

Izolowanie i oczyszczanie antygenów wirusa ludzkiego niedoboru immunologicznego (HIV) z bakterii *Escherichia coli* zawierających geny HIV

Andrzej Szczepanek¹

Andrzej Płucienniczak^{1,2}

¹Zakład Badawczo-Wdrożeniowy i Inżynierii Genetycznej, Terpol
Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA
Sieradz

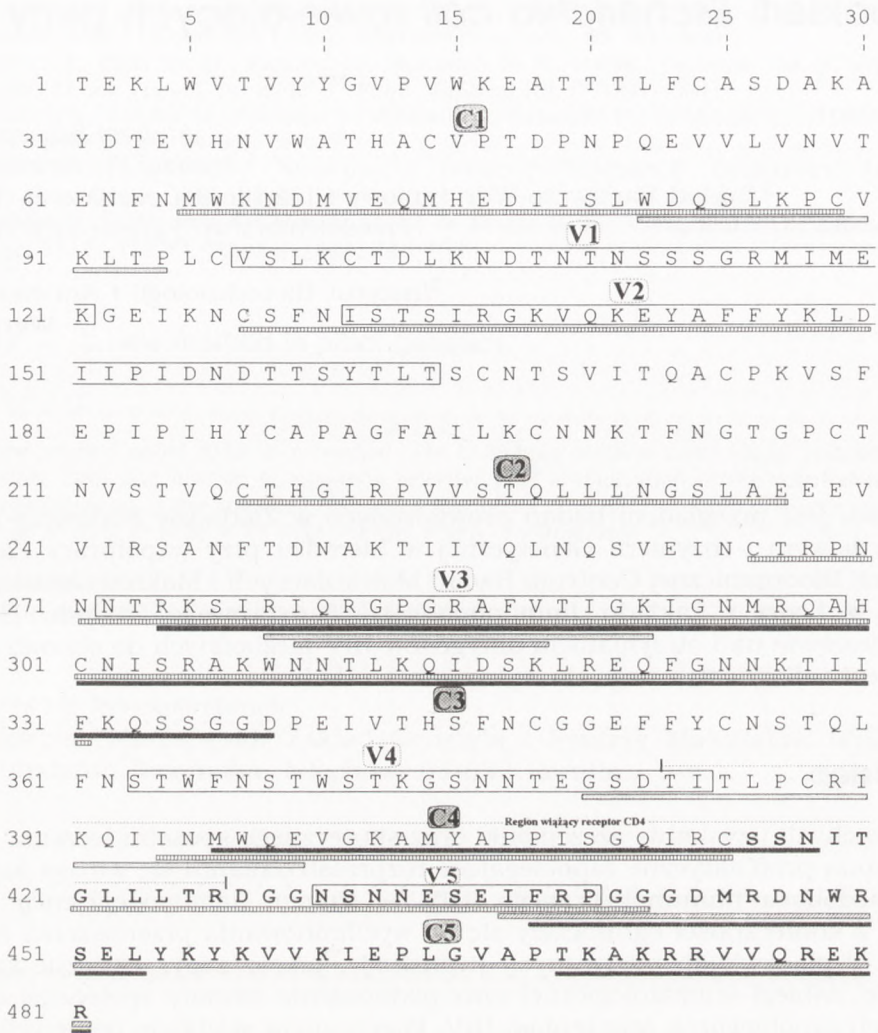
²Instytut Biotechnologii i Antybiotyków
Warszawa

Praca jest przeglądem badań prowadzonych w Zakładzie Badawczo-Wdrożeniowym i Inżynierii Genetycznej w Sieradzu przy współpracy Zakładu Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi i Zakładu Immunopatologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie nad otrzymaniem antygenów HIV niezbędnych do skonstruowania testu diagnostycznego do wykrywania zakażenia wirusem.

1. Wstęp

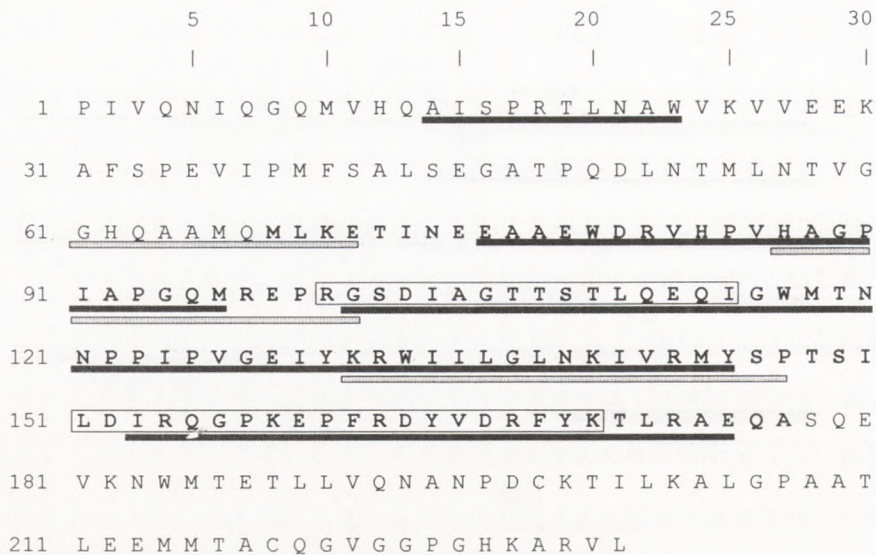
Do chwili uzyskania szczepionki oraz skutecznego sposobu leczenia AIDS, działania profilaktyczne zapobiegające rozprzestrzenianiu się wirusa ludzkiego niedoboru immunologicznego (HIV — *Human Immunodeficiency Virus*) będą z konieczności ograniczały się do wyeliminowania przenoszenia się wirusa w placówkach medycznych (transfuzje, przeszczepy, sztuczne zapłodnienie, zabiegi stomatologiczne) oraz podnoszenia oświaty społecznej o sposobach zapobiegania zakażeniom HIV. Pozytywnym skutkiem podjętych działań jest zmniejszenie się dynamiki wzrostu zachorowań na AIDS zwłaszcza w krajach Europy Zachodniej i Stanach Zjednoczonych (1).

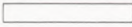


Powszechnie stosowane metody diagnozowania zakażenia HIV opierają się na wykrywaniu w surowicy swoistych przeciwciał przeciwko antygenom wirusa. Do badań przesiewowych najczęściej stosowane są testy immunoenzymatyczne typu ELISA. Początkowo do ich produkcji (pierwszy komercyjny test został dopuszczony do użycia w USA w 1985 r.) używano antygeny wirusowe izolowane z lizatów hodowli komórkowych wirusa. Wadą białek otrzymanych z wirusa było zanieczyszczenie antygenami tkankowymi typu HLA, co obniżało specyficzność testu, a ponadto ich otrzymywanie wiązało



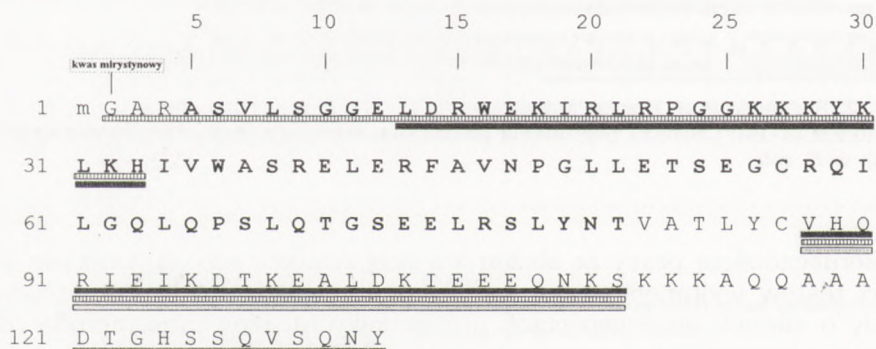
- V
- — — — — - sekwencje zmienne,
 C - sekwencje konserwatywne,
 — — — — — - silne domeny antygenowe, najczęściej rozpoznawane przez przeciwciała osób zarazonych,
 — — — — — - epitopy indukujące wytwarzanie przeciwciał neutralizujących wirusa,
 — — — — — - epitopy indukujące wytwarzanie przeciwciał uczestniczących w ADCC,
 — — — — — - epitopy przeciwko którym skierowana jest aktywność cytotoksyczna limfocytów CD8.




Rys. 1. Rozmieszczenie regionów zmiennych i konserwatywnych oraz domen antygenowych w sekwencji glikoproteiny gp120 HIV-1 (BH10) (5,7-10). Czcionką pogrubioną zaznaczono sekwencję Ser₄₁₆-Arg₄₈₁, którą wybrano do ekspresji w *E. coli*.



-
-  - regiony silnie konserwatywne dla p24 wirusa HIV-1 i p25 wirusa HIV-2 (pow. 80% homologii),
-  - silne domeny antygenowe, najczęściej rozpoznawane przez przeciwciała osób zarażonych,
-  - epitopy przeciwko którym skierowana jest aktywność cytotoksyczna limfocytów CD4,

Rys. 3. Rozmieszczenie regionów konserwatywnych oraz domen antygenowych w sekwencji proteiny p24 HIV-1 (BH10) (8-10,15-18). Czcionką pogrubioną zaznaczono sekwencję *Met*_{68-*Ala*₁₇₇, którą wybrano do ekspresji w *E. coli*.}



-
-  - silne domeny antygenowe, najczęściej rozpoznawane przez przeciwciała osób zarażonych,
-  - epitopy indukujące wytwarzanie przeciwciał neutralizujących wirusa,
-  - epitopy przeciwko którym skierowana jest aktywność cytotoksyczna limfocytów CD8,

Rys. 4. Rozmieszczenie domen antygenowych w obrębie sekwencji proteiny p17 HIV-1 (BH10) (5,8,19-21). Czcionką pogrubioną zaznaczono sekwencję *Arg*₄-*Thr*₈₁, którą wybrano do ekspresji w *E. coli*.

tydów syntetycznych i przeciwciał monoklonalnych umożliwiło określenie, które regiony białek wirusowych indukują poszczególne rodzaje odpowiedzi immunologicznej. W puli przeciwciał anti-HIV indukowanych u osób zarażonych wirusem przeważają przeciwciała skierowane przeciwko epitopom białek strukturalnych wirusa: glikoproteinie powierzchniowej gp120, glikoproteinie transbłonowej gp41, białku wewnętrznego kapsydu p24 i zewnętrznego kapsydu p17. Wirusowe białka enzymatyczne i regulatorowe z uwagi na niewielką liczbę kopii w cząsteczce wirusa indukują znacznie słabszą odpowiedź immunologiczną (5).

Fragmenty białek strukturalnych wirusa stosowane do konstrukcji testów diagnostycznych muszą pochodzić z konserwatywnych rejonów sekwencji białek, charakteryzujących się silnymi właściwościami antygenowymi (indukują powstawanie przeciwciał u większości zarażonych osób), co jest warunkiem wysokiej czułości i specyficzności testu.

Na rysunkach 1-4 przedstawiono sekwencje białek strukturalnych HIV-1 (izolat BH10) (6): gp120, gp41, p24, p17 w których na podstawie danych literaturowych (5,7-21) zaznaczono epitopy indukujące poszczególne typy odpowiedzi immunologicznej na zakażenie wirusem, a także regiony ważne funkcjonalnie oraz konserwatywne i zmienne.

Wyniki eksperymentalne dotyczące otrzymywania antygenów HIV-1 przedstawiono w odniesieniu do fragmentu glikoproteiny gp120. Pozostałe antygeny wirusowe zostały otrzymane analogicznie.

2. Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych

Sekwencje DNA kodujące wybrane epitopy białek strukturalnych HIV otrzymano poprzez ligację syntetycznych oligonukleotydów, analogicznie jak w pracy Hrabec i wsp. (22). Fragmenty DNA zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Geny wirusowe wklonowano w wektor ekspresyjny pWR450, kodujący N-końcowy fragment β -galaktozydazy *E. coli* (23). Produktem ekspresji powstałych plazmidów były białka fuzyjne składające się z fragmentu β -galaktozydazy i peptydów wirusowych (rys. 5).

Otrzymano wektory plazmidowe:

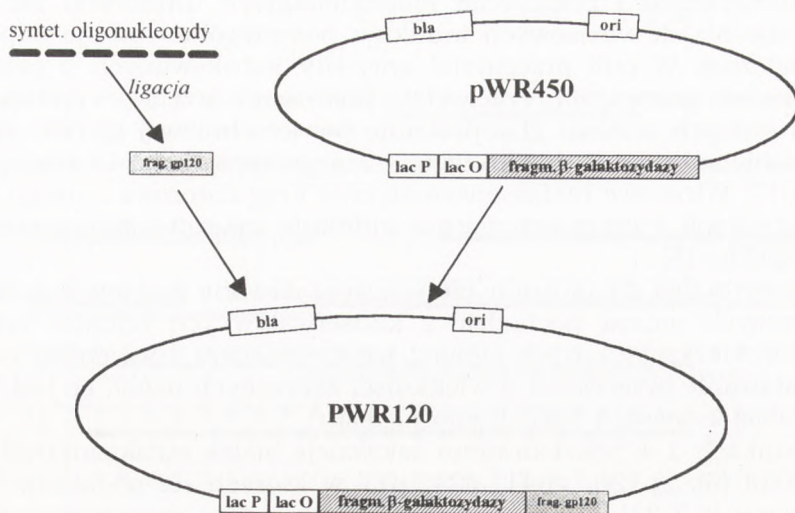
1. pW120 — koduje białko fuzyjne składające się z 529 aminokwasów, zawierające fragment *Ser*₄₁₆-*Arg*₄₈₁ glikoproteiny gp120 HIV-1 (BH10) (24).

2. pW41 — koduje białko fuzyjne składające się z 488 aminokwasów, zawierające fragment *Arg*₆₈-*Thr*₉₄ glikoproteiny gp41 HIV-1 (BH10) (25).

3. pW24 — koduje białko fuzyjne składające się z 531 aminokwasów, zawierające fragment *Met*₆₈-*Ala*₁₇₇ proteiny p24 HIV-1 (BH10) (25).

4. pW17 — koduje białko fuzyjne składające się z 549 aminokwasów, zawierające fragment *Arg*₄-*Thr*₈₁ proteiny p17 HIV-1 (BH10) (25).

Wymienionymi plazmidami transformowano bakterie *Escherichia coli* K12 (26). Najlepszą wydajność ekspresji uzyskano stosując linię MM294 (27).



Rys. 5. Konstrukcja wektora pW120.

3. Warunki hodowli bakterii

Bakterie *E. coli* K12 MM294, zawierające wektory ekspresyjne, hodowano w pożywce wg Tartofa i Hobbsa (28) zawierającej ampicylinę w stężeniu 100 µg/mL. Hodowlę przeprowadzano w kolbach stożkowych o pojemności 1 L zawierających 200 mL pożywki. Do zaszczeplenia hodowli stosowano po 0,2 mL inoculum na kolbę. Namnażanie bakterii prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej w 37°C w ciągu 12-14 godzin.

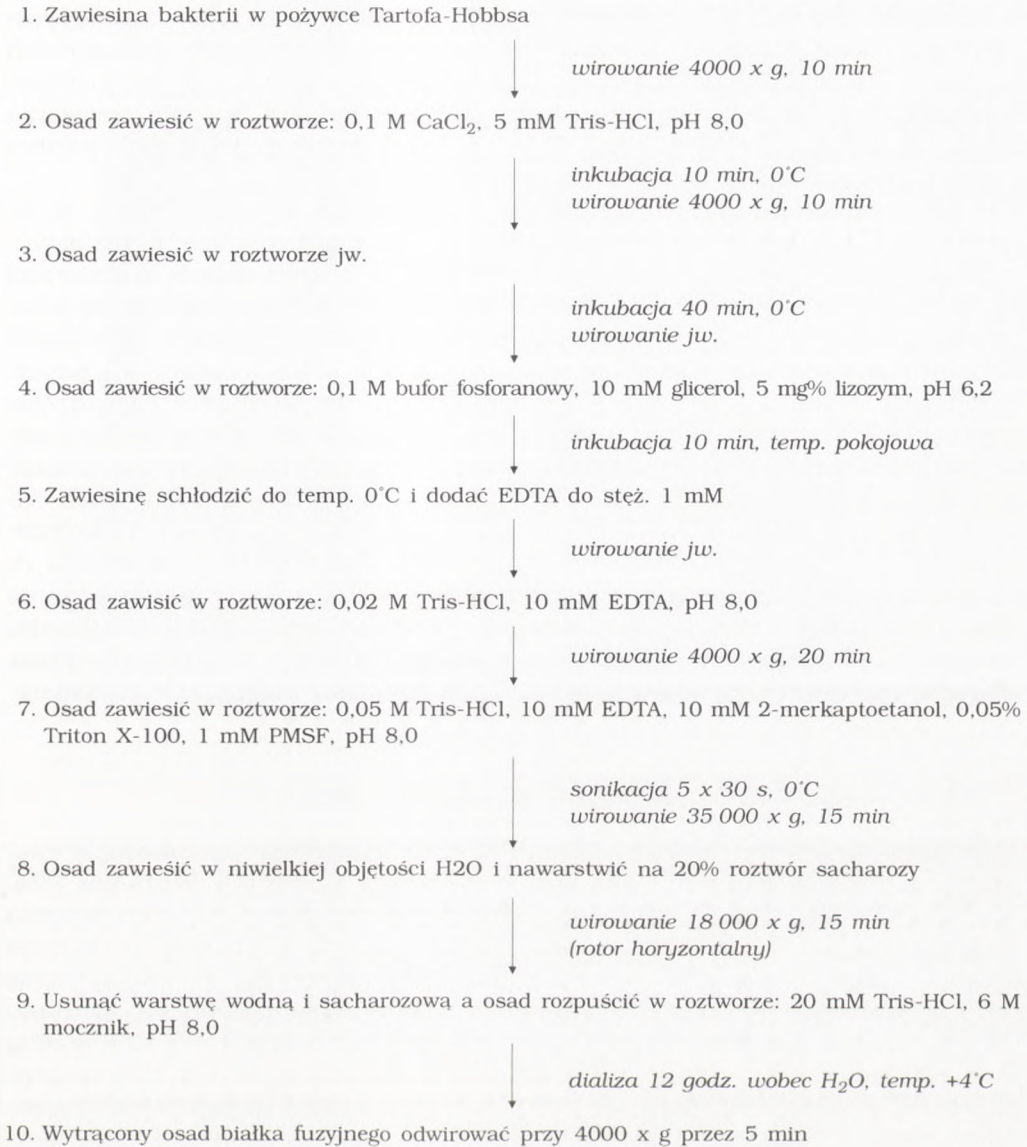
Wydajność hodowli bakterii zawierających plazmidy pW120, pW41, pW24 i pW17, mierzona na początku fazy stacjonarnej, była podobna i wynosiła ok. 12 g wilgotnej masy bakterii z 1 L hodowli.

Na podstawie pomiaru stężenia białka całkowitego w lizatach bakteryjnych (średnio 2 mg/mL) i procentowej zawartości białek fuzyjnych w lizatach bakteryjnych (ocenione na podstawie densytogramów rozdzielów SDS-PAGE wynosiły średnio 15% białka całkowitego) oszacowano wydajność ekspresji białek fuzyjnych na ok. 400 mg z 1 L hodowli.

4. Izolowanie i oczyszczanie białek fuzyjnych

β-galaktozydaza:: fragment białka HIV-1 (rys. 6).

Białka fuzyjne złożone z β-galaktozydazy i fragmentów wirusowych produkowane w *E. coli* odkładają się w cytoplazmie bakterii w postaci nierozpuszczalnych ziarnistości zwanych ciałkami inkluzyjnymi (ang. *inclusion body*) (29,30). Tworzą się one w wyniku agregacji białka, które w czasie syntezy



Rys. 6. Procedura izolacji i oczyszczania białek fuzyjnych: β -galaktozydaza:: Polipeptyd HIV-1.

w *E. coli* przyjmuje niestabilną, zdenaturowaną konformację (29). Poza rekombinowanym białkiem, które może stanowić nawet 95% masy, w ciałkach inkluzyjnych wykryto obecność kwasów nukleinowych (16S i 26S rRNA, plazmidowe DNA), białek bakteryjnych (polimerazę RNA, białka błony cytopla-

zmatycznej: OmpA, OmpC, OmpF) oraz fosfolipidów (29,31,32). Zanieczyszczenia te mogą zarówno wbudowywać się w strukturę ciałek inkluzyjnych w trakcie ich powstawania, jak również biernie adsorbować się na powierzchni ciałek w trakcie izolowania z komórek bakterii (32). Sposób izolowania ciałek inkluzyjnych z komórek *E. coli* ma zatem znaczny wpływ na poziom wstępnego zanieczyszczenia otrzymywanego białka (33).

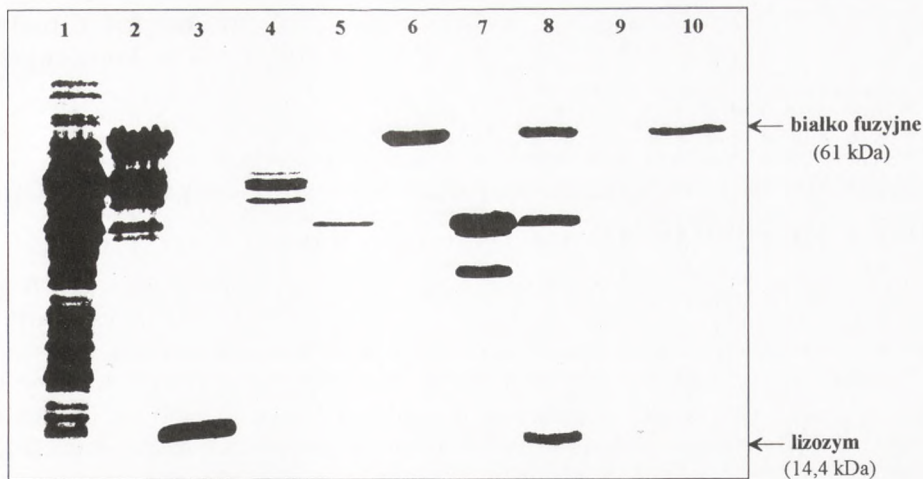
Metody izolowania ciałek inkluzyjnych z komórek *E. coli* polegają na fizycznej (za pomocą prasy francuskiej, prasy Hughesa, sonikacji, wielokrotnego zamrażania i rozmrażania) lub chemicznej (rozpuszczanie roztworami mocznika, chlorowodoru guanidyny, silnych detergentów) dezintegracji ściany komórkowej bakterii (30,33-35). W wyniku wirowania bakterii poddanych lizie większość zanieczyszczeń cytoplazmatycznych zostaje usunięta z supernatantem, ale osad ciałek inkluzyjnych ulega zanieczyszczeniu nierozpuszczalnymi elementami ściany komórkowej. Niedogodność tę można wyeliminować pozabawiając bakterie najpierw ściany komórkowej poprzez otrzymanie sferoplastów z komórek *E. coli*, które łatwo ulegają lizie w roztworach zawierających niskie stężenie detergentu niejonowego. Wraz ze ścianą komórkową ulegają usunięciu związane z nią białka (lipoproteidy, fosfolipaza A, glikoproteinowe receptory dla bakteriofagów i inne), a także zanieczyszczenia obecne w periplazmie, w tym enzymy proteolityczne (29,36). Całkowita aktywność proteolityczna lizatu sferoplastów jest przez to znacznie niższa w porównaniu z lizatem całych bakterii, co zmniejsza degradację enzymatyczną otrzymywanego białka (22,33,37,38).

4.1. Otrzymywanie sferoplastów z komórek *E. coli*

Sferoplasty bakterii *E. coli* K12 linii MM294, zawierających plazmidy ekspresyjne, otrzymywano modyfikując metodę wg Marvinina i Witholda (39). W metodzie tej poprzez inkubację bakterii w roztworze chlorku wapnia rozluźnia się struktura ściany komórkowej bakterii. Ułatwiona penetracja dodanego lizozymu w głąb ściany komórkowej powoduje, że nadtrawienie warstwy muraminowej następuje już przy bardzo niskich stężeniach lizozymu (ok. 50 µg/mL). Lizozym stosowany w wysokich stężeniach (150-400 µg/mL) staje się dodatkowym, trudnym do usunięcia zanieczyszczeniem izolowanego białka. W roztworze zawierającym czynnik chelatujący (EDTA) komórki bakterii tracą większość ściany komórkowej przyjmując postać sferoplastów. Po wirowaniu zawiesiny sferoplastów, z supernatantem usunięte zostają fragmenty ściany komórkowej oraz białka obecne w przestrzeni periplazmatycznej (w tym proteazy), bez strat izolowanego białka (rys. 7).

4.2. Izolowanie i oczyszczanie ciałek inkluzyjnych

Ciałka inkluzyjne uwalniano w wyniku lizy sferoplastów poprzez łagodną sonikację w hipotonicznym roztworze detergentu niejonowego (rys. 6) (22,33,37). Po wirowaniu bakterii poddanych lizie większość białkowych zanieczyszczeń cytoplazmatycznych pozostaje w supernatancie (rys. 7). Wyizo-



- 1) lizat bakterii *E. coli* MM294,
- 2) lizat bakterii *E. coli* MM294 zawierający plazmid p W120,
- 3) supernatant po inkubowaniu bakterii w buforze zawierającym lizozym,
- 4) supernatant po inkubowaniu bakterii w buforze zawierającym EDTA,
- 5) supernatant po odwirowaniu lizatu sferoplastów,
- 6) nie oczyszczone ciała inkluzyjne,
- 7) osad zatrzymujący się na warstwie sacharozowej po odwirowaniu ciałek inkluzyjnych,
- 8) osad po odwirowaniu roztworu mocznikowego białka fuzyjnego,
- 9) supernatant po odwirowaniu białka fuzyjnego wytrąconego po dializie wobec wody,
- 10) oczyszczone białko fuzyjne zawierające fragment gp120 wirusa HIV-1.

Rys. 7. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS. Rozdzielono frakcje uzyskane w kolejnych etapach otrzymywania białka fuzyjnego zawierającego fragment gp120 HIV-1.

lowane ciała inkluzyjne oczyszczano z fragmentów błony cytoplazmatycznej i resztek ściany komórkowej za pomocą wirowania w skokowym gradiencie sacharozy (rys. 6). Ciała inkluzyjne o dużej gęstości pławnej osadzały się na dnie probówki, podczas gdy zanieczyszczenia zatrzymywały się na granicy warstwy wodnej i sacharozy. Oczyszczone ciała inkluzyjne zawierały ok. 95% białka fuzyjnego (rys. 7).

4.3. Rozpuszczanie i oczyszczanie białek fuzyjnych

Oczyszczone ciała inkluzyjne rozpuszczano w 6 M roztworze mocznika. Nierozpuszczalne zanieczyszczenia usuwano poprzez wirowanie. W wyniku dializy supernatantu wobec wody białka fuzyjne ulegały wytrąceniu. Po wirowaniu w supernatancie pozostawały białka zanieczyszczające (głównie dodany lizozym) (rys. 7). Oczyszczone białka fuzyjne były prawie jednorodne w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS.

Wydajność metody dla białek fuzyjnych zawierających fragmenty gp120,

gp41, p24 i p17 HIV-1, była podobna i wynosiła ok. 300 mg z 1 L hodowli, co stanowi 80% oszacowanej zawartości białek fuzyjnych w komórkach *E. coli* (rys. 7).

5. Oddzielenie i oczyszczenie peptydów wirusowych od fragmentu β -galaktozydazy

Aby możliwe było oddzielenie peptydów wirusowych od fragmentu β -galaktozydazy, na styku obu fragmentów w pozycjach 462 i 463 występują dodatkowe aminokwasy: kwas asparaginowy i prolina, zaprogramowane na etapie konstrukcji wektorów plazmidowych. Rozerwanie wiązania między tymi aminokwasami umożliwia odłączenie fragmentów wirusowych od białka nośnikowego. Drugie takie wiązanie (naturalne) występuje we fragmencie β -galaktozydazy (rys. 8).

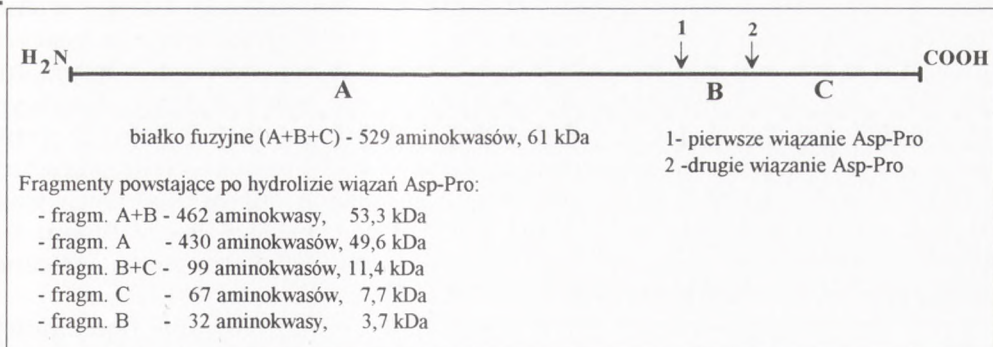
5.1. Hydroliza wiązań peptydowych: kwas asparaginowy-prolina

Wiązanie peptydowe pomiędzy kwasem asparaginowym a prolina ulega rozerwaniu w wyniku łagodnej hydrolizy kwaśnej, podczas gdy inne wiązania peptydowe są w tych warunkach stabilne (40). Spośród licznych sposobów hydrolizy wiązań Asp-Pro (40-42) zastosowano hydrolizę w 75% kwasie mrówkowym w 37°C (43). W stosunku do innych zastosowanych warunków hydrolizy wiązań Asp-Pro (15 mM HCl, 110°C i 40% kwas octowy, 42°C), metoda ta charakteryzowała się największą specyficnością w stosunku do wiązań Asp-Pro przy niskim poziomie niespecyficznej hydrolizy innych wiązań peptydowych.

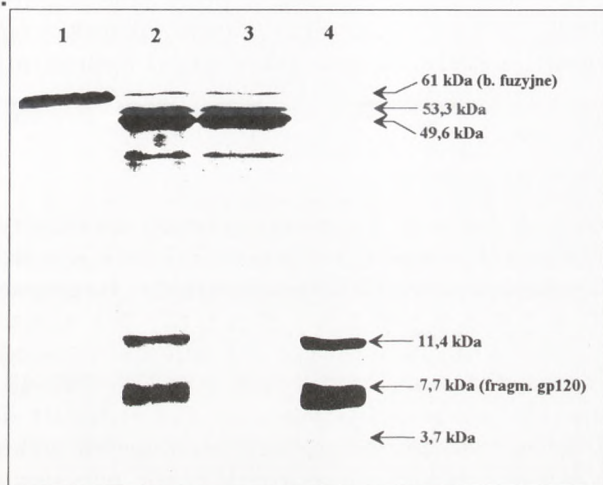
	10	20	30	40	50
1	MTMITDSLAV	VLQRRDWENP	GVTQLNRLAA	HPPFASWRNS	EEARTDRPSQ
51	QLRSLNGEWR	FAWFPAPEAV	PESWLECDLP	EADTVVVPNS	WQMHGYDAPI
101	YTNVTYPITV	NPPFVPTENP	TGCYSLTFNV	DESWLQEGQT	RIIFDGVNSA
151	FHLWCNGRWV	GYGQDSRLPS	EFDLSAFLRA	GENRLAVMVL	RWSDGSYLED
201	QDMWRMSGIF	RDVSLHLKPT	TQISDFH VAT	RFNDDFSRAV	LEAEVQMCGE
251	LRDYLRVTVS	LWQGETQVAS	GTAPFGGEII	DERGGYADRV	TLRLNVENPK
301	LWSAEIPNLY	RAVVELHTAD	GTLIEAEACD	VGPREVRIEN	GLLLLNGKPL
351	LIRGVNRHEH	HPLHGQVMDE	QTMVQDILLM	KQNNFNAVRC	SHYPNHPLWY
401	TLCDRYGLYV	VDEANIETHG	MVPMNRLTDD	PRWL PAMSER	VTRMVQDRDN
451	HRASSNSSSP	<u>GDPSSNITGL</u>	<u>LLTRDGGNSN</u>	<u>NESEIFRPGG</u>	<u>GDMRDNWRSE</u>
501	LYKYKVVKIE	PLGVAPTKAK	RRVVQREKR		

Rys. 8. Sekwencja aminokwasowa białka fuzyjnego: β -galaktozydaza::fragment Ser_{416} - Arg_{481} glikoproteiny gp120 HIV-1. Aminokwasy β -galaktozydazy 2-451 — czcionka normalna, aminokwasy fragmentu łącznikowego 452-463 — czcionka pochyła, aminokwasy fragmentu gp120 464-529 — czcionka pogrubiona. Podkreślono sekwencje Asp-Pro: 430-431 i 462-463.

A.



B.



- 1) białko fuzyjne,
- 2) produkty hydrolizy białka fuzyjnego,
- 3) osad wytrącony po zobojętnieniu hydrolizatu do pH 6,5,
- 4) supernatant po odwirowaniu osadu wytrąconego w pH 6,5.

Rys. 9. A. Schemat cząsteczki białka fuzyjnego zawierającego fragment glikoproteiny gp120 HIV-1.

B. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Rozdzielono frakcje uzyskane w wyniku hydrolizy kwaśnej białka fuzyjnego zawierającego fragment glikoproteiny gp120 HIV-1.

Podatność wiązań Asp-Pro na łagodną hydrolizę kwaśną zależy od rodzaju aminokwasów występujących w otoczeniu wiązania, jak również od długości łańcucha polipeptydowego, w którym to wiązanie występuje (im dłuższy łańcuch tym większa podatność wiązań Asp-Pro na hydrolizę) (44). Z tego powodu, po hydrolizie pierwszego wiązania Asp-Pro w cząsteczkach białek fuzyjnych, dalsza hydroliza odłączonych polipeptydów (fragment wirusowy połączony wiązaniem Asp-Pro z 32-aminokwasowym fragmentem β -galaktozy-

dazy) w celu rozerwania drugiego wiązania Asp-Pro zachodzi bardzo wolno. Zbyt długa hydroliza powoduje wzrost zawartości frakcji zanieczyszczających w wyniku niespecyficznego hydrolizy innych wiązań peptydowych. Optymalny czas hydrolizy białek fuzyjnych (w elektroforezie na żelu poliakrylamidowym prawie całkowity zanik pasma białka fuzyjnego) wynosił 36 godzin. Stężenie białka w hydrolizacie nie przekraczało 2 mg/mL. W obrazie elektroforetycznym poza głównymi frakcjami białkowymi o masach odpowiadających fragmentom, które powstają w wyniku hydrolizy wiązań Asp-Pro w białku fuzyjnym, widoczne są ilościowo małe pasma będące efektem niespecyficznego hydrolizy innych wiązań peptydowych (rys. 9).

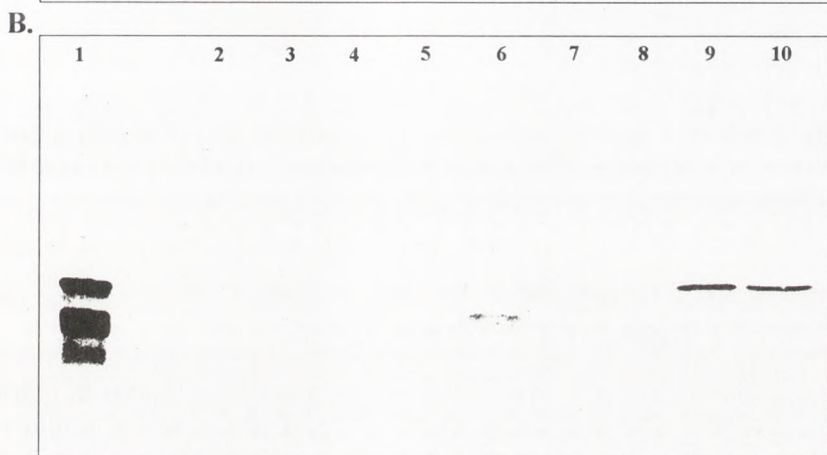
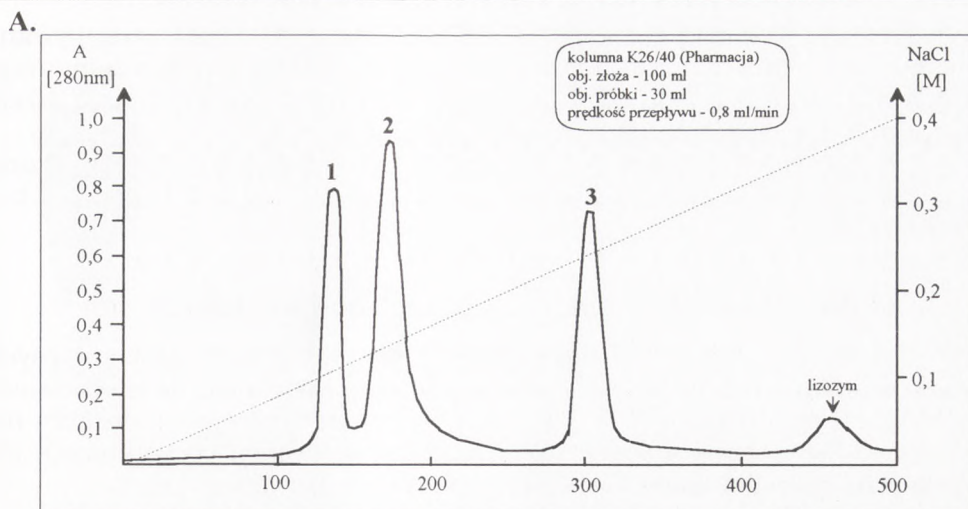
Kwas mrówkowy usuwano z hydrolizatu poprzez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem w wyparce rotacyjnej. Hydrolizat zagęszczano 50 razy. Pozostałość rozcieńczano wodą do poprzedniej objętości i powtórnie odparowywano. Proces powtarzano aż do obniżenia stężenia kwasu mrówkowego w preparacie do 10 mM. Po odparowaniu kwasu mrówkowego pH hydrolizatu wynosiło ok. 3,5.

5.2. Oczyszczenie polipeptydów wirusowych

Otrzymywane białka wirusowe są bardziej zasadowe (punkty izoelektryczne wyliczone za pomocą programu CHARGPRO, PC/GENE IntelliGenetics wynosiły: gp120-10,9; gp41-8,6; p24-6,1 i p17-9,7) niż odcięte fragmenty β -galaktozydazy (fragment 462 aminokwasowy-4,9, fragment 430 aminokwasowy-4,6). Punkt izoelektryczny silnie zasadowego 32-aminokwasowego fragmentu znajdującego się pomiędzy dwoma wiązaniami Asp-Pro 430-431 i 462-463 wynosił 12,2. Poprzez zobojętnienie hydrolizatów 0,1 N NaOH do wartości pH 5,0-6,5 wytrącano większość zanieczyszczeń białkowych wykorzystując gorszą rozpuszczalność fragmentów β -galaktozydazy niż oczyszczanych peptydów wirusowych. Po usunięciu wytrąconych białek poprzez wirowanie (3000 x g, 30 min, 4°C) supernatant zawierał głównie peptydy wirusowe. Stopień oczyszczenia preparatów na tym etapie był różny w zależności od ładunku i właściwości hydrofilowo/hydrofobowych izolowanego peptydu wirusowego. Najlepsze oczyszczenie uzyskano w przypadku zasadowego i hydrofilowego fragmentu gp120. W supernatancie po wirowaniu zobojętnionego hydrolizatu pozostały tylko fragmenty wirusowe i peptyd łączący wiązania Asp-Pro (rys. 9). W przypadku pozostałych fragmentów gp41, p24 i p17 znaczna część otrzymywanego białka pozostawała w osadzie.

Supernatanty zawierające fragmenty wirusowe poddawano chromatografii jonowymiennej na karboksymetylocelulozie (CM-52 Whatman). Rozdział prowadzono w 50 mM buforze fosforanowym pH 6,5 stosując liniowy gradient NaCl 0,05-0,3 M formowany za pomocą systemu FPLC (Pharmacia). Fragmenty wirusowe wymywały się przy stężeniu NaCl ok. 0,15 M (rys. 10). W przypadku gp41 i p17 stosowano rechromatografię w tych samych warunkach.

Fracje zawierające oczyszczone fragmenty białek HIV-1 dializowano wobec zbuforowanej soli fizjologicznej, sterylizowano poprzez mikrofiltrację



- 1 — preparat poddany rozdzielaniu chromatograficznemu,
 2,3,4 — frakcje z piksu 1,
 5,6,7,8 — frakcje z piksu 2 (izolowany fragment gp120 wirusa HIV-1),
 9,10 — frakcje z piksu 3.

Rys. 10. A. Oczyszczanie fragmentu $Ser_{416}-Arg_{481}$ glikoproteiny gp120 metodą chromatografii jonowymiennej na karboksymetylocelulozie (profil elucji). B. Elektroforetyczna (SDS-PAGE) identyfikacja materiału wymywającego się w poszczególnych szczytach chromatograficznych.

0,2 μm i przechowywano w -70°C . Preparat przechowywany przez okres 24 miesięcy, następnie rozdzielony w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, nie wykazywał cech degradacji.

Rozpuszczalność otrzymanego białka miała decydujący wpływ na wydajność metody. Charakteryzujący się bardzo dobrą rozpuszczalnością (w szerokim zakresie pH) fragment gp120 otrzymywano z wydajnością ok. 20 mg

z 1 L hodowli. Trudniej rozpuszczalne fragmenty gp41 i p24 otrzymywano z wydajnością odpowiednio 7 mg i 15 mg, a najtrudniej rozpuszczalny fragment p17 z wydajnością 3 mg z 1 L hodowli, przy czym największe straty następowały na etapie końcowych chromatografii.

Według danych literaturowych wydajność metod izolowania białek rekombinowanych z komórek *E. coli* waha się od 4 do 28 mg z 1 L hodowli bakteryjnej (38).

5.3. Analiza sekwencji aminokwasowej peptydów wirusowych

W Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi oznaczono sekwencję aminokwasową otrzymanych polipeptydów HIV-1 za pomocą automatycznego analizatora firmy Applied Biosystems. Potwierdzono zgodność sekwencji początkowych (N-końcowych) aminokwasów dla:

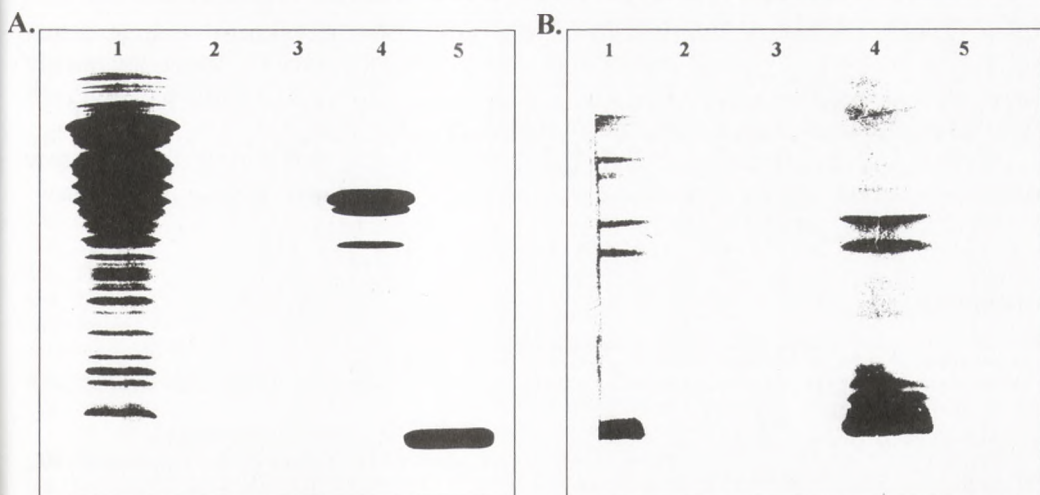
- 34 aminokwasów gp120,
- 36 aminokwasów gp41,
- 31 aminokwasów p24,
- 28 aminokwasów p17.

Zanalizowanie sekwencji aminokwasowej jest pośrednim dowodem jednorodności otrzymanych polipeptydów, gdyż niemożliwa jest efektywna analiza mieszaniny białek.

6. Ocena zawartości antygenów *E. coli* w otrzymanych fragmentach białek HIV-1

Poważnym ograniczeniem dla wykorzystania bakterii *E. coli* jako komórki gospodarza do produkcji heterologicznych białek jest obecność w komórce bakteryjnej endotoksyny i innych silnych antygenów. Oczyszczenie otrzymanego białka z tych głównie niebiałkowych zanieczyszczeń jest bardzo trudne. Jeżeli uzyskane białko wykorzystuje się *in vitro*, np. do celów diagnostycznych, wpływ tych zanieczyszczeń można wyeliminować wiążąc przeciwciała przeciw antygenom *E. coli* w badanej próbce poprzez inkubację z lizatem bakteryjnym (45). W przypadku gdy białko ma być stosowane jako lek (szczepionka), podawane zwierzętom laboratoryjnym lub testowane na kulturach komórkowych musi zostać pozbawione endotoksyny (lipopolisacharydu). Już stężenie endotoksyny powyżej 1 ng/mL wywołuje u ssaków wysoką gorączkę prowadzącą do śmierci (34).

Otrzymane fragmenty białek HIV-1 nie dawały reakcji z króliczymi przeciwciałami przeciwko antygenom *Escherichia coli* K12 (Dakopatts) w teście typu *western blot*, przy silnej reakcji z lizatami bakterii zawierającymi białka fuzyjne (46,47) (rys. 11). Najsilniejszą reakcję (liczne, silne pasma) uzyskano z osadem zatrzymującym się na granicy faz w trakcie wirowania lizatu sfe-



- 1) lizat bakterii *E. coli* MM294 zawierający plazmid pW120,
- 2) supernatant po inkubowaniu bakterii jw. w buforze zawierającym EDTA,
- 3) supernatant po odwirowaniu lizatu sferoplastów,
- 4) osad zatrzymujący się na warstwie sacharozowej po odwirowaniu ciałek inkluzyjnych,
- 5) oczyszczony fragment gp120 wirusa HIV-1.

Rys. 11. Ocena zawartości antygenów *E. coli* w preparatach uzyskanych na poszczególnych etapach otrzymywania fragmentu glikoproteiny gp120 HIV-1.

A. Wynik elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (białka z analogicznego żelu przeniesiono na nitrocelulozę metodą elektrotransferu).

B. Wynik otrzymany po przeniesieniu rozdzielonych białek z żelu poliakrylamidowego na nitrocelulozę i wykonaniu testu typu *western blot* z użyciem znakowanych przeciwciał przeciwko antygenom *E. coli* K12 (Dakopatts).

roplastów w gradiencie sacharozy (rys. 11). Zawiera on fragmenty błony plazmatycznej i ściany komórkowej o niskiej gęstości pławnej.

W Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi oznaczono stężenie endotoksyny w otrzymanych preparatach peptydów wirusowych, które wynosiło poniżej 1 ng/mg białka (test: Coatest Endotoxin, CHROMOGENIX AB).

7. Potwierdzenie swoistości immunologicznej uzyskanych antygenów HIV-1

W Zakładzie Immunopatologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie otrzymano przeciwciała chemiczne przeciwko uzyskanym peptydom wirusowym, które reagowały ze swoistymi białkami HIV-1 (gp120, gp41, p24 i p17) w komercyjnym teście diagnostycznym typu *western blot*. Z kolei w teście

western blot wykonanym z otrzymanych antygenów uzyskano reakcje z surowicami pochodzącymi od seropozytywnych nosicieli wirusa, które zawierały przeciwciała o swoistości anty-gp120, anty-gp41, anty-p24 i anty-p17 (wcześniej wyselekcjonowane testem komercyjnym) (48).

Otrzymane polipeptydy mogą być wykorzystane do konstrukcji testów diagnostycznych do wykrywania zakażenia HIV-1, a także w pracach badawczych i klinicznych (49,50).

Literatura

1. Blatner W. A., (1991), *FASEB J.*, 5, 2340-2348.
2. van Kerkhoven I., Vercauteren G., Piot P., van der Groen G., (1991), *Bulletin of the World Health Organization*, 69, 753-760.
3. Hahn B. H., Shaw G. M., Taylor M. E., (1986), *Science*, 232, 1548-1553.
4. Weiss R. A., Clapham P. R., Weber J. N., Dalgleish A. G., Lasky L. A., Berman P. W., (1986), *Nature*, 324, 572-575.
5. Nara P. L., Garrity R. R., Goudsmit J., (1991), *FASEB J.*, 5, 2437-2455.
6. Ratner I., Haseltine W., Patarca R., Livak K. J., Stracich B., Josephs S. F., Doran E. R., Rafalski J.A., Whitehorn E. A., Baumeister K., Ivanoff L., Patteway J. S. R., Pearson M. L., Lautenberg J. A., Papas T. S., Ghayeb J., Chang N. T., Gallo R. C., Wong-Staal F., (1985), *Nature*, 313, 277-284.
7. Capon D. J., Ward R. H. R., (1991), *Annu. Rev. Immunol.*, 9, 649-678.
8. Broliden P.-A., (1990), *The specificity and function of HIV antibody response*, Department of Virology, Karolinska Institute, Stockholm, 1-49.
9. Ramsay A. J., (1992), *Cell Biol.*, 70, 215-221.
10. Krowka J. F., Singh B., Stites D. P., Maino V. C., Narindray D., Hollander H., Jain S., Chen H., Blackwood L., Steimer K. S., (1991), *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 59, 53-64.
11. Gallaher W. R., Ball J. M., Garry R. F., Griffun M. C., Montelaro R. C., (1989), *AIDS Res. Hum. Retrovirus.*, 5, 431-440.
12. Bugge T. H., Lindhart B. O., Hansen L. L., Kusk P., Hulgaard E., Holmbck K., Klasse P. J., Zeuthen J., Ulrich K., (1990), *J. Virol.*, 64, 4123-4129.
13. Syu W., Lee W., Du B., Yu Q., Essex M., Lee T., (1991), *J. Virol.*, 65, 6349-6352.
14. Baur A., Vornhagen R., Korn K., Sonneborn H. H., Eberlein B., Harrer T., Brockhaus W., Jahn G., (1991), *J. Infec. Dis.*, 165, 419-426.
15. Kusk P., Bugge T. H., Lindhardt B. O., Hulgaard E. F., Holmbck K., (1992), *AIDS Res. Hum. Retrovirus.*, 8, 1789-1794.
16. Luzzati A. L., Giacomini E., Giordani L., Pugliese O., Viora M., Chersi A., (1992), *Immunol. Lett.*, 33, 307-314.
17. Carpio E., Duarte C., Hinkula J., Broliden P.-A., Rosn J., Campal A., Gaviñondo J., Wahren B., Jondal M., (1991), *AIDS Res. Hum. Retrovirus.*, 7, 97-101.
18. Otteken A., Nick S., Bergter W., Voss G., Faisst A.-Ch., Stahl-Hennig Ch., Hunsmann G., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 2721-2724.
19. Naylor P. H., Naylor C. W., Badamchian M., Wada S., Goldstein A. L., Wang S.-S., Sun D. K., Thornton A. H., Sarin P. S., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2951-2955.
20. Achour A., Picard O., Zagury D., Sarin P. S., Gallo R. C., Naylor P. H., Goldstein A. L., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 7045-7049.
21. Robert-Hebmann V., Emillani S., Resnicoff M., Jean F., Devaux C., (1992), *Molec. Immunol.*, 29, 1175-1183.
22. Hrabec E., Hrabec Z., Plucienniczak G., Skorupa G., Szczepanek A., Plucienniczak A., Uznański B., Wilk A., Okruszek A., Koziolkiewicz M., Guga P., Stec W. J., (1992), *Gene*, 117, 259-263.

23. Guo L.-H., Stępień P. P., Tso J. Y., Brousseau R., Narang S., Thomas D. Y., Wu R., (1984), *Gene*, 29, 251-254.
24. Płucienniczak A., Nowosławski A., Stec W. J., Dybczyński I., Uznański B., Wilk A., Guga P., Okruszek A., Koziolkiewicz M., (1988), Patent PL 161070 B1.
25. Szczepanek A., (1993), *Izolowanie i oczyszczanie antygenów białkowych wirusa HIV z komórek zrekombinowanych bakterii Escherichia coli*, Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi (praca doktorska), 116-127.
26. Chung C. T., Miller R. H., (1988), *Nucl. Acids Res.*, 16, 3580.
27. Meselson S., Yuan R., (1968), *Nature*, 217, 1110-1114.
28. Tartof K. D., Hobbs C. A., (1987), *Bethesda Res. Lab. Focus*, 9, 12.
29. Kane J. F., Hartley D. L., (1988), *Trends Biotechnol.*, 6, 95-101.
30. Bowden G. A., Paredes A. M., Georgiou G., (1991), *Bio/Technology*, 9, 725-730.
31. Mitraki A., King J., (1989), *Bio/Technol.*, 7, 690-697.
32. Valax P., Georgou G., (1993), *Biotechnol. Progr.*, 9, 539-547.
33. Szczepanek A., Płucienniczak A., Karwowska S., Kalinowska B., Guga P., (1994), Patent PL 165302 B1.
34. Sharma S. K., (1986), *Sep. Sci. Tech.*, 21, 701-726.
35. Sarmientos P., Duchesne M., Denfle P., Boiziau J., Fromage N., Delporte N., Parker F., Lelivre Y., Mayaux J.-F., Cartwright T., (1989), *Bio/Technology*, 7, 495-501.
36. Lugtenberg B., van Alphen L., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 51-115.
37. Szczepanek A., Płucienniczak A., (1994), *Biotechnologia*, 4, 102-125.
38. Lin K.-h., Cheng S.-y., (1991), *BioTechniques*, 11, 748-749.
39. Marvin H.J.P., Witholt B., (1987), *Anal. Biochem.*, 164, 320-330.
40. Piszczkiewicz D., Landon M., Smith E. L., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 1173-1178.
41. Landon M., (1977), *Methods Enzymol.*, 17, 145-149.
42. Szoka P. R., Schreiber A. B., Chan H., Murthy J., (1986), *DNA*, 5, 11-20.
43. Jauregui-Adell J., Marti J., (1975), *Anal. Biochem.*, 69, 468-473.
44. Rittenhouse J., Marcus F., (1984), *Anal. Biochem.*, 138, 442-448.
45. Ng V. L., Chiang C. S., Debouck Ch., McGrath M. S., Grove T. H., Mills J., (1989), *J. Clin. Immunol.*, 27, 997-982.
46. Towbin H., Staehelin T., Gordon J., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
47. Harlow E., Lane D., (1988), *Antibodies. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
48. Karwowska S., Kalinowska B., Płucienniczak A., Sidorkiewicz M., Nowosławski A., (1989), *Immunologia Polska*, XIV, 250 (VI Zjazd PTI, Gdańsk 27-30.09).
49. Zembala M., Pryjma J., Płucienniczak A., Szczepanek A., Ruggiero I., Jasiński M., Colizzi V., (1994), *Immunol. Invest.*, 23, 189-199.
50. Zembala M., Pryjma J., Płucienniczak A., Szczepanek A., Jasiński M., Ruggiero I., Piselli P., Colizzi V., (1995), *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 75, 131-139.

Isolation and purification of Human Immunodeficiency Virus (HIV) antigens from *Escherichia coli* bacteria containing HIV genes

Summary

Fragments of HIV-1 structural proteins: gp120, gp41, p24, p17 were expressed in *E. coli* as fusion proteins with N-end fragment of β -galactosidase. To extract the virus fragments from fusion proteins with the use of acid hydrolyse, acid-labile bonds Asp-Pro were added at the point of junction.

An original method of isolation and purification of inclusion bodies from *E. coli* cells was developed. The virus peptides obtained were homogeneous on SDS-PAGE. These peptides showed no reaction with anti-*E. coli* antibodies on *Western blot* test. The level of endotoxin was very

low. The obtained virus peptides had strong, antigenic specificity, good enough to be used to construct a diagnostic test for the detection of anti-HIV antibodies, that could be used in clinical and scientific research.

Key words:

E. coli, genetic engineering, recombinant protein inclusion bodies, protein purification, HIV-1 antigens, HIV diagnosis.

Adres do korespondencji:

Andrzej Szczepanek, Zakład Badawczo-Wdrożeniowy i Inżynierii Genetycznej, TERPOL, Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA, ul. POW 57, 98-200 Sieradz, fax (0-43) 22 71 05.