) بیمارستان امام خمینی تهران مراجعه و تحت عمل بیوپسی قرار گرفته بودند مطالعه گردیدند.

نمونه‌های لازم که بافت بیوپسی پستان بودند به صورت بلوک‌های پارافینه پاتولوژیکی و یا قسمت کوچکی از بافت تازه بیوپسی شده بیماران به آزمایشگاه ژنتیک دانشکده بهداشت دانشگاه تهران ارسال می‌شد.

با روش معمول فنل، کلروفرم استخراج DNA انجام گرفت بدین ترتیب که پس از پارافینه زدایی برشای بلوک پاتولوژیکی و یا خرد کردن بافت‌های تازه، آنها را در لوله آزمایش ریخته و به هر لوله آزمایش ۱/۵ mM, Tris-HCl ۱۰۰ mM, EDTA ۱۰ mM, Nacl ۱۰۰ mM، ۰/۱ میلی‌لیتر با فرلیز کننده (۲۴:۱) دوبار شستشو پروتئیناز K (mg/ml) ۲۵ (اضافه به مدت ۱۶-۲۴ ساعت در ۴۸۰°C).

پس از این مدت به هر لوله ۱/۵ میلی‌لیتر فنل به تعادل رسیده با Tris-HCl افزوده و پس از مخلوط کردن و سانتریفوژ (دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه) محلول بالایی (Supernatant) جدا و مجددأً توسط فنل (یکبار) و مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) دوبار شستشو می‌گردید. مجددأً پس از سانتریفوژ محلول بالایی جدا و به نسبت دو برابر حجم آن اتانل ۹۶% و به نسبت ۱/۰ حجم آن استات سدیم (M) ۳ (اضافه و سپس به مدت ۱۶-۲۴ ساعت در ۲۰۰°C- نگهداری و پس از آن سانتریفوژ گردید، رسوب DNA جدا و سه بار توسط اتانل ۷۵% شستشو و نهایتاً رسوب DNA در بافر Tris-HCl 10mM, EDTA 100mM (TE) حل می‌شد.

پس از تعیین درجه خلوص DNA با روش اسپکتروفوتومتری (نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر) جهت تکثیر اگزونهای مورد نظر از روش PCR استفاده گردید. پرایمرهای استفاده شده برای اگزون شماره ۵ رشته‌های رهبر و پیرو به ترتیب ۵ GACTTTCAACCTCTGT CTCCT3 و ۵ CTGGGGACCCTGGGAAACCA3 و پرایمرهای استفاده شده اگزون شماره ۸ برای رشته‌های رهبر و پیرو به ترتیب TGAATCTGAGGCATAATCTGC35 CCTTACTGCCTCTGCTTC35 که بر اساس توالی ۲۰ نوکلئوتید سمت ۳ و ۵ اگزونهای مورد نظر طراحی و ساخته شده بودند. ۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR شامل ۳۰ از هر پرایمر، M Pmol ngr (dNTP)، ۱۰۰ ژنومیک و یک واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq در بافر PCR تهیه و به هر میکرولیوب PCR اضافه گردید. PCR در دو مرحله انجام شد بدین ترتیب که برای اگزون شماره ۵ مرحله اول با شرایط ۹۴۰°C (۳ دقیقه) و ۵۴۰°C (۱ دقیقه) و ۷۲۰°C (۱ دقیقه) برای سه سیکل و مرحله دوم برای ۳۲ سیکل با شرایط ۹۴۰°C، ۹۴۰°C و ۷۲۰°C هر کدام یک دقیقه انجام گردید. برای اگزون شماره ۸ مرحله اول در سه سیکل با شرایط ۹۴۰°C به مدت ۲ دقیقه و ۵۵۰°C و ۷۲۰°C هر کدام یک دقیقه و برای ۳۲ سیکل مرحله دوم شرایط ۵۵۰°C و ۷۲۰°C هر کدام به مدت یک دقیقه انجام شد. به منظور

اطمینان از انجام موفق PCR محصولات در ژل آگاروز ۱٪ و در بافر TBE (M) ۰/۵ M,EDTA ۰/۴۴۵ M,Boric Acid ۰/۴۴۵ Tris-base) گردید.

جهت انجام SSCP، محصولات PCR نمونه‌های مختلف مطابق روش زیر در ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفورز و تعیین جهش گردیدند. بدین ترتیب که ابتدا محصولات PCR به منظور تک رشته‌ای شدن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C قرار گرفتند و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل گردیدند. از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰٪ در سیستم الکتروفورز عمودی برای انجام SSCP استفاده گردید، بدین منظور ۵ میکرولیتر محصول PCR و ۵ میکرولیتر با فر SSCP (فرمایید ۹۵٪، هیدروکسید سدیم mM ۱۰، برموفنلبلو ۰/۰۵٪ و گزیلین سیانول ۰/۰۵٪) با هم مخلوط و به چاهک‌های ژل اضافه و الکتروفورز انجام شد (۱۵ ساعت با ولتاژ ۷۰ و در بافر ۰/۶٪ TBE).

رنگ آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام گرفت بدین صورت که ژل در محلول A (اتانل ۱۰٪ و اسید استیک ۰/۵٪) به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه به محلول B (نیترات نقره ۰/۱٪) انتقال یافت آنگاه تا ظاهر شدن باندهای ژل در محلول C (۹/۴ میلی‌لیتر NaOH ۱۰ N، ۲۵ میلی‌لیتر ۱٪ NaBH<sub>4</sub>) و یک میلی‌لیتر فرمالدئید در حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر [ نگهداری و نهایتاً ژل به مدت ۵ دقیقه در محلول D (بی‌کربنات سدیم ۰/۷۵٪) قرار داده شد و پس از شستشو با آب مقطر باندها مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند.

#### نتایج:

مشخصات هیستوپاتولوژیکی تومور، سن و جنس بیماران در جدول (شماره ۱۵) آمده است تمامی بیماران دارای سابقه ابتلاء به سرطان در خانواده بودند. از ۳۲ بیمار دارای سرطان پستان مورد مطالعه ۶/۲۵٪ بیماران مرد و ۹۳/۷۵٪، زن ، ۱۶/۱٪ سن زیر ۳۲ سال و ۸۳/۹٪ سن بالای ۳۲ سال و ۴۵/۱٪ چهار درگیری غدد لنفاوی بودند. تشخیص پاتولوژیک بیماری در ۸۷/۵٪ (Inv.D.C)، ۳/۱٪ (infiltrating ductal carcinoma) Inf.D.C و ۳٪ (invasive Lobular carcinoma) Inv.L.C) بود. درجه تفکیک و تمایز تومور در ۵۸/۶٪ درجه III و بقیه درجه I-II، ۴۴٪ درگیری پستان سمت راست و ۵۶٪ درگیری پستان سمت چپ داشتند.

استخراج DNA بطور موفقیت‌آمیزی انجام گرفت و نتیجه تعیین درجه خلوص DNA (نسبت جذب نوری در nm ۲۸۰ nm ۲۶۰ nm ۲۶۰) در تمامی موارد در حد قابل قبول (۱/۳-۱/۷) بود. برای اطمینان از انجام PCR، محصولات PCR در آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردیدند (شکل شماره ۱) همانگونه که ملاحظه می‌گردد PCR با موفقیت بسیار خوبی انجام گرفته است.

شکل شماره ۲ نمونه‌ای از الکتروفورز SSCP اگزون شماره ۵ پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره می‌باشد. باندهای شماره ۲ و ۹ که متعلق به دو بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی می‌باشند، بطور مشخصی حرکت متفاوتی از نمونه کنترل و نیز نمونه‌های دیگر بیماران دارند که نشان دهنده تغییر نوکلئوئیدی (متواسیون نقطه‌ای) در این دو بیمار می‌باشد. بالاخره نتیجه SSCP، ۳۲ بیمار مورد مطالعه نشان

## بررسی فراوانی افراد غیر ایمن ... علی شمسی شاهم آبادی

داد که در اگزون شماره ۵ دو مورد و در اگزون شماره ۸ چهار مورد جهش اتفاق افتاده است. نتایج با آزمون آماری FISHER EXACT جهت تعیین میزان ارتباط جهش‌های شناخته شده و فاکتورهای متعدد دخیل در سلطان پستان بررسی و مقایسه گردید. بین جهش در اگزونهای شماره ۵ و ۸  $\chi^2 = ۵.۳$  و سن بیماران ارتباط معنیداری یافته نشد ( $P = ۰.۰۵$ ) همچنین ارتباط جهش‌های ذکر شده و درگیری غدد لنفاوی ( $P = ۰.۷۵$ )، تشخیص پاتولوژیک ( $P = ۰.۲۷$ )، درجه تمايز تومور ( $P = ۰.۳$ ) و درگیری پستان سمت راست یا چپ ( $P = ۰.۳۷$ ) در حد معنیداری نبود.

## بحث:

این پژوهش بخشی از یک طرح تحقیقاتی کلی میباشد که به منظور تعیین جهش‌های ژن  $P53$  در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی در جامعه ایرانی توسط وزارت بهداشت و درمان مصوب شده بود. نتیجه این تحقیق نشان داد که در ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی مطالعه شده در اگزون شماره ۵ دو جهش ( $6/25\%$ ) و در اگزون شماره ۸ چهار جهش ( $12/5\%$ ) اتفاق افتاده است. در مطالعات قبلی میزان جهش تعیین شده برای اگزون شماره ۵ در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی در جوامع مختلف، متفاوت بوده است. بطوریکه بر اساس مطالعات گزارش شده در بخشی از جامعه ژاپن آن را  $7\%$  ( $11$  و  $12$ )، در جامعه هلند  $17\%$  ( $4$ ) و در استرالیا  $12\%$  ( $10$ ) اعلام نموده‌اند. در مورد اگزون شماره ۸ در بخشی از جامعه ژاپن میزان جهش آن را در مبتلایان به سرطان پستان فامیلی  $28\%$  ( $11$  و  $12$ ) و در بخش دیگری از جامعه ژاپن  $5/2\%$  ( $1$  و  $12$ ) و در بخشی از جامعه استرالیا  $24\%$  ( $10$ ) و در هلند  $17\%$  ( $4$ ) گزارش کرده‌اند.

بنابراین فراوانی جهش‌های  $P53$  در سرطان پستان توزیع جغرافیایی دارد و می‌توان نتیجه‌گیری نمود عوامل محیطی که در اتیولوژی سرطان پستان نقش دارند بر نحوه جهش‌زایی ژنها نیز مؤثرند برای مثال در شمال ژاپن میزان کل جهش  $P53$  در مبتلایان به سرطان پستان  $\approx 81\%$  در حالیکه در جنوب این کشور این میزان،  $21\%$  گزارش شده است ( $11, 12$ ). لذا با توجه به وجود قومیت‌های مختلف در ایران اولاً لازم است میزان جهش‌ها در جامعه ایرانی و در ثانی در قوم‌های مختلف (همانند بسیاری از کشورها) به طور دقیق تعیین گردد.

مطالعه جهش‌های  $P53$  توسط تکنیک‌های مختلف انجام می‌گیرد که متداولترین آنها عبارتند از شکست RNA's ، الکتروفورز ژل با شب و اسرشتی ، برش شیمیایی جفت شدگی ناجور ، تجزیه و تحلیل هترو و دوبلکس ، آزمایش پروتئین ناقص شده و چند شکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP). از این میان روش PCR-SSCP متداولترین روشه است که جهت تعیین جهش‌های ژن  $P53$  توسط محققین استفاده می‌شود ( $3$ ) . اساس این روش آن است که قطعات با طول کمتر از  $300$  جفت باز چنانچه حتی یک نوکلئوئید نسبت به حالت طبیعی تغییر کرده باشد در شکل سه بعدی تک رشته‌ای DNA (Single strand) حرکتی متفاوت از حالت طبیعی در ژل خواهد داشت، با توجه به اینکه طول قطعات اگزونهای مورد مطالعه کمتر از  $300$  جفت باز بوده و نیز سادگی، سریع و ارزان بودن این روش و دقت بالای آن (میزان دقت روش مذکور جهت تعیین جهش  $90\%$  می‌باشد) ( $3$ ) . از این روش جهت تعیین جهش‌های ژن  $P53$  استفاده گردید. برای حصول اطمینان قطعی از جهش باید محصولات PCR اگزونهای جهش‌یافته در روش SSCP ، تعیین توالی شده و نوع تغییر نوکلئوئیدی به طور دقیق مشخص گردد اما در زمان انجام این طرح امکان این مرحله میسر نبود. به هر حال نتیجه این تحقیق میزان جهش‌های موجود در اگزون شماره ۵ و ۸ ژن  $P53$  در ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان فامیلی مورد مطالعه را مشخص نمود اما با توجه به محدود بودن تعداد بیماران و رسالت این بخش از تحقیق که وظیفه تعیین جهش در همین تعداد بیماران را به عهده داشت جهت نتیجه‌گیری کلی باید منتظر ارائه نتایج پایان طرح شد و با استفاده از نتایج مطالعات انجام شده در نقاط مختلف جغرافیایی جهان کدونهای حساس به جهش (Hot Spots) شناسایی شده و در طراحی تست‌های غربالگری و تشخیص‌های کلینیکی استفاده گردد.

بررسی فراوانی افراد غیر ایمن ...  
علی شمسی شاهم آبادی

جدول شماره ۱: مشخصات هیستوپاتولوژی، سن، جنس و سابقه  
فamilی ابتلاء به سرطان ۳۲ بیمار مبتلا به سرطان پستان

شماره بیمار	جنس	سن	نوع تومور	قطر تومور <i>Cm</i>	درجه تمایز	دد درگیری لتفاوی	پستان درگیر	سابقه خانوادگی
۱	<i>F</i>	۲۳	<i>inv.D.C</i>	۲	<i>III</i>	+	<i>L</i>	+
۲	<i>F</i>	۴۳	<i>inv.D.C</i>	۱/۳	<i>II</i>	+	<i>R</i>	+
۳	<i>F</i>	۳۸	<i>inv.D.C</i>	۴/۵	<i>III</i>	-	<i>L</i>	+
۴	<i>M</i>	؟	<i>inv.D.C</i>	۲	?	-	<i>L</i>	+
۵	<i>F</i>	۴۰	<i>inv.D.C</i>	۱/۳	?	+	<i>R</i>	+
۶	<i>F</i>	۳۴	<i>inv.D.C</i>	۲/۵	<i>III</i>	+	<i>L</i>	+
۷	<i>F</i>	۴۵	<i>inv.D.C</i>	۲/۵	<i>III</i>	-	<i>R</i>	+
۸	<i>F</i>	۵۶	<i>inv.D.C</i>	؟	<i>III</i>	+	<i>R</i>	+
۹	<i>M</i>	۷۵	<i>inv.D.C</i>	؟	?	؟	<i>R</i>	+
۱۰	<i>F</i>	۵۰	<i>inv.D.C</i>	۱/۵	<i>III</i>	-	<i>R</i>	+
۱۱	<i>F</i>	۴۴	<i>inv.D.C</i>	؟	<i>I-II</i>	-	<i>R</i>	+
۱۲	<i>F</i>	۵۰	<i>inv.D.C</i>	۲/۵	<i>II-III</i>	-	<i>L</i>	+
۱۳	<i>F</i>	۵۳	<i>inv.D.C</i>	۱	<i>II-III</i>	-	<i>L</i>	+
۱۴	<i>F</i>	۴۲	<i>inv.D.C</i>	۲/۵	<i>III</i>	-	<i>L</i>	+
۱۵	<i>F</i>	۴۸	<i>inv.D.C</i>	۳	<i>II-III</i>	-	<i>L</i>	+
۱۶	<i>F</i>	۳۰	<i>inv.D.C</i>	؟	<i>II-III</i>	-	<i>L</i>	+
۱۷	<i>F</i>	۴۰	<i>F</i>	۴	<i>II-III</i>	-	<i>R</i>	+
۱۸	<i>F</i>	۶۷	<i>inv.D.C</i>	۲/۵	<i>II-III</i>	-	<i>R</i>	+
۱۹	<i>F</i>	۶۵	<i>inv.D.C</i>	۲	<i>III</i>	-	<i>R</i>	+
۲۰	<i>F</i>	۴۲	<i>inv.D.C</i>	۴	<i>II</i>	-	<i>L</i>	+
۲۱	<i>F</i>	۴۸	<i>inv.D.C</i>	؟	<i>II</i>	-	<i>R</i>	+
۲۲	<i>F</i>	۴۵	<i>inv.D.C</i>	؟	<i>III</i>	-	<i>R</i>	+
۲۳	<i>F</i>	۳۴	<i>inv.D.C</i>	؟	<i>II</i>	-	<i>L</i>	+
۲۴	<i>F</i>	۳۸	<i>inv.D.C</i>	۲	<i>III</i>	-	<i>L</i>	+
۲۵	<i>F</i>	۳۶	<i>inv.D.C</i>	۲/۲	<i>III</i>	-	<i>R</i>	+
۲۶	<i>F</i>	۴۱	<i>inv.D.C</i>	۱/۹	<i>III</i>	-	<i>L</i>	+
۲۷	<i>F</i>	۳۴	<i>inv.D.C</i>	۷/۵	<i>III</i>	-	<i>L</i>	+
۲۸	<i>F</i>	۷۵	<i>inv.D.C</i>	۷	<i>III</i>	+	<i>L</i>	+

۲۹	<i>F</i>	۷۲	<i>inv.D.C</i>	۳	<i>II</i>	-	<i>L</i>	+
۳۰	<i>F</i>	۴۹	<i>inv.D.C</i>	۳/۵	<i>II</i>	-	<i>R</i>	+
۳۱	<i>F</i>	۵۲	<i>inv.D.C</i>	؟	?	-	<i>R</i>	+
۳۲	<i>F</i>	۳۶	<i>inv.D.C</i>	۳/۵	<i>III</i>	+	<i>R</i>	+

F (Female), M(Male)inv. D.C (invasive ductal carcinoma)inv. L.C (invasive lobular carcinoma), inf.D.C(infiltrating ductal carcinoma, L(Left), R(Right)

PCR شکل شماره ۱: الکتروفوز تعدادی از محصولات  
۵۳ ژن اگزون P

اگزون شماره ۵ زن **SSCP** شکل شماره ۲: نمونه ژل  
نمونه های ۲ و ۹ حرکتی متمایز از دیگر **P** ۵۳  
نمونه ها و نمونه کنترل داشته جهش تلقی می شود.

**C= Control**

**M= Marker V**

۱- مهدی پور پروین جنبه های ژنتیک سرطان پستان چاپ اول موسسه  
نشر، کلمه تهران ۱۳۷۶، ۱۴۲-۱۳۹

- ۲ Bchn M and Schverman M, Ggenetic alterations in breast cancer, Gene chromosome cancer.(1998); 14:227-251
- 3- Bich L, and Lide reav R Sensitive detection of P53 gene Mutant enriched PCR- SSCP technique. Nucleic acid reserch (1995); 2615:1356- 58.
- 4-) Broved C Verdier F and Sovssi T P53 gene mutation. Nucleic acid research (1996); 24:147-250.
- 5-) Chen A, Neubauer, W and kurisu FM etal.loos of heterozygosity on the short arm of chromosom 17 is associated with high proliferative capacity and DNA aneuploidy in primary human breayt cancer. ploc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996); 88(9):572-585.
- 6- Davidoff AM and Humphrey PA., etal. Genetic basis for P53 overexpression in human breast cancer proc. Natl. Acad. Sci. USA.(1991); 88(11):724-32
- 7) Faid D and Easton DF. the genetics of breast and orarian cancer. Br. J. cancer. (1995); 72: 805-12
- 8) Frebourg J, kassel J and lam KT. etal. Germ- line mutation of the P53 Tumor supressor gene in patients with high risk for cancer inactivato the P53 protein. proc. Natl. Acad. sci. USA. 1992; 89(14):1240-52.
- 9) Frebovry T and Barbier N etal. Germ-line P53 mutation in families with li-fraumeni syndrome, Am. J. Hum. Genet (1995); 56:608-615.
- 10- Greenblatt MS, Bennett W.P , Hollstein M and Harris M. Mutations in the P53 tumor supressor gene, cancer Reserch (1994); 54:4855-78
- 11- Hartmann A and Blaszyk A etal. P53 gene mutation inside and outside of exons 5-8: The patterns differ in breast cancer. oncogene (1995); 10:681-88
- 12) Kleihues P and Schavble B etal. tumors aassocaited with P53 germline mutations A synopsis of 91 families. AM. J pathology (1997); 150:1-9.
- 13) Levine A Momand J and Finalay CA. the P53 Tumour suppressor gene. Nature (1991); 351:453-55.
- 14) Moline R Segui MA and Climent MA etal. P53 on coprotein as a prognostic Indicator in patients with breast cancer. Anti- cacer Research (1998); 18:507-512
- 15) Moll UM Riou G and levine AJ. Tow distinct Mechanisms alter P53 in breast cancer: mutation and nuclrar exclusion. proc - Natl. Acad. USA (1992); 89(15):1320-28.
- 16) Polya K YongXia J and Kenneth W etal. A model for P53- induced apoptosis. Nature (1997); 389:300-305
- 17)Tornalet S Bates S and gred P. A high-resolution analysis of chromatin stucture along P53 sequences. molecular carcinogenesis (1996); 17:192-201.

---

## Detection of P 53 gene mutations in exons 5 and 8 in patients of familial breast cancer with PCR-SSCP methode.

**M.R Mirzaei (1) , P.Mehdipour (2) , M.Atri (3) , H.Teimouri (4) , GH.Asadi (1)**

1- Department of biochemistry-genetics, Rafsanjan School of Medicine, RAFSANJAN-IRAN

2- Department of Genetics, Faculty of healths, medical University of Tehran, TEHRAN-IRAN

3- Cancer institute, Imam Khomini Hospital, TEHRAN-IRAN

4- Department of biochimistry-Genetics, Gorgan School of Medicin GoRGAN-IRAN

**Background:** Breast cancer is one of the most common cancer of women in the world. Although different genetic alteration has been reported in this malignancy, but P 53 gene mutations has more frequency. P 53 gene is one of the most important suppressor genes and it play a central role in breast cancer and detecting of mutations in this gene would be very helpful in understanding of genetic mechanisms in intiation and progress of this cancer.

**Materials – Methods:** 32 patients with familial breast cancer were selected and biopsy of breast as sample were studied. DNA extraction were performed by phenol-chloroform method and polymerase chain reaction (PCR) for amplification of exons 5 and 8 were carried out. Inorder to detection of mutations SSCP (single strand conformation polymorphism) method was used and SSCP polyachrilamid gels were staind by silver nitrate. Abnormal band incompare with controls were selected as matation.

**Results:** 2 mutations in exon 5 and 4 mutations in exon 8 were detected by analysing of SSCP gels. There were not found any statistical differences relationship between breast cancer and different tumour establisher agents.

**Discussion:** Mutation of P 53 gene has been known as starter of breast cancer in the different population. In some area mutation of P 53 gene is cause of breast cancer with 80% frequency.

Due to some limitation in our study, such as: number of patients and exons that were studied, could not conclude an exact interpretation between P 53 gene mutation and breast cancer.

In order to reveal dominant P 53 gene mutations in iranian people, we recommend to perform this study on more patients with breast cancer and all exons of P 53 gene in Iran.

**Key words:** Breast cancer, P53 gene, Mutation, PCR-SSCP

