مقاله پژوهشی

به کارگیری روش سریع و حساس Real time PCR در تشخیص ناخالصی های DNA در اینترفرون نوترکیب

بابک ممنون[۱]، تقی ناصرپور فریور[۱*]، محسن کریمی ارزنانی[۲]

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۲- بخش پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۳/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۸/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: اینترفرون‌ها خانواده‌ای از سایتوکاین‌ها هستند که در پاسخ ایمنی به عفونت‌های ویروسی نقش اساسی دارند. در جریان تولید اینترفرون نوترکیب در میزبان بیولوژیک، قطعاتی از اسیدنوکلئیک میزبان وارد محصول می‌شود. به علت وجود محدودیت‌های روش‌های قبلی در تشخیص این آلودگی‌ها، هدف از این مطالعه، استفاده از روش مولکولی سریع و حساس Real time PCR در این ناخالصی‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا با استخراج DNA از میزبان باکتریایی و تهیه رقت‌های متوالی از آن، واکنش Real time PCR به کمک رنگ SYBR Green I انجام گرفت و منحنی استاندارد رسم گردید. پس از استخراج DNA از اینترفرون و انجام واکنش PCR، میزان DNA به کمک منحنی استاندارد، تعیین گردید.

نتایج: بررسی‌های انجام شده بر روی چند نمونه اینترفرون، میزان آلودگی DNA را حدود ۰/۰۲ پیکوگرم در هر دوز محصول نشان داد. همچنین پرایمرهای طراحی شده در واکنش فوق، هیچ گونه واکنشی با یکدیگر و سایر عوامل مداخله کننده نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: مطالعه فوق برای اولین بار در ایران بهینه سازی شد و نشان داد که تکنیک Real time PCR می‌تواند به عنوان یک روش کاربردی و بسیار دقیق در مراکز تولیدی جهت تشخیص ناخالصی‌های DNA ناشی از میزبان، در اینترفرون و سایر محصولات دارویی نوترکیب به کار برده شود.

کلمات کلیدی: ناخالصی DNA، محصولات دارویی نوترکیب، اینترفرون، Real time PCR، SYBR Green I

مقدمه

اینترفرون‌ها خانواده‌ای از سایتوکاین‌ها هستند که در پاسخ ایمنی ذاتی به عفونت‌های ویروسی، نقش اساسی دارند و به عنوان لیگاند، جهت اتصال اختصاصی به گیرنده‌های سطح سلول عمل می‌کنند. عملکرد بی نظیر اینترفرون‌ها باعث استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌هایی همچون هپاتیت، مالتیپل اسکلروزیس (MS) و لوسمی‌ها شده است (۱).

پس از کشف این واقعیت که اینترفرون‌ها باعث ایجاد تعادل بین سیستم‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی در پاسخ به عفونت‌های میکروبی می‌شوند، عملکرد این سایتوکاین‌ها در سیستم ایمنی، آشکارتر شده است (۲).

اینترفرون‌ها با ایجاد یک محیط داخل سلولی، شبکه‌ای از ژن‌ها را فعال می‌کنند که نسخه برداری از آن‌ها باعث ساخت پروتئین‌هایی با عملکرد ضد توموری و ضد ویروسی می‌شود (۳).

سه رده از اینترفرون‌ها وجود دارند: تیپ I یا اینترفرون‌های غیر ایمنی که شامل اینترفرون‌های آلفای تولید شده توسط لوکوسیت‌ها و اینترفرون‌های بتای تولید شده توسط فیبروبلاست‌ها، می‌باشند. تیپ II یا اینترفرون‌های ایمنی که شامل اینترفرون گاما می‌باشند و توسط سلول‌های کشنده طبیعی و

* نویسنده مسئول: تقی ناصرپور فریور، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. تلفن: ۳۳۲۴۹۷۱-۰۲۸۱
Email: taghin@yahoo.com

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

سلول‌های T تولید می‌شوند. تیپ III که شامل اینترفرون لامبدا می‌باشند (۴،۵).

در میان بسیاری از سیستم‌های زیستی که جهت تولید اینترفرون نوترکیب و سایر محصولات دارویی پروتئینی به کار می‌روند، باکتری گرم منفی *اشریشیا کولی* (*E.coli*) دارای توانایی رشد سریع و آسان در محیط‌های ارزان قیمت و سیستم ژنتیکی کاملاً شناخته شده می‌باشد (۶). همچنین این باکتری، به علت دارا بودن وکتورهای متعدد و گونه‌های جهش یافته متنوع، یکی از بهترین میزبان‌ها محسوب می‌شود (۷،۸).

استفاده از *E.coli* به عنوان میزبان تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب، منوط بر ایجاد سیستم‌های کنترلی مختلف از جمله پاکسازی محصولات تولید شده، از نظر حضور DNA سلول میزبان در حین تولید محصولات (۹) و در پایان فرآیند تخلیص و استخراج دارو می باشد (۱۰،۱۱).

اگر چه اهمیت حضور ناخالصی‌های DNA در محصولات دارویی به خوبی مشخص نشده است؛ لذا این امکان وجود دارد که این DNA بتواند وارد سیستم ژنتیکی مصرف کنندگان شده و باعث تغییر در سطح بیان ژن‌های سلولی و یا حتی بیان یک ژن بیگانه شود (۱۲). بنابراین شرکت‌های سازنده محصولات دارویی باید ورود ناخالصی‌های DNA را در محصول نهایی کنترل کرده و مقدار آن‌ها را اندازه گیری نمایند. میزان مجاز DNA باقی مانده در محصولات، از نظر سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) صد پیکوگرم در هر دوز محصول می‌باشد و از نظر سازمان بهداشت جهانی و اتحادیه اروپا تا حد ده نانوگرم در هر دوز محصول، مجاز در نظر گرفته می‌شود (۱۳).

در چند سال اخیر، روش‌های هیبریداسیون DNA و بررسی سطح آستانه کل DNA جهت تعیین مقدار کمی آلودگی‌های DNA در محصولات دارویی به کار رفته‌اند (۱۴).

اصول کلی روش هیبریداسیون DNA بر پایه اتصال DNA تک رشته‌ای کاوشگر (پروب) به DNA تک رشته‌ای باکتری میزبان که در یک نقطه ساکن شده است، می‌باشد. در این حالت، یک DNA دو رشته‌ای با دو رشته متفاوت ایجاد می‌شود (یک رشته DNA کاوشگر و رشته دیگر DNA میزبان) که میزان غلظت آن، به وسیله مقایسه سیگنال تولید شده توسط نمونه مجهول با سیگنال تولید شده توسط نمونه استاندارد، اندازه‌گیری می‌شود.

روش بررسی سطح آستانه کل DNA بر پایه اتصال دو پروتئین اختصاصی به DNA تک رشته می‌باشد که یکی از پروتئین‌ها به عنوان آنتی بادی و دیگری به عنوان پروتئین متصل شونده به DNA تک رشته عمل می‌کند (۱۵).

در صنایع تولید داروهای زیستی نوترکیب، تکنیک Real time PCR جهت تکثیر DNA و تعیین مقدار کمی آن به صورت همزمان، به کار می‌رود. این عمل باعث شناسایی توالی های اختصاصی DNA و تعیین مقدار آن در یک نمونه می‌شود (۱۶). روش Real time PCR جهت شناسایی باکتری‌ها، قارچها و ویروس‌ها در داروهای پروتئینی به کار رفته است (۲۱-۱۷). استفاده از Real time PCR جهت شناسایی اختصاصی ناخالصی‌های DNA در پلاسمیدها نیز گزارش شده است(۲۲, ۲۳). در سال‌های اخیر روش Real time PCR بر مبنای استفاده از رنگ ISYBR Green جهت شناسایی ناخالصی DNA ناشی از تخمدان همستر چینی به عنوان میزبان، در محصولات دارویی به کار رفته است (۲۴).

با توجه به صرف وقت زیاد، هزینه‌های بالا و حساسیت نسبتاً پائین روش‌های پیشین، هدف از این مطالعه، به کارگیری روش بسیار حساس و اختصاصی Real time PCR بر مبنای استفاده از رنگ SYBR Green I در تشخیص ناخالصی‌های DNA ناشی از باکتری *E.coli* در محصول دارویی نوترکیب اینترفرون براساس توالی 16S rRNA می‌باشد که در آن، امکان تشخیص آلودگی‌های DNA تا حد کمتر از یک پیکوگرم، امکان‌پذیر شده است.

مواد و روش‌ها

۱- **کشت نمونه:** ابتدا سویه غیر نوترکیب W3110 باکتری *E.coli* که میزبان تولید محصولات نوترکیب است، از بخش تولیدی انستیتوپاستور ایران دریافت شد و یک کلنی از آن در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محیط LB broth تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به طور شبانه روزی کشت داده شد.

۲- **استخراج ژنوم باکتری:** جهت استخراج DNA، از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به میزان ۴ میلی لیتر برداشته شد و به دو میکروتیوپ ۲ میلی لیتری انتقال یافت و در 12000rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد. سپس

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

طبق دستورالعمل کیت به میزان ۱۸۰ میلی لیتر بافر لیز کننده مخصوص کیت به نمونه‌ها اضافه شد و به دنبال آن نیم ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس از ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K جهت هضم پروتئینی استفاده شد. در این مرحله، لیز کامل سلولی صورت گرفت و یک محلول هموژن حاصل گردید. ادامه کار طبق دستور العمل کیت QIAGEN صورت گرفت و جذب ستونی DNA بر روی غشاء سیلیکا انجام گرفت و پس از شستشو با بافر مخصوص، استخراج DNA پایان پذیرفت. غلظت و چگالی نوری DNA تخلیص شده در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-1000 (BioRad,USA) تعیین گردید.

۳- طراحی پرایمر: جهت تکثیر ناحیه ژنی 16SrRNAبه طول ۱۴۱ نوکلئوتید از DNA ژنومی باکتری *E.coli*، ابتدا توالی ناحیه مورد نظر از پایگاه نوکلئوتیدی NCBI به دست آمد. سپس به کمک نرم افزار (Applied Biosystems, Foster city, CA,USA) Primer Express Ver3 برای ژن مورد مطالعه، پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید. توالی پرایمرهای تهیه شده به صورت زیر سفارش داده شد:

Fw-5'AAA GGA GAC TGC CAG TGA TA-3'
Rw-5'AGG TCG CTT CTC TTT GTA TG-3'

جهت اطمینان از عدم همولوژی و مکمل بودن توالی پرایمرها با توالی‌های نوکلئوتیدی در بخش‌های دیگر ژنوم، توالی‌های طراحی شده در قسمت BLAST پایگاه BLAST Search tool NCBI به آدرس http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast بررسی شدند.

۴- انجام واکنش Real time PCR: در مطالعه فوق از دستگاه ABI 7300 Sequence Detection system (Applied Biosystems, Foster city, CA,USA) استفاده شد. برنامه زمانی- دمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد.

مرحله اول که منجر به دناتوره شدن DNA الگو و فعال شدن آنزیم پلیمراز می‌گردد، در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و به مدت یک دقیقه انجام گرفت. در مرحله دوم، واکنش تکثیری DNA در ۴۰ سیکل و با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه ادامه یافت. مرحله پایانی جهت ترسیم منحنی تفکیک یا منحنی ذوب به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. واکنش های Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به صورت دوتایی در پلیت‌های۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از SYBR Green (TaKaRa,Japan) PCR Master Mix، یک میکرولیتر (غلظت ۱۰پیکومول) از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرولیتر رنگ Rox و بقیه آن آب مقطر تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر اضافه شد.

۵- تهیه رقت‌های متوالی از DNA الگو و ترسیم منحنی استاندارد: جهت بهینه سازی واکنش Real time PCR از DNA الگو، هفت رقت متوالی به صورت ۱۰ نانوگرم، ۲ نانوگرم، ۴۰۰ پیکوگرم، ۸۰ پیکوگرم، ۱۶ پیکوگرم، ۳/۲ پیکوگرم و ۰/۸ پیکوگرم در میکرولیتر تهیه شد و واکنش Real time PCR جهت تکثیر رقت‌های متوالی تهیه شده به صورت دوتایی به همراه یک واکنش بدون حضور DNA الگو (کنترل منفی) در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد. در پایان واکنش، منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و سیکل آستانه (محور عمودی) ترسیم شد. از شیب منحنی استاندارد برای محاسبه راندمان واکنش تکثیری استفاده شد.

۶- استخراج DNA از محصول دارویی اینترفرون: با توجه به حضور عوامل ممانعت کننده از PCR مانند توئین در فرآورده نهایی محصولات، از ترکیب دارویی فعال اینترفرون استفاده شد. پس از جمع آوری ۵ نمونه از ترکیب دارویی فعال اینترفرون تولید شده در انستیتو پاستور ایران، که در فواصل زمانی یک هفته تولید شده بودند، همه نمونه‌ها با یکدیگر ترکیب شده و استخراج DNA طبق دستور العمل کیت QIAGEN صورت گرفت و DNA به دست آمده در پایان، در میکروتیوپ ۲ میکرولیتری جمع آوری شد.

۷- انجام واکنش Real time PCR و محاسبه میزان ناخالصی DNA موجود در اینترفرون: پس از انجام واکنش Real time PCR به صورت دوتایی و به کمک ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده از محصول اینترفرون، از سیکل‌های آستانه (Ct) که برای هر واکنش به صورت دوتایی بود، میانگین گرفته

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

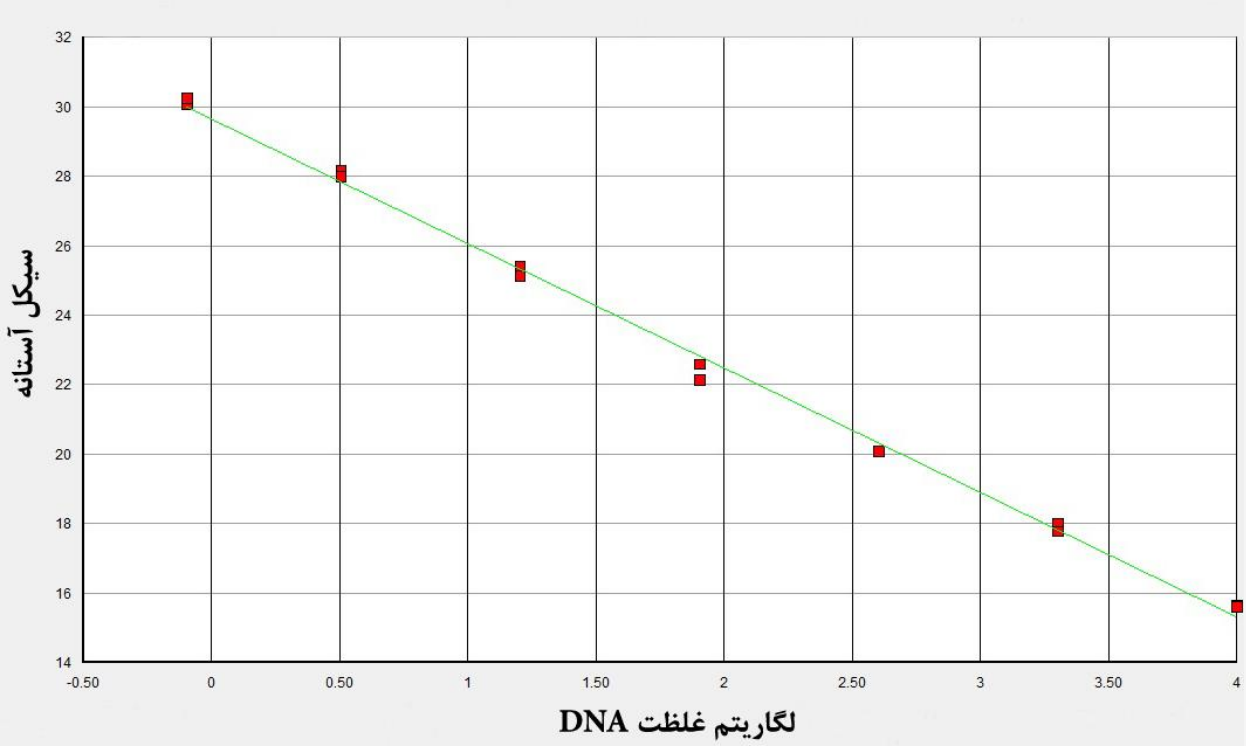
شد و سپس با قرار دادن عدد محاسبه شده در معادله منحنی استاندارد، میزان ناخالصی DNA موجود در اینترفرون، به دست آمد.

نتایج

پس از پایان تکثیر رقت‌های متوالی DNA باکتری *E.coli* با شیب غلظت‌های ۱۰ نانوگرم الی ۰/۸ پیکوگرم، منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت DNA و تعداد سیکل‌های واکنش Real time PCR ترسیم شد و یک نمودار خطی با ضریب همبستگی بالاتر از ۰/۹۸ به دست آمد (نمودار ۱).

شدن پرایمرها (پرایمردایمر) و عدم تکثیر قطعات بیگانه، منحنی ذوب و یا منحنی تفکیک ترسیم شد (نمودار ۲).

حساسیت و اختصاصی بودن واکنش Real time PCR به دمای اتصال، زمان اتصال و همچنین به غلظت کاتیون‌ها و پرایمرها در مخلوط واکنش بستگی دارد. بنابراین جهت افزایش حساسیت و اختصاصی بودن واکنش، این عوامل بهینه سازی شدند. غلظت مناسب برای پرایمرها ۱۰ پیکومول در میکرولیتر انتخاب شد. دمای اتصال مطلوب برابر ۶۰ درجه سانتی گراد و غلظت کاتیون‌ها از جمله منیزیم حدود ۲ میلی مول تعیین شد.



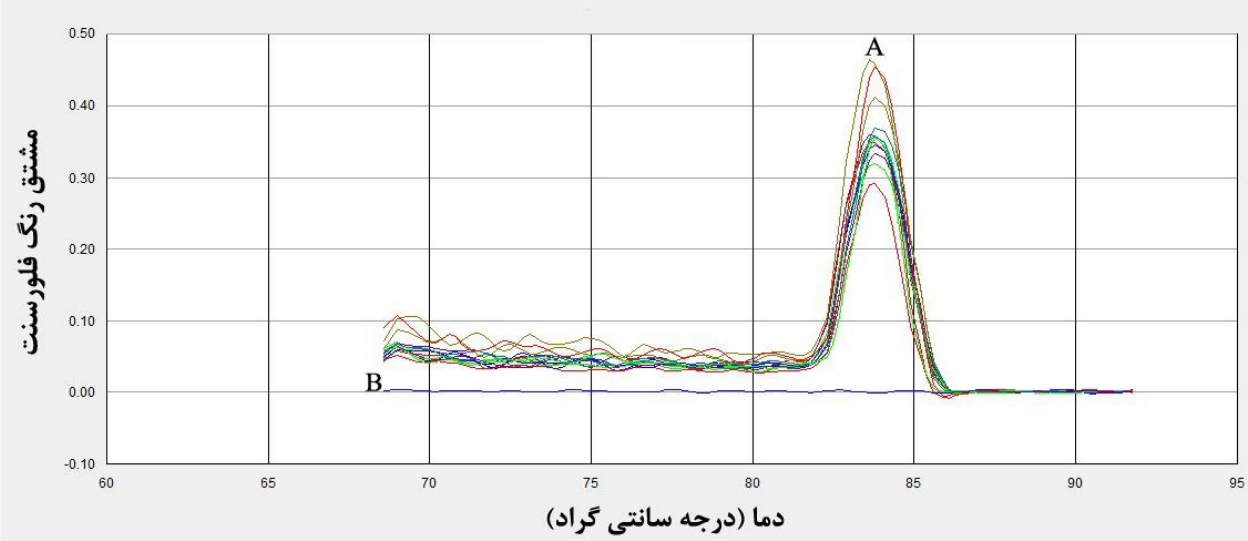
نمودار ۱: منحنی استاندارد تکثیر رقت‌های متوالی DNA ژنومی بر اساس لگاریتم غلظت DNA (محور افقی) و تعداد سیکل‌های واکنش PCR (محور عمودی). شیب خط منحنی برابر ۳/۲۳- با ضریب تعیین (R^2) ۰/۹۹ به دست آمد.

در مطالعه حاضر از رنگ فلورسنت SYBR Green I به عنوان آشکارساز استفاده شد. این ماده قادر است در شیار کوچک مولکول DNA دو رشته‌ای قرار گرفته و نور فلورسنت منتشر کند که به طور غیر اختصاصی به مولکول DNA متصل می‌شود. بنابراین جهت تعیین تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت

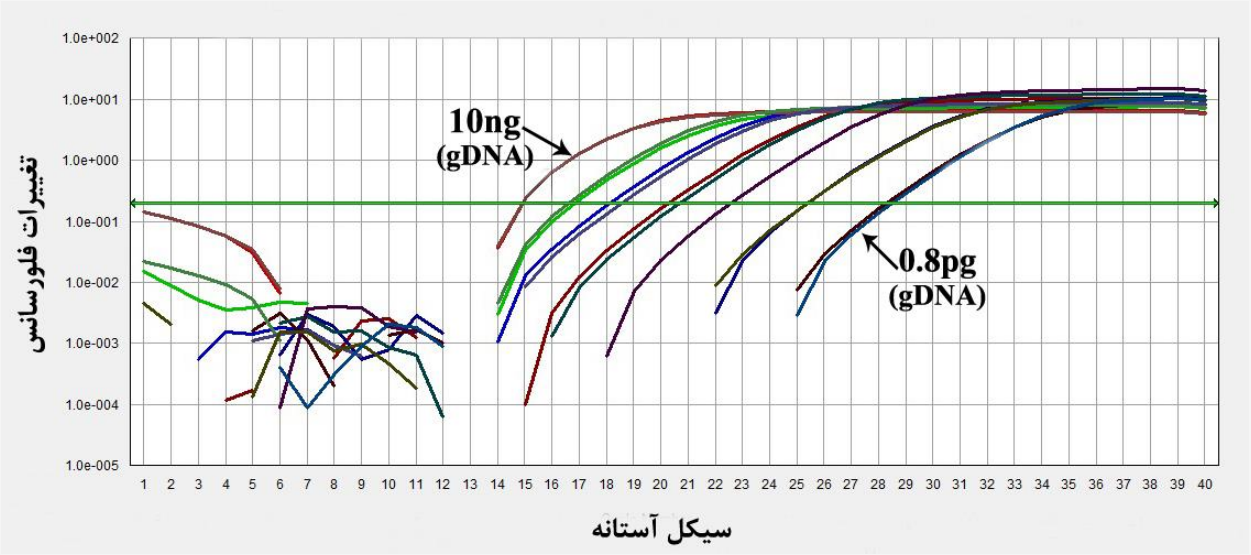
زمان اتصال مناسب، برابر ۲۰ ثانیه مشخص شد. حساسیت روش راه اندازی شده جهت تشخیص ناخالصی‌های DNA، تا حد ۰/۸ پیکوگرم در هر دوز محصول رسید. این میزان، ۴ برابر حساس‌تر از اعداد گزارش شده در روش‌های قبلی هیبریداسیون DNA (۳ پیکوگرم) و بررسی سطح آستانه DNA (۳/۷۳ پیکوگرم) مشخص

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

شد. در واکنش Real time PCR، منحنی‌های تکثیری مربوط به واکنش‌های دوتایی در اکثر موارد با یکدیگر همپوشانی داشتند و بیانگر رقت‌های متوالی ژنوم باکتری از ۱۰ نانوگرم الی ۰/۸ پیکوگرم بودند (نمودار ۳).

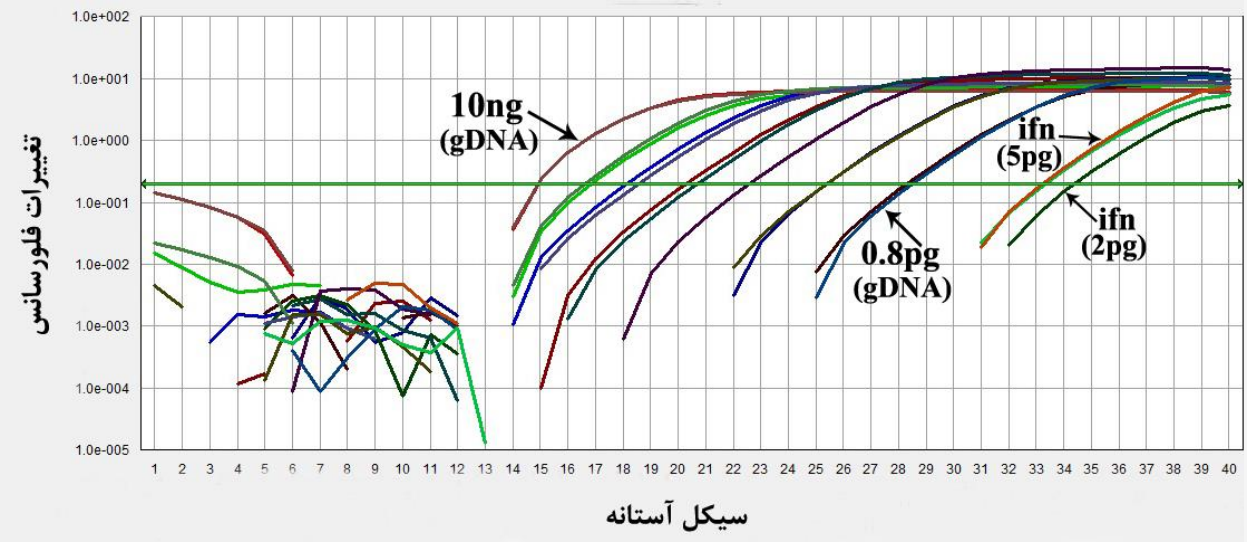


نمودار ۲: منحنی تفکیک (منحنی ذوب) بر اساس دما (محور افقی) و مشتق سیگنال فلورسنت (محور عمودی) دریافتی از دستگاه. A منحنی تفکیک ژن را نشان می‌دهد که قطعه تکثیری مورد نظر در دمای ۸۴ درجه سانتی گراد دناتوره می‌شود. B بیانگر عدم اتصال پرایمرها (پرایمردایمر) است.

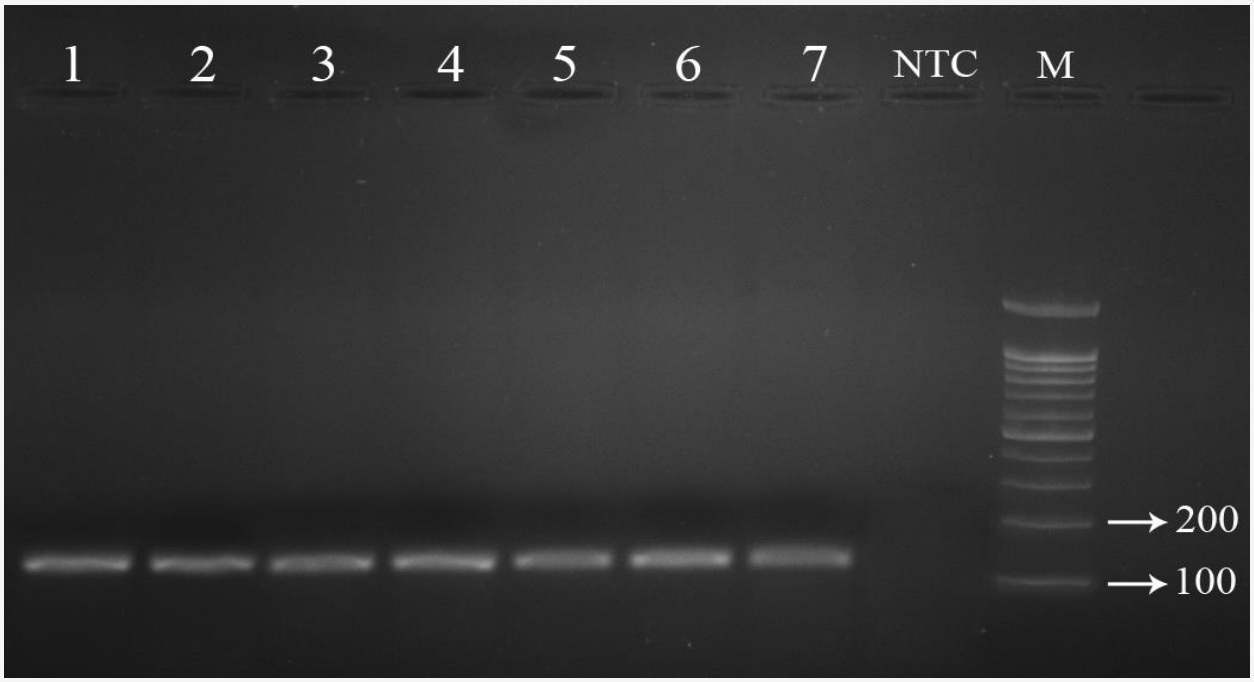


نمودار ۳: منحنی تکثیر قطعات ژنومی با رقت‌های متوالی از ۱۰ نانوگرم الی ۰/۸ پیکوگرم. رقت‌های متوالی از ۱۰ نانوگرم الی ۳/۲ پیکوگرم به نسبت $\frac{1}{5}$ برابر رقیق شده‌اند و در تهیه رقت ۰/۸ پیکوگرم به نسبت $\frac{1}{4}$ برابر رقیق سازی صورت گرفته است.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]



نمودار ۴: منحنی تکثیر رقت‌های متوالی ژنوم باکتری به همراه منحنی تکثیر DNA استخراج شده از اینترفرون. تعداد سیکل‌های آستانه روی محور افقی و تغییر فلورسانس دریافتی (ΔRn) روی محور عمودی نشان داده شده است. رنگ فلورسنت زمینه= Rn^- و کل رنگ دریافتی= Rn^+ و $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$



شکل ۱: ژل الکتروفورز قطعات تکثیر شده: 1=10ng , 2=2ng , 3=400pg , 4=80pg , 5=16pg , 6=3.2pg , 7=0.8pg
M=100bp DNA ladder کنترل منفی=NTC

همزمان با تکثیر رقت‌های متوالی DNA ژنومی باکتری، DNA استخراج شده از اینترفرون به مقدار ۵ میکرولیتر به صورت دوتایی، مورد تکثیر قرار گرفت و میانگین سیکل آستانه آن‌ها عدد ۳۲/۵۸ به دست آمد (نمودار ۴).

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

جهت بررسی کیفیت قطعات ژنومی تکثیر شده در واکنش Real time PCR، محصولات واکنش در ژل الکتروفورز ۰/۸ درصد بارگذاری شدند. از مارکر مولکولی با اندازه ۱۰۰ جفت بازی (100bp Ruler, fermentas) در واکنش فوق، استفاده شد و باندهایی به طول ۱۴۰ جفت باز به دست آمد (شکل ۱).

به کمک نمودار ۱، معادله منحنی استاندارد از روی شیب نمودار (۳/۲۳-) و عرض از مبدأ نمودار (۲۷/۱۴۱) مشخص شد (Y=-3.23X+27.141) که Y نشان دهنده سیکل آستانه و X نشان دهنده لگاریتم غلظت نمونه مورد آزمایش می‌باشد. سپس به کمک نمودار ۴، از میانگین سیکل‌های آستانه به دست آمده در واکنش تکثیری دوتایی اینترفرون، استفاده شد و به جای Y در معادله قرار داده شد. به کمک این اعداد، مقادیر X و از روی آن، غلظت DNA که همان مقدار ناخالصی موجود در محصول دارویی اینترفرون می‌باشد، ۰/۰۲ پیکوگرم در هر دوز محصول، اندازه‌گیری شد. این میزان، بسیار کمتر از مقدار مجاز توصیه شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (۱۰۰ پیکوگرم در هر دوز محصول)، گزارش شد.

بحث و نتیجه گیری

حضور بقایای DNA سلول باکتری *E.coli* به عنوان ناخالصی در محصولات نوترکیب، همواره به عنوان یک عامل خطر محسوب شده است (۲۵). بنابراین سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) و دیگر سازمان‌ها، معیارهای ایمنی و کنترل‌های کیفی خاصی را جهت اطمینان از عدم آلودگی محصولات، وضع کرده‌اند. با توجه به تغییر شرایط محیط داخلی سلول میزبان در حین استخراج داروی نوترکیب، تعیین مقدار DNA باقی مانده در محصولات دارویی، بسیار مشکل شده است (۲۶). روش‌های به کار رفته جهت تعیین میزان ناخالصی‌های DNA باید تا حدی حساس و دقیق باشند که میزان بسیار اندک آلودگی‌ها را نیز نشان دهند. جی و همکاران در سال ۲۰۰۲ روش هیبریداسیون DNA را جهت تعیین مقدار بقایای DNA سلول باکتری در محصولات دارویی معرفی کردند که میزان حساسیت آن در تشخیص ناخالصی‌های DNA تا حد ۲/۵ پیکوگرم بود (۲۷). در پژوهشی مشابه، وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۵ روش هیبریداسیون DNA را برای شناسایی بقایای DNA سلول میزبان در واکسن‌های DNA که جزء محصولات دارویی نوترکیب می‌باشند، معرفی کردند. حساسیت این روش برای شناسایی آلودگی‌های DNA باکتری *E.coli* به عنوان میزبان تولید محصول، تا حد ۱۰ پیکوگرم بود که در این مورد، چنین حساسیتی چندان مناسب به نظر نمی‌رسید (۲۸). به طور عمومی روش‌های هیبریداسیون DNA و بررسی سطح آستانه کل DNA[۲] برای اندازه گیری میزان ناخالصی‌های DNA ناشی از سلول میزبان در صنایع تولیدی محصولات دارویی به کار رفته‌اند، هر چند که این روش‌ها بسیار وقت‌گیر، پر هزینه و نسبتاً غیر حساس می‌باشند. لی و همکاران در سال ۲۰۱۰ روش‌های هیبریداسیون DNA و سطح آستانه کل DNA را جهت اندازه گیری کمی DNA ژنومی باکتری *E.coli* با روش Real time PCR مقایسه کردند که در آن حساسیت و دقت روش Real time PCR، ۳۰ برابر بالاتر از دو روش دیگر ذکر شد (۲۹). بررسیلی و همکاران، صرفا جهت مقایسه سه روش گفته شده، به کار برده شد و کنترل کیفی هیچ گونه دارویی در آن مدنظر قرار گرفته نشده بود.

در این مطالعه از روش سریع، بسیار حساس و اختصاصی Real time PCR بر مبنای استفاده از رنگ SYBR Green I جهت تشخیص آلودگی DNA ناشی از باکتری *E.coli* به عنوان میزبان، در اینترفرون نوترکیب استفاده شد. این روش قادر است با حساسیتی مناسب، در زمانی اندک و بر اساس منحنی استاندارد، میزان آلودگی‌های DNA را در محصولات دارویی نشان دهد. جهت شناسایی این آلودگی‌ها از ناحیه ژنی 16S rRNA که دارای بیشترین درجه حفاظت شدگی در بین سویه‌های مختلف باکتری می‌باشد، استفاده شد. بر اساس نتایج BLAST و بررسی واکنش بر روی عوامل احتمالی مداخله‌گر، نشان داده شد که پرایمرهای طراحی شده هیچ گونه واکنشی با سایر نواحی دیگر ندارند. اگرچه نشانگرهای حاوی رنگ فلورسنت همچون تک من، بیکون‌های مولکولی و اسکورپیون وجود دارند که به طور اختصاصی به DNA الگو متصل می‌شوند، ولی بسیار پر هزینه‌تر از رنگ SYBR Green I می‌باشند. یک نقص عمده در هنگام استفاده از رنگ SYBR Green I، ایجاد اتصالات پرایمر (پرایمردایمر) می‌باشد که با بهینه سازی شرایط واکنش از جمله طراحی دقیق پرایمرها، تنظیم غلظت کاتیون‌ها از جمله منیزیم، تنظیم دمای اتصال و زمان اتصال، این نقایص به حداقل مقدار خود رسیدند (۳۰). اگرچه افزایش غلظت پرایمرها باعث افزایش سرعت اتصال آن‌ها به DNA

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

الگو می‌شود، لیکن احتمال افزایش اتصالات غیر اختصاصی آن‌ها نیز بیشتر می‌شود.

غلظت کاتیون‌ها به خصوص منیزیم، دمای تفکیک رشته‌های DNA از یکدیگر و در نتیجه اتصال پرایمرها را به DNA الگو، تحت تأثیر قرار می‌دهد. این یون‌ها به گروه‌های فسفات دارای بار منفی در رشته‌های DNA متصل شده و باعث تسهیل اتصال پرایمرها به الگو می‌شوند. افزایش غلظت یون منیزیم از مقدار معینی، باعث تکثیر غیر اختصاصی قطعات ژنی و ایجاد پرایمر دایمر می‌شود. پس از رسم منحنی تکثیر رقت‌های متوالی DNA، سیکل‌های آستانه در بازه‌ای بین ۱۴/۸۱ و ۲۸/۴۲ به دست آمدند. جرم مولکولی باکتری *E.coli* معادل $۲/۸۶\times۱۰^{۹}$ دالتون می‌باشد. به طور متوسط هفت نسخه از توالی 16S rRNA در ژنوم هر باکتری *E.coli* وجود دارد. در مطالعه حاضر، حساسیت روش راه اندازی شده، معادل ۰/۸ پیکوگرم از DNA ژنومی باکتری می‌باشد. با تبدیل این عدد بر حسب دالتون و تقسیم آن به جرم مولکولی هر باکتری، عدد ۱۶۷ و با ضرب آن در عدد هفت، عدد ۱۱۶۹ به دست می‌آید. این ارقام نشان دهنده آن است که در حضور آلودگی در محصولات دارویی، روش راه اندازی شده فوق، قادر است که حداقل ۱۶۷ عدد باکتری *E.coli* و حداقل ۱۱۶۹ نسخه از توالی ژنی 16S rRNA را در نمونه مورد آزمایش تشخیص دهد. این روش می‌تواند میزان ناخالصی‌های DNA ناشی از باکتری میزبان را در حین تولید محصول و همچنین در پایان تولید محصول و در فرآورده‌های نهایی، اندازه‌گیری کند.

روش Real time PCR علاوه بر داشتن حساسیت و ویژگی بالا، دارای کاربردی آسان، سرعت زیاد و قیمت تمام شده مناسبی نیز می‌باشد که مجموع این ویژگی‌ها باعث می‌شود که بتوان از آن به عنوان یک روش مناسب در مراکز تولید دارو جهت تشخیص میزان ناخالصی‌های DNA در محصولات نوترکیب و کنترل کیفی آن‌ها استفاده نمود. امید است بتوان با به کارگیری روش فوق، محصولات دارویی با حداقل ناخالصی و حداکثر کیفیت را مطابق با استانداردهای جهانی به بازار عرضه نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کلیه همکاران محترم بخش کنترل کیفی انستیتو پاستور ایران بالاخص سرکار خانم دکتر درود و جناب آقای دکتر عزیزی کمال تشکر را داریم. این مطالعه در قالب طرح پژوهشی در دانشگاه علوم پزشکی قزوین از پایان نامه دانشجویی با شماره ثبت ۲۸/۲۰/۵۵۹۱ انجام شد که ۶۰ درصد از هزینه‌ها توسط دانشگاه علوم پزشکی قزوین و ۴۰ درصد از هزینه‌ها توسط انستیتو پاستور ایران تأمین گردید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections.Biofactors. 2009;35(1):14-20.
2. Content J. Mechanisms of induction and action of interferons. Verh K Acad Geneeskd Belg. 2009;71(1-2):51-71.
3. Grandvaux N, Tenoever BR, Servant, MJ, Hiscott J. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. Curr Opin Infect Dis. 2002;15(3):259-67.
4. MeyerO. Interferons and autoimmune disorders.Joint Bone Spine. 2009;76(5):464-73.
5. Wang H, Zhou M, Brand J, Huang L. Inflammation activates the interferon signaling pathways in taste bud cells. J Neurosci. 2007;27(40):10703-13.
6. Banexy F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol. 1999;10(5): 411-421.
7. Jana S, Deb JK.Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol. 2005;67(3):289-298.
8. Swartz JR. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. Curr Opin Biotechnol. 2001;12(2): 195-201.
9. Shukla A, Jiang C, Ma J, Rubacha M, Flansburg L, Lee SS. Demonstration of robust host cell protein clearance in biopharmaceutical downstream processes. Biotechnol prog. 2008;24(3): 615-622.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

10. Hoffman T.Anticipating, recognizing, and preventing hazards associated with in vivo use of monoclonal antibodies: special considerations related to human anti-mouse antibodies. Cancer Res. 1990;50(3):1049-1050
11. Rathore AS, Sobacke TJ, Kocot DR, Morgan DR, Dufield RL, Mozier NM. Analysis for residual host cell proteins and DNA in process streams of a recombinant protein product expressed in Escherichia coli cells. JPharm Biomed Anal. 2003;32(6): 1199-1211.
12. Walsh G. Proteins: biochemistry and biotechnology.1st ed. West Sussex, England: John Wiley & Sons; 2002. P.205-206.
13. Eldering JA, Felten C, Veilleux CA, Potts BJ. Development of a PCR method for mycoplasmatesting of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinanttherapeutic proteins. Biologicals. 2004;32(4):183-93.
14. Wolter T, Richter A. Assays for controlling host-cell impurities in biopharmaceuticals. BioProcess Int. 2005;3(2): 40-46.
15. Kung VT, Panfili PR, Sheldon EL, King RS, Nagainis PA, Gomez JB, et al. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system.Anal biochem. 1990;187(2): 220-227.
16. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006;27(2):95-125.
17. Jeong HS, Shin JH, Park YN, Choi JY, Kim YL, Kim BG, et al. Development of real-time RT-PCR for evaluation of JEV clearance during purification of HPV type 16 L1 virus-like particles. Biologicals.2003;31(3): 223-229.
18. Lee DH, Jeong HS, Kim TE, Oh SH, Lee J, Kim IS. Real-Time RT-PCR for Validation of Reovirus Type 3 Safety During the Manufacture of Mammalian Cell Culture-Derived Biopharmaceuticals. Korean J Microbiol. 2008;44(2):56-65
19. Monis PT, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. Infect Genet Evol. 2006;6(1): 2-12.
20. Wit C, Fautz C, Xu Y. Real-time quantitative PCR for retrovirus-like particle quantification in CHO cell culture. Biologicals. 2000;28(3): 137-148.
21. Wolf J, Wang L, Wang F. Application of PCR technology in vaccine product development. Expert RevVaccines.2007;6(4): 547-558.
22. Martins S, Prazeres D, Cabral J, Monterino G. Comparison of real-time polymerase chain reaction and hybridization assays for the detection of Escherichia coli genomic DNA in process samples and pharmaceutical-grade plasmid DNA products. Anal Biochem. 2003;322(1):127-129.
23. Lee C,Lee S, Shin SG, Hwang S.Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with Escherichia coli. ApplMicrobiolBiotechnol. 2008;78(2): 371-376.
24. Nissom PM. Specific detection of residual CHO host cell DNA by real-time PCR. Biologicals. 2007;35(3): 211-215.
25. Lahijani R, Duhon M, Lusby E, Betita H, Marquet M. Quantitation of host cell DNA contaminate in pharmaceutical-grade plasmid DNA using competitive polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. Hum Gene Ther. 1998;9(8):1173-1180.
26. Workman WE. Sample preparation and residual DNA analysis of biopharmaceuticals. J Pharm Biomed Anal. 1995;21(1):479-483
27. Ji X, Lee K, DiPaolo B. High-sensitivity hybridization assay for quantitation of residual E. coli DNA: Biotechniques. 2002;32(5):1162-7.
28. Wang KY, Guo YJ, Sun SH, Shi k, Zhang S, Wang KH, et al. 16S rRNA gene probe quantitates residual host cell DNA in pharmaceutical-grade plasmid DNA. Vaccine. 2006;24(14): 2656-2661.
29. Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. Quantitative detection of residual E. coli host cell DNA by real-time PCR. J Microbiol Biotechnol. 2010;20(10):1463-70.
30. Lovatt A. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. J Biotechnol. 2002;82(3):279-300.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]

Original Article

Application of Rapid and Sensitive Real Time PCR Technique in Detection of DNA Impurities in Recombinant Interferon

Mamnoon B[1], Naserpour Farivar T[1*], Karimi Arzenani M [2]

1- Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
2- Molecular Medicine Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 16 Jun 2014 Accepted: 23 Oct 2014

Abstract

Background & Objective: Interferon belongs to a family of cytokines, which has the most important role in the innate immune response to virus infections. While producing recombinant interferon in biological host, some pieces of host nucleic acids remain in product. Because of limitations in previous techniques for detection of these impurities, the objective of this study is to use rapid and sensitive Real time PCR method for detecting the impurities.

Materials & Methods: First, with DNA extraction from bacterial host cell and preparation of its serial dilutions, SYBR Green-based Real time PCR reaction was held and standard curve was plotted. After DNA extraction from interferon and performing PCR, total DNA amount was determined using standard curve.

Results: Studies performed on some interferon samples, revealed that the amount of DNA impurities was about 0.02 pg. per product dose. In addition, the designed primers in the above reaction had no interaction with each other and other interfering agents.

Conclusion: For the first time in Iran, this study was set up and it revealed that Real time PCR can be used as a functional and accurate technique in manufacture centers for detection of residual host cell DNA in interferon and other recombinant pharmaceutical products.

Keywords: **DNA impurities, Recombinant pharmaceutical products, Interferon, Real time PCR, SYBR Green I**

***Corresponding author: Taghi Naserpour Farivar**, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
Email: taghin@yahoo.com
Tel: +98 281 3324971

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-10-18]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2015.4.4.4.2]