

## مشخصه-سازی پروتئین-نو ترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) با استفاده از محاسبه ضریب خاموشی

فریبا باقریه\*

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده فناوری-های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

### چکیده

زمینه و هدف: ضریب خاموشی (Extinction Coefficient)، عددی است که برای هر پروتئین منحصر به فرد است و با محاسبه آن می‌توان نوع و خلوص پروتئین نو ترکیب تولید شده در آزمایشگاه‌ها یا کارخانجات تولیدکننده پروتئین‌های نو ترکیب را ارزیابی نمود. در این مطالعه روشی ساده برای محاسبه ضریب خاموشی پروتئین نو ترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) ارائه می‌گردد.

روش بررسی: پروتئین (G-CSF) با غلظت ۰/۵ mg/ml از آریا تینا ژن تهیه شد. ابتدا روش الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات برای بررسی میزان خلوص پروتئین به کار رفت، سپس رقت‌های سریالی  $\frac{1}{2}$  الی  $\frac{1}{64}$  از پروتئین تهیه شد و با استفاده از طیف سنجی فرابنفش- مرئی میزان جذب نوری آن‌ها اندازه گیری شد.

یافته‌ها: نتیجه الکتروفورز به صورت تک بانده حدود ۱۸ کیلو دالتون به دست آمد. نتایج حاصل از طیف سنجی فرابنفش- مرئی هر یک از رقت‌های سریالی به صورت اسپکتروگرام‌هایی مجزا رسم شد و از آن‌ها برای رسم منحنی خطی رگرسیون غلظت‌های استاندارد پروتئین نو ترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) استفاده شد. نتیجه گیری: نتایج بدست آمده در این مطالعه ضریب خاموشی معادل با  $0.81 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  را برای پروتئین نو ترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) نشان می‌دهد که مطابق عدد جهانی گزارش شده توسط تولیدکنندگان بین-المللی این پروتئین و حاکی از درستی روش به کار رفته برای محاسبه این پارامتر فیزیکوشیمیایی است.

کلمات کلیدی: ضریب خاموشی، طیف‌سنجی فرابنفش- مرئی، پروتئین نو ترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-

CSF)، الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)

نویسنده مسئول: فریبا باقریه

آدرس: ایران، گرگان؛ دانشگاه علوم پزشکی گلستان

ایمیل:



## مقدمه

در ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) (۳)، نقشه برداری پپتیدی (Peptide mapping)، آزمایش برادفورد (Bradford protein assay) (۴)، آزمایش لوری (Lowry protein assay) (۵)، تعیین توالی N-ترمینال (N-terminal sequencing)، وسترن بلائینگ (Western blotting) (۶)، انواع طیف-سنجی ها و غیره اشاره نمود (۱-۲). از میان این روش-ها محاسبه ضریب خاموشی Extinction Coefficient) با طیف سنجی فرابنفش-مرئی (UV-VIS Spectroscopy) راهی آسان، کم هزینه، سریع و مطمئن برای مشخص کردن خلوص و نوع پروتئین است (۸-۷ و ۱).

ضریب خاموشی (Extinction Coefficient) یا اپیسلون (ε) با محاسبه میزان جذب نوری (Absorbance) در طول موج ۲۸۰ نانومتر و با استفاده از قانون بیر-لامبرت (Beer-Lambert Law)  $A = \epsilon Cl$ ، به دست می آید که در آن ε، ضریب جذب مولی با واحد (M-1 cm-1)، l طول مسیر با واحد cm و C غلظت پروتئین با واحد M است (۸-۱۰).

پروتئین نوترکیب انسانی فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF)، یک عامل مهم تنظیم

امروزه استفاده از پروتئین های نوترکیب در تحقیقات علوم پایه و علوم پزشکی امری معمول است. زمانی دانش تولید پروتئین نوترکیب مختص به تعداد معدودی از دانشمندان بود اما در حال حاضر با توجه به پیشرفت هایی که باعث تسهیل در روند تولید پروتئین های نوترکیب شده است، هم می توان این پروتئین ها را با آسانی در مراکز تحقیقاتی تولید کرد، هم می توان از شرکت های تجاری فراوانی تهیه نمود (۱). اما آنچه باعث می شود پروتئین نوترکیب تولید شده توسط یک شرکت تجاری از سایر محصولات موجود در بازار جهانی و داخلی معروف-تر گردد، انجام مراحل خالص سازی (Purification) و سپس مشخصه سازی (Characterization) ویژگی های یک پروتئین نوترکیب، شامل تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ارزیابی های زیستی است که برای کارخانجات تولید پروتئین نوترکیب و فرآورده های دارویی پروتئینی بسیار حائز اهمیت است (۲-۱).

روش های بسیاری برای اثبات ماهیت پروتئین تولید شده و تعیین ویژگی های آن وجود دارد که از بین آنها می توان به انواع کروماتوگرافی ها براساس اندازه و شکل و بار الکتریکی پروتئین، الکتروفورز

## روش بررسی:

این مطالعه تجربی در دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. پروتئین نوترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) با غلظت  $0.5 \text{ mg/ml}$  به صورت محلول از آریا تینا ژن (کارخانه تولید پروتئین‌های نوترکیب) خریداری شد.

تعیین وزن مولکولی پروتئین نوترکیب G-CSF با روش الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)

محلول پروتئینی (G-CSF) با روش لاملی برای حصول اطمینان از وزن مولکولی و خالص بودن آن، الکتروفورز شد (۳). ژل ردیف کننده (Stacking Gel) و ژل تفکیک کننده (Resolving Gel) ۵٪ ساخته شد. از نشانگر وزن مولکولی شرکت Vivantis (با شماره کاتالوگ: PR0602) با دامنه  $175 - 10.5 \text{ kDa}$  استفاده شد. ژل با آبی کوماسی رنگ آمیزی گردید و با محلول رنگ بر تیمار شد.

آماده‌سازی رقت‌های سریالی استاندارد

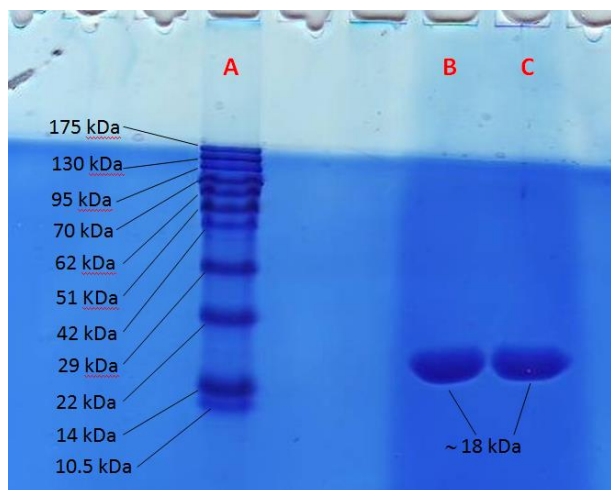
از محلول پروتئین، رقت‌های سریالی به ترتیب  $1/2$ ،  $1/4$ ،  $1/8$  الی  $1/64$  ساخته شد به این صورت که ابتدا به ۶ لوله فالکن  $15 \text{ ml}$ ، میزان  $4 \text{ ml}$  بافر اضافه شد. (این بافر، بافر فرمولاسیون پروتئین بود که از آریا تینا ژن تهیه

کننده گرانولوسیت‌ها در *in vivo* است که برای تحریک تکثیر، تمایز و بقاء دودمان گرانولوسیت‌ها ضروری است. G-CSF انسانی طبیعی، محصول یک لوکوس روی کروموزوم ۲۲-۲۱  $17q$  است که گلایکوپروتئینی شامل ۲۰۴ آمینواسید است که ۳۰ عدد از این آمینواسیدها توالی نشانه هستند که در شکل ترشحی پروتئین حذف شده‌اند (۱۱). برای جلوگیری از عفونت در بیماران سرطانی که دچار نوتروپنی ناشی از شیمی‌درمانی می‌شوند، G-CSF تجویز می‌گردد. همچنین برای درمان بیماران مبتلا به نوتروپنی شدید مادرزادی، لوکمی حاد، آنمی آپلاستیک، سندرم آنمی مایلودی‌پلاستیک، جهت پیشگیری از عفونت در مبتلایان به ایدز، بعد از پیوند مغز استخوان و برای حرکت سلول‌های بنیادی پیوند زده شده به گردش خون در بیماران سرطانی و اهدا کنندگان سالم به کار می‌رود (۱۱). G-CSF نوترکیب یا Filgrastim، پروتئینی با  $18.7$  کیلو دالتون وزن و  $174$  آمینو اسید است که فاقد گلایکوزیلاسیون است و نیمه عمر نسبتاً کوتاهی حدود  $(3/5)$  تا  $(3/8)$  ساعت دارد (۱۷-۱۲).

در این مطالعه روشی ساده برای محاسبه ضریب خاموشی پروتئین نوترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) ارائه می‌گردد.

## یافته ها

الکتروفورگرام حاصل از SDS-PAGE محلول پروتئینی، نمایانگر تک باند با وزن مولکولی تقریباً ۱۸ کیلودالتون است و عدم رویت باند اضافی یا اسمیر نشان از موفقیت در مرحله خالص سازی پروتئین نو ترکیب تولیدی است (شکل ۱).



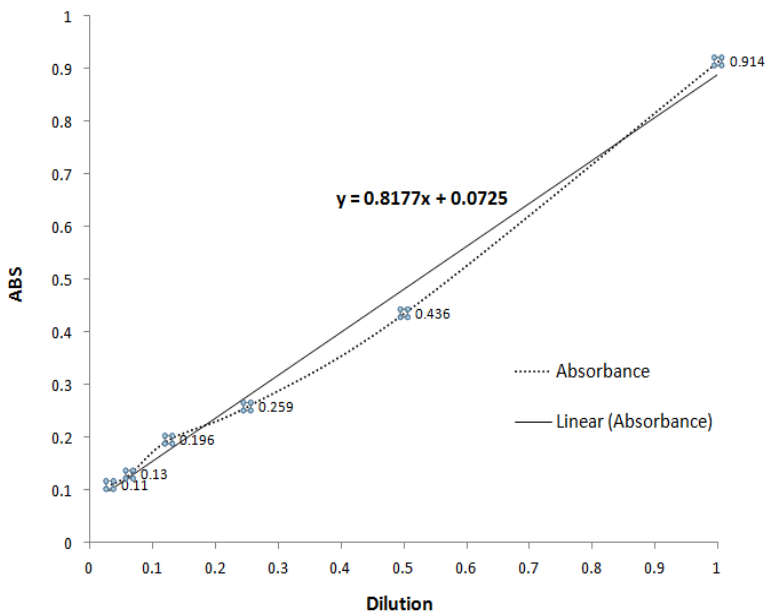
شکل ۱: تعیین وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب G-CSF با روش الکتروفورز در ژل پلی-آکریل-آمید (SDS-PAGE). (A) سدیم دودسیل سولفات؛ نشانگر وزن مولکولی شرکت Vivantis به شماره کاتالوگ PR0602؛ B و C: باندهای پروتئین G-CSF روی ژل ۱۲٪.

شد و متشکل از سوریتول، سدیم استات و توین ۸۰ بود. سپس به فالکن  $\frac{1}{2}$ ، ۴ ml از محلول پروتئین اضافه شد. حجم کل فالکن به ۸ ml رسید. پس از چند بار آرام تکان دادن و حصول اطمینان از مخلوط شدن بافر و پروتئین به طور یکنواخت، مقدار ۴ ml از آن به فالکن  $\frac{1}{4}$  اضافه شد یعنی این بار فالکن  $\frac{1}{4}$  به حجم ۸ ml رسید که مجدداً مقدار ۴ ml از آن به فالکن  $\frac{1}{8}$  منتقل شد و این روند تا فالکن آخر یعنی  $\frac{1}{64}$  ادامه یافت و از این فالکن مقدار ۴ ml مخلوط بافر و پروتئین دور ریخته شد.

## طیف سنجی فرابنفش-مرئی

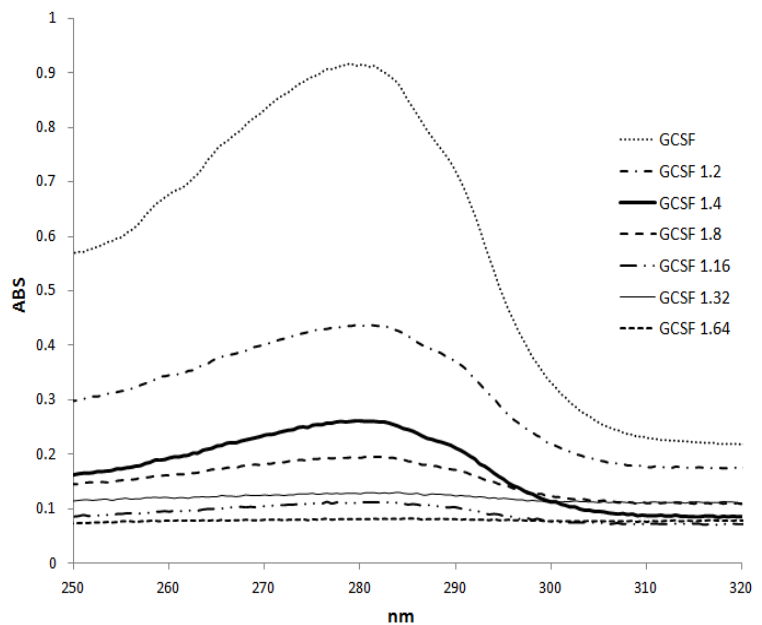
با استفاده از دستگاه طیف سنج دو پرتویی (T90 UV-VIS Spectrometer, PG instruments) و در محدوده طول موج فرابنفش (۲۰۰ الی ۳۸۰ نانومتر) میزان جذب نوری هر یک از رقت های سریالی آماده شده، به ترتیب از رقیق به غلیظ خوانده شد و پس از آن اطلاعات هر رقت به صورت اسپکتروگرامی مجزا رسم شد. با قرار دادن بالاترین شدت جذب هر یک از رقت ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر به صورت متناظر در مقابل غلظت هر یک از آنها روی نمودار استاندارد، منحنی رگرسیون نقاط حاصله بدست آمد.

هم‌گرایی منظم شدت جذب‌های نوری حاصله از رقت‌ها در طول ۲۸۰ نانومتر دلیل دیگری بر موفقیت در بیان اختصاصی پروتئین نو ترکیب تولیدی و نیز خلوص بالای آن است. همین امر باعث شد تا منحنی رگرسیون حاصله از در کنار هم قرارگیری حداکثر جذب نوری تک‌تک اسپکتروگرام‌ها به طور متناظر با غلظت آنها ماهیتی کاملاً خطی را موجب شود. خطی بودن منحنی رگرسیون حاصله خود دلیلی بر دقت در تهیه رقت‌های سریالی و ترسیم اسپکتروگرام‌های بدست آمده است (شکل ۳).



شکل ۳: منحنی استاندارد رگرسیون خطی پروتئین نو ترکیب G-CSF که شیب خط آن معادل M-1 8177/0 است.

همچنین اسپکتروگرام‌های حاصل از طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی رقت‌های پروتئینی، حداکثر جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارد که بدلیل حضور گروه‌های کروموفوری موجود (اسیدهای آمینه حلقوی مانند سیستئین، تریپتوفان و تیروزین) (۱۸) در ساختار پروتئین است (شکل ۲).



شکل ۲: اسپکتروگرام‌های استاندارد برای رقت‌های ۲/۱ الی ۶۴/۱ از محلول پروتئین نو ترکیب G-CSF در طول موج ۲۵۰ الی ۳۲۰ نانومتر

روش‌های دیگری از قبیل تعیین محتوای ماده خشک پروتئین و یا حضور آمینواسیدهای رادیواکتیو در محیط رشد سلول‌ها و سپس تعیین مقدار پروتئین‌های دارای ماده رادیواکتیو نیز برای تعیین مقدار پروتئین به کار می‌روند که به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته و پیچیدگی روش کار، معمول نیستند (۲۱).

روش‌های رنگ‌سنجی روش‌های غالب در تعیین مقدار پروتئین‌ها هستند زیرا روش‌هایی آسان، ساده و کم هزینه هستند. از میان آن‌ها می‌توان به روش‌های زیر اشاره کرد: روش طیف سنجی فرابنفش - مرئی که بر پایه میزان جذب پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر است. روش بیورت توسط Gornall و همکارانش در سال ۱۹۴۹، که در شرایط قلیایی یون مس به نیتروژن پیوند پپتیدی متصل می‌شود و این مجموعه نور را در طول موج ۵۵۰ نانومتر جذب می‌کند. در روش برادفورد رنگ آبی کوماسی به پروتئین اضافه می‌شود و میزان جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده می‌شود که روشی آسان است اما تنها ایراد این روش این است که به سختی می‌توان رنگ آبی کوماسی را از نمونه زدود. روش لوری و روش BCA نیز از دیگر روش‌های رنگ‌سنجی هستند (۵-۴ و ۲۲-۲۱).

روش طیف سنجی فرابنفش - مرئی در طول موج ۲۸۰ نانومتر که در این مطالعه از آن استفاده شده است روشی بسیار آسان، ساده، کم هزینه، دقیق و قابل دسترس برای پژوهشگران است. این روش را

با محاسبه شیب خط منحنی رگرسیون حاصله ضریب خاموشی محلول پروتئینی معادل  $M-1 \text{ cm}^{-1}$  ۰/۸۱ محاسبه شد که با عدد جهانی گزارش شده برای پروتئین نوترکیب تولید شده بوسیله تولیدکنندگان بین‌المللی این محصول نوترکیب تطابق دارد (۲۰-۱۹).

### بحث و نتیجه گیری:

روش‌های بسیاری برای توصیف پروتئین وجود دارد که به دو دسته روش‌های غیر رنگ‌سنجی و روش‌های رنگ‌سنجی تقسیم می‌شوند. از روش‌های غیر رنگ‌سنجی می‌توان به روش تعیین مقدار نیتروژن پروتئین‌ها اشاره کرد که در سال ۱۸۸۰ توسط Johan Kjeldahl توصیف شد که روندی پیچیده است که تمام نیتروژنهای موجود را ارزیابی می‌کند و بیشتر در صنایع غذایی کاربرد دارد و برای تحقیقات و آزمایشگاه‌های بالینی روش مناسبی نیست (۲۱).

روش دیگر برای مشخص کردن غلظت پروتئین، تعیین توالی آمینواسیدی آن است که این روش هم مستلزم وجود دستگاه‌های پیچیده‌ای است و منطقی به نظر نمی‌رسد که جهت کارهای روزمره تحقیقاتی از آن استفاده شود و نکته آخر این که در این روش پروتئین باید خالص باشد Gill و همکاران و Pace و همکاران نیز از روش تعیین محتوای آمینو اسیدی یک پروتئین استفاده می‌کردند (۹-۸).

می‌توان با نمونه استاندارد پروتئین یا بدون حضور آن انجام داد. با محاسبه ضریب خاموشی پروتئین مورد نظر و مقایسه آن با اعداد جهانی گزارش شده می‌توان نوع پروتئین را تشخیص داد. همچنین با استفاده از قانون بیر-لامبرت (Beer-Lambert Law) و جایگذاری ضریب خاموشی بدست آمده در این معادله، غلظت پروتئین را نیز می‌توان به طور دقیق تعیین کرد (۲۱، ۲۳).

نتایج بدست آمده در این مطالعه ضریب خاموشی معادل با  $M-1 \text{ cm}^{-1} \ 81/0$  را برای پروتئین نو ترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) نشان می‌دهد که مطابق عدد جهانی گزارش شده توسط تولیدکنندگان بین‌المللی این پروتئین و حاکی از درستی روش به کار رفته برای محاسبه این پارامتر فیزیکوشیمیایی است.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان با کد طرح تحقیقاتی به شماره ۹۱۱۱۱۷۱۰۷ است. بدین وسیله از زحمات مسئولین دانشکده و دانشگاه و کارشناسان آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد.



### References:

1. Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, et al. Protein production and purification. *Nat Methods*. 2008 Feb;5(2):135-46.
2. Clogston CL, Hsu YR, Boone TC, Lu HS. Detection and quantitation of recombinant granulocyte colony-stimulating factor charge isoforms: comparative analysis by cationic-exchange chromatography, isoelectric focusing gel electrophoresis, and peptide mapping. *Anal Biochem*. 1992 May 1;202(2):375-83.
3. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 August;227(5259):680-5.
4. Tzong-Shi Lu S-YY, Kenneth Lim, Roderick V. Jensen, Li-Li Hsiao. Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification. *North Am J Med Sci*. 2010 July;2(7):325-8.
5. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
6. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep;4(9):429-34.
7. James NG, Mason AB. Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron-containing transferrins. *Anal Biochem*. 2008 Jul 15;378(2):202-7.
8. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*. 1989 Nov 1;182(2):319-26.
9. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci*. 1995 Nov;4(11):2411-23.
10. James NG, Mason AB. Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron-containing transferrins. *Anal Biochem*. 2008;378:202-7.
11. Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta). *Curr Pharm Des*. 2004;10(11):1235-44.
12. Veronese FM, Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs*. 2008;22(5):315-29.
13. Vanz AL, Renard G, Palma MS, Chies JM, Dalmora SL, Basso LA, et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact*. 2008;7:13.
14. Veronese FM, Mero A, Caboi F, Sergi M, Marongiu C, Pasut G. Site-specific pegylation of G-CSF by reversible denaturation. *Bioconjug Chem*. 2007 Nov-Dec;18(6):1824-30.
15. Natalello A, Ami D, Collini M, D'Alfonso L, Chirico G, Tonon G, et al. Biophysical characterization of Met-G-CSF: effects of different site-specific mono-pegylations on protein stability and aggregation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42511.



16. A. Skrlin IR, M. Vuletic, D. Schwinke, D. Runac, T. Kusalic, I. Paskvan, M. Krsic, M. Bratos,, Marinc S. Comparison of the physicochemical properties of a biosimilar filgrastim with those of reference filgrastim. *Biologicals*. 2010;38:557-66.
17. Krishnanand Tiwari KK, Shebannavar SN, Pokalwar S, Mishra M, Chauhan U. Evaluation of PEGylation reaction and purification of monoPEGylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *JSIR*. 2011 Dec;70(12):1049-53.
18. John C. Anders BFP, Glenn E. Petrie, Robert L. Marlowe, John E. McEntire. Using Amino Acid Analysis to Determine Absorptivity Constants A Validation Case Study Using Bovine Serum Albumin. *BioPharm International*. 2003 FEBRUARY:30-7.
19. Chi EY, Krishnan S, Kendrick BS, Chang BS, Carpenter JF, Randolph TW. Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Protein Sci*. 2003 May;12(5):903-13.
20. Raso SW, Abel J, Barnes JM, Maloney KM, Pipes G, Treuheit MJ, et al. Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. *Protein Sci*. 2005 Sep;14(9):2246-57.
21. Alexander J. Ninfa DPB, Marilee Benore. *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology* Wiley; 2009.
22. Krishnanand Tiwari SS, Krishna Kattavarapu, Dileep Tiwari, Santosh Pokalwar, Maheshwari K Mishra. Standard curve derived errors in colorimetric quantification of biotherapeutic proteins. *Scholarly J Biotechnol*. 2012 April;1(1):24-7.
23. Daming Zhu FQ, Yimin Wu, David S. Jones, Christopher Rowe, David L. Narum,, Patrick Duffy LHM, Allan Saul. Determination of protein concentration for protein-protein conjugates using ultraviolet absorption. *Journal of Immunological Methods*. 2012;387:317-21.