

بهینه‌سازی واکنش‌های اتصال آمینو اسید به رزین ونگ و نشاندار کردن پپتید با کروموفور (۵/۶)-کربوکسی فلورسین

ریحانه خسروی^۱، مرتضی دلیری^۲، زهرا عزیزی^۳، محمد حسین صنعتی^۴، مریم محقق^{۱،۴} و امیر نوروزی^{*۱}

^۱ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرآیند

^۲ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زیست فناوری دامی

^۳ ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، گروه پزشکی مولکولی

^۴ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۳

چکیده

متداول ترین روش سنتز پپتیدها، سنتز روی رزین جامد است. در بین انواع رزین، رزین ونگ (Wang) یکی از رایج ترین آنهاست. در این مطالعه روشهایی برای بهبود اتصال اولگین آمینواسید از انتهای کربوکسیل (C-terminus) به رزین ونگ و همچنین نشاندار کردن انتهای آمین پپتید سنتز شده با رنگ فلورسنت (۵/۶)- کربوکسی فلورسین ارائه می‌شود. پپتید تترآرژینین (RRRR) بر روی رزین ونگ به روش سنتز بر پایه جامد سنتز شده و به انتهای آن رنگ فلورسنت (۵/۶)- کربوکسی فلورسین متصل شد. نشاندار کردن پپتید توسط تست کایزر (نین هیدرین) مورد ارزیابی قرار گرفت. بهره واکنش اتصال اولگین آرژینین (Fmoc-Arg(pbf)-OH) توسط آزادسازی گروه Fmoc (Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride) متصل به آن و سنجش میزان جذب ماوراء بنفش آن در طول موج ۲۷۸ نانومتر مورد اندازه گیری کمی قرار گرفت. جهت مقایسه بهره واکنش‌های "اتصال اولگین آمینواسید به رزین" و "نشاندار کردن با رنگ فلورسنت"، از دو گروه فعال کننده معروف کربوکسیل به نامهای DIC (N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium) و HBTU (N,N'-diisopropyl carbodiimide) استفاده شد. در اتصال اولگین آمینواسید آرژینین، واکنشگر DIC بهره واکنش را بیشتر از واکنشگر HBTU افزایش می‌دهد. هر چند لازم است طول زمان انکوباسیون به ۱۷ ساعت افزایش یابد. در حالی که برای نشاندار کردن پپتیدها، HBTU عملکرد بهتری نسبت به DIC دارد. این در حالی است که در اکثر پروتکلها از DIC برای نشاندار کردن پپتیدها توسط انواع رنگ فلورسنت استفاده شده است و برای اتصال اولگین آمینواسید نیز زمان انکوباسیون بسیار کمتر از ۱۷ ساعت پیشنهاد شده است.

واژه های کلیدی: سنتز پپتید، رنگ فلورسنت، واکنش تراکمی، گروههای فعال کننده

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۳۴۹، پست الکترونیکی: a_norouzy@nigeb.ac.ir

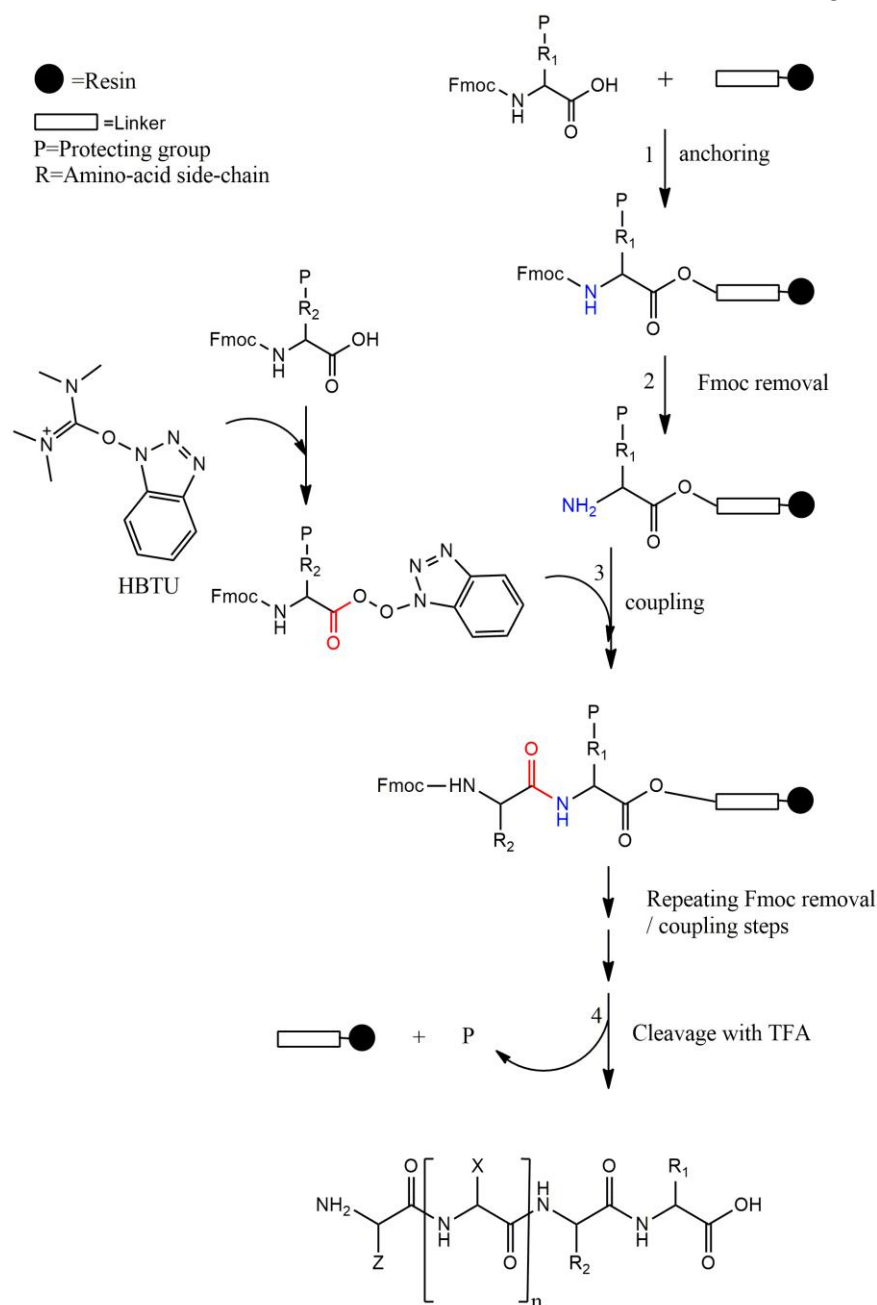
مقدمه

شیمی، سلولی و مولکولی، فیزیولوژی و... کاربرد دارند (۱۳ و ۳۷). از مزایای استفاده از پپتیدها می‌توان به وزن مولکولی پایین، زیست سازگاری بالا و سمیت کم اشاره کرد (۳۷). فیشر اولین پپتید (دی گلیسین) را سنتز کرد و

فیشر نشان داد که پروتئینها از آمینواسیدها تشکیل شده اند که توسط پیوند پپتیدی به هم متصل شده اند. پپتیدها توالیهای کوتاهی از آمینواسیدها هستند که توسط پیوند پپتیدی (آمیدی) به هم متصل می‌شوند و در علوم مختلف

تشکیل پیوند آمیدی یا پیوند پپتیدی می‌شود. در طبیعت، این میانکنشها بین بیست عدد ال-آمینواسید استاندارد، در ریبوزوم صورت می‌گیرد و در نهایت منجر به سنتز پروتئینها می‌شود. (۳) در حالی که در ریبوزوم پپتیدها از ناحیه آمین انتهایی (N-terminus) به سمت ناحیه کربوکسیل انتهایی سنتز می‌شوند، در سنتز پپتید به روش شیمیایی این مسیر برعکس است (شکل ۱).

"پدر شیمی پپتید" نام گرفت (۲۶). به سبب اهمیت سنتز پپتیدها، بروس مریفلد در سال ۱۹۶۰ سنتز پپتید در فاز جامد را معرفی کرد (۲۲). از آن زمان سنتز پپتید در زمینه های علمی مختلف مانند شیمی پروتئین و شیمی آلی مورد توجه قرار گرفته که منجر به تولید انواع پپتیدهای دارویی شده است. اساساً، سنتز پپتید از طریق واکنشهای تراکمی آمیداسیون متوالی بین گروه آمین یک آمینواسید و گروه کربوکسیل آمینواسید بعدی صورت می‌گیرد که منجر به



شکل ۱- نمایش شماتیک سنتز پپتید در فاز جامد. ۱- اتصال اولین آمینو اسید به رزین. ۲- جدا شدن گروه محافظتی Fmoc از انتهای آمینو اسید اول. ۳- گروه کربوکسیل آمینو اسید دوم ابتدا با HBTU فعال شده و سپس به گروه آمین آمینو اسید اول متصل می‌شود. مراحل ۲ و ۳ به تعداد آمینواسیدهای مورد نظر تکرار می‌شود و نهایتاً در مرحله ۴، پپتید سنتز شده در حضور اسید آلی و قوی (TFA) از رزین جدا شده و همزمان گروه‌های محافظتی زنجیره های جانبی نیز حذف می‌شوند...

دوم پیوند پپتیدی تشکیل می‌دهد. در مرحله بعد رزین شسته شده و محصولات جانبی و واکنشگرهای اضافی حذف می‌شوند. مراحل اتصال آمینواسید و جدا شدن گروه Fmoc برای تک تک آمینواسید ادامه می‌یابد. پس از اتمام سنتز روی رزین، پپتید سنتز شده با اسید قوی تری فلورواستیک اسید (TFA) (Trifluoroacetic acid) به مدت یک تا چهار ساعت (یا حتی بیشتر، بسته به توالی پپتید) انکوبه می‌شود. اسید به طور همزمان گروه‌های محافظتی زنجیره‌های جانبی را از آمینواسیدها و پپتید را از رزین جدا می‌کند. سپس با فیلتراسیون پپتید از رزین جدا شده و با دی اتیل اتر سرد رسوب داده می‌شود. پپتید رسوب داده شده توسط روش کروماتوگرافی با بهره‌بردار HPLC یا مورد خالص سازی قرار می‌گیرد.

سنتز پپتید در فاز جامد، انقلابی در تولید پپتیدهای بزرگتر و پیچیده‌تر (یا حتی پروتئینها) ایجاد کرد (۱۷). "بروس مریفیلد" پیشگام در سنتز پپتید بر پایه جامد است که در آن پپتید بر روی یک رزین نامحلول سنتز می‌شود و در آخر یک مرحله جداسازی پپتید از رزین اجازه می‌دهد پپتید مورد نظر به صورت محلول به دست آید (۲۱). او در سال ۱۹۸۴ جایزه نوبل شیمی را به دلیل اهمیت این ابداعش به دست آورد (۲۶). همان طور که گفته شد، مزیت اصلی سنتز در فاز جامد سهولت در خالص سازی تنها با یکبار شستشو است. اساساً استفاده از فاز جامد برای اتصال به پروتئینها و آنزیمها هم یک روش خالص سازی است. به این ترتیب که پس از انجام واکنش آنزیماتیک آنزیم تثبیت شده بر روی رزین با یک شستشوی ساده قابل جداسازی از محیط واکنش است. (۲۴، ۲۵، ۲۸) برای بازیابی بعد از اتصال هر آمینواسید، محصولات جانبی واکنش و واکنش دهنده‌های اضافی به راحتی با حلال دی متیل فرمامید شسته شده و توالی پپتیدی متصل به رزین باقی می‌ماند.

گام کلیدی سنتز پپتید در فاز جامد، اتصال اولگین آمینواسید به رزین است. مقیاس واکنشهای فاز جامد با توجه به

در حال حاضر سنتز شیمیایی پپتید به دو صورت انجام می‌گیرد:

۱- سنتز در فاز محلول (Liquid Phase Peptide Synthesis): بیشتر برای سنتز پپتیدهای کوچک با تعداد رزیدوهای کم به کار می‌رود. مهمترین مزیت این روش امکان جداسازی و خالص سازی پپتید محافظت زدایی شده و کامل بعد از هر مرحله است (۱۱).

۲- سنتز در فاز جامد (Solid Phase Peptide Synthesis): عبارتست از رشد زنجیره پپتیدی روی یک رزین جامد که با افزودن متوالی اسیدهای آمینه از انتهای کربوکسیل (C-terminus) توالی پپتیدی به سمت انتهای آمین (N-terminus) انجام می‌شود (۱۱، ۲۳، ۳۱).

سنتز در فاز جامد نسبت به سنتز در فاز مایع این مزیت مهم را دارد که پس از اضافه کردن هر آمینواسید با یک شستشوی ساده پپتید متصل به رزین روی فیلتر باقی می‌ماند و سایر مواد از جمله ناخالصیها و محصولات جانبی شسته می‌شوند. پس خالص سازی بسیار ساده تر از سنتز پپتید در فاز مایع است. فرآیند سنتز پپتید در فاز جامد با فعال سازی گروه کربوکسیل اولگین آمینواسید و اتصال آن به رزین آغاز می‌شود (شکل ۱). در مورد آمینواسیدهای مورد استفاده در سنتز لازم به ذکر است که انتهای آمین آنها توسط گروه Fmoc (Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride)، محافظت شده است. در این مشتقات آمینو-اسیدی علاوه بر آمین انتهایی، در صورت وجود گروه عاملی فعال (مانند گروه عاملی هیدروکسیل در سرین، گروه عاملی آمین در لیزین و غیره)، آن گروه جانبی نیز توسط مولکولهای خاصی محافظت شده هستند. بنابراین تنها گروه عاملی در دسترس و آزاد گروه کربوکسیل آنها است. پس از اتصال اولگین آمینواسید به رزین، گروه محافظ Fmoc توسط محلول ۲۰ درصد پپیریدین (Piperidine) در دی‌متیل فرمامید (DMF) (Dimethylformamide) جدا می‌شود. سپس گروه آمین آزاد شده با کربوکسیل آمینواسید

آمینواسید اول به رزین ونگ، و همچنین بهبود اتصال رنگ فلورسنت جهت نشان دار کردن پپتید پیشنهاد شده است.

مواد و روشها

مواد شیمیایی مورد استفاده و منبع آنها به شرح زیر می باشد: رنگ فلورسنت (۵/۶)-کربوکسی فلورسین با درصد خلوص ۹۰ درصد، رزین ونگ (۳۵)، آمینواسید آرژینین با درصد خلوص ۹۹ درصد (۲۷)، دی متیل فرمامید (۱۰) و دی ایزو پروپیل اتیل آمین (۳۲)، HBTU (۳۲)، دی کلرومتان (۱۰) و دی ایزو پروپیل کربودی‌ایمید، HOBt و پیریدین، دی‌متیل‌آمینوپیریدین (۳۲).

بارگذاری آمینواسید بر روی رزین ونگ در سنتز پپتید در فاز جامد: ۵۰ میلی‌گرم رزین ونگ پس از سه بار شستشو با دی متیل فرمامید، به منظور تورم (swelling) به مدت ۹۰-۸۰ دقیقه در دی متیل فرمامید قرار داده شد تا گروه‌های عاملی هیدروکسیل برای واکنش در معرض قرار بگیرند. برای اتصال اولگین آمینواسید به رزین، ابتدا آمینو-اسید در محلول DCM/DMF حل و سپس HOBt به آن اضافه شد. پس از حل شدن کامل HOBt، محلول حاوی آمینواسید به رزین اضافه شد و سپس DIC و در آخر DMAP به رزین اضافه شدند، در حالی که فلاسک واکنش در دمای اتاق بر روی شیکر با ۵۰ دور در دقیقه قرار داشت (شکل ۴).

به منظور مقایسه میزان بارگذاری در یک روش دیگر به جای DIC از HBTU برای فعال کردن گروه کربوکسیل آمینواسید اول و اتصال آن به رزین استفاده شد. مانند روش قبل پس از متورم کردن رزین، آمینواسید به آن اضافه شد. به این صورت که ابتدا گروه کربوکسیل آمینواسید توسط HBTU و DIPEA فعال و به رزین اضافه شد (آمینواسید فعال شده دو بار اضافه و هر بار به مدت یک ساعت انکوبه شد). گروه Fmoc نور فرابنفش را در طول موج ۲۷۸ نانومتر جذب می‌کند که از این ویژگی برای سنجش میزان

مقدار اولگین آمینواسید متصل شده به رزین مشخص می‌شود و نسبت به اتصال سایر آمینواسیدها به یکدیگر، اتصال اولگین آمینواسید به رزین مرحله محدود کننده بازده واکنش است. ظرفیت بارگذاری روی رزینهای تجاری معمول بین ۰/۳ تا ۲/۵ میلی مول به ازای هر گرم رزین گزارش شده است (۲۶). بنابراین هدف از بهبود اتصال اولین آمینواسید به رزین، افزایش بهره واکنش بارگذاری است تا بدین وسیله بهره نهایی سنتز پپتید افزایش یابد.

پروتئینها و پپتیدها در زیر میکروسکوپ غیر قابل مشاهده هستند و با نشاندار کردن فلورسانسی می‌توان آنها را در سلول، بافت و غیره ردیابی کرد (۱۴، ۱۵، ۲۷، ۳۵) بنابراین نشاندار کردن پپتیدها و پروتئینها به عنوان یک ابزار بسیار متداول و ضروری مورد استفاده قرار می‌گیرد. رنگ فلورسانس یا کروموفور (۵/۶)-کربوکسی فلورسین (5/6) carboxyfluorescein با نام تجاری FAM یکی از متداول ترین رنگها برای نشان دار کردن پروتئینها و پپتیدها است. رنگ FAM این محبوبیت را مدیون پایداری شیمیایی در شرایط سخت دمایی و pH های بسیار اسیدی و بازی، زیست سازگاری، قیمت پایین و بهره کوانتومی بالا است. مشتقات پپتیدی نشان دار شده با فلورسین به عنوان نشانگرهای فلورسنت در تجهیزاتی مانند میکروسکوپ کونفوکال روبشی لیزری (Laser Scanning Confocal Microscope)، فلوسایتومتر، اندازه گیری قطبش فلورسانس و طیف سنجی قطبش فلورسانس درون سلولی استفاده می‌شوند (۱۰).

رنگ فلورسنت (۵/۶)-کربوکسی فلورسین، سبز رنگ و از مشتقات FITC (Fluorescein isothiocyanate) (فلورسین ایزوتیوسیانات) بوده و با بهره کوانتومی بالا جزء رنگهای بسیار پر کاربرد در زمینه نشاندار کردن انواع مولکولها مانند پروتئینها، الیگونوکلوئیدها و پپتیدها می باشد (۹، ۱۹، ۲۰، ۳۲، ۳۶). در این پژوهش، راهکارهایی برای بهبود اتصال

۲-فعال سازی گروه کربوکسیل رنگ توسط DIC-HOBt (شکل ۳) (۳۳).

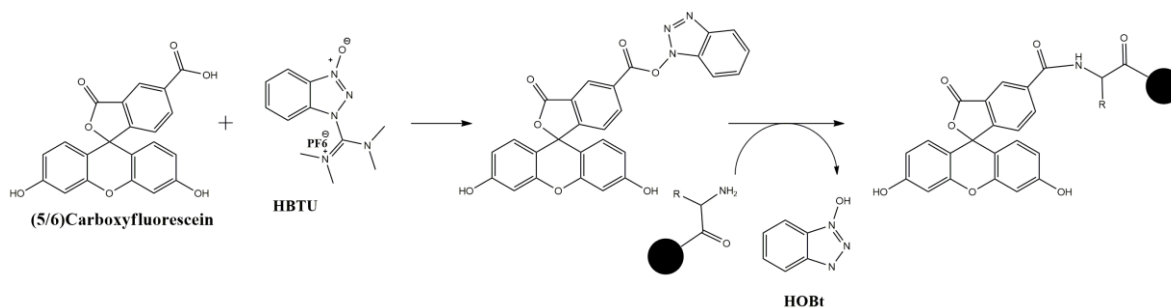
در روش اول، ۰/۳ میلی مول (۵/۶)-کربوکسی فلورسین با HBTU فعال شده و به ۰/۱ میلی مول پپتید تترا آرژینین متصل به رزین اضافه شد. محلول فوق در دمای اتاق با سرعت ۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۷ ساعت انکوبه شد. سپس تست کایزر (نین هیدرین) به منظور اطمینان از اتصال رنگ به انتهای آمین پپتید انجام شد. مکانیسم واکنش در شکل ۲ نشان داده شده است.

در روش دوم، به ۰/۱ میلی مول رزین-پپتید با انتهای آمین آزاد، ۰/۳ میلی مول (۵/۶)-کربوکسی فلورسین در ۲ میلی-لیتر محلول حجمی DMF/DCM حل شد و بعد ۰/۱۴ میلی لیتر DIC و ۱۳ میلی گرم HOBt به آن اضافه شد و سپس محلول حاصل به رزین-پپتید اضافه شد در حالی که فلاسک واکنش بر روی شیکر با ۵۰ دور در دقیقه قرار داشت و مانند روش اول در دمای محیط به مدت ۱۷ ساعت انکوباسیون صورت گرفت. شکل ۳ مکانیسم فعال سازی رنگ FAM با DIC را نشان می‌دهد.

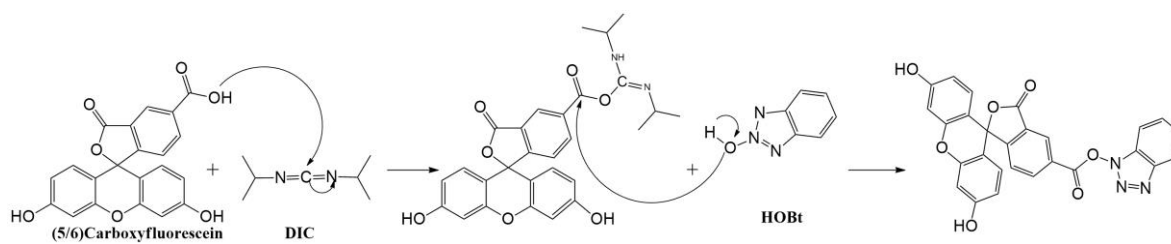
اتصال آمینواسید به رزین و مقایسه میزان بارگذاری در دو روش فوق استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰ میلی گرم از رزین بار گذاری شده توزین و ۱ میلی لیتر از محلول پیپریدین ۲۰ درصد در دی متیل فرمامید به آن اضافه شد و بعد از ورتکس به مدت یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفت تا گروههای Fmoc به طور کامل جدا شود. پس از ته نشین شدن رزین، ۱۰ میکرو لیتر از محلول رویی برداشته شد و با ۹۹۰ میکرو لیتر از پیپریدین ۲۰ درصد رقیق شد (ضریب رقت = ۰/۰۱). سپس در طول موج ۲۷۸ نانومتر شدت جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر با محلول شاهد ۲۰ درصد پیپریدین در دی متیل فرمامید مورد اندازه گیری قرار گرفت.

نشاندن کردن انتهای آمین پپتید متصل به رزین: برای فعال کردن رنگ (۵/۶)- کربوکسی فلورسین به منظور اتصال آن به انتهای آمین پپتید به دو روش زیر عمل شد:

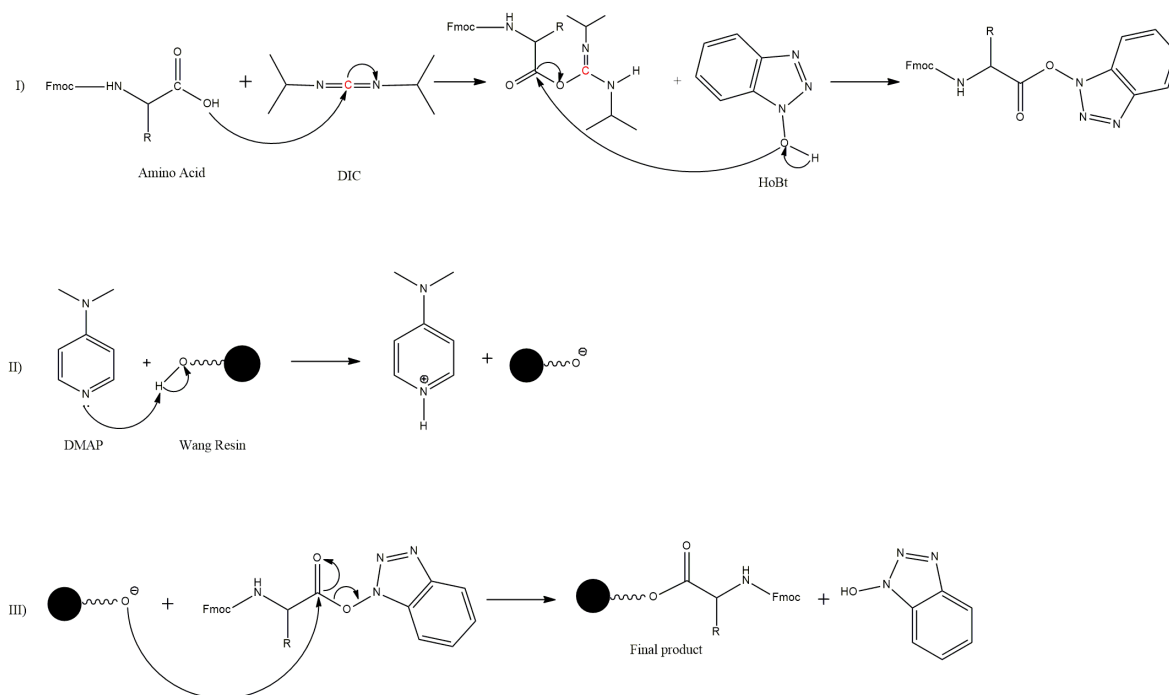
۱-فعال سازی گروه کربوکسیل رنگ توسط HBTU (شکل ۲) (۵).



شکل ۲- فعال کردن رنگ (۵/۶)- کربوکسی فلورسین با HBTU و اتصال آن به انتهای آمین پپتید.



شکل ۳- فعال کردن رنگ (۵/۶)- کربوکسی فلورسین توسط DIC-HOBt.



شکل ۴- بارگذاری اولین آمینواسید بر روی رزین ونگ.

گردید. به این ترتیب نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از DIPEA به عنوان جمع‌کننده پروتون از محیط به هر صورت در افزایش میزان بارگذاری مؤثر است، به ویژه در طول زمانهای انکوباسیون کوتاهتر. در دو بار بارگذاری متوالی آمینواسید روی رزین با استفاده از HBTU و DIPEA هر بار به مدت یک ساعت، میزان جذب ۰/۳ گزارش شد که در مقایسه با واکنشگرهای DIC، HOBt و DMAP و انکوباسیون ۳ ساعت بیشتر است. اما با افزایش طول مدت انکوباسیون آمینواسید با DMAP/HOBt/DIC به ۱۷ ساعت بهره‌بارگذاری نسبت به استفاده از HBTU/DIPEA بالاتر می‌رود.

نشاندار کردن پپتید با رنگ فلورسنت برای ردیابی آن و مطالعات درون سلولی ضروری است. در این مطالعه، پپتید تترا آرژینین به دو روش مختلف با رنگ FAM نشاندار شد. تفاوت روشها در استفاده از واکنشگرهای HBTU/DIPEA یا DIC/HOBt بود. کامل بودن واکنش به صورت کیفی و با تست کایزر صورت پذیرفت.

در هر دو روش برای سنجش کیفی میزان اتصال رنگ به پپتید، از تست کایزر استفاده شد. در روش اول برای اتصال رنگ به انتهای آمین، تست کایزر منفی مشاهده شد، به این معنی که آمین آزاد وجود ندارد و واکنش به طور کامل انجام شده است. در روش دوم، بعد از دو بار اضافه کردن رنگ و هر بار به مدت ۱۷ ساعت در دمای اتاق (۳۳)، همچنان تست کایزر مثبت بود که نشان دهنده وجود آمین آزاد و در نتیجه ناکامل بودن واکنش است.

نتایج

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در شرایط یکسان و با استفاده از واکنشگرهای DIC، HOBt و DMAP، افزودن DIPEA به واکنش باعث افزایش جذب پروتون و بهبود بارگذاری بر روی رزین می‌شود. در شرایط انکوباسیون به مدت ثابت ۳ ساعت، در حضور DIPEA جذب ۰/۲۵ و در غیاب آن ۰/۲ گزارش شد. با افزایش مدت زمان انکوباسیون به ۱۷ ساعت، در حضور DIPEA جذب ۰/۴۲ و در عدم حضور آن ۰/۴ مشاهده

جدول ۱- شرایط مختلف بار گذاری رزین با آمینواسید.

DIC	HOBt	DMAP	DIPEA	HBTU	t^a / hr	A_{278}^b
●	●	●	●		۱۷	۰/۴۲
●	●	●	●		۳	۰/۲۵
●	●	●			۱۷	۰/۴
●	●	●			۳	۰/۲
			●	●	۲×۱ ^c	۰/۳

دو بار انکوباسیون^c، جذب در ۲۷۸ نانومتر^b، طول مدت انکوباسیون^a

متداول و ساده تر از بیوستتر آن است. همان طور که در مقدمه گفته شد، سنتز بر پایه جامد روی رزینهای مخصوص سنتز پپتید صورت می‌گیرد. یکی از انواع رزینهایی که برای سنتز پپتید در فاز جامد استفاده می‌شود، رزین ونگ می‌باشد. از مزایای استفاده از این رزین می‌توان به ظرفیت بار گذاری بالا، عدم نیاز به واکنشگرهای گران قیمت و ممانعت از راسمیزاسیون آمینواسیدها اشاره کرد (۳۰). در بسیاری از مطالعات برای سنتز پپتید در فاز جامد از این رزین استفاده شده است (۷، ۳۰، ۳۴). در مطالعه حاضر نیز پپتید بر روی رزین ونگ سنتز شده است. در اوکین سنتز پپتید بر پایه فاز جامد که توسط بروس مریفیلد انجام شد، از (N,N'-dicyclohexylurea) DCC برای فعال کردن گروه کربوکسیل به منظور تشکیل پیوند پپتیدی مورد استفاده قرار گرفت (۲۱). پس از آن به کار گیری DCC برای سنتز پپتید در فاز جامد گسترش یافت. در هنگام استفاده از DCC ترکیب دی‌سیکلوهگزیل اوره به عنوان یکی از محصولات جانبی تولید می‌شود که در بسیاری از حلالهای مورد استفاده در سنتز پپتید نامحلول است و می‌تواند موجب انسداد منافذ فیلتر شود. برای غلبه بر این مشکل از DIC استفاده شد که محصول جانبی آن، N-آسیل اوره می‌باشد که حلالیت بیشتری نسبت به دی‌سیکلوهگزیل اوره دارد (۱۶).

هدف از این مطالعه بهبود بارگذاری آمینواسید بر روی رزین ونگ به منظور افزایش بازده سنتز پپتید بر پایه فاز

نین هیدرین معرف آمین نوع اول است زیرا در حضور آن به رنگ آبی پررنگ در می‌آید. در صورتی که آمین انتهایی پپتید به رنگ FAM متصل شود، پیوند حاصل یک پیوند آمیدی است و معرف نین هیدرین بی‌رنگ می‌شود. پس از جدا کردن آخرین Fmoc از انتهای آمین پپتید تترآرژینین متصل به رزین، رنگ FAM با هر یک از دو واکنشگر مذکور فعال و به صورت مجزا به انتهای آمین پپتید متصل شد. سپس پپتید نشاندار شده متصل به رزین با معرف نین هیدرین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از یک بار واکنش، با هر یک از واکنشگرهای HBTU/DIPEA یا DIC/HOBt تست کایزر مثبت بود. هر چند رنگ آبی مشاهده شده با استفاده از واکنشگر HBTU/DIPEA کمرنگ تر بود. اما با تکرار واکنش روی آمینهای آزاد پپتید (قسمتهای نشاندار نشده) تست کایزر برای واکنشی که در آن از HBTU/DIPEA استفاده شده بود کاملاً منفی (عدم حضور آمین آزاد و در نتیجه کامل شدن واکنش) و برای واکنشی که در آن از DIC/HOBt استفاده شده بود همچنان مثبت (وجود آمین آزاد و کامل نشدن واکنش) بود. بنابراین برای نشاندار کردن پپتید، واکنشگر HBTU/DIPEA از واکنشگر DIC/HOBt بهتر عمل می‌کند.

بحث

پپتیدها کاربردهای گسترده ای دارند که از آن جمله می‌توان به خواص ضد سرطانی و ضد میکروبی آنها اشاره کرد. (۱، ۲). سنتز پپتیدهای کوتاه به روش شیمیایی بسیار

افعال شدن گروه کربوکسیل آمینواسید با DIC و سپس واکنش آن با HOBt مجموعاً یک واکنش دو مرحله‌ای است؛ در حالی که در مرحله III یون الکوکسی در رزین یک نوکلئوفیل قوی و گروه کربوکسیل در آمینواسید دارای گروه ترک‌کننده خوب HOBt است. بنابراین هر دو واکنشگر این مرحله بسیار فعال هستند و از واکنش‌پذیری بالایی برخوردارند. لذا حمله نوکلئوفیلی و به دنبال آن انجام واکنش با سرعت بالایی صورت می‌گیرد. بنابراین احتمالاً مرحله محدود کننده سرعت مرحله I است. همچنین افزودن DIPEA به واکنش موجب افزایش بازده بارگذاری بر روی رزین شد. زیرا DIPEA به سبب ساختار خود -آمین نوع سوم با ممانعت فضایی بالا- به عنوان جمع‌کننده پروتون به کار می‌رود و از سویی باز DMAP به پروتون و یا آب حساس است که می‌تواند پروتون را از محیط جمع کند تا کاتالیزور عملکرد بهتری داشته باشد. همچنین در مرحله I، DIPEA می‌تواند یک پروتون از گروه اسیدی آمینواسید جذب کند که باعث حمله موثرتر آن به DIC خواهد شد.

نتایج نشان می‌دهد که بارگذاری با واکنشگرهای HBTU و DIPEA حتی با زمان انکوباسیون کوتاهتر، بازده بیشتری نسبت به DIC و HOBt و DMAP در زمان سه ساعت دارد که نشان دهنده دو چیز است: ۱- تاثیر مثبت DIPEA در واکنش و ۲- بهتر بودن HBTU به عنوان فعال‌کننده گروه کربوکسیل نسبت به HOBt-DIC. مکانیسم اتصال آمینو اسید با HBTU مشابه شکل ۲ می‌باشد یعنی فعال شدن گروه کربوکسیل آمینو اسید و حمله اکسیژن الکلی رزین به آن. با افزایش زمان واکنش، HOBt-DIC بهره بالاتری از HBTU در بارگذاری از خود نشان می‌دهد. بنابراین به رغم سینتیک پایین، HOBt-DIC همچنان بهتر از HBTU برای بارگذاری آمینواسید روی رزین عمل می‌کند، مشروط بر این که زمان انکوباسیون به اندازه کافی طولانی باشد.

جامد و نیز بهبود واکنش تراکمی در اتصال رنگ (۵/۶)- کربوکسی فلورسین به انتهای آمین سنتز شده بود. در یکی از روشهای بارگذاری، اولین آمینواسید از ناحیه انتهای کربوکسیل بر روی رزین ونگ با استفاده از HOBt-DIC و DMAP به مدت زمان انکوباسیون سه ساعت انجام شد (۱۲). مکانیسم واکنش در شکل ۴ ترسیم شده است. در این بارگذاری، ابتدا در مرحله (I) آمینو اسید از اکسیژن کربوکسیل به DIC حمله نوکلئوفیلی می‌کند. سپس در یک واکنش اضافه-حذف HOBt جایگزین باقی مانده DIC در ترکیب Amino acid/DIC می‌شود. HOBt یک گروه ترک‌کننده خوب است که در صورت مواجه شدن کربوکسیل آلفا در آمینواسید متصل به HOBt با یک نوکلئوفیل خوب می‌تواند با آن جایگزین شود. نوکلئوفیل خوب در مرحله (II) تشکیل می‌شود به این ترتیب که DMAP به میزان کاتالیتیک ۰/۱ کی والان نسبت به رزین باعث ایجاد یون الکوکسی در رزین می‌شود. الکوکسی (O^-) نسبت به گروه هیدروکسیل رزین ($-OH$) نوکلئوفیل بسیار قوی تری است که می‌تواند حمله موثرتری به محصول مرحله (I) داشته باشد (شکل ۴ مرحله III).

در مدت سه ساعت میزان بارگذاری (واکنشهای سریالی فوق در شکل ۴) مطلوب نبود و با افزایش زمان انکوباسیون به مدت ۱۷ ساعت، میزان بارگذاری به میزان ۴۰ درصد افزایش یافت (جدول ۱). بنابراین واکنش تراکمی مذکور از سینتیک پایینی برخوردار است و پیشنهاد می‌شود به رغم طول زمان انکوباسیون پیشنهادی به میزان حدود سه ساعت در اکثر پروتکلها، زمان انکوباسیون افزایش یابد. در شکل ۴، مرحله II یک واکنش ساده باز با اسید است لذا از سرعت بالایی برخوردار است و نمی‌تواند مرحله محدود کننده سرعت باشد. در عوض مراحل I و III واکنشهای جایگزینی از نوع اضافه-حذف هستند. از آنجا که HOBt یک گروه ترک‌کننده خوب و یون الکوکسی (محصول II) یک نوکلئوفیل قوی است، منطقاً سرعت واکنش III از I باید بیشتر باشد. زیرا در مرحله

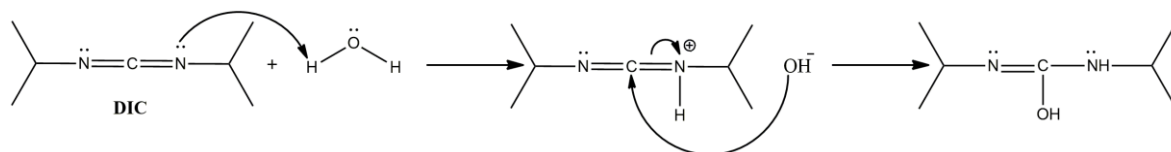
مقایسه قرار گرفت. در روش اول، گروه کربوکسیل رنگ FAM با HBTU فعال شده و به انتهای آمین اضافه شد (شکل ۲). بعد از نشاندار کردن، تست کایزر منفی بود که نشان دهنده تکمیل واکنش است. Pengcheng Zhang و همکاران (۳۸) نیز از همین روش استفاده کردند و نتیجه بهتری در اتصال رنگ FAM به آمینو اسید حاصل شده است. این مطالعات کاربردی بودن پروتکل این تحقیق را تعیین می‌کند. در حالی که در اکثر مطالعات و پروتکل‌های مرسوم (۶، ۱۰، ۳۳) از روش دوم یعنی استفاده از HOBt-DIC برای فعال کردن FAM استفاده شده بود. در این تحقیق مشخص شد با روش دوم و حتی افزایش زمان انکوباسیون به مدت ۱۷ ساعت و تکرار مجدد کوپلینگ، نتیجه مطلوب حاصل نشد و تست کایزر همچنان مثبت بود.

البته رنگ نارنجی در هر دو روش مشاهده می‌شد که نشان دهنده انجام واکنش در محیط بازی و حلال آلی است ولی روش اول بهره بالاتری دارد. بنابراین در مراحل نهایی که کلیویج و خالص سازی با HPLC است، پپتید نشاندار (محصول) با بهره بیشتری سنتز شده و مانند روش دوم بخشی از پپتید نشاندار نشده وجود ندارد. علاوه بر مزایای فوق، با توجه به گران بودن قیمت رنگهای فلورسنت از جمله رنگ FAM در استفاده از روش اول (علی‌رغم ذکر روش دوم در اکثر پروتکلها) تردیدی باقی نمی‌ماند.

بازده پایین در روش دوم نسبت به روش اول می‌تواند به دو دلیل باشد: یکی واکنش جانبی و ناخواسته DIC با آب (شکل ۵) و دیگری واکنش مؤثرتر HBTU در فعال کردن گروه کربوکسیل رنگ FAM و طبیعتاً حمله بهتر نوکلئوفیل آمین انتهایی به آن.

بهتر است محل نشاندار کردن پپتید انتهای آمین آن باشد زیرا اولاً در مقایسه با سایر نواحی پپتید که دارای آمینواسید هایی با گروههای عاملی قابل نشاندار کردن هستند (مانند لیزین، سرین، ترئونین) گروه حجیم پروب فلورسانس به انتهای پپتید متصل است که معمولاً مزاحمت کمتری در عملکرد بیولوژیکی پپتید ایجاد می‌کند. ثانیاً همان طور که گفته شد (شکل ۱) پپتیدها تا وقتی روی رزین هستند گروههای جانبی محافظت شده دارند ولی می‌توان انتهای آمین را با پیپریدین محافظت زدایی کرد. بنابراین نشاندار کردن در انتهای آمین به لحاظ سنتزی این مزایا را دارد: ۱- رنگ فلورسنت نمی‌تواند واکنش ناخواسته ای با گروه های جانبی سایر آمینواسید بدهد ۲- خالص سازی بسیار ساده و فقط با چند بار شستشو قابل انجام است. ۳- با انجام یک تست کایزر می‌توان مشاهده کرد که آیا واکنش اتصال رنگ کامل شده است یا خیر، و در صورت مثبت بودن تست (وجود آمین آزاد) واکنش تراکمی دوباره تکرار شود. ۴- پیوند آمیدی رنگ FAM با آمین انتهایی به اسید قوی TFA حساس نیست و در اثر کلیویج از آن جدا نمی‌شود. بنا به دلایل گفته شده، در این مطالعه پپتید ترا آرژینین در ناحیه آمین انتهایی نشاندار شد.

رنگ فلورسنت FAM از دیرباز برای نشاندار کردن مولکولها (۸) و ردیابی آنها در سلول مورد استفاده قرار گرفته است (۴، ۲۹). از این رنگ به دلایل گوناگون و در سلولهای مختلف استفاده شده است. از جمله کاربردهای این رنگ می‌توان به ردیابی پپتیدهای ضد میکروبی در ریه انسان، (۴) و مطالعه پپتیدهای حامل داروی علیه سلولهای سرطانی (۱۸، ۳۸) نیز اشاره کرد. در این تحقیق برای تعیین بهترین روش نشاندار کردن با رنگ FAM، از دو پروتکل (قسمت مواد و روشها) استفاده شد و نتایج آنها مورد



شکل ۵- واکنش DIC با آب.

استفاده از گروه فعال کننده DIC/HOBt و افزایش زمان انکوباسیون روش بهینه در بارگذاری روی رزین محسوب می‌شود. برای نشاندار کردن انتهای آمین پپتید با رنگ (۵/۶)-کربوکسی فلورسین به رغم اکثر پروتکلها، استفاده از HBTU برای فعال کردن گروه کربوکسیل رنگ از واکنشگرهای DIC/HOBt بهتر است زیرا واکنشگر HBTU فعال کننده بهتری برای گروه کربوکسیل است.

تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از طرح شماره 960318-I-625 پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری می باشد که بدینوسیله نویسندگان لازم می دانند از پژوهشگاه مذکور تقدیر و تشکر نمایند.

تخریب DIC توسط آب می تواند در واکنش بارگذاری آمینو اسید با DIC روی رزینها هم اتفاق بیفتد، به همین دلیل در اکثر پروتکلها به استفاده از حلال خشک توصیه شده است.

نتایج مشاهده شده در ارتباط با ارجحیت HBTU به DIC/HOBt برای نشاندار کردن عکس نتایج بارگذاری روی رزین بود. علت این امر، تفاوت در خواص نوکلئوفیلی آمین انتهای با گروه هیدروکسیل در رزین ونگ است. گروه آمین (انتهای پپتید) نسبت به گروه هیدروکسیل (در رزین) نوکلئوفیل بهتری است.

نتیجه گیری

برای اتصال اولین آمینواسید به رزین ونگ به عنوان اولین و تعیین کننده ترین مرحله در سنتز پپتید بر پایه فاز جامد،

منابع

- 1- دانشمند، ف (۲۰۱۴). "استخراج و خالص سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب (*Ziziphus Jujuba*). " مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۲۷(۲): ۲۱۱-۲۲۳.
- 2- زرنندی میان‌دوآب، ل. و زاده حسینقلی، الف. (۲۰۱۸). "تجزیه و تحلیل آماری پپتیدهای ضدسرطان گیاهی با استفاده از محیط R". مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۳۱(۳): ۴۳۶-۴۴۸.
- 3- Abdali, N., Barth E., Norouzy A., Schulz R., Nau W. M., Kleinekathöfer U., Tauch A. and Benz R. (2013). "Corynebacterium jeikeium jk0268 constitutes for the 40 amino acid long PorACj, which forms a homooligomeric and anion-selective cell wall channel." PloS one 8(10): e75651.
- 4 - Akram, A. R., Avlonitis N., Lilienkamp A., Perez-Lopez A. M., McDonald N., Chankeshwara S. V., Scholefield E., Haslett C., Bradley M. and Dhaliwal K. (2015). "A labelled-ubiquicidin antimicrobial peptide for immediate in situ optical detection of live bacteria in human alveolar lung tissue." Chemical science 6(12): 6971-6979.
- 5 - Anaspec. "Tips for Peptide Synthesis." from https://www.anaspec.com/html/peptide_tips.html.
- 6 - Begum, A. A., Moyle P. M. and Toth I. (2016). "Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor." Bioorganic & medicinal chemistry 24(22): 5834-5841.
- 7 - Cabrele, C., Langer M. and Beck-Sickinger A. G. (1999). "Amino acid side chain attachment approach and its application to the synthesis of tyrosine-containing cyclic peptides." The Journal of Organic Chemistry 64(12): 4353-4361.
- 8 - Chen, R. F. and Knutson J. R. (1988). "Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers." Analytical biochemistry 172(1): 61-77.
- 9 - Duval, R., Bui L.-C., Berthelet J., Dairou J., Mathieu C., Guidez F., Dupret J.-M., Cools J., Chomienne C. and Rodrigues-Lima F. (2015). "A RP-UFLC Assay for Protein Tyrosine Phosphatases: Focus on Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2 (PTPN2)." Scientific reports 5: 10750.
- 10 - Fischer, R., Mader O., Jung G. and Brock R. (2003). "Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis." Bioconjugate chemistry 14(3): 653-660.

- 11 - Guzmán, F., Barberis S. and Illanes A. (2007). "Peptide synthesis: chemical or enzymatic." *Electronic Journal of Biotechnology* **10**(2): 279-314.
- 12 - Hoogewijs, K., Deceuninck A. and Madder A. (2012). "Aromatic capping surprisingly stabilizes furan moieties in peptides against acidic degradation." *Organic & biomolecular chemistry* **10**(20): 3999-4002.
- 13 - Hooshmand, K. and Asoodeh A. (2016). "The influence of GL-9 peptide on A549 and human and animal blood cells".
- 14 - Horn, M. and Neundorff I. (2018). "Design of a novel cell-permeable chimeric peptide to promote wound healing." *Scientific reports* **8**(1): 16279.
- 15 - Hossein-Nejad-Ariani, H., Althagafi E. and Kaur K. (2019). "small peptide Ligands for targeting eGFR in triple Negative Breast Cancer Cells." *Scientific reports* **9**(1): 2723.
- 16 - Izdebski, J., PACHULSKA M. and ORLOWSKA A. (1994). "N-Cyclohexyl-N'-isopropylcarbodiimide: a hybrid that combines the structural features of DCC and DIC." *International journal of peptide and protein research* **44**(5): 414-419.
- 17 - Kent, S. (2008). "Total chemical synthesis of proteins." *Chemical Society Reviews* **38**(2): 338-351.
- 18 - Kiss, É., Gyulai G., Pári E., Horváti K. and Bősze S. (2018). "Membrane affinity and fluorescent labelling: comparative study of monolayer interaction, cellular uptake and cytotoxicity profile of carboxyfluorescein-conjugated cationic peptides." *Amino acids* **50**(11): 1557-1571.
- 19 - Mann, A. P., Scodeller P., Hussain S., Braun G. B., Mölder T., Toome K., Ambasadhan R., Teesalu T., Lipton S. A. and Ruoslahti E. (2017). "Identification of a peptide recognizing cerebrovascular changes in mouse models of Alzheimer's disease." *Nature Communications* **8**(1): 1403.
- 20 - Mann, A. P., Scodeller P., Hussain S., Joo J., Kwon E., Braun G. B., Mölder T., She Z.-G., Kotamraju V. R., Ranscht B., Krajewski S., Teesalu T., Bhatia S., Sailor M. J. and Ruoslahti E. (2016). "A peptide for targeted, systemic delivery of imaging and therapeutic compounds into acute brain injuries." *Nature Communications* **7**: 11980.
- 21 - Merrifield, R. B. (1985). "Solid phase synthesis (Nobel lecture)." *Angewandte Chemie International Edition in English* **24**(10): 799-810.
- 22 - Nelson, D. L., Lehninger A. L. and Cox M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*, Macmillan.
- 23 - Norouzy, A., Assaf K. I., Zhang S., Jacob M. H. and Nau W. M. (2015). "Coulomb Repulsion in Short Polypeptides." *The Journal of Physical Chemistry B*. **43**(1), 119-133.
- 24 - Norouzy, A., Habibi-Rezaei M., Qujeq D., Vatani M. and Badiei A. (2010). "Adsorptive immobilization of acetylcholine esterase on octadecyl substituted porous silica: optical bioanalysis of carbaryl." *Bulletin of the Korean Chemical Society* **31**(1): 157-161.
- 25 - Norouzy, A., Qujeq D. and Habibi-Rezaei M. (2009). "The inhibitory effect of dissolved carbaryl in dioxane on physically adsorbed acetylcholinesterase." *Reaction Kinetics and Catalysis Letters* **98**(2): 391.
- 26 - Palomo, J. (2014), Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides." **4**(62): 32658-32672.
- 27 - Pedersen, N. W., Holm A., Kristensen N. P., Bjerregaard A.-M., Bentzen A. K., Marquard A. M., Tamhane T., Burgdorf K. S., Ullum H., Jennum P., Knudsen S., Hadrup S. R. and Kornum B. R. (2019). "CD8+ T cells from patients with narcolepsy and healthy controls recognize hypocretin neuron-specific antigens." *Nature Communications* **10**(1): 837.
- 28 - Qujeq, D., Roushan T., Norouzy A., Habibi-Rezaei M. and Mehdinejad-Shani M. (2012). "Effects of dichlorvos and carbaryl on the activity of free and immobilized acetylcholinesterase." *Toxicology and industrial health* **28**(4): 291-295.
- 29 - Ralston, E., Hjelmeland L. M., Klausner R. D., Weinstein J. N. and Blumenthal R. (1981). "Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions effect of impurities, and purification of the dye." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **649**(1): 133-137.

- 30 - Sandhya, K. and Ravindranath B. (2008). "A protocol for racemization-free loading of Fmoc-amino acids to Wang resin." *Tetrahedron Letters* **49**(15): 2435-2437.
- 31 - Shahabi, M., Hajihosseini R., Nau W. M., Noghabi K. A. and Norouzy A. (2020). "Augmenting Peptide Flexibility by Inserting Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in Their Sequence." *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*: 1-8.
- 32 - Tan, B. X., Brown C. J., Ferrer F. J., Yuen T. Y., Quah S. T., Chan B. H., Jansson A. E., Teo H. L., Nordlund P. and Lane D. P. (2015). "Assessing the Efficacy of Mdm2/Mdm4-Inhibiting Stapled Peptides Using Cellular Thermal Shift Assays." *Scientific Reports* **5**: 12116.
- 33 - Tokmina-Roszyk, M., Tokmina-Roszyk D. and Fields G. B. (2013). "The synthesis and application of Fmoc-Lys (5-Fam) building blocks." *Peptide Science* **100**(4): 347-355.
- 34 - Trivedi, H. S., Anson M., Steel P. G. and Worley J. (2001). "A method for selective N-Boc deprotection on Wang resin." *Synlett* **2001**(12): 1932-1934.
- 35 - Wang, X., Teng D., Wang X., Hao Y., Chen H., Mao R. and Wang J. (2019). "Internalization, distribution, and activity of peptide H2 against the intracellular multidrug-resistant bovine mastitis-causing bacterium *Staphylococcus aureus*." *Scientific reports* **9**(1): 7968.
- 36 - Wang, Y., Tang L., Li Z., Lin Y. and Li J. (2014). "In situ simultaneous monitoring of ATP and GTP using a graphene oxide nanosheet-based sensing platform in living cells." *Nature Protocols* **9**: 1944.
- 37 - Zarandi, M. L. (2018). "Statistical analysis of plant anticancer peptides using the R environment".
- 38 - Zhang, P., Lock L. L., Cheetham A. G. and Cui H. (2014). "Enhanced cellular entry and efficacy of tat conjugates by rational design of the auxiliary segment." *Molecular pharmaceutics* **11**(3): 964-973.

Improving Reaction Yields of Binding Amino Acids to Wang Resin and Peptide Labeling with (5/6)-Carboxyfluorescein

Khosravi R.¹, Daliri M.², Azizi Z.³, Sanati M.H.⁴, Mohaghegh M.^{1,4} and Norouzy A.^{1*}

¹ Dept. of Bioprocess Engineering, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Animal Biotechnology, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

³ Dept. of Molecular Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran

⁴ Dept. of Medical Genetics, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The most common method for peptide synthesis is to synthesize it on a solid resin. Among the variety of resins, Wang resin is one of the highly use ones. In this study, we introduced improved protocols for anchoring an amino acid on the Wang resin, a famous resin for peptide synthesis, and N-terminally labeling peptide with (5/6)-carboxyfluorescein, a fluorescent dye. The peptide tetra arginine, RRRR, was synthesized on Wang resin with solid phase peptide synthesis (SPPS) method and the dye was attached to its N-terminus. The attachment yield of the first arginine residue (Fmoc-Arg(pbf)-OH) were quantified by liberating the Fmoc groups from the amino acid/resin complex following measure its UV absorption at 278 nm. The labeling was monitored by Ninhydrin test that reveals presence of primary, unbound N-terminally amines. In anchoring the first arginine residue on the resin, DIC (N,N'-Diisopropyl carbodiimide) works more efficiently than HBTU (N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate), only if the incubation time increases to 17 hours; while, HBTU undeniably enhances the efficiency of the fluorescence labeling compared to DIC. However, in most available protocols, DIC was recommended for labeling the peptides with (5/6)-carboxyfluorescein and the recommended incubation time for attaching the first amino acid on the Wang resin is usually far shorter than 17 hours.

Keywords: Peptide synthesis, Fluorescent dye, Coupling reaction, Activating agents