Short Commnucation

Design and Expression of Recombinant HER-2 Antigen as a Marker for Detection of Breast Cancer

Marjane Kazemi[1], Jafar Amani[2*], Ali Hatef Salmanian[3], Mohammad Mahdi Forghanifard[4], Hossein Aghamollaei[5]

1- M.Sc. Student, Department of Biology, Islamic Azad University of Damghan, Damghan, Iran
2- Assistant Professor, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associated Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University of Damghan, Damghan, Iran
5- Ph.D. Candidate, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O. Box 19395-5487, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: Jafar.amani@gmail.com

Received: 18/May/2014, Accepted: 17/Sep/2014

Abstract

Objective: The incidence of breast cancer is approximately one million which makes this cancer one of the most common among women worldwide. Breast cancer comprises 7% of the total death rate caused by cancers. Several strategies that use tumor-associated antigen (TAA) vaccination and early detection of breast cancer are clinically being developed. Breast cancer is caused by increased over expression of certain genes. HER-2 is a tyrosine kinase receptor in the epidermal growth factor family. The role of HER-2 in breast cancer has been extensively studied. HER-2 is found in 25%-30% of breast cancer patients. Herceptin, a human antibody, is used as a therapeutic target for HER-2. The purpose of this study is to produce recombinant protein HER-2 for early detection of breast cancer cells.

Methods: We used specific primers to amplify the HER-2 gene. The amplified gene was cloned into pET28a as an expression vector. Cloning was confirmed by restriction analysis and sequencing. Expression was induced using IPTG and the recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE.

Results: Cloning of the HER-2 gene was confirmed by enzyme digestion and sequencing. The gene was expressed in *E.coli* BL21 DE3. The pET-28a vector which contained the HER-2 gene showed a high level of expression. The recombinant protein was confirmed by Western blot analysis.

Conclusions: A portion of the HER-2 gene was expressed as a recombinant in *E.coli*. This could be a good diagnostic test for breast cancer.

Keywords: Cloning and Gene Expression, her-2 Gene, Recombinant Protein Expression, Breast Cancer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 17 (2014-2015), No. 4, Pages: 89-99

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

مقاله کوتاه

طراحی و بیان آنتی‌ژن نوترکیب HER-2 به‌عنوان نشانگر تشخیصی سرطان سینه

مرجانه کاظمی[1]، جعفر امانی[2*]، علی هاتف سلمانیان[3]، محمد مهدی فرقانی فرد[4]، حسین آقا مولایی[5]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان ، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان ، ایران
۵- دانشجوی دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی ۵۴۸۷ –۱۹۳۹۵، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی
Email: Jafar.amani@gmail.com

دریافت مقاله: ۹۳/۰۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۶/۲۶

چکیده

هدف: سرطان سینه با شیوع حدوداً یک میلیونی یکی از معمول‌ترین سرطان‌ها در میان زنان سراسر جهان است و هفت درصد مرگ و میرهای ناشی از سرطان را شامل می‌شود. راهبردهای ایمنی‌زایی و شناسایی زود هنگام متعددی با استفاده از آنتی‌ژن‌های سطحی سرطان سینه هم‌اکنون به‌صورت بالینی توسعه یافته است. در واقع سرطان سینه در اثر افزایش بیان بیش از حد یک سری از ژن‌ها ایجاد می‌شود. HER-2 به‌عنوان گیرنده تیروزین کینازی در خانواده گیرنده‌های عامل رشد اپیدرمی قرار دارد. نقش HER -2 در سرطان سینه به‌طور گسترده مطالعه شده است. HER-2 تنها در ۲۵–۳۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان سینه شایع بوده و هدف درمانی HER-2 با آنتی‌بادی‌های انسانی مثل هرسپتین ثابت شده است. هدف از این تحقیق تولید پروتئین نوترکیب HER-2 به‌منظور تشخیص زود هنگام سرطان سینه است.

مواد و روش‌ها: بخشی از ژن her-2 با طراحی آغازگر مناسب به‌وسیلهٔ PCR تکثیر شده و سپس درون ناقل پلاسمیدی pET28a برای بیان کلون شد، پس از تأیید فرآیند کلونینگ با روش‌های هضم آنزیمی و تعیین توالی، بیان این ژن در باکتری اشریشیا کلی با استفاده از IPTG القا و سپس پروتئین مورد نظر توسط ژل SDS-PAGE بررسی شد.

نتیجه‌گیری: بخشی از ژن her-2 انسانی به‌صورت نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی بیان شد که می‌تواند یک عامل تشخیصی مناسب برای سرطان سینه باشد.

کلید واژگان: کلون و بیان ژن، ژن her-2، تولید نوترکیب پروتئین، سرطان سینه

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، صفحات: ۸۹-۹۹

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ و میرهای فراوانی در بین زنان می‌شود و با وجود پیشرفت‌های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته است، قریب ۵۰۰۰۰ زن مبتلا در سال دچار متاستاز (Metastasis) می‌شوند [۱، ۲] این سرطان شایع‌ترین سرطان در زنان است که ۳۳ درصد از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

موارد سرطان را شامل می‌شود [۱، ۳، ٤]. پس از سرطان ریـه، شایع‌ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان محسوب می‌شود که عامل ۱۹ درصد از مرگ و میرهای وابسته به سرطان در زنان است [٥]. بنابراین سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در ایران و جهان است با این تفاوت که به‌دلایل نامشخصی سن ابتلا به این نوع سرطان در ایران یک دهه کاهش یافتـه اسـت [٦]. میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ٥٦ سال و در ایران ٤٥ سال است [٦]. درصد بالایی از مبتلایان به سرطان سینه (۷۰–۸۰ درصد) در مراحل ابتدایی قابل درمان هستند در این بیماران نقش درمان‌های کمکی(شیمی درمانی و هورمون درمانی) تأیید شده است. بیمـاران در مراحـل بـالاتر بدون وجود متاستاز نیز با درمان‌های کمکی در ۳۰–۵۰ درصد موارد درمان قطعی می‌یابند. بسیاری از بیماران به علـت عـود ناشی از سرطان فوت می‌کنند؛ بنابراین استفاده از روش‌هـا و داروهای جدیدتر در این بیماران بسیار ضروری است و این امر مگر با شناخت بیشتر عوامل جدید و مؤثر در پیش‌آگهی و عود بیماران مقدور نخواهد بـود [۷]. از جملـه عوامـل مطـرح در پیش‌آگهی جهـش در ژن پروتوانکـوژن her-2 اسـت [۸]. ژن گیرنـده عامـل رشـد اپیـدرمی انسـان (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2: HER-2) که با نـام *C-erbB-2/neu* یا her-2/neu نیز خوانده می‌شود، در سلول‌های طبیعی یک گیرنده گلیکوپروتئینی غشایی بـا ۱۲۵۵ آمینواسـید و وزن ۱۸۵ کیلودالتون با فعالیت تیروزین کینازی را کد مـی‌کنـد کـه وظیفه آن انتقال پیام‌های تنظیمی برای رشد سـلول اسـت [۹، ۱۰]. HER-2 دومین عضو خانواده her از کلاس I گیرنده‌های تیروزین کینازی عوامل رشد است. خانواده her شامل her-1، her-2، her-3 و her-4 است. HER-2 قادر است همودایمر یـا هترودایمر با اعضای دیگر خـانواده HER تشـکیل دهـد [۱۱]. هترو دایمر شدن آن بستگی به لیگاند سـایر اعضـای خـانواده EGFRها دارد [۸]. اتصال لیگاند به این کمپلکس روی سـطح سلول باعث فعال شدن فعالیت تیروزین کیناز داخلـی شـده و سبب انتقال پیام می‌شود. این مسئله باعث انتقال پیام از طریـق غشای سلول و فضای داخل سلولی به هسته شده و باعث تغییر در فعالیت ژن‌ها می‌شود [۱۲، ۱۳]. سلول‌های سالم دارای یک کپی از ژن ERBB-2 (Receptor Tyrosine-Protein Kinase) روی هر کروموزوم ۱۷ خـود هسـتند. HER-2 شـایع‌تـرین و مهم‌ترین نشانگرتومور در سرطان سینه است [١٤] به‌طوری که در ۲۵–۳۰ درصد سرطان‌های مهاجم پستان به میـزان زیـادی بیان مـی‌شـود [۹، ۱۵]، (دو میلیـون مولکـول HER-2 در هـر سلول به جای ۲۰۰۰۰ مولکول در هر سلول در حالت طبیعی) افزایش بیان و در نتیجه فعالیت گیرنده باعث تولید پیام بیشتر، تقسیم بیش از حد سلولی و در نهایت ایجاد تومور مـی‌شـود [١٦] بنابراین افزایش بیان گیرنده نقش مستقیم در رفتار بـالینی و زیستی سلول‌های توموری HER-2 مثبت دارد [۱۷–۲۰].

تکثیر و بیان بیش از حد HER-2 در سـلول‌هـای سـرطان سینه با افزایش اندازه تومور، افزایش طول فاز s چرخه سلولی، آنیوپلوییـدی (Aneuploidy) و کـاهش بیـان گیرنـده‌هـای هورمون‌های استروژن و پروژسترون همراه است و تومورهایی که حاوی افزایش این پروتئین هستند تمایل به رشـد بیشـتر و سریع‌تری دارند. یـک چنـین سـرطان‌هـایی در برابـر درمـان هورمونی و یک‌سری از روش‌های شیمی درمانی مقاوم هستند [۱۲]. نشانگرهای تومور معمولاً بـرای تشـخیص زود هنگـام سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد که می‌توان بـه مـوارد زیـر اشـاره نمـود، خـانواده موسـین (MUC) شـامل CA27.29، CA15-3، خـانواده پـروتئین‌هـای انکوفتـال (Oncofetal Antigen) شامل CEA (Carcinoembryonic Antigen) و انکوپروتئین‌ها شامل P53، C-myc و c-erbB2، (HER-2) [۲۱، ۲۲]. به‌طور کلی میزان رسوب‌دهی اریتروسیت [۲۳]، همچنین ژن‌ها PAI (Plasminogen Activator Inhibitor Type 1)، UPA (Urokinase-type Plasminogen Activator)، VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)، BRCA2 (Breast Cancer 2)، BRCA1، CadherinE، CI، PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)، CD، CB (Cannabinoid Receptor Type 1) [۲۱، ٢٤] و گیرنده‌های

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

استروژن و پروژسترون و ماماگلوبین (Mammaglobin) به‌دلیل این‌که در تعیین اولیه سرطان حساسیت کمی (۱۵–۲۵ درصد) دارند نمی‌توانند برای اهداف تشخیصی مفید واقع شوند [۲۵]، به همین دلیل نشانگرهای تومور (Tumor Marker) در تشخیص بسیار اهمیت دارند. در اکثر روش‌های تشخیصی و درمانی نیاز به مقادیر قابل توجهی از پروتئین تشخیصی است. از آن‌جایی که خالص‌سازی این پروتئین از سلول‌های سینه بسیار پرهزینه بوده و بهره‌وری کمی دارد بایستی از روش‌های دیگری مانند مهندسی ژنتیک برای دستیابی به پروتئین مورد نظر بهره گرفت. هدف از این تحقیق تولید پروتئین نوترکیب HER-2 به‌عنوان یک آنتی‌ژن شاخص در سرطان سینه است که می‌توان از آن در الایزا به‌عنوان تشخیص زود هنگام سرطان سینه استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

مواد

مواد شیمیایی و آنزیم‌ها و سویه‌های باکتریایی

آنزیم Pfu DNA Polymerase، T4 DNA Ligase و آنزیم‌های اندونوکلئاز محدود کننده از شرکت سیناکلون (ایران) تهیه شد. کیت جداسازی DNA از ژل و کیت تخلیص پلاسمید از شرکت Bioneer کره جنوبی تهیه و آغازگرها (Primers) به شرکت ژن فناوران (ایران) سفارش داده شد. باکتری E.coli DH5α برای اهداف کلون‌سازی و تکثیر و باکتری E.coli BL21 DE3 به‌عنوان میزبان بیانی و پلاسمید pET28a که از شرکت Life Science Research (Novagen، آلمان) تهیه شده بود، به‌عنوان ناقل بیانی استفاده شد. ستون Ni-NTA Agarose از شرکت QIAGEN (هلند) تهیه شد.

روش‌ها

۱) تکثیر ژن her-2 با استفاده از PCR

برای تکثیر بخشی از ژن her -2، از ژن دو قسمتی her-2-muc1 به‌عنوان آنتی‌ژن دوگانه (KF 430636) که قبلاً ساخته شده بود استفاده شد [۱۸، ۲۶]. برای تکثیر قطعه ژن مورد نظر، نیاز به آغازگرهای مناسب بود که برای این کار از نرم‌افزارهای Oligo و DNASIS استفاده شد. توالی آغازگر فرادست 5- ATA TAT GGA TCC CCG TGG GAT CAA CTG -3' به‌گونه‌ای طراحی شد که جایگاه برش آنزیمی BamHI در بخش ابتدای '۵ آن قرار گیرد. آغازگر فرودست شامل توالی 5-GAC CAG AAG CTT TTA TTC TTC GTC CGG -3' بود که جایگاه برش آنزیمی HindIII در ابتدای '۵ آن طراحی شد. واکنش PCR با آنزیم Pfu DNA Polymerase و آغازگرهای ذکر شده با استفاده از ۱۰ نانوگرم DNA الگو (پلاسمید حاوی ژن دو قسمتی که قبلاً ساخته شده بود) در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. برنامه PCR برای ازدیاد قطعه مورد نظر به شرح زیر انجام گرفت؛ ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد سپس ۳۵ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل: ۱ دقیقه دمای واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال در ۵۷ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه دمای طویل‌سازی انتهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (جدول ۱) پس از تکثیر قطعه ژنی، توالی ۴۵۰ جفت‌بازی برای تأیید روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و بررسی شد.

جدول ۱ میزان و مواد لازم برای انجام واکنش PCR برای HER-2

مواد	مقدار (میکرولیتر)
الگو	۱
کلرید منیزیم(۵۰ میلی‌مولار)	۰/۵
بافر ۱۰X	۲/۵
dNTP (۱۰ میلی‌مولار)	۰/۷
آغازگر فرودست	۱
آغازگر فرودست	۱
آنزیم امپلیکان(PFU)	۰/۲
آب مقطر	۱۸/۱

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

۲) تهیه سازه ژنی pET28a-her-2

به‌منظور کلون‌سازی محصول PCR، بخشی از ژن her-2 با استفاده از کیت از ژل تخلیص شده و به همراه ناقل pET28a هرکدام به‌طور جداگانه توسط آنزیم‌های محدود کننده BamHI و HindIII که محل برش آن‌ها روی آغازگرها طراحی شده بود طبق جدول ۲ و ۳ هضم آنزیمی شدند. با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase طبق جدول ٤ هم‌جوشی بین قطعات ذکر شده صورت گرفت. سپس محصول واکنش با روش شوک حرارتی به سویه باکتریایی *E.coli* BL21DE3 انتقال داده شد. برای تأیید انتقال ناقل نوترکیب به باکتری، PCR و سپس هضم آنزیمی انجام شد. در نهایت پلاسمید حاوی ژن مذکور تعیین توالی شد.

جدول ۲ واکنش هضم آنزیمی برای قطعه her-2

مواد	مقدار (میکرولیتر)
محصول PCR	۲۰
بافر هضم آنزیمی (Fast)	٦
BamHI	۳
HindIII	۳
آب مقطر	۲۸
کل حجم	٦۰

جدول ۳ واکنش هضم آنزیمی برای پلاسمید pET28a

مواد	مقدار (میکرولیتر)
پلاسمید pET28a	۱۵
بافر هضم آنزیمی (Fast)	٦
BamHI	۳
HindIII	۳
آب مقطر	۳۳
کل حجم	٦۰

جدول ٤ واکنش اتصال برای HER-2

مواد	مقدار (میکرولیتر)
ناقل خطی	۱۰
قطعه DNA	٦
بافر T4 DNA Ligase	۲
T4 DNA Ligas	۲
آب مقطر	۰
کل حجم	۲۰

۳) بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب HER-2

برای بیان، پنج کلونی از باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در ۵ میلی‌لیتر محیط LB (Luria-Bertani) حاوی ٤۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر کانامایسین (Kanamycin) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب انکوبه شد. از کشت شبانه ۳ میلی‌لیتر به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۸۰ انکوبه شد. پس از رشد باکتری تا طول موج ۰/٦ – ۰/۸، ایزو پروپیل بتا دی گالاکتو پیرانوزید (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) به‌منظور القای بیان ژن با غلظت نهایی یک میلی‌مولار IPTG اضافه شد و کشت باکتری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ساعت ادامه یافت. پس از آن به کمک سانتریفوژ رسوب باکتری‌ها جمع‌آوری و به دو قسمت سوپ رویی و رسوب تفکیک شد. سپس برای پی بردن به ماهیت پروتئین، نمونه‌های تهیه شده قبل و بعد از القا در ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد الکتروفورز و با رنگ آبی کوماسی (Coomassie Blue) رنگ‌آمیزی شد. با توجه به این‌که پروتئین نوترکیب با نشانه His-Tag بیان شده بود از ستون Ni-NTA برای تخلیص پروتئین نوترکیب استفاده شد. برای این منظور رسوب باکتریایی در ٦ میلی‌لیتر بافر لیز کننده [۳ میلی‌لیتر اوره ۸ مولار، ۳ میلی‌لیتر PBS 1X (Phosphate Buffered Saline)] حل شد و سپس سونیکاسیون (Sonication) انجام گرفت و سانتریفوژ شده محلول رویی از ستون عبور داده شد. پروتئین مورد نظر با استفاده از بافر حاوی ایمیدازول (Imidazole) از ستون جداسازی و جمع‌آوری شد. غلظت پروتئین خالص‌سازی شده با استفاده از ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد ارزیابی شد. برای تأیید پروتئین مورد نظر از وسترن بلاتینگ (Western Blot) و الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) با آنتی‌بادی پلی کلونال ضد HER-2 استفاده شد.

٤) وسترن بلاتینگ به‌منظور تأیید پروتئین بیان شده

برای انجام این روش از آنتی‌بادی پلی کلونال ضد HER-2

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

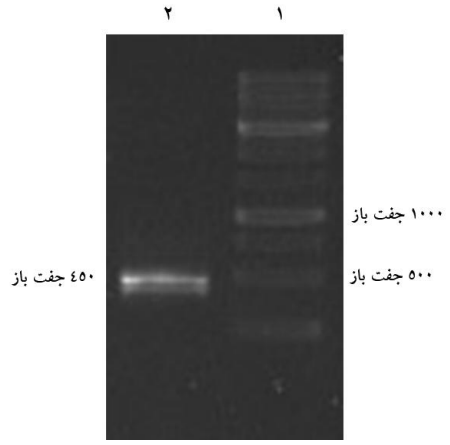
(قبلاً در آزمایشگاه تولید و تأیید شده است) بـه‌صـورت زیـر استفاده شد. یکی از نمونه‌های بعد از بیان و نمونه بدون القای مربوط به بیان پروتئین نوترکیب انتخاب شد و روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد الکتروفورز و سپس به کاغذ نیتروسلولز بـه ابعاد ژل انتقال داده شـد. پـس از بلاتینـگ کاغـذ نیتروسـلولز به‌مدت ۲ ساعت، در داخل بافر بلاکینگ شناور و سپس با بافر PBS-T (PBS-Tween) شستشو داده شد. آنتـی‌بـادی Anti-His tag با رقت ۱:۲۰۰ در داخـل بـافر PBS-T تهیـه، کاغـذ نیتروسلولز درون آن غوطه‌ور و به‌مدت یک ساعت در دمـای اتاق روی شیکر (Shaker) قرار داده شد. سـپس سـه بـار بـا PBS-T و هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه علیه آنتی‌بادی موشی با رقـت ۱:۲۰۰۰ در داخـل بـافر PBS-T تهیه شد. دستورالعمل فوق اجرا شـد. محلـول DAB (Diaminobenzidine) روی کاغذهای نیتروسلولز ریخته شد و پس از ظهور باندها با آب مقطر واکنش مهار شد.

۵) تعیین غلظت پروتئین

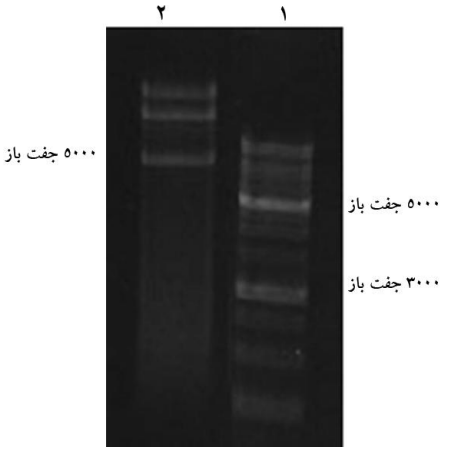
تعیین غلظت پروتئین بیان شده به کمـک روش برادفـورد (Bradford) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) (سیناژن، ایران) به‌عنـوان اسـتاندارد انجـام گرفت.

نتایج

انجام واکنش PCR روی بخشی از ژن her-2 با استفاده از آغازگر اختصاصی که توسط نرم‌افزار Oligo تجزیه و تحلیـل شده بود، صورت گرفت که موجب تکثیر قطعه مورد نظر بـه انـدازهٔ ٤٥٠ جفـت‌بـاز شـد. از تـوالی‌هـای GGATTC و AAGCTT که محل اثر آنزیم‌های بـرش BamHI و HindIII است، برای توالی‌های برش مورد نیاز روی آغازگرها استفاده شد. برای تأیید تکثیر ژن، محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. اندازه قطعه ژن تکثیر یافته در مقایسه با نشانگر DNA نشان دهنده تکثیر ژن هدف بود (شکل ۱). شکل ۲ نشان دهنده پلاسمید pET28a تخلیص شده با کیت است.



شکل ۱ الکتروفورز ژل آگارز ژن her-2 حاصل از واکنش PCR: ستون ۱) نشانگر DNA، ستون ۲) محصول PCR ژن her-2



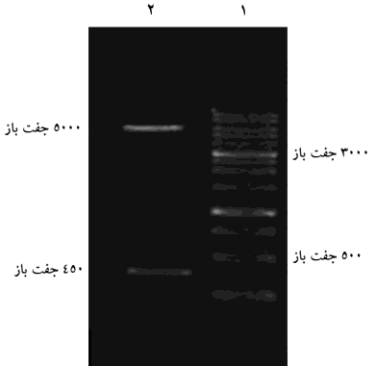
شکل ۲ الکتروفورز ژل آگارز پلاسمید pET 28a تخلیص شده: از راست به چپ: ستون ۱) نشانگر DNA (۱۰۰۰ جفت‌باز)، ستون ۲) پلاسمید pET 28a تخلیص شده

پس از انتخاب ناقل بیانی pET28a و هضم آن با دو آنزیم BamHI /HindIII، برای الحاق با ژن مورد نظر آماده شد. پس از آن تراریخت محصولات واکـنش الحـاقی بـا روش شـوک حرارتی به سـلول‌هـای مسـتعد میزبـان (E.coli BL21-DE3) انجام گرفت. برای غربالگری، کلـون‌هـا در محـیط مـایع LB حاوی کانامایسین کشت داده شد، سپس عمل تخلیص پلاسمید

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

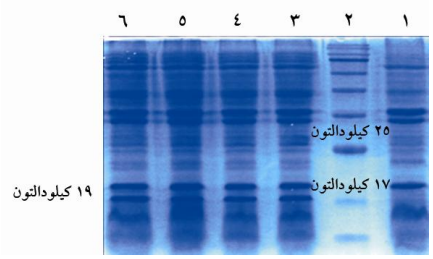
صورت گرفت و با استفاده از PCR (شکل ۳) و هضم آنزیمی (شکل ٤) ژن مورد نظر تأیید شد. در نهایت سازه مورد نظر برای تعیین توالی ارسال و تأیید شد.

شکل ۳ کلونی PCR وکتور pET28a حاوی ژن her-2؛ ستون ۱) نشانگر DNA، ستون ۲ تا ٦) کلونی‌های مثبت (حاوی ژن her-2)، ستون ۷) کنترل مثبت، ستون ۸) کنترل منفی



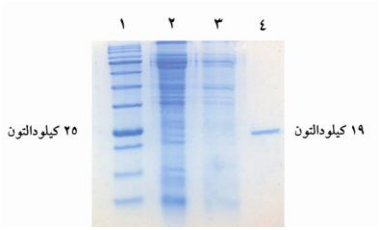
شکل ٤ نتیجهٔ هضم آنزیمی پلاسمید pET28a حاوی ژن her-2؛ ستون ۱) نشانگر DNA، ستون۲) پلاسمید هضم شده (با آنزیم BamHI، HindIII)

کلون‌های جدا شده پس از کشت مجدد و القا با IPTG بیان شد، سپس جداسازی پروتئین به روش واسرشت‌سازی انجام گرفت و مشخص شد که پروتئین به‌صورت نامحلول است و در نهایت نتیجه روی ژل SDS-PAGE بررسی شد. با توجه به این‌که وزن پروتئین نوترکیب به همراه His-Tag حدود ۱۹ کیلو دالتون است، از ژل ۱۵ درصد استفاده شد (شکل ٥).



شکل ٥ بیان پروتئین نوترکیب HER-2 با استفاده از غلظت یک میلی‌مولار IPTG: ستون ۱) رسوب کشت باکتری E. coli BL21-DE3 حاوی ناقل PET28a همراه ژن her-2 قبل از اضافه نمودن IPTG به‌عنوان کنترل، ستون ۲) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۳ تا ٦) رسوب کشت باکتری E. coli BL21-DE3 حاوی ناقل PET28a همراه ژن her-2، ٥ ساعت پس از اضافه نمودن IPTG

تخلیص پروتئین نوترکیب نشان‌دار شده با 6x His به‌وسیلهٔ کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تحت شرایط واسرشت‌سازی صورت گرفت. میزان غلظت پروتئین محاسبه شده پس از تخلیص ۰/٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ٦).



شکل ٦ تخلیص پروتئین HER-2 به کمک ستون Ni-NTA: ستون۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون۲) خروجی ستون، ستون۳) شستشوی ستون با بافر حاوی ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ستون٤) شستشو با بافر حاوی ۲٥۰ میلی‌مولار ایمیدازول (حاوی پروتئین HER-2)

به‌منظور تأیید محصول پروتئینی از روش وسترن بلات استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی تولید شده در موش (آنتی‌بادی پلی کلونال) استفاده شد که در شکل ۷ مشاهده می‌شود. در ستون ۲ که مربوط به نمونهٔ بعد از بیان است یک باند در محدوده ۱۹ کیلو دالتون مشاهده می‌شود که مربوط به پروتئینHER-2 (SDS-PAGE ۱٥ درصد) است. در ستون ۳ سلول القا نشده به‌عنوان کنترل منفی باندی مشاهده نمی‌شود.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

شکل ۷ آزمایش وسترن بلاتینگ برای تعیین اختصاصیت پروتئین نوترکیب تولید شده: ستون۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون۲) پروتئین نوترکیب HER-2، ستون۳) کنترل منفی (سلول القا نشده)

بحث

ژن her-2 پروتوانکوژنی است که در حدود ۳۰ درصد از موارد سرطان‌های سینه تکثیر می‌یابد. گیرنده HER-2 برای فعالیت وابسته به اتصال به لیگاند نیست یعنی بدون اتصال به لیگاند نیز می‌تواند دایمریزه شود که این دایمریزه شدن بر عهده ناحیه خارج سلولی گیرنده است. پس با استفاده از آنتی‌بادی‌هایی که قسمت خارج سلولی HER-2 را هدف قرار می‌دهد می‌توان از دایمریزه شدن و در نتیجه فعال شدن آبشار انتقال پیام ممانعت کرد و در درمان سرطان نقش به‌سزایی ایفا کرد [۲۷]. با توجه به نقش مهم وضعیت HER-2 در مدیریت و پیش‌آگهی بیماری سرطان سینه، انتخاب روش مناسب برای سنجش و تعیین وضعیت HER-2 چه در سطح ژن و چه در سطح پروتئین از اهمیت بالایی برخوردار است [۲۲، ۲۳]. در سال‌های ۱۹۹۷–۱۹۹۸، FDA (Food and Drug Administration)، CA27.29، CA15-3 و HER-2 را به‌عنوان نشانه توموری در تعیین عود مجدد بیماران سرطان سینه تأیید کرده است. مولینا (Molina) و همکاران در سال ۱۹۹۹، سه نشانه توموری CEA، CA15-3، C-erbB-2 را در سرم ۲۵۰ بیمار سرطانی سینه به‌منظور تشخیص عود مجدد سرطان اندازه‌گیری کردند و به این نتیجه رسیدند که نشانه‌های توموری فوق ابزار مفیدی برای تشخیص اولیه متاستاز و همچنین تعیین عود مجدد بیماری سرطان سینه است [۲٤، ۲۵] در یک مطالعه دیگر علی (Ali) و همکاران در سال ۲۰۰۲ غلظت دو نشانه توموری CA15-3 و HER-2 را در ٥٦٦ بیمار سرطانی اندازه‌گیری کردند و پیشنهاد دادند که اندازه‌گیری همزمان این دو، نتایج بهتری را نسبت به اندازه‌گیری CA15-3 به تنهایی در بردارد [۲۸]. مولینا و همکاران در سال ۱۹۹۸، سه نشانه توموری CEA، CA15-3، C-erbB-2 را به‌عنوان عامل پیش‌آگهی در مراحل مختلف بیماران سرطان سینه بررسی کرده‌اند و استفاده همزمان از این سه نشانه را برای ارزیابی بیماران مبتلا به سرطان سینه پیشنهاد کرده‌اند [۲۷]. مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ توسط کوکه (Cooke) و همکارانش با هدف بررسی HER-2 به‌عنوان نشانگر تشخیصی و پیشگویی کننده سرطان سینه انجام شد. در این مطالعه از روش رادیوایمونواسی (Radioimmunohistochemistry) برای اندازه‌گیری میزان افزایش بیان HER-2 در نمونه‌های سرطان سینه استفاده شد. با روش‌های معمولی ۲۰–۳۰ درصد از سرطان‌های سینه دارای افزایش بیان HER-2 است. این روش نشان داد که ۷۰–۸۰ درصد تمام نمونه‌های تومور پستان میزان بالای گیرنده HER-2 را نشان می‌دهد. در رژیم‌های درمانی مشتمل بر آنتی‌بادی‌های ضد HER-2، ارزیابی وضعیت HER-2 در طبقه‌بندی بیماران برای رژیم‌های درمانی مناسب دارای اهمیت است [۲۹]. مطالعات متعدد دیگری نیز در رابطه با نقش CA15-3 و CA27.29 و HER-2 در سرطان سینه صورت گرفته است. اکثر این مطالعات با استفاده از کیت‌های مختلف صورت گرفته است و نمونه‌های بیماران سرطان سینه نیز از کلیه مراحل این سرطان یعنی مراحل ۱ و ۲ و ۳ و ٤، افراد سالم، زنان شیرده، بیماران با تومور خوش‌خیم سینه و سایر بیماری‌ها استفاده شده است. با توجه به موارد گفته شده و مطالعات صورت گرفته HER-2 به‌عنوان نشانگر توموری در سرطان سینه مورد قبول واقع شده است و امروزه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی از این نشانگر به‌منظور ارزیابی و تشخیص بیماران سرطان سینه استفاده می‌شود. مطالعات ثابت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

کرده است که جریان آنتی‌بادی anti – HER2 ممکن است به‌عنوان یک عامل تشخیصی مطلوب برای بیماران مبتلا به سرطان سینه در مراحل اولیه قبل از درمان استفاده شود [۳۰، ۳۱]. از این رو در این تحقیق برای ایجاد یک روش معتبر و موثق برای شناسایی آنتی‌بادی‌های سرم بر ضد HER2، بخشی از پروتئین نوترکیب HER2 را در اشریشیا کلی بیان شد که شامل ترادف نوکلئوتیدی بخش خارج سلولی آنتی‌ژن HER2 که بیشتر در معرض بود و کمترین تغییرات پس از ترجمه را داشت و از اسید آمینه ٤٨٠ تا ٦٢٠ انتخاب شد؛ که این بخش خارج سلولی پروتئین، به راحتی می‌تواند تولید آنتی‌بادی کند و شناسایی شود. به‌علاوه؛ بخش انتخاب شده دارای خاصیت آنتی‌ژنی و اختصاصیت بالاست که ویژگی تعیین کننده‌ای برای یک آنتی‌ژن پوششی برای تشخیص آنتی‌بادی‌های anti-HER2 در نمونه‌های بالینی را دارا است.

به انتخاب یک میزبان مناسب برای بیان و تولید پروتئین مورد نظر در این تحقیق توجه شده است. میزبان اشریشیا کلی یکی از رایج‌ترین و کم هزینه‌ترین میزبان‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مد نظر است، در این مطالعه، برای تولید پروتئین نوترکیب در میزبان اشریشیا کلی استفاده شد. برای افزایش بیان پروتئین در سیستم پروکاریوتی تغییر کدون‌های این ژن با کدون‌های رایج در اشریشیا کلی [۲۹] صورت گرفت. پس از بیان، خالص‌سازی پروتئین نوترکیب نشان دار شده با 6x His به‌وسیلهٔ کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA انجام شد. نتایج ایمونوبلات (Immunoblot) نمایانگر وجود یک باند در محدوده ۱۹ کیلو دالتونی است که هم اندازه با وزن مولکولی پیش‌بینی شده برای پروتئین HER-2 بوده و وزن مولکولی آن با پروتئین بیان شده در سیستم پروکاریوتی تقریباً یکسان است. این مسئله نشان دهنده آن است که ماشین ساخت پروتئین در باکتری، از روی mRNA یک پروتئین بالغ را ترجمه کرده است و هیچ‌گونه حذف یا تخریبی در پروتئین مورد نظر صورت نگرفته است.

پروتئین مورد نظر به‌طور مناسب بیان شد و تخلیص نیز انجام گرفت که آنتی‌بادی اختصاصی آن را شناسایی نمود. این پروتئین می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل تشخیصی در سرطان سینه باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد که در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی انجام گرفته است.

منابع

[1] Thongsuksai P[1], Chongsuvivatwong V, Sriplung H. Delay in breast cancer care: a study in Thai women. Med Care 2000; 38(1): 108-14.

[2] Ursin G, Ma H, Wu AH, Bernstein L, Salane M, Parisky YR, Astrahan M, Siozon CC, Pike MC. Mammographic density and breast cancer in three ethnic groups. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12(4): 332-8.

[3] Wiechmann L, Kuerer HM. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. Cancer 2008; 112(10): 2130-42.

[4] Moore KL, Dalley AF, Agur AM. Clinically oriented anatomy. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2013; p: 342-3.

[5] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008; 58(2): 71-96.

[6] Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. Public Health 2000; 114(2):

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

143-5.

[7] Rosenberg SA, Hellman S, DeVita VT. Cancer. Principles & Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005; p: 1633.

[8] Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, Richmond J, Donald B, Ferrier R, Cooke TG. Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. J Pathol 2001; 195(4): 422-8.

[9] Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. Oncology 2001; 61 Suppl 2: 1-13.

[10] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2(2): 127-37.

[11] Reiter JL, Maihle NJ. A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. Nucleic Acids Res 1996; 24(20): 4050-6.

[12] Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. Clin Cancer Res 2003; 9(14): 5078-84.

[13] Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. Science 2002; 297(5585): 1330-3.

[14] Stojadinovic A, Nissan A, Gallimidi Z, Lenington S, Logan W, Zuley M, Yeshaya A, Shimonov M, Melloul M, Fields S, Allweis T, Ginor R, Gur D, Shriver CD. Electrical impedance scanning for the early detection of breast cancer in young women: preliminary results of a multicenter prospective clinical trial. J Clin Oncol 2005; 23(12): 2703-15.

[15] Levenson VV. Biomarkers for early detection of breast cancer: what, when, and where? Biochim Biophys Acta 2007; 1770(6): 847-56.

[16] Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. Cancer Treat Res 2000; 103: 57-75.

[17] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235(4785): 177-82.

[18] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244(4905): 707-12.

[19] Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. Oncologist 2003; 8(4): 307-25.

[20] Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. HER-2/neu testing in breast cancer. Am J Clin Pathol 2003; 120 Suppl: S53-71.

[21] Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. J Surg Oncol 1999; 71(2): 130-5.

[22] Bjerner J, Norum LF, Nilsson O, Nustad K. MUC1 serum assays in breast cancer: tumor

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]

specificities and reference levels. Tumour Biol 2002; 23(6): 315-23.

[23] Cheung KL, Graves CR, Robertson JF. Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer. Cancer Treat Rev 2000; 26(2): 91-102.

[24] Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. Clin Chem 2002; 48(8): 1194-7.

[25] O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer. Clin Chem 2002; 48(8): 1362-4.

[26] Kesisis G, Kontovinis LF, Gennatas K, Kortsaris AH. Biological markers in breast cancer prognosis and treatment. J BUON 2010; 15(3): 447-54.

[27] Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. J Control Release 2010; 146(3): 264-75.

[28] Ali SM, Leitzel K, Chinchilli VM, Engle L, Demers L, Harvey HA, Carney W, Allard JW, Lipton A. Relationship of serum HER-2/neu and serum CA 15-3 in patients with metastatic breast cancer. Clin Chem 2002; 48(8): 1314-20.

[29] Cooke T, Reeves J, Lanigan A, Stanton P. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. Ann Oncol 2001; 12 Suppl 1: S23-8.

[30] Tang Y, Wang L, Zhang P, Wei H, Gao R, Liu X, Yu Y, Wang L. Detection of circulating anti-mucin 1 (MUC1) antibodies in breast tumor patients by indirect enzyme-linked immunosorbent assay using a recombinant MUC1 protein containing six tandem repeats and expressed in Escherichia coli. Clin Vaccine Immunol 2010; 17(12): 1903-8.

[31] Daniele L, Sapino A. Anti-HER2 treatment and breast cancer: state of the art, recent patents, and new strategies. Recent Pat Anticancer Drug Discov 2009; 4(1): 9-18.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-28]