

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

Marjane Kazemi¹, Jafar Amani^{2*}, Ali Hatef Salmanian³, Mohammad Mahdi Forghanifard⁴, Hossein Aghamollaei⁵

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

طراحی و بیان آنتی ژن نو ترکیب HER-2 به عنوان نشانگر تشخیصی سرطان سینه

مرجانہ کاظمی^۱، جعفر امانی^{۲*}، علی هاتف سلمانیان^۳، محمد مهدی فرقانی فرد^۴، حسین آقا مولایی^۵

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

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۶/۲۶

دریافت مقاله: ۹۳/۰۲/۲۸

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 آنتی ژن‌های 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 نو ترکیب HER-2 به‌منظور تشخیص زود هنگام سرطان سینه است. **مواد و روش‌ها:** بخشی از ژن her-2 با طراحی آغازگر مناسب به‌وسیله 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب پروتئین، سرطان سینه

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

مقدمه

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

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

کلونینگ و بیان ژن her-2

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 خود هستند. HER-2 شایع‌ترین و مهم‌ترین نشانگر تومور در سرطان سینه است [۱۴] به طوری که در ۲۵-۳۰ درصد سرطان‌های مهاجم پستان به میزان زیادی بیان می‌شود [۹، ۱۵]، (دو میلیون مولکول HER-2 در هر 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 می‌شود [۱۶] بنابراین افزایش بیان گیرنده نقش مستقیم در رفتار بالینی و زیستی سلول‌های توموری HER-2 مثبت دارد [۱۷-۲۰].

تکثیر و بیان بیش از حد HER-2 در سلول‌های سرطان سینه با افزایش اندازه تومور، افزایش طول فاز S چرخه سلولی، آنپلوئیدی (Aneuploidy) و کاهش بیان گیرنده‌های هورمون‌های استروژن و پروژسترون همراه است و تومورهایی که حاوی افزایش این پروتئین هستند تمایل به رشد بیشتر و سریع‌تری دارند. یک چنین سرطان‌هایی در برابر درمان هورمونی و یک‌سری از روش‌های شیمی درمانی مقاوم هستند [۱۲]. نشانگرهای تومور معمولاً برای تشخیص زود هنگام سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد که می‌توان به موارد زیر اشاره نمود، خانواده موسین (MUC) شامل CA27.29، CA15-3، خانواده پروتئین‌های انکوافتال (Oncofetal Antigen) شامل CEA (Carcinoembryonic Antigen) و انکوپروتئین‌ها شامل C-myc، P53، c-erbB2 (HER-2) [۲۱]، [۲۲]. به طور کلی میزان رسوب‌دهی اریتروسیت [۲۳]، همچنین ژن‌ها PAI (Plasminogen Activator Inhibitor Type 1)، UPA (Urokinase-type Plasminogen Activator)، VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)، BRCA2، PCNA، CI، CadherinE، BRCA1، (Breast Cancer 2)، CB، CD، (Proliferating Cell Nuclear Antigen) و [۲۱، ۲۴] گیرنده‌های

موارد سرطان را شامل می‌شود [۱، ۳، ۴]. پس از سرطان ریه، 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 [۵]. بنابراین سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در ایران و جهان است با این تفاوت که به دلایل نامشخصی سن ابتلا به این نوع سرطان در ایران یک دهه کاهش یافته است [۶]. میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است [۶]. 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. بیماران در مراحل بالاتر بدون وجود متاستاز نیز با درمان‌های کمکی در ۳۰-۵۰ درصد موارد درمان قطعی می‌یابند. بسیاری از بیماران به علت عود ناشی از سرطان فوت می‌کنند؛ بنابراین استفاده از روش‌ها 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 بود [۷]. از جمله عوامل مطرح در پیش‌آگهی جهش در ژن پروتوانکوژن her-2 است [۸]. ژن گیرنده عامل رشد اپیدرمی انسان (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2: HER-2) که با نام *C-erbB-2/neu* یا *her-2/neu* نیز خوانده می‌شود، در سلول‌های طبیعی یک گیرنده گلیکوپروتئینی غشایی با ۱۲۵۵ آمینواسید و وزن ۱۸۵ کیلودالتون با فعالیت تیروزین کینازی را کد می‌کند که وظیفه آن انتقال پیام‌های تنظیمی برای رشد سلول است [۹]. 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 یا هتروداایمر با اعضای دیگر خانواده HER تشکیل دهد [۱۱]. هتروداایمر شدن آن بستگی به لیگاند سایر اعضای خانواده EGFRها دارد [۸]. اتصال لیگاند به این کمپلکس روی سطح سلول باعث فعال شدن فعالیت تیروزین کیناز داخلی شده و سبب انتقال پیام می‌شود. این مسئله باعث انتقال پیام از طریق

muc1 به عنوان آنتی ژن 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 نرم افزارهای Oligo و DNASIS استفاده شد. توالی آغازگر فرادست 5'-ATA TAT GGG TCC CCG TGG GAT CAA CTG -3' به گونه ای طراحی شد که جایگاه برش آنزیمی BamHI در بخش ابتدای 5' آن قرار گیرد. آغازگر فرودست شامل توالی 5'-GAC CAG AAG CTT TTA TTC TTC GTC CCG -3' بود که جایگاه برش آنزیمی HindIII در ابتدای 5' 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 واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد سپس ۳۵ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل: ۱ دقیقه دمای واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال در ۵۷ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت ۵ دقیقه دمای طویل سازی انتهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد (جدول ۱) پس از تکثیر قطعه ژنی، توالی ۴۵۰ جفت بازی برای تأیید روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و بررسی شد.

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

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

استروژن و پروژسترون و ماماگلوبین (Mammaglobin) به دلیل این که در تعیین اولیه سرطان حساسیت کمی (۱۵-۲۵ درصد) دارند نمی توانند برای اهداف تشخیصی مفید واقع شوند [۲۵]، به همین دلیل نشانگرهای تومور (Tumor Marker) در تشخیص بسیار اهمیت دارند. در اکثر روش های تشخیصی و درمانی نیاز به مقادیر قابل توجهی از پروتئین تشخیصی است. از آنجایی که خالص سازی این پروتئین از سلول های سینه بسیار پرهزینه بوده و بهره وری کمی دارد بایستی از روش های دیگری مانند مهندسی ژنتیک برای دستیابی به پروتئین مورد نظر بهره گرفت. هدف از این تحقیق تولید پروتئین نو ترکیب HER-2 به عنوان یک آنتی ژن شاخص در سرطان سینه است که می توان از آن در الایزا به عنوان تشخیص زود هنگام سرطان سینه استفاده کرد.

مواد و روش ها

مواد

مواد شیمیایی و آنزیم ها و سویه های باکتریایی

آنزیم Pfu DNA Polymerase، T4 DNA Ligase و آنزیم های اندونوکلاز 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 DH5α E.coli برای اهداف کلون سازی و تکثیر و باکتری pET28a BL21 DE3 E.coli به عنوان میزبان بیانی و پلاسمید که از شرکت Life Science Research (Novagen، آلمان) تهیه شده بود، به عنوان ناقل بیانی استفاده شد. ستون Ni-NTA Agarose از شرکت QIAGEN (هلند) تهیه شد.

روش ها

(۱) تکثیر ژن her-2 با استفاده از PCR

برای تکثیر بخشی از ژن her-2، از ژن دو قسمتی her-2-

۲) تهیه سازه ژنی pET28a-her-2

به منظور کلون سازی محصول PCR، بخشی از ژن her-2 با استفاده از کیت از ژل تخلیص شده و به همراه ناقل pET28a هرکدام به طور جداگانه توسط آنزیم های محدود کننده BamHI و HindIII که محل برش آن ها روی آغازگرها طراحی شده بود طبق جدول ۲ و ۳ هضم آنزیمی شدند. با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase طبق جدول ۴ هم جوشی بین قطعات ذکر شده صورت گرفت. سپس محصول واکنش با روش شوک حرارتی به سویه باکتریایی BL21DE3 *E.coli* انتقال داده شد. برای تأیید انتقال ناقل نو ترکیب 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

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

جدول ۳ واکنش هضم آنزیمی برای پلاسمید pET28a

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

جدول ۴ واکنش اتصال برای HER-2

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

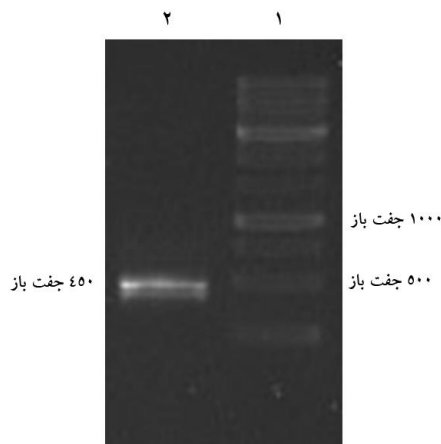
۳) بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب HER-2

برای بیان، پنج کلونی از باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب در ۵ میلی لیتر محیط LB (Luria-Bertani) حاوی ۴۰ میکروگرم/ میلی لیتر کانامایسین (Kanamycin) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شد. از کشت شبانه ۳ میلی لیتر به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۱۸۰ انکوبه شد. پس از رشد باکتری تا طول موج ۰/۶ - ۰/۸، ایزو پروپیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside: IPTG) به منظور القای بیان ژن با غلظت نهایی یک میلی مولار IPTG اضافه شد و کشت باکتری در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت ادامه یافت. پس از آن به کمک سانتریفوژ رسوب باکتری ها جمع آوری و به دو قسمت سوپ رویی و رسوب تفکیک شد. سپس برای پی بردن به ماهیت پروتئین، نمونه های تهیه شده قبل و بعد از القا در ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد الکتروفورز و با رنگ آبی کوماسی (Coomassie Blue) رنگ آمیزی شد. با توجه به این که پروتئین نو ترکیب با نشانه His-Tag بیان شده بود از ستون Ni-NTA برای تخلیص پروتئین نو ترکیب استفاده شد. برای این منظور رسوب باکتریایی در ۶ میلی لیتر بافر لیز کننده [۳ میلی لیتر اوره ۸ مولار، ۳ میلی لیتر 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 جمع آوری شد. غلظت پروتئین خالص سازی 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 آنتی بادی پلی کلونال ضد HER-2 استفاده شد.

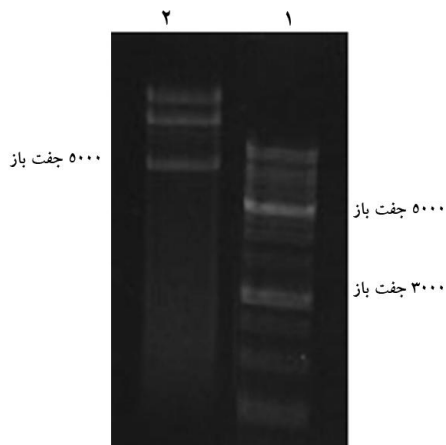
۴) وسترن بلاتینگ به منظور تأیید پروتئین بیان شده

برای انجام این روش از آنتی بادی پلی کلونال ضد HER-2

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 جفت باز)، 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 واکنش الحاقی با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد میزبان (E.coli BL21-DE3) انجام گرفت. برای غربالگری، کلون‌ها در محیط مایع LB حاوی کانامایسین کشت داده شد، سپس عمل تخلیص پلاسمید

(قبلاً در آزمایشگاه تولید و تأیید شده است) به صورت زیر 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 نیتروسولوز به ابعاد ژل انتقال داده شد. پس از بلاتینگ کاغذ نیتروسولوز به مدت ۲ ساعت، در داخل بافر بلاکینگ شناور و سپس با بافر PBS-T (PBS-Tween) شستشو داده شد. آنتی‌بادی Anti-His tag با رقت ۱:۲۰۰ در داخل بافر PBS-T تهیه، کاغذ نیتروسولوز درون آن غوطه‌ور و به مدت یک ساعت در دمای اتاق روی شیکر (Shaker) قرار داده شد. سپس سه بار با PBS-T و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه علیه آنتی‌بادی موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ در داخل بافر PBS-T تهیه شد. دستورالعمل فوق اجرا شد. محلول DAB (Diaminobenzidine) روی کاغذهای نیتروسولوز ریخته شد و پس از ظهور باندها با آب مقطر واکنش مهار شد.

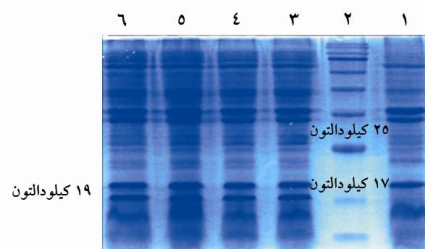
۵) تعیین غلظت پروتئین

تعیین غلظت پروتئین بیان شده به کمک روش برادفورد (Bradford) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) (سیناژن، ایران) به عنوان استاندارد انجام گرفت.

نتایج

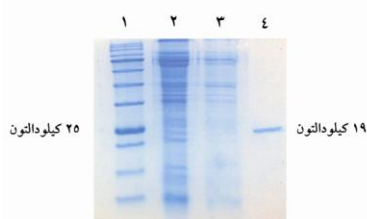
انجام واکنش PCR روی بخشی از ژن her-2 با استفاده از آغازگر اختصاصی که توسط نرم‌افزار Oligo تجزیه و تحلیل شده بود، صورت گرفت که موجب تکثیر قطعه مورد نظر به اندازه ۴۵۰ جفت‌باز شد. از توالی‌های GGATTC و AAGCTT که محل اثر آنزیم‌های برش BamHI و HindIII است، برای توالی‌های مورد نیاز روی آغازگرها استفاده شد. 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

کلونینگ و بیان ژن her-2



شکل ۵ بیان پروتئین نوترکیب HER-2 با استفاده از غلظت یک میلی-مولار IPTG: ستون (۱) رسوب کشت باکتری E. coli BL21-DE3 حاوی ناقل PET28a همراه ژن her-2 قبل از اضافه نمودن IPTG به عنوان کنترل، ستون (۲) نشانگر اندازه پروتئین، ستون (۳ تا ۶) رسوب کشت باکتری E. coli BL21-DE3 حاوی ناقل PET28a همراه ژن her-2، ۵ ساعت پس از اضافه نمودن IPTG

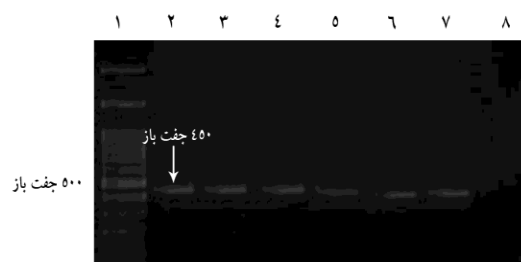
تخلیص پروتئین نوترکیب نشان‌دار شده با His 6x به وسیله کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA تحت شرایط واسرشت‌سازی صورت گرفت. میزان غلظت پروتئین محاسبه شده پس از تخلیص ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۶).



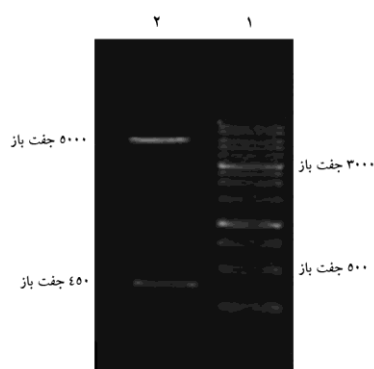
شکل ۶ تخلیص پروتئین HER-2 به کمک ستون Ni-NTA: ستون (۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون (۲) خروجی ستون، ستون (۳) شستشوی ستون با بافر حاوی ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ستون (۴) شستشو با بافر حاوی ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول (حاوی پروتئین HER-2)

به منظور 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 نمونه بعد از بیان است یک بانده در محدوده ۱۹ کیلو دالتون مشاهده می‌شود که مربوط به پروتئین HER-2 (SDS-PAGE ۱۵ درصد) است. در ستون ۳ سلول القا نشده به عنوان کنترل منفی بانده مشاهده نمی‌شود.

صورت گرفت و با استفاده از PCR (شکل ۳) و هضم آنزیمی (شکل ۴) 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 ۶) کلونی‌های مثبت (حاوی ژن her-2)، ستون (۷) کنترل مثبت، ستون (۸) کنترل منفی



شکل ۴ نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید PET28a حاوی ژن her-2: ستون (۱) نشانگر DNA، ستون (۲) 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 به صورت 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 ۵).

برای تشخیص اولیه متاستاز و همچنین تعیین عود مجدد بیماری سرطان سینه است [۲۴، ۲۵] در یک مطالعه دیگر علی (Ali) و همکاران در سال ۲۰۰۲ غلظت دو نشانه توموری CA15-3 و HER-2 را در ۵۶۶ 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 ۴، 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



شکل ۷ آزمایش وسترن بلاتینگ برای تعیین اختصاصیت پروتئین نوترکیب تولید شده: ستون ۱) نشانگر اندازه پروتئین، ستون ۲) پروتئین نوترکیب HER-2، ستون ۳) 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 فوق‌ابزار مفیدی

کلونینگ و بیان ژن her-2

این ژن با کدون‌های رایج در اشریشیا کلی [۲۹] صورت گرفت. پس از بیان، خالص‌سازی پروتئین نوترکیب نشان دار شده با His 6x به وسیله 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.

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]. 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 ۴۸۰ تا ۶۲۰ 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 تعیین‌کننده‌ای برای یک آنتی‌ژن پوششی برای تشخیص آنتی‌بادی‌های anti-HER2 در نمونه‌های بالینی را دارا است.

به انتخاب یک میزان مناسب برای بیان و تولید پروتئین مورد نظر در این تحقیق توجه شده است. میزان 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

منابع

- [1] Thongsuksai P¹, 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):

- 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, Puztai 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, Puztai 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

كلونينگ و بيان ژن *her-2*

- 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.