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

فریبا باقریه*

*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 نوترکیب تولید شده در آزمایشگاه‌ها یا کارخانجات تولیدکننده پروتئین‌های نوترکیب را ارزیابی نمود. در این مطالعه روشی ساده برای محاسبه ضریب خاموشی پروتئین نوترکیب 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 آن ها اندازه گیری شد.

یافته ها: نتیجه الکتروفورز به صورت تک باندی حدود ۱۸ کیلو دالتون به دست آمد. نتایج حاصل از طیف سنجی فرابنفش-مرئی هر یک از رقت های سریالی به صورت اسپکتروگرام هایی مجزا رسم شد و از آن ها برای رسم منحنی خطی رگرسیون غلظت های استاندارد پروتئین نوترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) استفاده شد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده در این مطالعه ضریب خاموشی معادل با $M^{-1}\ cm^{-1}$ ۰/۸۱ را برای پروتئین نوترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) نشان می دهد 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، طیف سنجی فرابنفش-مرئی، پروتئین نوترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF)، الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)

نویسنده مسئول: فریبا باقریه

آدرس: ایران، گرگان؛ دانشگاه علوم پزشکی گلستان

ایمیل:fariba.b.001@gmail.com

مقدمه

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 فرآرده 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 آن ها می توان به انواع کروماتوگرافی ها براساس اندازه و شکل و بار الکتریکی پروتئین، الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل 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 بلاتینگ (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) ، $A=\varepsilon Cl$ ، 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(۱۰-۸).

پروتئین نوترکیب انسانی فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF)، یک عامل مهم تنظیم کننده گرانولوسیت ها در in vivo است که برای تحریک تکثیر، تمایز و بقاء دودمان گرانولوسیت ها ضروری است. G-CSF انسانیِ 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 شده اند (۱۱). برای جلوگیری از عفونت در بیماران سرطانی که دچار نوتروپنیای ناشی از شیمی درمانی می شوند، G-CSF تجویز می گردد. همچنین برای درمان بیماران مبتلا به نوتروپنیای شدید مادرزادی، لوکمی حاد، آنمی آپلاستیک، سندرم آنمی مایلودی پلاستیک، جهت پیشگیری از عفونت در مبتلایان به ایدز، بعد از پیوند مغز استخوان و برای حرکت سلول های بنیادی پیوند زده شده به گردش خون در بیمارن سرطانی و اهدا کنندگان سالم به کار می رود (۱۱). G-CSF نوترکیب یا Filgrastim، پروتئینی با ۱۸/۷ کیلو دالتون وزن و ۱۷۴ آمینو اسید است که فاقد گلایکوزیلاسیون است و نیمه عمر نسبتاً کوتاهی حدود (۳/۵ تا ۳/۸ ساعت) دارد (۱۲-۱۷).

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

روش بررسی

این مطالعه تجربی در دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. پروتئین نوترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) با غلظت ۰/۵ 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 پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل 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) ۵٪ و ژل تفکیک کننده (Resolving Gel) ۱۲٪ ساخته شد. از نشانگر وزن مولکولی شرکت Vivantis (با شماره کاتالوگ: PR0602) با دامنه kDa ۱۷۵- ۱۰/۵ استفاده شد. ژل با آبی کوماسی رنگ آمیزی گردید و با محلول رنگ بر تیمار شد.

آماده سازی رقت های سریالی استاندارد

از محلول پروتئین، رقت های سریالی به ترتیب $\frac{1}{2}$، $\frac{1}{4}$، $\frac{1}{8}$ الی $\frac{1}{64}$ ساخته شد به این صورت که ابتدا به ۶ لوله فالکن ۱۵ ml، میزان ۴ ml بافر اضافه شد. (این بافر، بافر فرمولاسیون پروتئین بود که از آریا تینا ژن تهیه شد و متشکل از سوربیتول، سدیم استات و تویین 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

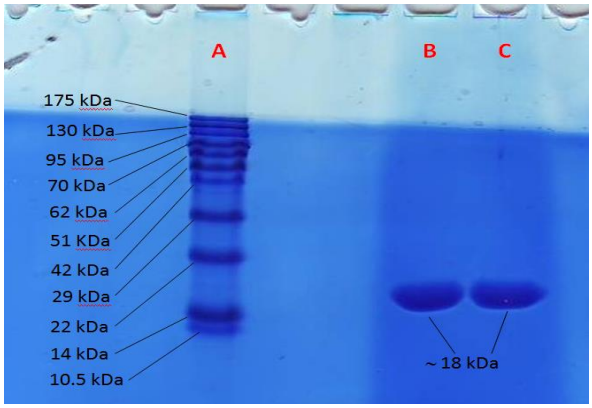
با استفاده از دستگاه طیف سنج دو پرتویی (T90 UV-VIS Spectrometer, PG instruments) و در محدوده طول موج فرابنفش (۲۰۰ الی ۳۸۰ نانومتر) میزان جذب نوری هر یک از رقت های سریالی آماده شده، به ترتیب از رقیق به غلیظ خوانده شد و پس از آن اطلاعات هر رقت به صورت اسپکتروگرامی مجزا رسم شد. با قرار دادن بالاترین شدت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

یافته ها

الکتروفورگرام حاصل از SDS-PAGE محلول پروتئینی، نمایانگر تک باند با وزن مولکولی تقریبا ۱۸ کیلودالتون است و عدم رویت باند اضافی یا اسمیر نشان از موفقیت در مرحله خالص سازی پروتئین نوترکیب تولیدی است (شکل۱).

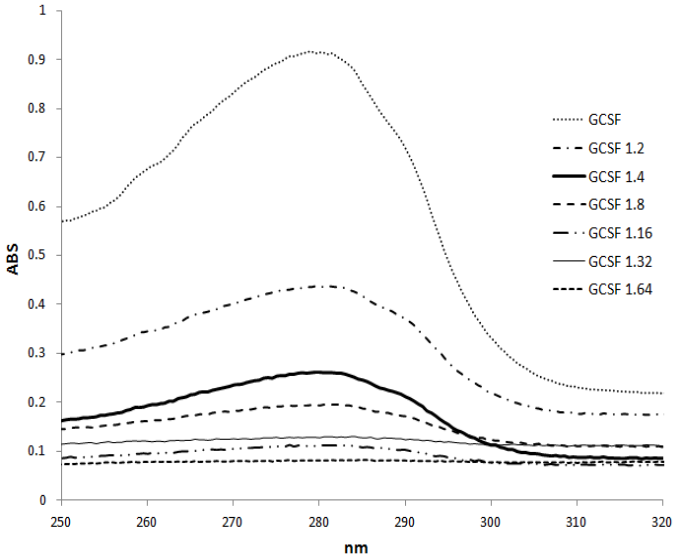
شکل۱: تعیین وزن مولکولی پروتئین نوترکیب G-CSF با روش الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE). (A): نشانگر وزن مولکولی

شرکت Vivantis به شماره کاتالوگ PR0602؛ B و C: باندهای پروتئین G-CSF روی ژل ۱۲ درصد)



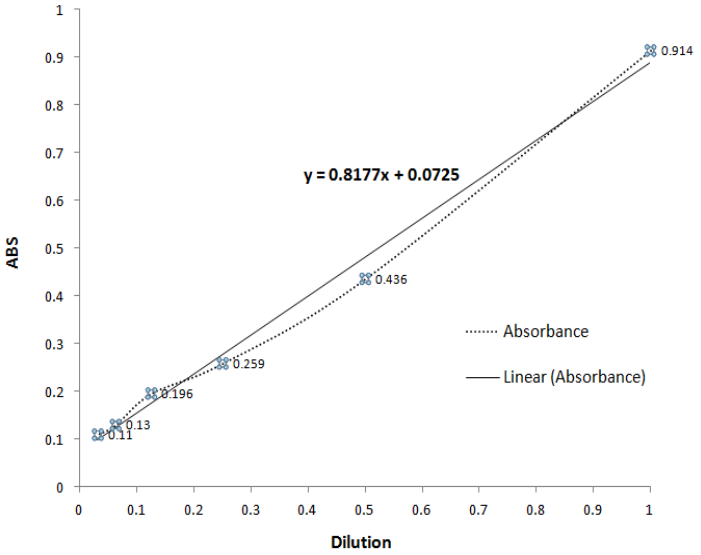
همچنین اسپکتروگرام های حاصل از طیف سنجی فرابنفش-مرئی رقت های پروتئینی، حداکثر جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارد که بدلیل حضور گروه های کروموفوری موجود (اسید های آمینه حلقوی مانند سیستئین، تریپتوفان و تیروزین) (۱۸) در ساختار پروتئین است (شکل۲).

شکل۲: اسپکتروگرام های استاندارد برای رقت های ۲/۱ الی ۶۴/۱ از محلول پروتئین نوترکیب G-CSF در طول موج ۲۵۰ الی ۳۲۰ نانومتر



هم گرایی منظم شدت جذب های نوری حاصله از رقت ها در طول ۲۸۰ نانومتر دلیل دیگری بر موفقیت در بیان اختصاصی پروتئین نوترکیب تولیدی و نیز خلوص بالای آن است. همین امر باعث شد تا منحنی رگرسیون حاصله از در کنار هم قرارگیری حداکثر جذب نوری تک تک اسپکتروگرام ها به طور متناظر با غلظت آن ها ماهیتی کاملاً خطی را موجب شود. خطی بودن منحنی رگرسیون حاصله خود دلیلی بر دقت در تهیه رقت های سریالی و ترسیم اسپکتروگرام های به دست آمده است (شکل۳).

شکل۳: منحنی استاندارد رگرسیون خطی پروتئین نوترکیب G-CSF که شیب خط آن معادل 8177/0 M-1 cm-1 است.



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

بحث و نتیجه گیری

روش های بسیاری برای توصیف پروتئین وجود دارد که به دو دسته روش های غیر رنگ سنجی و روش های رنگ سنجی تقسیم می شوند. از روش های غیر رنگ سنجی می توان به روش تعیین مقدار نیتروژن پروتئین ها اشاره کرد که در سال ۱۸۸۰ توسط Johan Kjeldhl توصیف شد که روندی پیچیده است که تمام نیتروژن های موجود را ارزیابی می کند و بیشتر در صنایع غذایی کاربرد دارد و برای تحقیقات و آزمایشگاه های بالینی روش مناسبی نیست (۲۱).

روش دیگر برای مشخص کردن غلظت پروتئین، تعیین توالی آمینواسیدی آن است که این روش هم مستلزم وجود دستگاه های پیچیده ای است و منطقی به نظر نمی رسد 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 می کردند (۸-۹). روش های دیگری از قبیل تعیین محتوای ماده خشک پروتئین و یا حضور آمینواسیدهای رادیواکتیو در محیط رشد سلول ها و سپس تعیین مقدار پروتئین های دارای ماده رادیواکتیو نیز برای تعیین مقدار پروتئین به کار می روند که به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته و پیچیدگی روش کار، معمول نیستند(۲۱)

روش های رنگ سنجی روش های غالب در تعیین مقدار پروتئین ها هستند زیرا روش هایی آسان، ساده و کم هزینه هستند. از میان آن ها می توان به روش های زیر اشاده کرد: روش طیف سنجی فرابنفش-مرئی که بر پایه میزان جذب پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر است. روش بیورت توسط Gornallو همکارانش در سال ۱۹۴۹، که در شرایط قلیایی یون مس به نیتروژن پیوند پپتیدی متصل می شود و این مجموعه نور را در طول موج ۵۵۰ نانومتر جذب می کند. در روش برادفورد رنگ آبی کوماسی به پروتئین اضافه می شود و میزان جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده می شود که روشی آسان است اما تنها ایراد این روش این است که به سختی می توان رنگ آبی کوماسی را از نمونه زدود. روش لوری و روش BCA نیز از دیگر روش های رنگ سنجی هستند (۴-۵ 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 می توان 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 می توان نوع پروتئین را تشخیص داد. همچنین با استفاده از قانون بیر-لامبرت(Beer-Lambert Law) و جایگذاری ضریب خاموشی به دست آمده در این معادله، غلظت پروتئین را نیز می توان به طور دقیق تعیین کرد (۲۱ ,۲۳)

نتایج به دست آمده در این مطالعه ضریب خاموشی معادل با 81/0 M-1 cm-1 را برای پروتئین نوترکیب فاکتور محرک گرانولوسیتی (G-CSF) نشان می دهد 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.

تقدیر و تشکر

این مطالعه برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد دانشکده فناوری های 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 می گردد.

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 ۱۹۹۵Nov;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.

Characterization of recombinant Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) protein by Extinction Coefficient Calculation

Fariba Bagherieh[1*]

*M.Sc. of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Abstract

Background & Objective: *Extinction coefficient* is the unique value to each protein and can evaluate the type and purity of recombinant protein produced in laboratories and factories producing recombinant proteins. In this study, a simple method for calculating the extinction coefficient of recombinant protein Granulocyte-Colony Stimulating Factor (**G-CSF**) is presented.

Method: G-CSF with concentration of 0.5 mg/ml was prepared from Arya Tina Gene. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method was used to check the purity of the protein, then serial dilutions of 1.2 to 1.64 of the protein were prepared and using UV-VIS spectroscopy the optical density was measured.

Results: Electrophoresis result as a single band of 18 kDa was observed. The results of UV-VIS spectroscopy of serial dilution were plotted as a distinct spectrograms and these were used to plot linear regression curve of the standard concentration of G-CSF.

Conclusion: The results of this study shows the extinction coefficient equal to 0.81 M^{-1} cm^{-1} for recombinant G-CSF that was accordant with the number reports by international producers of G-CSF and suggests the correct method is used to calculate the physicochemical parameter.

Key words: Extinction coefficient (ε), UV-VIS Spectroscopy, Recombinant Granulocyte-Colony stimulating Factor (G-CSF), sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Corresponding Author: Fariba Bagherieh

Address: Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

E-mail: fariba.b.001@gmail.com