

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jasmina BEVC

**RAZVOJ METODE ČIŠČENJA HEMAGGLUTININA VIRUSA INFLUENCE NA
MONOLITNIH KROMATOGRAFSKIH NOSILCIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

DEVELOPMENT OF PURIFICATION METHOD OF HEMAGGLUTININ FROM
INFLUENZA VIRUS ON MONOLITHIC CHROMATOGRAPHIC SUPPORTS

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija mikrobiologije: To delo je bilo v celoti izvedeno v podjetju BIA separations, Teslova 30, 1000 Ljubljana.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je dne 30.7.2009 sprejela temo in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za somentorja dr. Matjaža Peterka in za recenzenta pa prof.dr. Toma Turka.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Somentor: dr. Matjaž Peterka

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor

Predsednica komisije: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Tom Turk

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Matjaž Peterka

BIA Separations, Teslova 30, 1000 Ljubljana

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jasmina Bevc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 545.54 : 578(043)=163.6
KG Virusi / virus influence / virusni proteini / hemaglutinin / koncentriranje virusov / biokromatografija / CIM® monolitni nosilci
AV BEVC, Jasmina
SA MARINŠEK LOGAR, Romana / (mentorica), PETERKA / Matjaž (somentor), TURK, Tom (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN RAZVOJ METODE ČIŠČENJA HEMAGLUTININA VIRUSA INFLUENCE NA MONOLITNIH KROMATOGRAFSKIH NOSILCIH
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 56 str., 6 pregl., 27 sl., 28 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Hemaglutinin (HA) je zaradi svojih antigenskih lastnosti pomemben protein virusa influence. Čisti HA potrebujemo za različne študije strukture HA, izdelavo afinitetnih kolon za čiščenje protiteles proti HA kot tudi za razvoj proteinskih cepiv proti virusu influence. Razvili smo metodo osamitve HA virusa influence s monolitnimi ionsko izmenjevalnimi nosilci CIM®-Convection Interaction Media®. Metoda temelji na ideji združene anionske in kationske izmenjevalne kromatografije, ki so jo razvili Wang in sodelavci (2005). Hemaglutinin smo pridobili iz virusa influence A/New Caledonia/20/99 z uporabo detergenta Tween 20. Prisotnost HA smo dokazovali s SDS PAGE elektroforezo in prenosom po westernu. Optimizirali smo vezavo HA na CIM®QA, CIM®SO3 in CIM®CM z različnimi puferskimi sistemi. Na osnovi optimizacij vezave smo se odločili za uporabo CIM®QA in 50mM HEPES, 1mM EDTA, pH8=in CIM®CM 20mM MES, 1mM EDTA, pH=5,9. Uspelo nam je delno osamiti hemaglutinin iz virusnega lizata. S SDS PAGE in prenosom po westernu smo dokazali prisotnost monomera hemaglutinina in podenote HA1, v eluciji po čiščenju na CIM®CM.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 545.54 : 578(043)=163.6
CX viruses / influenza virus / virus proteins / hemagglutinin/ virus concentrating / biochromatography / CIM® monolithic supports
AU BEVC, Jasmina
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor) / PETERKA, Matjaž (co-advisor)/ TURK, Tom (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI DEVELOPMENT OF PURIFICATION METHOD OF HEMAGGLUTININ FROM INFLUENZA VIRUS ON MONOLITHIC CHROMATOGRAPHIC SUPPORTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 56 p., 6 tab., 27 fig., 28 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Hemagglutinin (HA) is due to its antigenic nature very important influenza virus protein. Purified HA is required for different structural studies, manufacturing of affinity supports for purifying HA specific antibodies, as in developing protein-based vaccines for influenza virus. We have developed a method for purification of influenza virus HA on CIM- Convection Interaction Media® monolithic ion exchange supports. The method is based on an idea of conjoined anionic and cationic exchange chromatography, which has been developed by Wang and coworkers (2005). HA was extracted from influenza virus A/New Caledonia/20/99, with Tween 20. Presence of hemagglutinin was proved with SDS PAGE electrophoresis and western blot. We have optimized binding of HA to CIM®QA, CIM®SO3 and CIM®CM with different buffer systems. Based on optimizations we decided on the use of CIM®QA, whit 50mM HEPES, 1mM EDTA at pH 8 and CIM®CM with 20mM MES, 1mM EDTA, and pH 5, 9. We have succeeded in partly purifying HA from virus lysat. We have proven the presence of HA monomer and HA1 subunit in final fraction after purification on CIM®CM.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KRATICE IN OKRAJŠAVE	IX
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZA	2
1.2 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VIRUS INFLUENCE	3
2.2 HEMAGLUTININ	4
2.1.1 Struktura hemaglutinina	5
2.3 ČIŠČENJE IN IZOLACIJA HEMAGLUTININA VIRUSA INFLUENCE	6
2.3.1 Ekstrakcija hemaglutinina z detergenti	6
2.4 OSAMITEV HEMAGLUTININA	8
2.4.1 Osamitev rekombinantnega hemaglutinina z ionsko izmenjevalno kromatografijo	8
2.4.2 Čiščenje virusa z velikostno izključitveno kromatografijo in šibkim anionskim nosilcem	10
2.5 KVANTIFIKACIJA HEMAGLUTININA Z RP-HPLC	12
2.6 MONOLITI IN HPLC (TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI)	13
2.6.1 Čiščenje virusa na kromatografskih nosilcih CIM®QA	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Virus	16
3.1.2 Celice	16
3.1.3 Material, potreben za delo s celicami VERO	16
3.1.4 Aparature, potrebne za delo z celicami VERO	17
3.1.5 Kemikalije, potrebne za pripravo pufrov	17
3.1.6 Pufri za koncentriranje virusov:	17
3.1.7 Pufri za koloni UNO-Q in SP Sepharosa Fast Flow:	18
3.1.8 Pufri za testiranje diska CIM®QA	18
3.1.9 Pufri za testiranje diska CIM®SO3.	18
3.1.10 Pufri za testiranje diska CIM®CM.	19
3.1.11 Nabor uporabljenih kolon za HPLC:	19
3.1.12 Material za izvedbo testa hemaglutinacije:	19
3.1.13 Material za ekstrakcijo hemaglutinina:	20

3.1.14 Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (SDS – PAGE):	20
3.1.15 Aparature za izvedbo SDS PAGE elektroforeze in prenosa po westernu:	21
3.1.16 Kemikalije za prenos po westernu in točkovni prenos:	21
3.1.17 Material za test Mikro BCA:	22
3.2 METODE	23
3.2.1 Celična kultura	23
3.2.1.1 Odmrzovanje in inkubacija celic VERO	23
3.2.1.2 Presajanje in ponovna inkubacija	23
3.2.1.3 Ugotavljanje živosti celic in njihove koncentracije	23
3.2.2 Gojenje virusov	24
3.2.3 Koncentriranje zbranega virusa	24
3.2.4 Hemaglutinacija	24
3.2.5 Ekstrakcija hemaglutinina	25
3.2.6 Izračunavanje izoelektrične točke in molekulske mase hemaglutinina	26
3.2.7 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	26
3.2.8 Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (SDS – PAGE)	27
3.2.9 Metoda prenosa proteinov na membrano po westernu	27
3.2.10 Točkovni prenos HA na nitocelulozno membrano	28
3.2.11 Test za kvantifikacijo proteinov-Mikro BCA	28
4 REZULTATI	30
4.1 GOJENJE VIRUSA INFLUENCE	30
4.2 KONCENTRIRANJE VIRUSA	30
4.3 TESTIRANJE RAZLIČNIH DETERGENTOV ZA RAZBITJE VIRUSA INFLUENCE	31
4.4 IZRAČUNAVANJE IZOELEKTRIČNE TOČKE IN MOLEKULSKE MASE HEMAGLUTININA	32
4.5 TESTIRANJE KOLON UNO-Q in SP SEPHAROSA FAST FLOW	32
4.6 OPTIMIZACIJA LOČEVANJA HA NA MONOLITNEM NOSILCU CIM®QA	34
4.6.1. Optimizacija vezave HA pri različnih puferskih območjih na CIM®QA	34
4.6.2. Testiranje dinamične kapacitete vezave HA na disku CIM®QA	36
4.6.3. Ločevanje HA na disku CIM®QA	38
4.7 OPTIMIZACIJA VEZAVE HA NA DISKU CIM®SO₃ V RAZLIČNIH PUFERSKIH SISTEMIH	39
4.8 OPTIMIZACIJA LOČEVANJA HA DISKU CIM®CM	42
4.8.1 Optimizacija vezave HA na CIM®CM v različnih puferskih sistemih.	42
4.9 OSAMITEV HA S KOMBINACIJO KOLONE CIM®QA IN DISKA CIM®CM	45
5 RAZPRAVA in SKLEPI	49
6 VIRI	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Grafični prikaz virusa influence (Kaiser..., 2006)	4
Slika 2: Struktura hemaglutinina (Stevens..., 2004)	6
Slika 3: Elucijski profil rekombinantnega HA iz anionske kolone UNOsphere Q in kationske kolone Sepharosa Fast Flow (Wang in sod., 2005)	9
Slika 4: Elucijski profil hemaglutinina na DEAE celulozni koloni (Collins in Knight, 1978)	10
Slika 5: SDS - lizata virusne vakcine velikostno izključitvena kromatografija na Bio-Gel A-5m (Bucher in sod., 1976)	11
Slika 6: Kromatogram kvantifikacije hemaglutinina z RP- HPLC virusa influence A/New Caledonia/20/99 (Kapteyn in sod., 2006)	13
Slika 7: Kromatogram koncentriranja virusa influence z tremi zaporedno vezanimi kolonami CIM®QA-8 (Peterka in sod., 2008)	15
Slika 8: Kromatogram koncentriranja virusa H1N1 na CIM®QA-8 koloni	31
Slika 9: Aminokislinsko zaporedje HA virusa A/New Caledonia/20/99(NCBI..., 1995)	32
Slika 10: Kromatogram čiščenje HA na zaporedno vezanih kolonah UNO-Q in SP- Sepharosa Fast Flow	33
Slika 11:Dokazovanje HA v frakcijah po čiščenju na kolonah UNO Q in SP-Sepharose Fast Flow	33
Slika 12: Elucijski kromatogrami vezave HA na disku CIM®QA z različnimi puferskimi sistemi	35
Slika 13: Dokazovanje HA v frakcijah optimizacije vezave HA na CIM®QA	36
Slika 14:Kromatogram testiranja dinamične kapacitete vezave HA na CIM®QA disk	37
Slika 15: Dokazovanje HA v frakcijah pri testiranju dinamične kapacitete vezave na CIM®QA	37
Slika 16: Kromatogram ločevanja HA na disku CIM®QA v linearinem gradientu NaCl	38
Slika 17: Kromatogrami vezave HA na CIM®SO ₃ v različnih puferskih sistemih	40
Slika 18:Dokazovanje HA v frakcijah pri testiranju puferskih sistemov na CIM®SO ₃	41
Slika 19: Kromatogram vezave HA na CIM®SO ₃ v MES puferskem sistemu V) MES puferski sistem	41
Slika 20: Dokazovanje HA v frakcijah pri ločevanju na CIM®SO ₃ disku v MES puferskih sistemih	42
Slika 21:Kromatogrami vezave HA na disk CIM®CM v različnih puferskih sistemih	43
Slika 22: Dokazovanje HA v frakcijah ločevanja HA na CIM®CM disku v puferskih sistemih MES, fosfatni pufer	44
Slika 23: Kromatogram spiranja HA iz diska CIM®CM v linearinem gradientu pufrov A in B	44
Slika 24: Kromatogram ločevanja HA v na koloni CIM®QA-8 z linearnim gradientom NaCl. I) celoten kromatogram, II) izsek območja linearnega gradijeta	46
Slika 25: Dokazovanje HA v frakcijah ločevanja HA na koloni CIM®QA z gradientom NaCl	46
Slika 26: Kromatogram spiranja HA iz diska CIM®CM	47
Slika 27: Dokazovanje HA v frakcijah po čiščenju na disku CIM®CM	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Hemaglutinacijske vrednosti posameznih virusnih žetev	30
Preglednica 2: Rezultati testa hemaglutinacije virusnih frakcij koncentriranja virusa	31
Preglednica 3: Rezultati optimizacije vezave HA na CIM®QA pri različnih pogojih elucije na CIM®QA	36
Preglednica 4: Detekcija HA z točkovnim prenosom v frakcijah ločevanja HA na disku CIM®QA v linearjem gradientu soli	38
Preglednica 5: Rezultati vezave HA na CIM®SO3 pri različnih pogojih elucije	42
Preglednica 6: Rezultati vezave HA na CIM®CM v različnih razmerah spiranja	45
Preglednica 7: Masna bilanca proteinov v frakcijah po čiščenju na koloni CIM®QA	48
Preglednica 8: Masna bilanca proteinov v frakcijah po čiščenju na disku CIM®CM.....	48

KRATICE IN OKRAJŠAVE

BCIP/NBT	5-Bromo-4-kloro-3-indolfosfat/Nitromodri tetrazol
BSA	bovine serum albumin
CIM®	Convective Interaction Media
DEAE	dietilamino etanol
DPBS	Dulbecco's phosphate buffer saline
EDTA	Etilen dinitriltetraocetna kislina dinatrijev dihidrat
HA	hemaglutinin
HEPES	2-[4-(2-Hidroksietil)-1-piperazinil]-etansulforonska
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MES	2-Morfolinoetansufronska kislina monohidrat
PVDF	polivinilfluoridna membrana
RP-HPLC-	tekočinska kromatografijo visoke ločljivosti na obrnjeni fazi
SDS	PAGE Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
SRID	single radial- immunodiffusion test
TCID50	Tissue Culture Infections Dose 50
TFA	triflorooacetna kislina
TRIS	hidroksimetil)-aminometan

1 UVOD

Influenca oziroma gripa je zelo nalezljiva bolezen dihalnega sistema, ki jo povzročajo virusi influence. Letne epidemije pozno jeseni oziroma zgodaj spomladi in redke pandemije povzročajo veliko smrtnost povsod po svetu (MMWR - Morbidity and mortality weekly report..., 2009). Vzrok ponovljivosti epidemij je visoka frekvenca mutacijskih sprememb v genih za hemaglutinin (HA) in nevraminidazo. Pri virusu influence se pojavlja tako antigenski premik kot tudi antigenski odmik.

HA je eden glavnih antigenov na površini virusa influence, ki omogoča vezavo virusa na celice in prenos v celico. Zaradi antigenskega premika poznamo več podtipov HA, ki se razlikujejo v zaporedju aminokislin. Čisti HA je zaradi svojih antigenskih lastnosti možno uporabljati kot cepivo proti influenci. Razvili so nekaj različnih metod čiščenja proteina HA. Pri prvih razvitih metodah osamitve virusa so uporabljali velikostno izključitveno kromatografijo (Bucher in sod, 1976). Metode, ki so jih razvili kasneje, so poleg velikostno izključitvene kromatografije vključevale tudi ionsko izmenjevalno kromatografijo in sicer šibki anionski izmenjevalec (Collins in Knight, 1978). Metoda, ki so jo razvili Wang in sodelavci (2005) je vključevala čiščenje na anionskem in kationskem izmenjevalcu. Z metodo so uspeli osamiti HA do stopnje, ki je primerna za humano uporabo.

Čiščenje z ionsko-izmenjevalno kromatografijo predstavlja cenovno dostopen način osamitve iskanega proteina. CIM[®] monolitni kromatografski nosilci so stacionarne faze optimizirane za ločevanje velikih molekul in nanodelcev. Masni transport temelji na konvekciji, posledično pa so kromatografske lastnosti CIM[®] kolon neodvisne od pretokov. Poznamo več različnih CIM[®] monolitnih nosilcev: ionsko izmenjevalne, afinitetne, aktivirane, hidrofilne in hidrofobne. Med ionsko izmenjevalne nosilce spadajo anionski QA, DEAE, EDA in kationski SO₃, CM.

1.1 HIPOTEZA

Predvidevali smo, da nam bo z uporabo CIM[®] monolitnih nosilcev uspelo razviti metodo čiščenja hemaglutinina virusa influence.

1.2 NAMEN DELA

Idejo osamitve HA z uporabo anionskih in kationskih kolon, ki so jo razvili Wang in sodelavci (2005), smo poizkušali prenesti na CIM[®] kolone. Z uporabo različnih monolitnih anionskih in kationskih izmenjevalce smo želeli osamiti HA iz virusnega lizata. Očiščen HA je uporaben za nadaljnje raziskave, kot je izdelovanje afinitetnih kolon za čiščenje protiteles specifičnih proti HA.

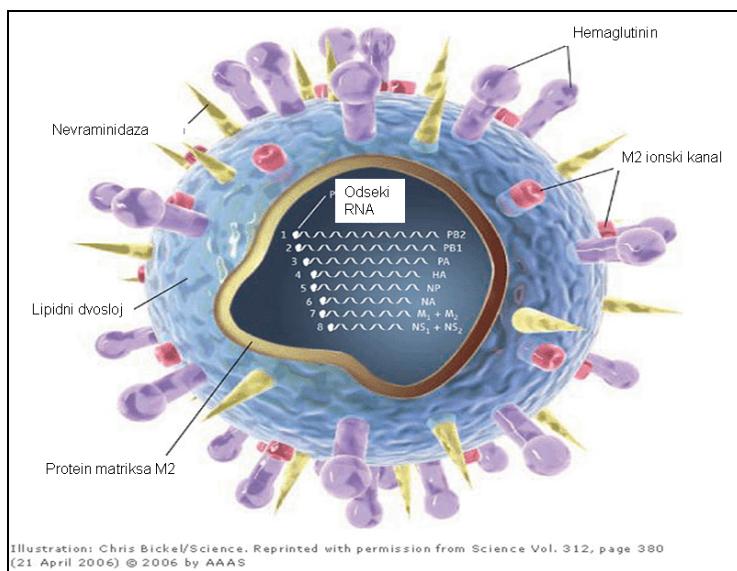
2 PREGLED OBJAV

2.1 VIRUS INFLUENCE

Influenca ali gripa je zelo nalezljiva bolezen, ki jo povzroča virus influence. Vsako leto se pojavi epidemija virusa influence, občasno pa se pojavi pandemija gripe(MMWR - Morbidity and mortality weekly report..., 2009). Do epidemij in pandemij prihaja zaradi visoke frekvence mutacij v genih, ki nosijo zapis za HA in nevraminidazo. Pri virusu influence prihaja tako do antigenskega premika kakor tudi do antigenskega odmika (Webster in sod., 1992). Antigenski odmik je posledica točkovnih mutacij, ki povzročijo malenkostno spremembo v zgradbi molekul HA in nevraminidaze. Pojav, pri katerem pride do prerazporeditve genetske informacije med različnimi virusi influence, imenujemo antigenski premik (Koren in sod., 2002)

Virus influence spada v družino *Orthomyxoviridae*. Virioni so zgrajeni iz ovojnice, proteinov matriksa, nukleoproteinskega kompleksa in polimeraznega kompleksa. Virusna kapsida je obdana z ovojnico. Virioni so sferični do pleomorfni. Merijo od 80 do 120 nm v premeru in 200 do 300 nm v dolžino. Po površini virionov so gosto razporejeni HA, ob katerih je nevraminidaza (Slika 1). Genom je sestavljen iz šest do deset odsekov. Je negativno polarna enojna vijačnica RNA, ki nosi zapis za virusne proteine. Poznamo 3 različne skupine virusov influence: virus influence A, virus influence B in virus influence C (ICTVdB Management... , 2006).

Viruse influence A delimo v več podtipov, ki imajo enake nukleoproteine in matriks, razlikujejo pa se po zgradbi HA in nevraminidaze. HA je glavni antigenski protein na površini viriona, ki omogoča fuzijo viriona in gostiteljske celice. Nevraminidaza sodeluje pri zorenju virionov. Do zdaj poznamo 16 različnih molekul HA in 9 različnih molekul nevraminidaze. Virus influence A je bolj virulenten od virusov influence B in C. Rezervoar za influenco A je v divjih vodnih pticah. Z virusom influence A pa se lahko okužijo ptice in sesalci (CDC... , 2009).



Slika 1: Grafični prikaz virusa influence(Kaiser..., 2006)

Gobam podobne strukture označujejo hemaglutinin, storžaste strukture označujejo nevraminidazo, modro označuje lipidni dvosloj, v notranjosti pa je označen genom iz osmih odsekov RNA.

2.2 HEMAGLUTININ

HA je integralni membranski protein in glavni površinski antigen virusa influence. Odgovoren je za združenje virusne ovojnice in gostiteljske celice. Zapis za HA najdemo na RNA odseku 4 (Webster in sod., 1992).

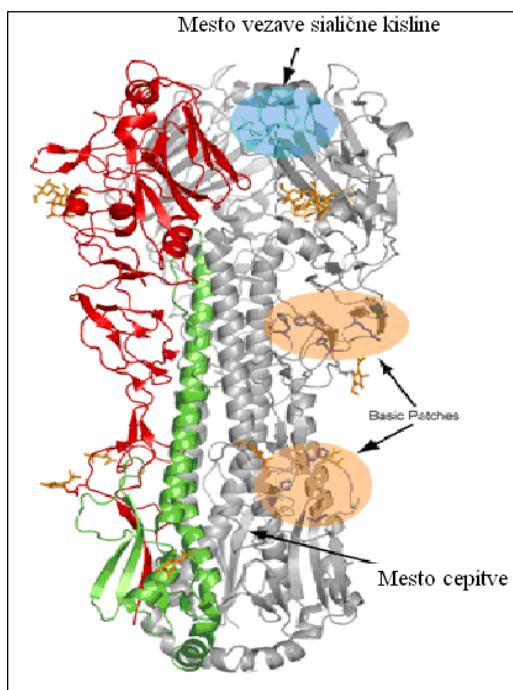
Vezava viriona na gostiteljsko celico poteka preko vezave HA s sialično kislino, ki je vezana na receptorsko molekulo gostiteljske celice. Virion vstopi v gostiteljsko celico z endocitozo. Kisel pH (pH med 5 in 6) povzroči strukturno spremembo HA. Strukturna sprememba omogoča združitev virusne in endosomske membrane, temu sledi sprostitev virusnega ribonukleoproteina v citoplazmo celice. Pred združitvijo pride do cepitve HA na podenoti HA1 in HA2. Znižana pH vrednost omogoča razkritje osnovnih aminokislin na mestu cepitve, ki jih prepozna ubikvitarna intracelularna gostiteljska proteaza (Foder in Brownlee, 2002). Carr in sodelavci (1997) so odkrili, da se lahko virus influence združi z endosomsko membrano tudi pri nevtralnem pH. Rezultati so pokazali, da obstaja splošni mehanizem aktivacije, ki vključuje destabilizacijo nativne oblike HA, to pa

sprožijo nizek pH, temperatura ali kemični denaturant pri nevtralni pH vrednosti (Carr in sod., 1997). V jedru gostiteljske celice se virusna RNA prepiše v informacijsko RNA. Prepis izvede od RNA odvisna RNA polimeraza. Informacijsko RNA pa gostiteljski ribosomi prepišejo v virusne proteine (Foder in Brownlee, 2002).

Za funkcionalen HA je potrebno več posttranslacijskih sprememb in sicer proteolitična cepitev, glikozilacija in acetilacija maščobnih kislin. Novo sintetiziran HA se najprej razcepi, s tem se odstrani signalno zaporedje za transport na celično membrano. Nato se dodajo stranske sladkorne verige. Med zorenjem viriona tvorijo molekule HA homotrimjer. HA je zaradi nenatančne virusne RNA polimerazene aktvnosti podvržen zelo pogostim mutacijam. Selekcijo aminokislinskih zamenjav usmerja odziv imunskega sistema gostitelja (Webster in sod., 1992).

2.1.1 Struktura hemaglutinina

HA je zgrajen iz podenot HA1 in HA2, ki sta povezani z enim disulfidnim mostičkom (slika 2). V osnovi je vsaka monomerna molekula zgrajena iz globularne glave in steba. Glava je zgrajena iz podenote HA1 in nosi vezavno mesto za receptor ter večino antigenskih mest. Steblo je sestavljen iz podenote HA2 in je vstavljen v ovojnico virusa (Webster in sod., 1992). Monomer HA seva A/New Caledonia/20/99 je sestavljen iz 547 aminokislinskih ostankov z izračunano molekulsko maso 63,15 kDa in izoelektrično točko 6,30 (Wang in sod., 2005).



Slika 2: Struktura hemagglutinina (Stevens..., 2004).

Trimer hemagglutinina, rdeča veriga (podenota HA1) in zeleni heliks (podenota HA2) predstavljata monomer HA, modro osenčeno je mesto vezave na receptor.

2.3 ČIŠČENJE IN IZOLACIJA HEMAGGLUTININA VIRUSA INFLUENCE

Razvili so nekaj tehnik čiščenja HA. Očiščen HA rabi za raziskave sestave HA. Bucher in sodelavci (1976) so čisti HA uporabili za določitev aminokislinskega zaporedja. Collins in Knight (1978) pa so uporabili čisti HA za analizo ogljikohidratnih sestavin. V zadnjem času pa so se raziskave čiščenja HA osredotočile na čiščenje rekombinantnega HA. Očiščen rekombinatni HA, bi omogočal proizvodnjo in uporabo rekombinantnih proteinskih cepiv. Ta cepiva kažejo velik potencial, saj je HA glavni antigenski protein virusa influence (Wang in sod. 2005).

2.3.1 Ekstrakcija hemagglutinina z detergenti

HA virusa influence je transmembranski protein. Transmembranske proteine ekstrahiramo z neionskimi detergenti ali organskimi topili. Detergenti imajo hidrofilne in hidrofobne lastnosti. Zaradi amfifilnih lastnosti je možno razbitje membran in

ekstrakcija membranskih proteinov. Za ekstrakcijo proteinov uporabljajo neionske ali detergente ionov dvojčkov, ker ti ne denaturirajo proteinov (Hafiz, 2005).

Hu in sodelavci so testirali različne detergente za ekstrakcijo HA. Testirali so neionske detergente: NP-40, Triton X-100, Tween 20, O-G in CHAPS, detergent ion dvojček. Z uporabo detergentov Triton X-100 ali Tween 20 so dobili primerljive rezultate. Drugi detergenti niso omogočili zadovoljive ekstrakcije HA. Proteine so izločili z dvostopenjsko ekstrakcijo. V prvem koraku so z dodatkom 1% detergenta raztopili proteinske nečistoče, ki so lahko topne v detergentu. Višja koncentracija (2%) pa je raztopila rekombinantni HA. Pri tem so ugotovili, da Tween 20 omogoča večji izplen proteinov kot pa Triton X-100 (Hu in sod., 2006).

Obdelava virusa z 1% Tween 20 v 0,02 M bikarbonatnem pufru (končna koncentracija Tween 20 je 0,5%) pri sobni temperaturi v alkalnem pH ne zadostuje za uspešno ekstrakcijo HA. Vendar pa obdelava virusa pri pH 10 in temperaturi 37°C povzroči popolno izgubo aktivnosti HA. To mešanico so dializirali proti 0,1 M fosfatnem pufru in jo s tem nevtralizirali. Večje delce so odstranili s centrifugiranjem, Tween 20 pa so kromatografsko odstranili na Sephadex G200 koloni z 0,05M fosfatnim pufrom (Webster in Darlington, 1969).

Za izolacijo C-terminalne domene HA2 je potrebno raztopljanje površinskih glikoproteinov virusa v neionskem detergentu oktil-β-D-glukozidu. Opisana metoda je rutinska metoda za raztopljanje kompleksa hemaglutinin/nevroaminidza (HA/NA). 5 % (w/v) oktil-β-D-glukozid popolnoma razbije strukturo virusa. Transmisijski elektronski mikroskop (TEM) po razbitju virusne strukture pokaže nastanek agregiranih rozet, ki so zgrajene iz 7 do 9 HA paličic v micelni raztopini. Rozete so pred proteolizo izpostavili nizkim pH-jem, da je HA denaturiral. Za denaturacijo uporabijo pepsin in termolizin za encimsko hidrolizo HA/NA kompleksa (Radyukhin in sod. 2006).

Kapteyn in sodelavci (2006) so razvili RP-HPLC metodo, ki je hitra in učinkovita metoda detekcije podenote HA1. Več desetletij so imunogenost HA določali z enojno radialno imunodifuzijo (SRID). Podenota HA1 nosi večji del antigenskih lastnosti HA, zato se

uporablja za ugotavljanje imunogenosti cepiv. Podenoto HA1 so pripravili tako, da so očiščenemu virusu influence v 0,15 M TRIS HCl pH=8,0 dodali Zwittergent 3-14 (Calbiochem) do končne koncentracije 1% (w/v). Vzorec so inkubirali pri sobni temperaturi 30 minut, ter cepili HA na podenoti s tripsinom (Kapteyn in sod. 2006).

Za določitev aminokislinske sekvene HA je potrebno le-tega očistiti. Prva stopnja čiščenja HA je ekstrakcija virusnih proteinov. Virusni pelet so pridobili s specifično precipitacijo z 0,2 M MgSO₄ pri pH 8,5 ter z 10-15 ml 10% natrijevega dodecil sulfata (SDS) in ultrazvočno obdelali raztopino, dokler ni postala bistra. Virusne proteine so nato segrevali pri 56 °C za 60 minut, raztopino virusnih proteinov so nato kromatografsko očistili (Bucher in sod. 1976).

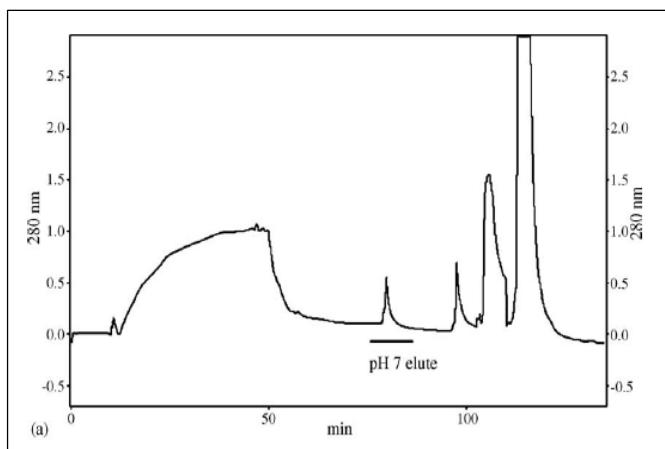
2.4 OSAMITEV HEMAGLUTININA

HA je potrebno za nadaljnje študije osamiti iz virusnega lizata. Razvili so več različnih metod osamitve HA. Večina metod temelji na kromatografiji. Prve metoda za čiščenje HA s kromatografskimi tehnikami je bila razvita z velikostno izključitveno kromatografijo, ki so jo uporabili Bucher in sodelavci (1976). Collins in sodelavci (1978) so za osamitev HA uporabljali poleg velikostno izključitvene kromatografije tudi ionsko izmenjevalno kromatografijo. Wang in sodelavci (2005) so za osamitev HA uporabili kombinacijo anionske in kationske kromatografije.

2.4.1 Osamitev rekombinantnega hemaglutinina z ionsko izmenjevalno kromatografijo

Mrtva cepiva so cepiva iz inaktiviranih virusov in virusnih proteinov. Proteine s ključnimi virusnimi antigenskimi determinantami izdelujejo tudi z genskim inženiringom. Ti proteini so dovolj imunogeni, da sprožijo imunski odziv. Gene, ki nosijo zapis za različne proteine, z vektorji vstavijo v bakterije, ki nato izdelujejo virusne proteine (Koren in sod., 2002).

Cepiva iz rekombinantnih proteinov proti virusu influence so sestavljena iz virusnih antigenov kot je na primer HA. Cepivo na osnovi rekombinantnega HA so nedavno klinično testirali (Wang in sod. 2005). Pokazalo se je, da je takšno cepivo enako ali bolj imunogeno kot cepivo iz oplojenih jajc. Da bi zagotovili dovolj cepiva v primeru pandemije influence so morali razviti zanesljivo metodo izražanja rekombinantnega cepiva ter razviti učinkovito in hitro metodo osamitve rekombinantnega HA (Slika 3). Rekombinatni HA so zbrali 56-65 ur po infekciji s centrifugiranjem. Celičnemu sedimentu so dodali 1% tergitol NP-9, v pufru A (20mM natrijev fosfat, 1mM EDTA in 0,01 % tergitola NP-9, 5 % glicerol pH 5,89). Ekstrakt so centrifugirali, supernatant pa nanesli na zaporedno vezani anionsko in kationsko kromatografsko kolono. Uporabili so kolono UNOsphere-Q (BIO RAD, Hercules, CA) in kolono SP Sepharose Fast Flow (GE/Amersham/Pharmacia, Piscataway, NJ). Kolona UNO-Q predstavlja anionsko izmenjevalno kolono, ki veže vse negativno nabite delce. SP Sepharose FF pa je kationsko izmenjevalna kolona, ki veže HA pri pH 5,89. Po nanašanju so kolono UNO-Q odklopili. V tem primeru je prva kolona predstavljala sito za proteine, ki imajo pri pH 5,89 negativen naboj. Iskani HA ima pozitiven naboj in se je v danih razmerah vezal na kolono SP Sepharose Fast Flow. Spiranje je potekalo v pufru s pH 7,02 (20 mM natrijev fosfat, 0,03 % tergitol, 5 % glicerol).

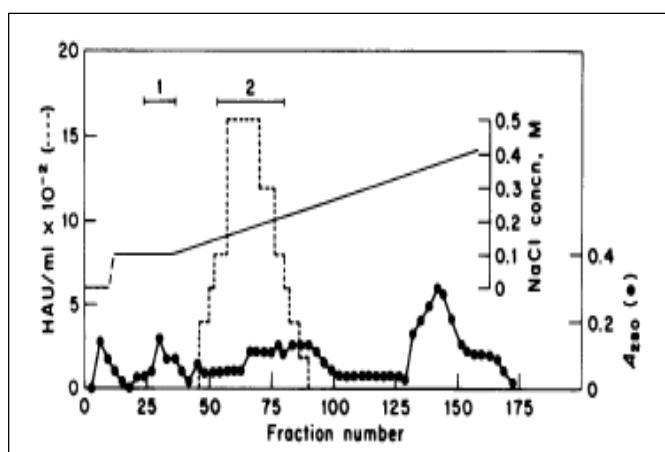


Slika 3: Elucijski profil rekombinantnega HA iz anionske kolone UNOsphere Q in kationske kolone Sepharosa Fast Flow (Wang in sod., 2005).

Elucijski vrh pri pH=7,02, ki je vseboval HA, so čistili na koloni napolnjeni s hidroksiapatitom (Wang in sod., 2005). Hidroksiapatit je primeren za ločevanje proteinov, nukleinskih kislin in virusov. Kromatografijo največkrat izvajajo v linearjem gradientu kalijevega ali natrijevega fosfata. Vezava proteina na hidroksiapatit je možna na dva načina in sicer na ogljik ali na fosfat. Če ima protein izoelektrično točko nižje od 7, je v večjem delu vezan na ogljik (Kawasaki in sod., 1985). Eluiranje HA iz hidroksiapetita poteka z večanjem koncentracije natrijevega fosfata. HA eluirajo s 40 mM natrijevim fosfatom, z dodatkom 0,05 % Tweena 20 in 5 % glicerola. HA so koncentrirali z ultrafiltracijo na celulozni membrani 100kDA MWCO (Wang in sod., 2005).

2.4.2 Čiščenje virusa z velikostno izključitveno kromatografijo in šibkim anionskim nosilcem

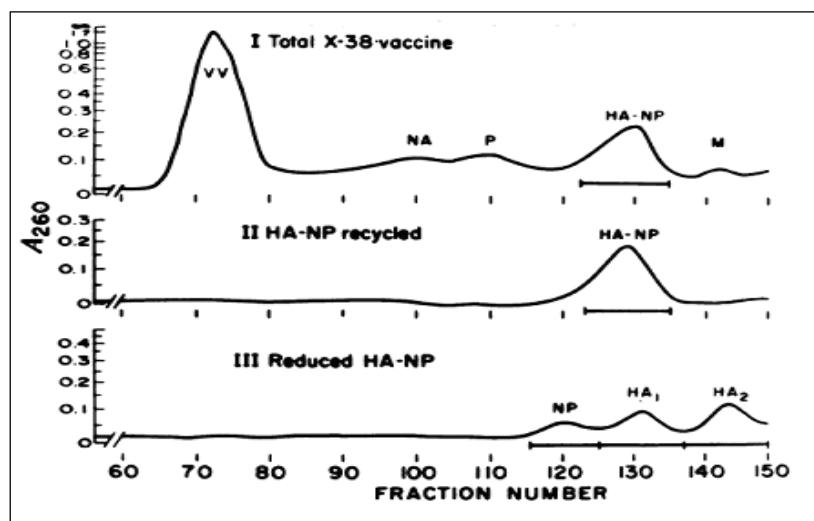
Collins in Knight (1978) sta razvila metodo osamitve HA z velikostno izključitveno kromatografijo. Virus influence sta razbila z detergentom in topilom (DOC-TNBP postopek), Detergent in TNBP sta odstranila istočasno z velikostno izključitveno kromatografijo na Sephadex G-150. HA se izpere prvi, ostanki detergenta in topilo v drugi stopnji. Frakcijo, ki je vsebovala HA so nato čistili na DEAE celulozni koloni, ki je šibek anionski izmenjevalec. HA izpirajo v gradientu soli in sicer od 0,1 M NaCl do 0,3 M NaCl (Slika 4) (Collins in Knight, 1978).



Slika 4: Elucijski profil hemaglutinina na DEAE celulozni koloni (Collins in Knight, 1978).
Vrh, označen s številko 2, označuje eluiranje hemaglutinina.

2.4.3 Čiščenje hemaglutinina s velikostno izključitveno kromatografijo

Bucher in sod. (1976) so virus obdelali s SDS pri 56°C in ga nanesli na koloni napolnjeni z Bio-Gel A-5m (BioRad) (slika 5). Koloni so pred tem uravnotežili s pufrom 0,2M TRIS-HCl pH=7,5; 0,1% SDS; 0,05 % natrijev azid. Izpirali so z istim pufrom s pretokom 12-15 ml/uro na sobni temperaturi. Frakcije ki so vsebovale kompleks HA in nukleoprotein so skoncentrirali s ultrafiltracijo na 4 ml. Frakcijo so ponovno čistili v enakih razmerah. Po drugem čiščenju so odstranili nečistoče, ki so večje od 122 kDa in manjše od 27 kDa. Frakcijo s kompleksom HA in nukleoproteina so ponovno koncentrirali z ultracentrifugiranjem. Kompleks HA in nukleoproteina so obdelali z dodatkom reducenta (ditiotreitol). Vzorec z reducentom so ponovno naložili na isti par kolon. Rezultati frakcij SDS PAGE gela so pokazali, da je prišlo do ločitve nukleoproteina ter ločitve podenot hemaglutinina HA1 in HA2 (Bucher in sod., 1976).



Slika 5: SDS - lizata virusne vaccine velikostno izključitvena kromatografija na Bio-Gel A-5m (Bucher in sod., 1976).

a)velikostno izključitvena kromatografija virusnega lizata. b)velikostna izključitvena kromatografija hemaglutinin-nukleoprotein kompleksa. c)velikostna izključitvena kromatografija reduciraneha hemaglutinin-nukleoprotein kompleksa.

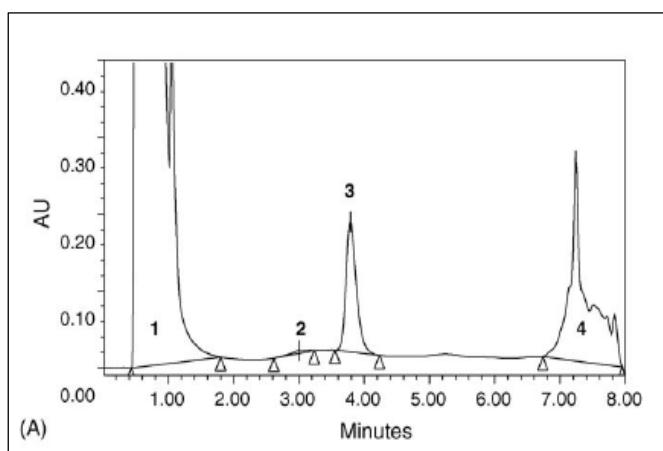
2.5 KVANTIFIKACIJA HEMAGLUTININA Z RP-HPLC

Metoda zaznavanja HA z RP-HPLC (Reverse phase-high preformance liquid chromatography) je alternativna metoda kvantifikacije virusa influence (Kapteyn in sod. 2006).

Tekočinska kromatografija na obrnjeni fazi temelji na interakcijah med nepolarnimi (hidrofobnimi mesti) molekulami in hidrofobnimi ligandi (alkilnimi ali arilnimi skupinami), ki so vezani na trden matriks. Površinska koncentracija hidrofobnih mest vezave je običajno od nekaj sto $\mu\text{mol}/\text{ml}$ sorbenta do nekaj mmol/ml sorbenta. Eksperimentalne razmere so ugodnejše za prenos iz mobilne faze na stacionarno fazo. To pomeni, da do prenosa pride v vodi oziroma v vodni raztopini. Iz energetskega vidika je bolj ugodna tvorba kompleksa z ligandom. Vezani topljenci se nato odlepijo od obratno-faznega medija s prilagajanjem polarnosti mobilne faze (Tennikova in Vlakh, 2009).

Večina metod za detekcijo virusa influence temelji na ugotavljanju količine imunogenega HA (Kapteyn in sod., 2006). Podenota HA1 nosi večino antigenskih mest ter nevtralizacijskih epitopov. Glavna metoda za ugotavljanje količine imunogenega HA je enojni radialni imunodifuzijski test (SRID). Pri tehniki SRID so HA antigeni raztopljeni v detergentu ter podvrženi imunodifuziji v agaroznih gelih, ki vsebujejo specifične antogene. Protitelesa vodijo do cone precipitacije, ki je direktno proporcionalna količini HA. Slaba stran te metode je zahtevana visoka čistost HA, saj je točnost odvisna od ionske jakosti in pH. Metoda kvantifikacije HA z RP-HPLC je hitra in učinkovita metoda. Temelji na dejstvu, da je možno trimerni protein HA z tripsinom ločiti na podenoti HA1 in HA2. Glede na velikost vrha HA1, ki ga je mogoče dobro ločiti od drugih proteinov, je možno določiti koncentracijo HA. Vzorce so analizirali s pomočjo kolone POROS[®] R1/10 z mobilno fazo je A: 0,1% TFA (trifluoroacetna kislina) 5% acetonitril v vodi, faza B je 0,098% TFA v acetonitrilu. Glavni cilj razvoja metode je bila ločitev HA1 od drugih virusnih proteinov. Selektivnost metode so raziskali z analizo inaktiviranga virusa influence A/New Caledonia/20/99 (H1N1), ki so ga gojili v celični liniji PER.C[®]. Inaktiviran virus influence so obdelali z detergentom Zwittergent 3-14

(Calbiochem) in tripsnom. Tripsinska obdelava vzorca je ločila HA na podenote HA1 in HA2. Virusni lizat so nato analizirali na koloni POROS® R1/10 (slika 6). Vse vrhove so zbrali in analizirali s SDS PAGE elektroforezo. Frakcija z zadrževalnim časom 3,8 minute je vsebovala celoten HA1 protein, v tej frakciji ni bilo vidnih nobenih nečistoč. Prisotnost HA1 so potrdili s prenosom po westernu s specifičnim protitelesi proti tipu virusa A/New Caledonia/20/99 (Kapteyn in sod. 2006).



Slika 6: Kromatogram kvantifikacije hemaglutinina z RP- HPLC virusa influence A/New Caledonia/20/99 (Kapteyn in sod., 2006).

Označene elucijske vrhove so analizirali s SDS PAGE in prenosom po westernu. V vrhu št. 3 so dokazala prisotnost podenote HA1 hemaglutinina.

2.6 MONOLITI IN HPLC (TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je orodje, ki omogoča ločevanje, izolacijo in osamitev različnih tipov naravnih in sintetičnih snovi. Monolitni nosilci predstavljajo nov tip stacionarnih faz za tekočinsko kromatografijo. So odlitek nepretrgane homogene faze, ki predstavlja neprožen, zelo porozen polimer. Prosti volumen je pri monolitu zmanjšan na minimum. Omogočajo dobra razmerja med prenosom mase in nizkim tlakom kot tudi visoko učinkovitost pri povečanih pretokih. Zaradi tega se poveča hitrost ločitve, velikost por pa omogoča lažji dostop tudi večjim molekulam. Precipitacija, ultrafiltracija in tekočinska kromatografija so največkrat uporabljene tehnike za izolacijo in čiščenje biomolekul, vendar samo tekočinska

kromatografija lahko očisti produkt do stopnje, ki je potrebna, da lahko produkt označimo kot varnega za humano uporabo (Štrancar in sod., 2002).

CIM® monoliti so po osnovni zgradbi poliglicidil metakrilat koetilen dimetil krilatni matriks. Na to osnovno zgradbo kemijsko vežejo različne kemijske skupine, ki omogočajo ionske, hidrofobne ali afinitetene interakcije. Polimetakrilatni monolit sta prva predstavila Tennikova in Švec (2005). Lastnosti monolitov se bistveno razlikujejo od klasičnih kolon napolnjenih z delci. Polnjene kolone z delci imajo približno 40% prostega volumna, medtem ko ga monoliti nimajo. Konvektivni tok tekočine omogoča hiter prenos snovi. To močno skrajša čas, ki je potreben za prenos molekul med stacionarno fazo in mobilno fazo (Vlakh in Tennikova, 2009).

Danes so komercialno dostopni monolitni materiali v obliki diskov, kolon in cevi. Monolitni diskki so bili prvi uspešen primer polimetakrilatnih separacijskih kolon, ki jih proizvaja in prodaja BIA separations, d.o.o. Ljubljana, Slovenija pod imenom CIM® diskki. Standardni CIM® diskki imajo premer 12 mm in debelino 3 mm. Volumen je 0,34 ml. Ti diskki omogočajo pretok do 8 ml/min brez izgube resolucije vrha in so kemijsko zelo stabilni (Vlakh in Tennikova, 2009).

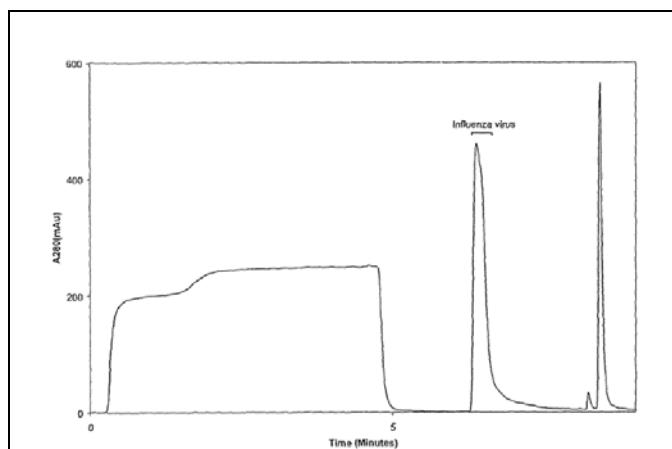
Ionsko izmenjevalno kromatografijo največkrat uporabljam za ločitev nabitih molekul. Metoda temelji na izmenjavi nasprotno nabitih ionov, običajno enostavnih anionov in kationov, kot sta kloridni in natrijevi ioni. Zadrževanje in ločevanje sta odvisna od narave molekul, mobilne faze in tipa ionskega izmenjevalca (Vlakh in Tennikova, 2009).

2.6.1 Čiščenje virusa na kromatografskih nosilcih CIM®QA

Intakten virus influence ima na površini lipidni dvosloj in glikoproteine. Zaradi proteinov so virusni delci nabiti in jih je možno ločiti glede na nabolj. Nabolj pa je odvisen od proteinov oziroma od izoelektrične točke proteinov. Prav zaradi nabolja pa je možno čiščenje oziroma koncentriranje virusov na ionsko izmenjevalnih kolonah, tako anionskih kakor tudi kationskih izmenjevalcih (Peterka in sod., 2008). CIM® monoliti so zelo

primerni za čiščenje virusov, saj imajo velike pore, kar omogoča vezavo tudi večjim delcem od virusov (Vlakh in Tennikova, 2009).

Proces čiščenja virusa na CIM® ionsko izmenjevalnih monolitih (anionske izmenjevalce), je možno uporabljati tako v laboratorijske namene kakor tudi v industriji za čiščenje večjih količin cepiva. Za čiščenje oziroma koncentriranje virusa najpogosteje uporablajo anionsko kolono CIM®QA. Zbranemu virusu so uravnali ionsko jakost, tako da je bil negativno nabit, ter nanesli na kolono. Virus se veže na nosilec, ki je v teh razmerah pozitivno nabit. Uravnoteženje so dosegli s primernimi pufri, HEPES (2-[4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil]-etansulfonronska kislina, pH 7,5. Virusne delce so eluirali z večanjem ionske jakosti. Večji del virusa se eluira z 0,5 M NaCl. Titer virusa so določili s testom hemaglutinacije in testom TCID 50 (tissue culture infective dose 50 %) (Peterka in sod., 2008).



Slika 7: Kromatogram koncentriranja virusa influence z tremi zaporedno vezanimi kolonami CIM®QA-8 (Peterka in sod., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Virus

Sev virusa A/New Caledonia/20/99 H1N1 nam je priskrbela BIA Separations. Za infekcijo celic smo uporabljali virusne pripravke, ki so imeli znan virusni titer. Virusni titer smo določili s hemaglutinacijo.

3.1.2 Celice

Celice VERO smo dobili iz banke mikroorganizmov DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Braunschweig. Iz izvornega vzorca celic smo celice razmnožili in v tretji pasaži pripravili več alikvotov, ki so služili kot delovna celična banka.

3.1.3 Material, potreben za delo s celicami VERO

- Invitrogen
 - OptiPro-SFM (12309-019)
 - Glutamax (35050-061)
 - TrypLE Express (12605-010)
- TPP® (Techno Plastic Products)
 - Posoda za gojenje celičnih kultur (90076)
 - Serološke pipete različnih velikosti
 - Posodice za zmrzovanje (89020)
 -
- Cambrex
 - DPBS (Dulbecco's phosphate buffer saline(17-512F)

- NUNC
 - NunclonTM Δ Cell Factory- CF (140004)

3.1.4 Aparature, potrebne za delo z celicami VERO

- IBS Integra Biosciences
 - Vacusafe – posoda za odstranjevanje gojišča ali pufra iz posode za gojenje celičnih kultur s pomočjo vakuma
- Sanyo
 - CO₂ inkubator, zagotavlja konstantno temperaturo 37°C, primerno vlažnost in 5 % CO₂ v atmosferi

3.1.5 Kemikalije, potrebne za pripravo pufrov

- Merck
 - Etilen dinitriltetraocetna kislina dinatrijev dihidrat-EDTA (1.08421.1000)
 - 2 - [4 - (2 - Hidroksietil) - 1 - piperazinil] - etansulfuronska kislina - HEPES (1.10110.1000)
 - 2-Morfolinoetansufonska kislina monohidrat (MES) (1.06126.0250)
 - Natrijev dihidrogenfosfat-monohidrat (1.06346.0500)
 - Di-natrijev dihidrogenfosfat-dihidrat (1.06580.0500)
 - Natrijev hidroksid (1.06498.1000)
 - Natrijev klorid (1.06404.1000)
- Fluka
 - Ocetna kislina (45731)

3.1.6 Pufri za koncentriranje virusov:

A: 50mM HEPES; 0,1 M NaCl; pH=7,5

B: 50mM HEPES; 0,5 M NaCl; pH=7,5

C: 50mM HEPES; 2 M NaCl; pH=7,5

Čistilni pufer 1 M NaOH

Deionizirana voda.

Pufer za shranjevanje kolon in diskov: 20% etanol.

Vsi pufri so bili sterilno filtrirani skozi 0,22 μ m filter.

3.1.7 Pufri za koloni UNO-Q in SP Sepharosa Fast Flow:

A: 20mM Na-fosfat, 1,0mM EDTA, 0,01% Tween 20, 5% glicerol, pH=5,89

B: 20mM Na-fosfat, 0,03% Tween 20, 5% glicerol, pH=7,02

C: 20mM Na-fosfat, 150mM NaCl, 0,03% Tween 20, 5% glicerol, pH=7,02

3.1.8 Pufri za testiranje diska CIM®QA

Za optimizacijo ločevanja HA smo pripravili naslednje pufre:

- 50 mM HEPES, 1mM EDTA in 50 mM HEPES, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=8,5,
- 50 mM HEPES, 1mM EDTA in 50 mM HEPES, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=7,5,
- 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA in 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=6,5,
- 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA in 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA z 1M NaCl pH=5,5,
- čistilni pufer: 1M NaOH.

3.1.9 Pufri za testiranje diska CIM®SO3.

Za optimizacijo ločevanja HA na CIM®SO3 smo si pripravili naslednje pufre:

- 50 mM HEPES, 1mM EDTA in 50 mM HEPES, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=8,5,
- 50 mM HEPES, 1mM EDTA in 50 mM HEPES, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=7,5,
- 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA in 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=6,5,
- 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA in 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA z 1M NaCl pH=5,5,
- 20mM MES, 1mM EDTA in 20mM MES, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=5,9,

- čistilni pufer: 1M NaOH.

3.1.10 Pufri za testiranje diska CIM®CM.

Za optimizacijo ločevanja HA na CIM®CM smo si pripravili naslednje pufre:

- 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA in 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=5,9,
- 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA in 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA z 1M NaCl pH=5,9,
- 20mM MES, 1mM EDTA in 20mM MES, 1mM EDTA z 1M NaCl, pH=5,9,
- čistilni pufer: 1M NaOH.

3.1.11 Nabor uporabljenih kolon za HPLC:

- BIA Separations (CIM® Laboratory Columns ..., 2008)
 - CIM®QA 8 ml kolona
 - CIM®QA disk
 - CIM®SO3 disk
 - CIM®CM disk
- BioRad
 - UNOsphere Q Support (156-0103)
- GE Helthcare
 - HiTrap SP Sepharose XL (17-5160-01)

3.1.12 Material za izvedbo testa hemaglutinacije:

- mikrotitrski plošče s 96 luknjicami U oblike.
- kokošji eritrociti (Biotehniška fakulteta, oddelek za Zootehniko, Rodica)

- Cambrex
 - DPBS (Dulbecco's phosphate buffer saline(17-512F)

3.1.13 Material za ekstrakcijo hemaglutinina:

- BIORAD
 - Tween 20 (170-6531)
- Calbiochem
 - Zwittergent 3-14 (693017)
 - N –oktil-β- glukopranozid NOGA (494459)

3.1.14 Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (SDS – PAGE):

- Lonza
 - 10X Tris-Glycine- SDS pufer (50880)
 - PAGE® Gels (10-20%) TRIS-glycine 12 well (12001-036)
 - Nalagalni pufer za SDS-PAGE (161-0737)
- Expedeon
 - RunBlue SDS Run Buffer (NXB50500)
 - RunBlue LDS Sample Buffer (NXB31010)
 - RunBlue SDS-PAGE gel (NXG82012)
- Fermentas
 - PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (1811)
- GE Healthcare & Amersham
 - PlusOne protein Silver staining kit (17-1150-01)

3.1.15 Aparature za izvedbo SDS PAGE elektroforeze in prenosa po westernu:

- Expedeon
 - Dual Run and Blot System (NXE00002)
- Biorad
 - Mini-PROTEAN® 3 Cell (165-3301)
 - PowerPac™ Basic Power Supply (164-5050)

3.1.16 Kemikalije za prenos po westernu in točkovni prenos:

- Merck
 - Metanol (1.06011.2500)
 - (hidroksimetil)-aminometan TRIS (1.08382.1000)
 - Bovine Serum Albumin-BSA (126593)
- Lonza
 - 10X TRIS Glicin (50879)
 - 10X PBS (15-517)
- Expedeon
 - PVDF membrana (polivinilfluoridna membrana) (NXA29320)
- Abcam
 - Primarna protitelesa: 1 x HA tag antibody [HA.C5] (ab61854)
 - Sekundarna protitelesa 1 x Mouse IgG secondary antibody - H&L (ab6729)
- Calbiochem
 - 5-Bromo-4-kloro-3-indolfosfat/nitromodri tetrazol BCIP/NBT (203790)

- BIORAD
 - Tween 20 (170-6531)
 - Nitrocelulozna membrana (kat. Št. 162-0145)
- Pomurske mlekarne
 - mleko v prahu

3.1.17 Material za test Mikro BCA:

- Thermo Scientific Pierce
 - 2mg/ml BSA standard (23208)
 - Micro BCA Protein Assay Kit (kat. Št. 23235)
- NUNC
 - Mikrotiterske plošče z ravnim dnom (475094)

3.2 METODE

3.2.1 Celična kultura

3.2.1.1 Odmrzovanje in inkubacija celic VERO

Celice smo shranjevali v zamrzovalnih posodicah, v Dewarjevi posodi s tekočim dušikom, ki ohranja temperaturo pri -196 °C. Celice smo odmrzovali v vodni kopeli (37 °C). Ko je bila vsebina odmrznjena, smo jo prenesli v laminarij. Suspenzijo celic smo odpipetirali s serološko pipeto v posodo za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm², ki je vsebovala 15 ml kompletnega gojišča OptiPro-SFM, ogretega na 37 °C. Celično kulturo smo inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % relativni vlažnosti. Po 24 h inkubacije smo gojišče zamenjal in po 2 dneh rasti smo celice presadili.

3.2.1.2 Presajanje in ponovna inkubacija

Ko so celice dosegle 90 % konfluenco, kar pomeni, da so skorajda popolnoma prerasle dno gojitvene posode, smo pripravili suspenzijo posameznih celic. Konfluentni monosloj celic pomeni približno $1,3 \times 10^5$ živih celic/cm². Iz posode za gojenje celičnih kultur smo odstranili gojišče in celice dvakrat sprali z D-PBS pufom. Celice smo obdelali z encimom TrypleExpress po navodilih proizvajalca. Odlepljenim celicam smo dodali sveže OptiPro-SFM gojišče, ogreto na 37 °C ali na sobno temperaturo. Dobili smo suspenzijo posameznih celic, ki smo jo razdelili v nove gojitvene posode, predhodno napolnjene s svežim gojiščem. Celične kulture smo inkubirali v inkubatorju pri 37 °C, 95 % relativni vlagi in 5 % CO₂.

3.2.1.3 Ugotavljanje živosti celic in njihove koncentracije

Živost (odstotek živih celic) ter koncentracijo celic smo ugotavljali ob vsaki pripravi suspenzije posameznih celic, obvezno pa pred zamrzovanjem in pred preverjanjem infektivnosti virusnih vzorcev na celicah. Za štetje smo uporabili Bürkerjevo števno komoro.

3.2.2 Gojenje virusov

Za gojenje virusov smo uporabili več-pladenjski sistem (CF) proizvajalca Nunc (NunclonTM Δ Cell Factory). Sistem omogoča rast celic na veliki površini in je narejen iz plastike, ki omogoča hitrejše pritrjevanje celic. Za posamezen pladenj, ki ima površino 632 cm² smo potrebovali 200 ml kompletnega gojišča. V pladnje smo najprej nasadili celice VERO. Ko so celice dosegle pred-konfluentno fazo rasti (skoraj popolnoma prerasle vso površino pladnja), smo dodali virusno suspenzijo s približno multipliciteto infekcije (MOI) 0,1. To pomeni, da smo na 10 celic dodali priblžno 1 virus. Najprej smo odstranili izrabljeno gojišče in v polovični volumen kompletnega gojišča dodali ustrezni volumen virusa ter inkubirali v CO₂ inkubatorju 1,5 ure. Po inkubaciji smo dodali še drugo polovico svežega gojišča. V kontrolni posodi za gojenje celičnih kultur smo spremljali citopatski učinek (CPU) z opazovanjem z invertnim mikroskopom. Žetev smo opravili pri 80-100% CPU. Suspenzijo smo centrifugirali 10 min pri 3500 obratih na minuto (RPM) in 4 °C. Supernatant smo prelili v nove centrifugirke in jih shranili pri -80 °C.

3.2.3 Koncentriranje zbranega virusa

Supernatant, ki je vseboval virus influence, smo koncentrirali na CIM[®] QA-8 koloni. Med nanašanjem supernatanta smo zbirali nevezano frakcijo. Po nanašanju smo kolono spirali z začetnim pufrom A; 50mM HEPES in 0,1 M NaCl pH=7,5, to je bil korak spiranja. Virus smo najprej eluirali s pufrom B; 50mM HEPES in 0,5 M NaCl pH=7,5, ter zbrali celotno frakcijo. Ostali, močno vezani virus, pa smo eluirali s pufrom C; 50mM HEPES in 2 M NaCl pH=7,5, ter zbrali celotno frakcijo.

3.2.4 Hemaglutinacija

Pripravili smo 200-kratno redčitev kokošjih eritrocitov v pufru DPBS. Raztopino smo dobro premešali, ter odpipetirali na Neubauerjevo števno komoro. Ko smo prešteli eritrocite v vseh petih diagonalnih kvadratkih smo izračunali povprečno število

eritrocitov na kvadratek, ter po enačbi (1) izračunali, koliko je bilo eritrocitov v začetnem vzorcu.

$$Nc = A * (25) * (10^4) * K \quad \dots (1)$$

Nc= število eritrocitov v mL raztopine

A= povprečno število eritrocitov na kvadrat

K=faktor redčitve (200)

Ker smo pri hemaglutinacijski uporabljali 0,5% raztopino eritrocitov ($4 * 10^7$ celic /ml), smo dobljeno število celic v mililitru raztopine delili s $4 * 10^7$ celic/ml in tako dobili faktor redčitve začetnega volumna eritrocitov.

Pri hemaglutinaciji smo uporabljali mikrotitrsko ploščo z U dnom. Negativna kontrola je bil DPBS, pozitivna kontrola pa je bila raztopina z znanim virusnim titrom. Hemaglutinacijo smo naredili kot niz dvakratnih redčitev, iz prve vrstice smo prenesli 50 μ l vzorca v drugo vrstico tam trikrat premešali in prenesli v naslednjo vrstico. Postopek smo ponavljali do zadnje vrstice na plošči, zadnjih 50 μ l zavrgli kot biološki odpadek. V vsako luknjico smo dodali 50 μ l 0,5 % raztopino eritrocitov. Mikrotitrsko plošče smo inkubirali na sobni temperaturi eno uro. Pozitiven rezultat predstavlja mrežasta struktura zlepljenih eritrocitov, negativen rezultat predstavlja skupek posedlih eritrocitov na dnu jamice.

3.2.5 Ekstrakcija hemaglutinina

Preizkusili smo več detergentov Zwittergent 3-14, NOGA, Tween 20. V virusni koncentrat smo dodali do končne koncentracije 1 % Zwittergent 3-14. Detergent NOGA smo dodali do koncentracije 5 %. Detergent Tween 20 smo dodali virusnem koncentratu do končne koncentracije 2 %. Dobro premešali ter pustili na sobni temperaturi za 30 minut. Ekstrakcijo HA smo testirali z prenosom po westernu. Detergent, ki je dal najboljše rezultate smo uporabili za nadaljnjo dezintegracijo virusa.

3.2.6 Izračunavanje izoelektrične točke in molekulske mase hemaglutinina

Molekulsko maso in izoelektrično točko smo izračunali s programom Palabra(Nihil Novus...2009), kamor smo vnesli aminokislinsko zaporedje HA virusa influence H1N1 A/New Caledona/20/99.

Aminokislinsko zaporedje je objavljeno na spletni strani NCBI (NCBI..., 2005)

3.2.7 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Uporabili smo Knauer HPLC sistem, ki je sestavljen iz naslednjih delov: dve črpalki K-1000, analitski glavi (10 ml), preparativni glavi (50 ml), dinamična mešalna komora, injektor, injekcijske zanke, spektrofotometrični detektor (K-2501), s spremenljivo valovno dolžino, računalniški vmesnik (vse Knauer) in detektor prevodnosti (Amersham Biosciences). Dele HPLC sistema smo povezali s kapilarimi premera 0,75 mm. Za vodenje sistema smo uporabljali program Eurochrom 2000 za Windows. Uporabljali smo tudi Biorad Biologic Converter and WorkStation sistem, z vezanim Variable wavelenght monitor (Knauer) in programsko opremo Biologic (BIORAD) ter Äkta Purifier sistem (GE (Pharmacia)), ki smo ga nadzorovali preko programa Unicorn (GE (Pharmacia)).

Spreminjali smo gradiента pufrov A in B in pretok. Uporabljali smo linearni gradient ter stopenjski gradient, da smo dosegli pravilno mešanje dveh pufrov in primerno sestavo mobilne faze. Frakcije smo pobirali glede na absorbanco frakcije. Po končanem nanosu in eluciji smo sistem in monolitni nosilec spirali s čistilnim pufom od 2 uri pri pretoku 1ml/min. Po dvournem spiranju monolitnega nosilca s čistilnim pufom smo sprali še z deionizirano vodo, da je prevodnost padla pod 100 μ S/cm in v pH nevtralno območje. Postopek spiranj smo zaključili s spiranjem z 20 % etanolom in monolitni nosilec smo v tem mediju tudi shranili do nadaljnje uporabe.

3.2.8 Elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom (SDS – PAGE)

Uporabljali smo pripravljene gele, ki smo jih kupili od proizvajalca Lonza ali Expedeon. Za gele proizvajalca Lonza smo uporabljali 1X Tris Glicin SDS pufer. Za gele proizvajalca Expedeon, pa smo uporabili 1X Run Buffer. Uporabljali smo gradientne gele in sicer od 10-20 % zamreženosti z akrilamidom. Na gele smo nanašali 2 µl proteinskih standardov. Vzorce za SDS-PAGE smo pripravili tako, da smo 15µl vzorcev zmešali z 5 µl nanašalnega pufra.

Elektroforeza z geli proizvajalca Lonza je potekala pri 200V in sicer 55 minut. Na gelih Expedeon pa je elektroforeza potekla pri 180V in sicer 50 minut.

Gele smo barvali s srebrovim nitratom po navodilih proizvajalca (GE Healthcare): Protein silver staining kit; 17-1150-01 (Silver staining kit protein..., 2009). Gele smo fotodokumentirali z digitalnim fotoaparatom Canon Powershot P90 in jih obdelali z računalniškim programom Microsoft Office Picture Manager.

3.2.9 Metoda prenosa proteinov na membrano po westernu

Pripravili smo prenosni pufer iz 80 ml 10 x TRIS–Glicin, 200 ml metanola in vode do 1L. Membrano PVDF (polivinilfluoridna membrana) smo pred prenosom namočili v 80 % metanolu za 10 minut, nato v vodi za 10 minut ter v prenosnem pufru za 10 minut. Ko je bila SDS PAGE elektroforeza končana, smo odstranili plastični ovoj gela ter gel namočili za 10 minut v prenosnem pufru. Po vrstnem redu smo zložili gel, membrano, filter papir in vlaknasto blazinico na kaseto.

Prenosni pufer smo dolili do vrha posode, postavili banjico z ledom v posodo ter pokrili s pokrovom, ki je bil priključen na električni usmernik. Prenos na membrano je potekal 90 minut pri 85V.

Po končanem prenosu smo membrano za 1 uro namočili v 30ml 1 x PBS, 3g posnetega mleka in 0,6 ml Tween 20. Po blokiranju prostih mest, smo membrani dodali 3 μ l primarnih protiteles proti HA ter inkubirali pri 4°C čez noč. Naslednji dan smo membrano spirali 3-krat po pet minut z 1 x PBS in 0,05 % Tween 20. Po spiranju smo dodali 30 μ l sekundarnih protiteles z vezano alkalno fosfatazo, v raztopino 30ml 1 x PBS, 3 g posnetega mleka in 0,6 ml Tween 20, pustili 2 uri na sobni temperaturi. Po dveh urah smo 3-krat po pet minut spirali z 1 x TBS in 0,05 % Tween 20. Po spiranju smo dodali okoli 15 ml BCIP/NBT, ter ga pustili toliko časa dokler se ne pojavijo lise, kjer je HA. (Western blotting- a beginner's guide..., 1998)

3.2.10 Točkovni prenos HA na nitocelulozno membrano

Na nitocelulozno membrano smo narisali mrežo, kvadratke mreže ter oštevilčili. V oštevilčene kvadratke smo nakapljali po 5 μ l vzorca, počakali da se posušijo, in nato dali membrano v raztopino 0,1%BSA 1 x TBS/T (20 mM TRIS in 150 mM M NaCl pH=7,5 z 0,05% Tween-om 20). Membrano smo inkubirali 1 uro, po eni uri smo dodali primarna protitelesa proti HA, ter spet 1 uro inkubirali pri sobni temperaturi. Po eni uri inkubacije smo membrano sprali 3-krat po 5 minut v 1 x TBS/T. Membrano smo ponovno dali v raztopino 0,1%BSA 1 x TBS/T ter dodali sekundarna protitelesa z vezano alkalno fosfatazo. Membrano smo inkubirali na sobni temperaturi 30 minut. Po 30 minutah smo membrano spirali 3-krat po 5 minut s TBS/T in 5 minut s TBS. Po spiranju smo dodali približno 15 ml BCIP/NBT ter počakali, da so se razvile lise na mestih, kjer je bil HA.

3.2.11 Test za kvantifikacijo proteinov-Mikro BCA

Pripravili smo umeritveno vrsto iz 2mg/ml BSA standarda (23208), in sicer 1000, 500, 200, 100, 50, 10, 5, 2, 1 μ g/ml. Umeritveno krivuljo smo pripravili v pufru, v katerem je bil vzorec. Ko smo imeli pripravljene vse redčitve standardnih proteinov in vzorcev, smo jih odpipetirali po 150 μ l v luknjice na mikrotitrski plošči. Pripravili smo tudi delovno raztopino in sicer po postopku proizvajalca Micro BCA Thermo Scientific Pierce (23235) in sicer v razmerju 25:24:1= reagent MA : reagent MB : reagent MC. Pripravljeno raztopino smo dodali v luknjice z vzorcem in sicer 150 μ l. Vzorce smo nato inkubirali 2

uri na 37°C in izmerili absorbanco pri 562 nm. Iz umeritvene vrste smo izračunali naklon krivulje in izračunali koncentracije proteinov. Iz odčitane koncentracije in izmerjenega volumna smo izračunali skupno maso proteinov v posamezni frakciji. S primerjavo mase virusnega lizata in frakcij smo izračunali masno bilanco (v odstotkih) v posamezni frakciji.

4 REZULTATI

4.1 GOJENJE VIRUSA INFLUENCE

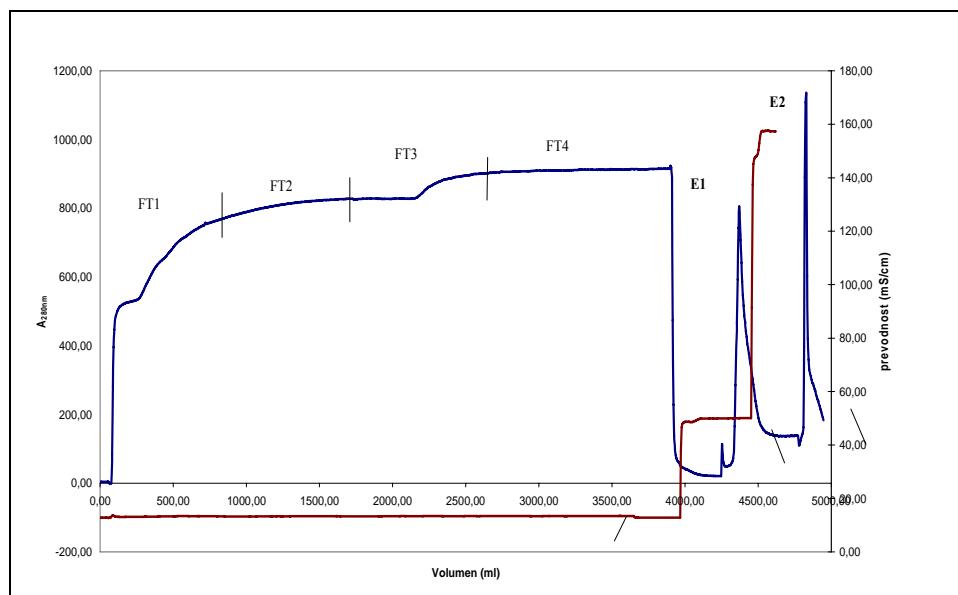
Celice VERO smo inficirali z virusom influence H1N1 A/New Caledonia/20/99 z multipliciteto infekcije 0,1. Virus smo želi 48 ur po infekciji oziroma pri 80 % CPU. Titer smo preverjali s testom hemaglutinacije. Titer virusa ob žetvah je bil od 2 do 32. Titre virusa ob posameznih žetvah prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Hemaglutinacijske vrednosti posameznih virusnih žetev

Žetev št.	Pasaža celic	Volumen (ml)	Titer
1	12	400	32
2	4	360	16
3	7	210	4
4	8	120	32
5	8	210	2
6	12	240	32
7	9	400	16
8	10	400	4

4.2 KONCENTRIRANJE VIRUSA

Žetev, ki je vsebovala virus, smo redčili s pufom A; 50mM HEPES in 0,1M NaCl, pH=7,5 v razmerju 1:1 in prečrpavali skozi CIM QA-8 kolono (slika 8). Virus smo eluirali z dvigom prevodnosti pufra. Zbirali smo vse frakcije in jih testirali s testom hemaglutinacije. Dobili smo tipično prebojno krivuljo (Slika 8), v kateri smo po pričakovanju zaznali zelo malo virusa (Preglednica 2). V obeh elucijskih vrhih smo zaznali virus, v prvem E1 je bil titer 16, v regeneracijskem vrhu pa 64 (Preglednica 2).



Slika 8: Kromatogram koncentriranja virusa H1N1 na CIM®QA-8 koloni.

Virusno žetev smo prečrpavali skozi kolono CIM®QA-8ml. Viruse smo eluirali s pufrom B, 50mM HEPES, 0,5M NaCl; pH=7,5. Regeneracija kolone je potekala v pufru C, 50mM HEPES in 2 M NaCl, pH=7,5. FT1, FT2, FT3, FT4: nevezane frakcije, E1: frakcija izprana z pufrom B, E2 je frakcija v regeneracijskem pufru

Preglednica 2: Rezultati testa hemaglutinacije virusnih frakcij koncentriranja virusa

Frakcija	Volumen (ml)	Titer
L	4000	4
FT1	1000	0
FT2	1000	0
FT3	1000	2
FT4	900	4
W	350	0
E1	175	16
E2	75	64
Pozitivna kontrola	/	16
Negativna kontrola	/	0

4.3 TESTIRANJE RAZLIČNIH DETERGENTOV ZA RAZBITJE VIRUSA INFLUENCE

Za dezintegracijo virusnih proteinov smo testirali različne detergente in sicer Zwittergent 3-14, n-oktil-β-D-glukopiranozid (NOGA), Tween 20. Lizatni pufer smo pri detergentu Zwittergent 3-14 pripravili po metodi, ki so jo opisali Kaptyn in sodelavci (2006). Detergent NOGA smo dodali virusnemu koncentratu do končne koncentracije 5 %.

Tween 20 pa smo dodali do končne koncentracije 2 %. Uspešnost posameznih metod smo preverjali s SDS PAGE in prenosom po westernu. Ugotovili smo, da pri tretiranju virusa z detergentom Zwittergent ne zaznamo HA, zato smo se odločili za uporabo Tween 20.

4.4 IZRAČUNAVANJE IZOELEKTRIČNE TOČKE IN MOLEKULSKE MASE HEMAGLUTININA

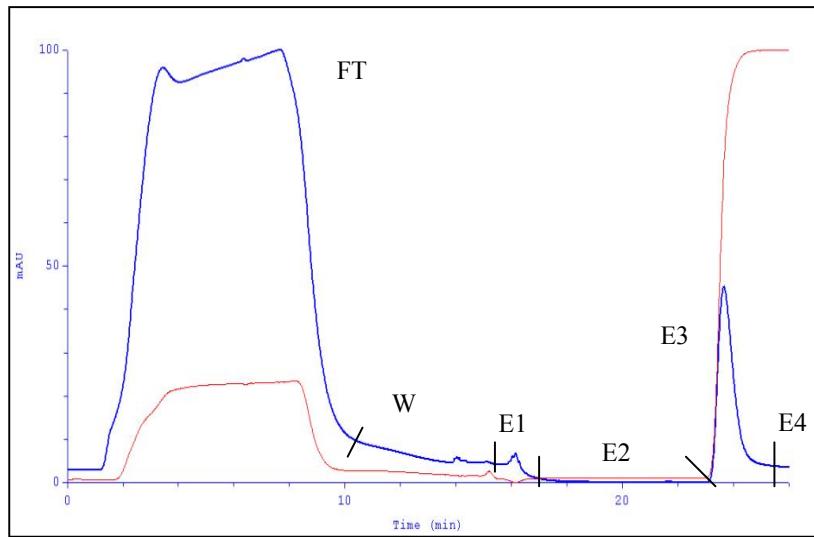
Aminokislinsko zaporedje HA virusa influence A/New Caledonia/20/99 smo poiskali na strani NCBI (NCBI..., 1995) Izoelektrično točko smo izračunali s programom Palabram. Ugotovili smo, da je izoelektrična točka monomera HA pri pH=6,431, molska masa je 63,15 kDa .

MKAKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVTDTVLEKNVTVTHSVNLLEDSHNGKLCLLGIA
PLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETPNPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEI
FPKESSWPNTVTGVSASCSSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYVNNKEKEVLVLWGVHH
PPNIGNQRALYHTENAYVSVVSSHYSSRRTPEIAKRKVRDQEGRINYYWTLEPGDTIIFEANGNL
IAPWYAFALSRGFGSGIITSNAPMDECDAKCQTPQGAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRSAKLRM
VTGLRNIPSIQSRLGLFGAIAGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGSGYAADQKSTQNAINGITNKV
NSVIEKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVK
NLYEKVKSQLKNNAKEIGNGCFFYHKCNNECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLEM
GVYQILAIYSTVASSLVLLVSLGAISFWMCNSGSLQCRICI

Slika 9: Aminokislinsko zaporedje HA virusa A/New Caledonia/20/99(NCBI..., 1995)

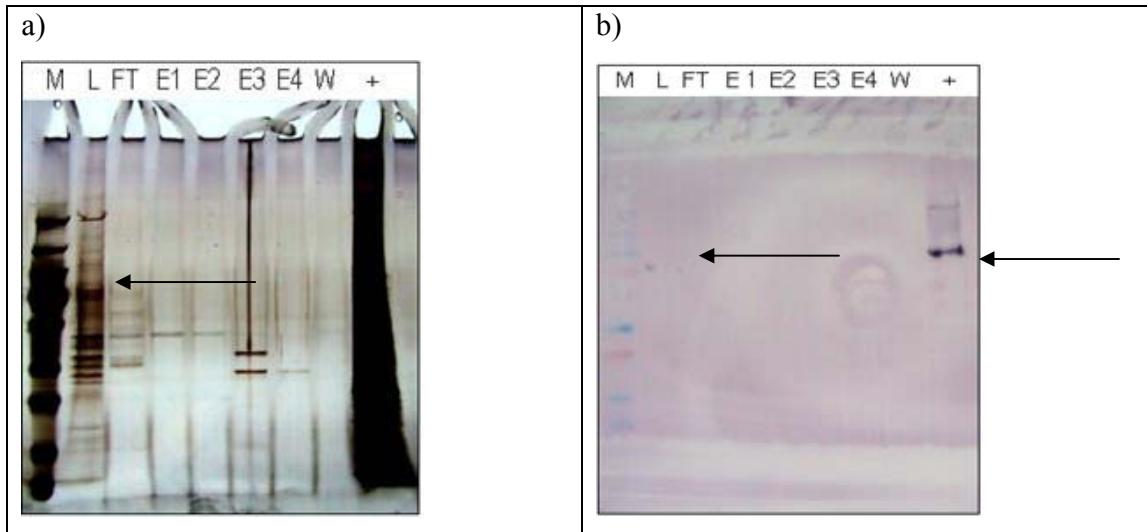
4.5 TESTIRANJE KOLON UNO-Q in SP SEPHAROSA FAST FLOW

Za čiščenje HA smo povzeli metodo po Wang-u in sodelavcih (2005). Na zaporedno vezani koloni UNO-Q in SP Sepharose Fast Flow smo nanesli 10 ml virusnega lizata. Zbrali smo vse frakcije in jih analizirali s SDS-PAGE elektroforezo in prenosom po westernu. S kolonama UNO Q in SP-Sepharose Fast Flow nam ni uspelo osamiti HA, kar je vidno iz prenosa po westernu (Slika 11b). Prisotnost HA smo dokazali le pri virusnem lizatu in pozitivni kontroli.



Slika 10: Kromatogram čiščenje HA na zaporedno vezanih kolonah UNO-Q in SP- Sepharosa Fast Flow.

Po nalaganju virusnega lizata smo odklopili kolono UNO-Q. Kolono SP –Sephadose FastFlow smo spirali prvo s pufrom B in nato C. Pufer A: 20 mM Na-fosfat, 1mM EDTA 0,01% Tween 20. Pufer B: 20mM Na-Fosfat, 0,03% Tween 20, 5 % glicerol pufrom C: 20mM Na-fosfat, 0,15 M NaCl, 0,03% Tween 20, 5% glicerol. FT, nevezana frakcija, W, spiranje kolon s pufrom A, E1, elucijski vrh spiranje iz kolone E2, spiranje z pufrom B, E3 elucijski vrh, spiranje z pufrom C, E4 spiranje s pufrom C.



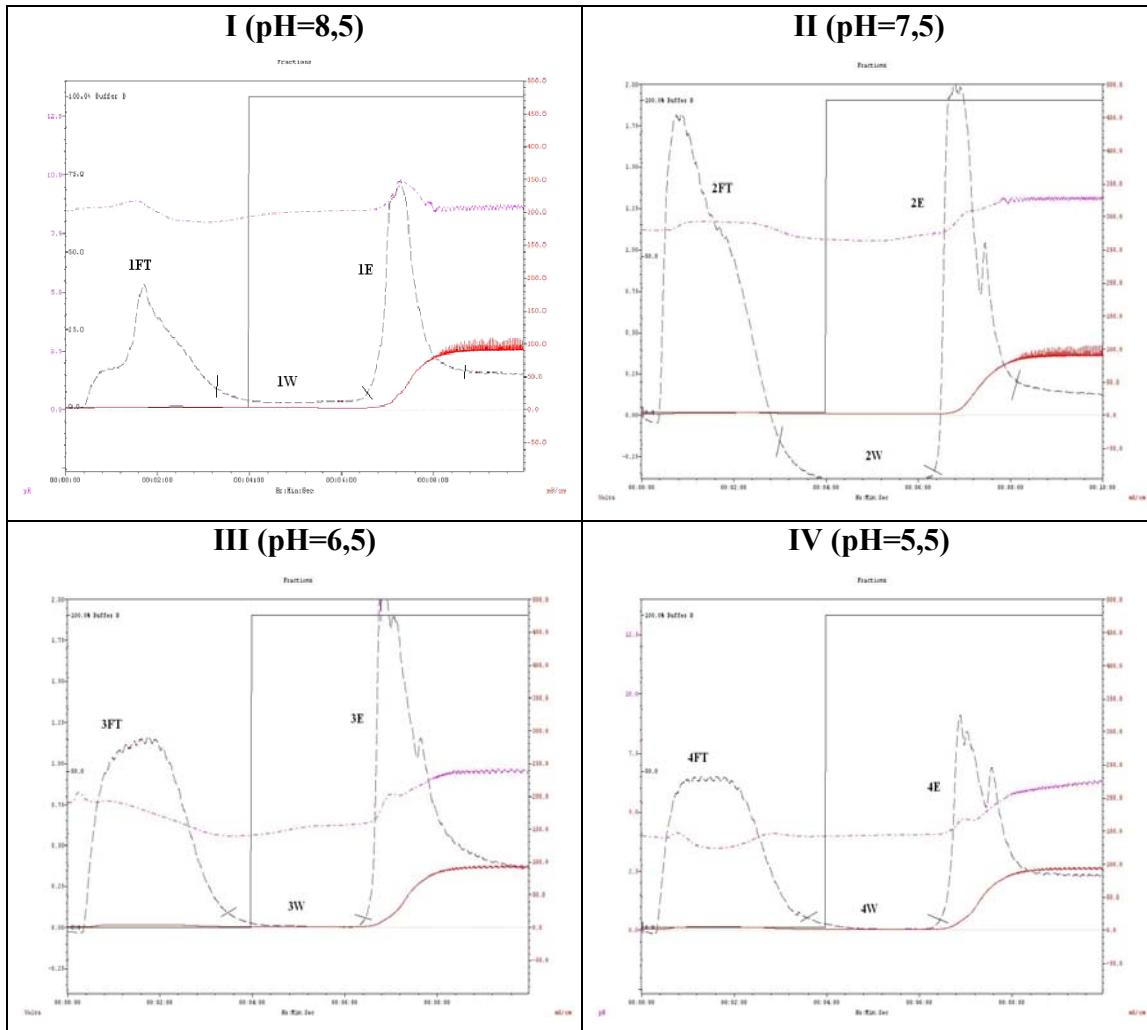
Slika 11:Dokazovanje HA v frakcijah po čiščenju na kolonah UNO Q in SP-Sepharose Fast Flow.

Legenda: FT, nevezana frakcija, W, spiranje kolon s pufrom B, E2, spiranje z pufrom B, E3 elucijski vrh, spiranje z pufrom C, E4 spiranje s pufrom C a) SDS PAGE elektroforeza; naložene elucije iz slike 9 ter + pozitivna kontrola. b) prenos po westernu, pozitiven rezultat L in pozitivna kontrola

4.6 OPTIMIZACIJA LOČEVANJA HA NA MONOLITNEM NOSILCU CIM[®] QA

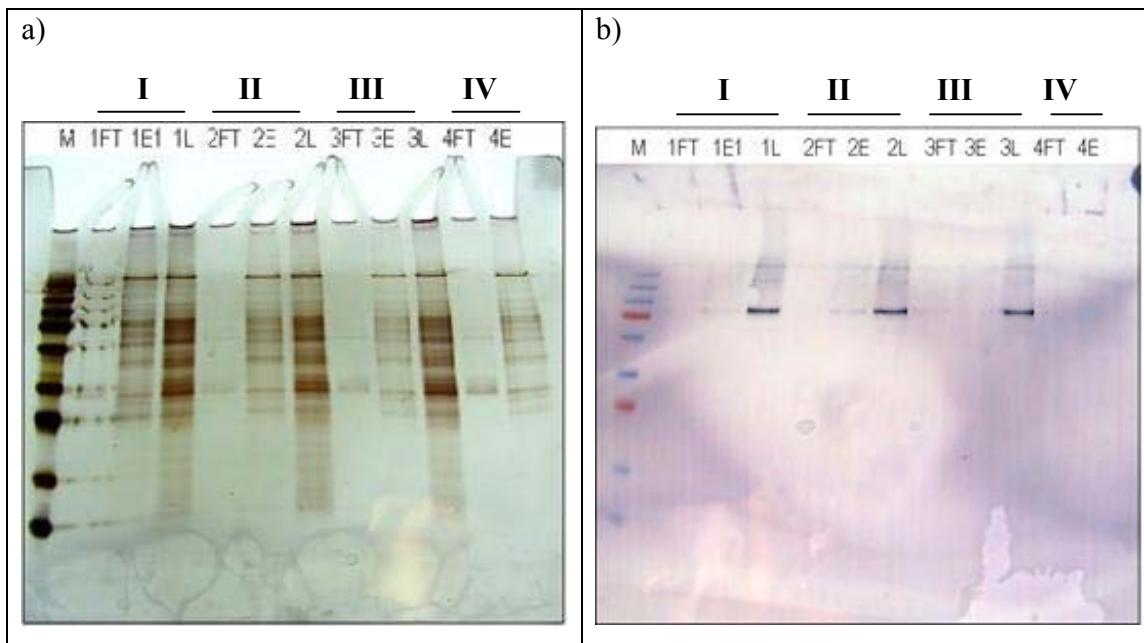
4.6.1. Optimizacija vezave HA pri različnih puferskih območjih na CIM[®] QA

Ugotoviti smo želeli, pri katerih pogojih se HA veže na CIM[®] QA. Testirali smo različne puferske sisteme. Na disk CIM[®] smo nanesli 4ml virusnega lizata. Proteine smo spirali z 1 M NaCl. Zbirali smo vse frakcije in testirali s SDS-PAGE elektroforezo in s prenosom po westernu vse nevezane frakcije in elucijske vrhove. Ugotovili smo, da se je pri pH vrednostih 8,5 in 7,5 HA vezal na disk CIM[®] QA (Slika, 13, I in II, Preglednica 3). Pri pH=6,5 in 5,5 (Slika 13, III, IV, Preglednica3) se HA ni vezal na disk CIM[®] QA, (slika 13b, III, IV)), in je bil v celoti prisoten v nevezani frakciji .



Slika 12: Elucijski kromatogrami vezave HA na disku CIM®QA z različnimi puferskimi sistemi.

I) vezava HA pri pH=8,5 Legenda: 1FT, nevezana frakcija, 1W, spiranje z pufrom A, 1E elucijski vrh, spiranje z pufrom B, Pufer A: 50mM HEPES, 1mM EDTA pH=8,5, Pufer B: 50mM HEPES, 1mM EDTA in 1M NaCl pH=8,5. **II) vezava HA pri pH=7,5.** Legenda: 2FT, nevezana frakcija, 2W, spiranje z pufrom A, 2E elucijski vrh. Pufer A: 50mM HEPES, 1mM EDTA pH=7,5. Pufer B: 50mM HEPES, 1mM EDTA in 1M NaCl pH=7,5, **III) vezava HA pri pH=6,5.** Legenda: 3FT, nevezana frakcija, 3W, spiranje z pufrom A, 3E elucijski vrh. Pufer A: 20mM fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=6,5. Pufer B: 20mM fosfatni pufer, 1mM EDTA in 1M NaCl, pH=6,5. **IV) vezava HA pri pH=5,5.** Legenda: 4FT, nevezana frakcija, 4W, spiranje z pufrom A, 4E elucijski vrh. Pufer A: 20mM fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=5,5. Pufer B: 20mM fosfatni pufer, 1mM EDTA in 1M NaCl pH=5,5.



Slika 13: Dokazovanje HA v frakcijah optimizacije vezave HA na CIM®QA.

a) SDS PAGE elektroforeza vzorcev M: proteinski standardi, nevezane frakcije, elucijske frakcije in virusni lizati naloženi iz kromatogramov slike 12 (I, II, III, IV) b) prenos po westernu, pozitivno v frakcijah: 1E, 1L, 2E, 2L, 3FT, 3L,

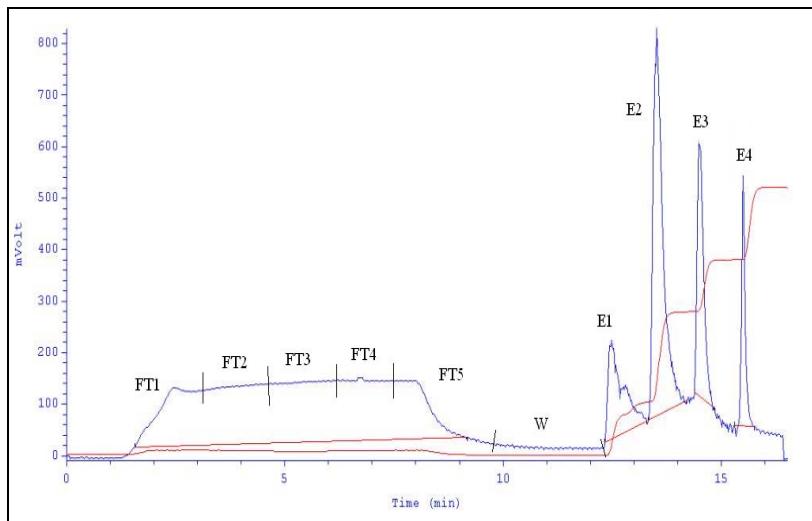
Preglednica 3: Rezultati optimizacije vezave HA na CIM®QA pri različnih pogojih elucije na CIM®QA

Pogoji vezave	Vezava na CIM®QA	Elucija iz CIM®QA
50mM HEPES, 1mM EDTA, pH=8,5 (slika13, linije I)	+	+
50mM HEPES, 1mM EDTA, pH=7,5 (slika 13, linije II)	+	+
20mM Fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=6,5 (slika 13, linije III)	-	-
20mM Fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=5,5 (slika 13, linije IV)	-	-

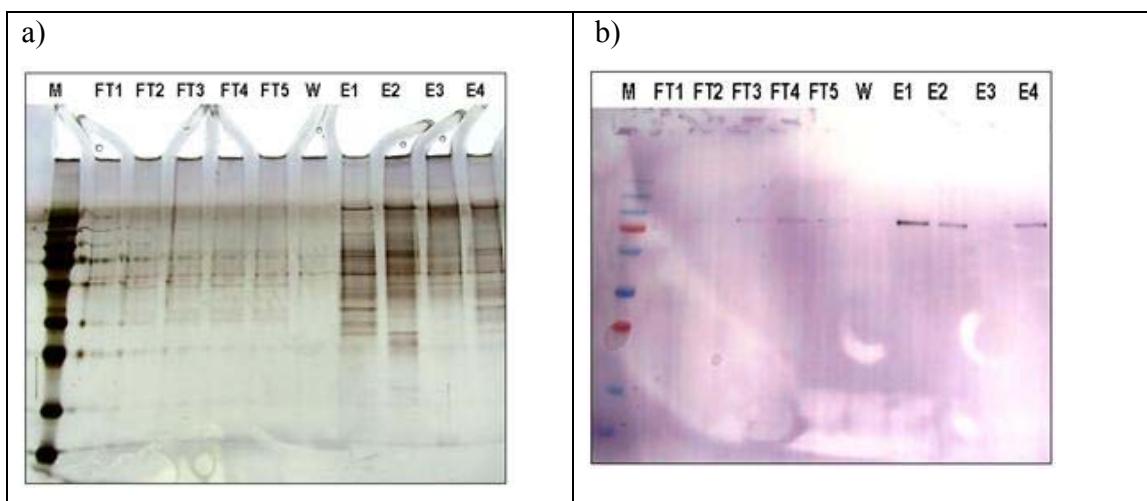
4.6.2. Testiranje dinamične kapacitete vezave HA na disku CIM®QA

Na CIM®QA disk smo nalagali virusni lizat pri pretoku 3 ml/min. Nevezane frakcije smo zbirali po volumnu prečrpanega virusnega lizata, in sicer do frakcije FT4 po 1 mililiter, frakcija FT5 pa je vsebovala 2,5 ml prečrpanih proteinov (Slika 14). Vse frakcije smo analizirali s SDS-PAGE in s prenosom po westernu (Slika 14). Pri določanju kapacitete vezave HA nismo opazili tipične prebojne krivulje (slika14). Rezultati kažejo (Slika

15b), da se začne HA izpirati v tretji nevezani frakciji. Do tretje nevezane frakcije smo prečrpali 22,4 mg skupnih proteinov. HA smo zaznali tudi v elucijskih vrhovih E1, E2, E4, kar pomeni da se je del HA vezal na disk CIM®QA.



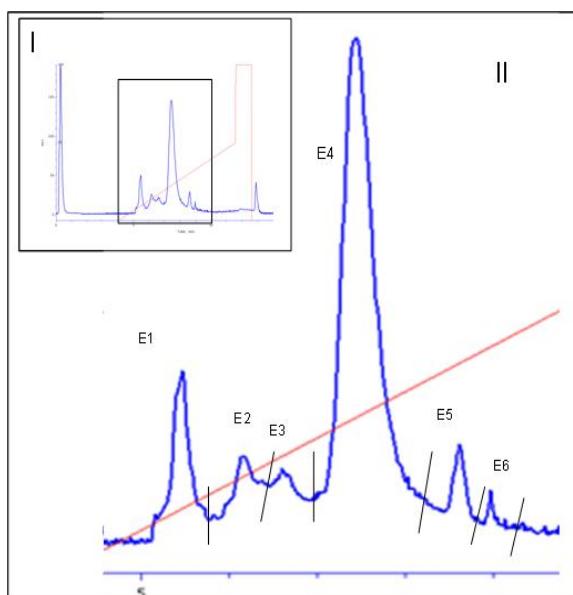
Slika 14: Kromatogram testiranja dinamične kapacitete vezave HA na CIM®QA disk.
Pufer A: 50mM HEPES, 1mM EDTA pH=8, 50mM HEPES, 1mM EDTA, 1M NaCl pH=8. Vezane proteine smo sprali po korakih in sicer z 0,2; 0,5; 0,7; 1M NaCl.



Slika 15: Dokazovanje HA v frakcijah pri testiranju dinamične kapacitete vezave na CIM®QA.
a) SDS PAGE elektroforeza vseh zbranih frakcij slika 29. b) Prenos po westernu, pozitivne frakcije FT2, FT3, FT4, FT5, E1, E2, E3, E4

4.6.3. Ločevanje HA na disku CIM®QA

Nanesli smo 2ml virusnega lizata. Vezane proteine smo iz diska CIM QA sprali z linearnim gradientom NaCl (Slika 18). Frakcije smo zbirali glede na absorbanco. Elucijske vrhove smo analizirali s točkovnim prenosom in detekcijo s protitelesi specifičnimi za HA. Ugotovili smo, da se začne HA izpirati iz diska CIM®QA že v prvi frakciji (Preglednica 4). HA se spira do koncentracije 0,5 M NaCl (preglednica 4, elucijski vrhovi E1 do E4).



Slika 16: Kromatogram ločevanja HA na disku CIM®QA v linearinem gradientu NaCl.
I) celoten kromatogram. II) izsek linearnega območja. Nanos 2 ml virusnega lizata na 8ml kolono CIM®QA, eluiranje proteinov v linearinem gradientu pufrov in B. Pufer A: 50mM HEPES, 1mM EDTA, pH=8, B: 50mM HEPES, 1mM EDTA z 2M NaCl, pH=8.

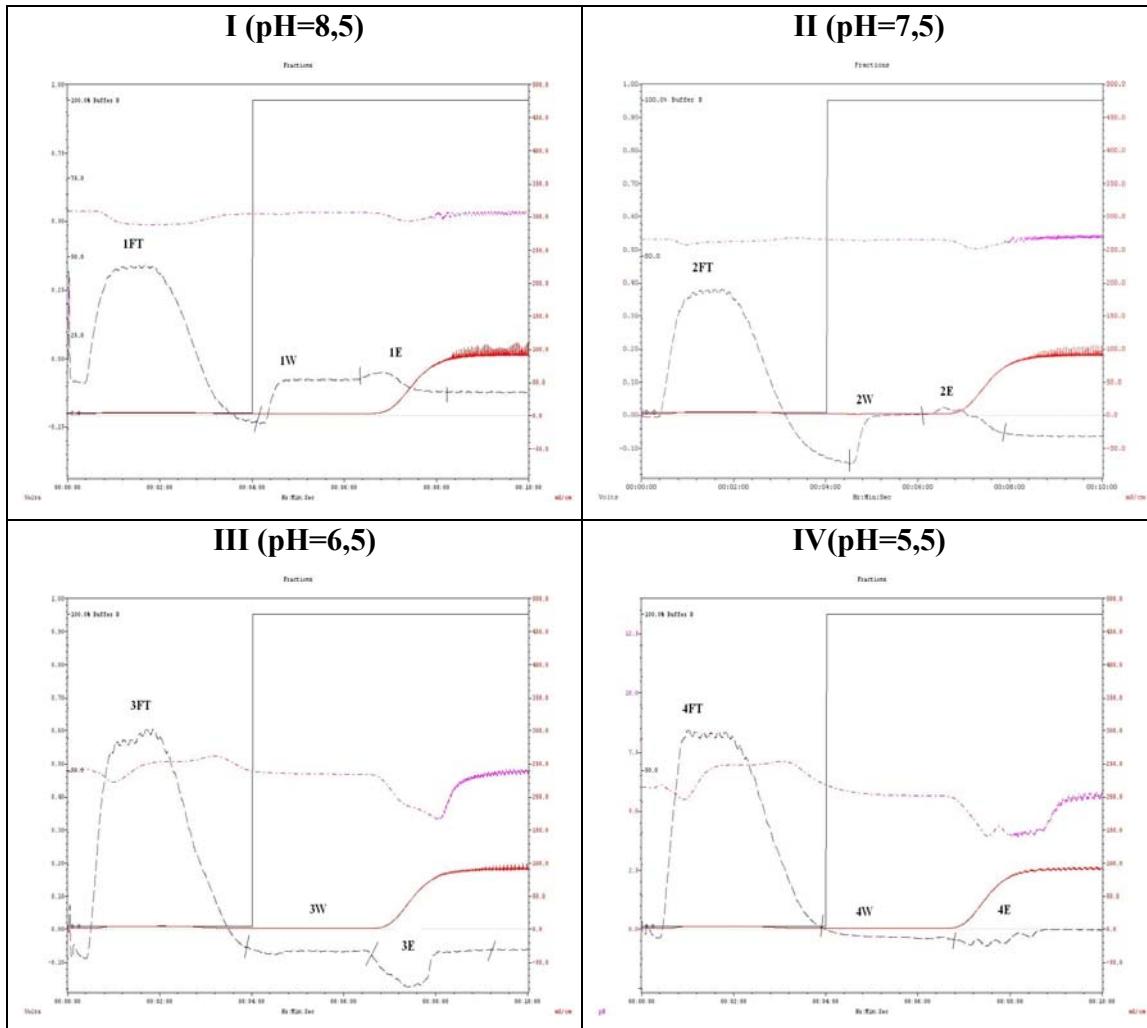
Preglednica 4: Detekcija HA z točkovnim prenosom v frakcijah ločevanja HA na disku CIM®QA v linearinem gradientu soli.

Legenda: +: detekcija HA s protitelesi, -: negativni rezultat

Frakcija	Rezultat
L	-
FT	-
E1	+
E2	+
E3	+
E4	+
E5	-
E6	-

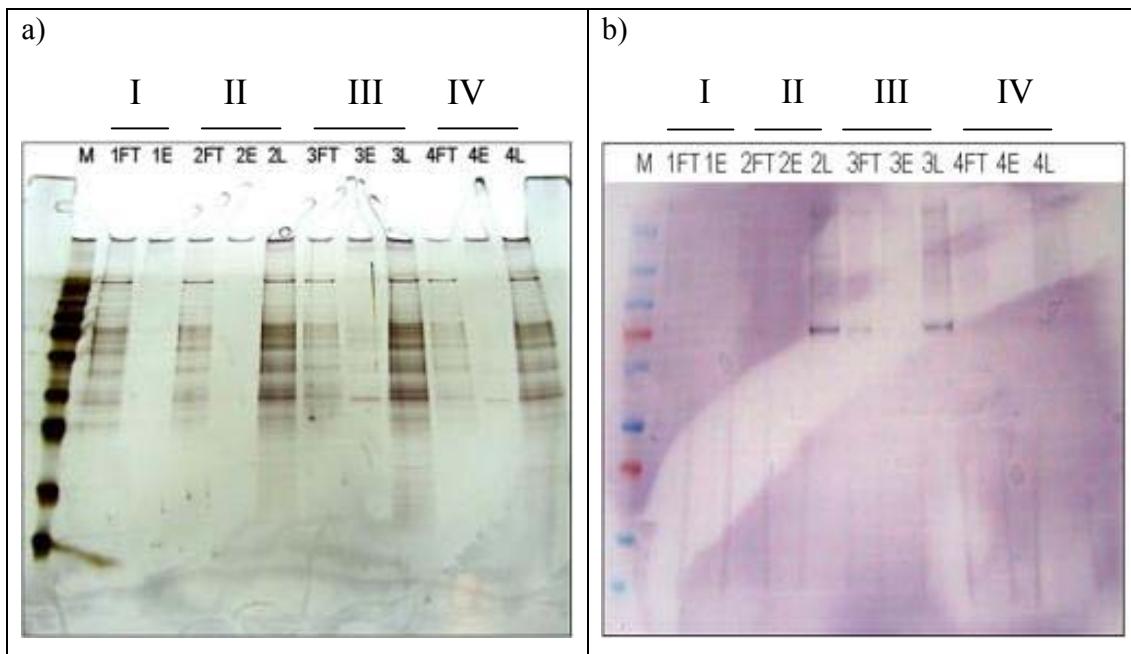
4.7 OPTIMIZACIJA VEZAVE HA NA DISKU CIM[®]SO₃ V RAZLIČNIH PUFERSKIH SISTEMIH

Pri optimizaciji vezave HA na CIM[®]SO₃ monolita smo uporabili različne puferske sisteme. Na CIM disk smo nanesli 4ml virusnega lizata. Proteine smo spirali z 1 M NaCl. Zbirali smo vse frakcije in jih testirali s SDS PAGE elektroforezo in s prenosom po westernu. Ugotoviti smo želeli, pri katerem pH in pri katerih puferskih sistemih se HA veže na CIM[®]SO₃. Ugotovili smo, da se HA veže in eluira iz diska CIM[®]SO₃ samo pri pufru MES, pH=5,9 (Slika 19, V in 20, linija V). Pri vseh drugih puferskih sistemih smo HA zaznali bodisi v nevezani frakciji ali pa ga sploh nismo zaznali (Sliki 18 in 20, linije I, II, III, IV.).

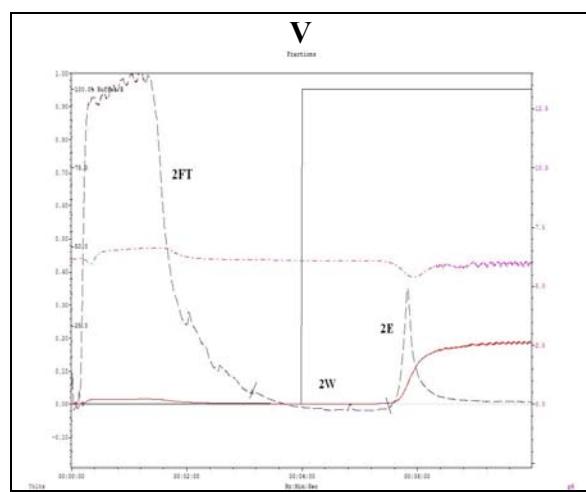


Slika 17: Kromatogrami vezave HA na CIM[®]SO₃ v različnih puferskih sistemih.

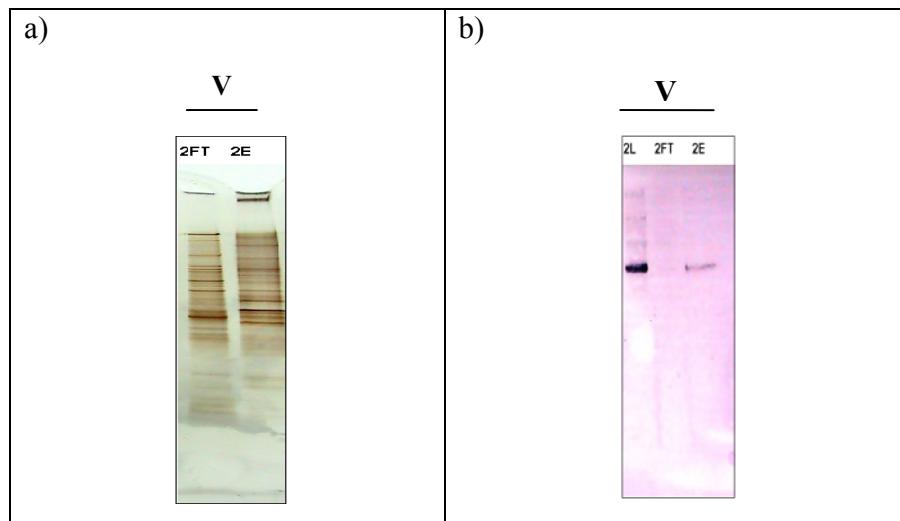
I) vezava HA pri pH=8,5 Legenda: 1FT, nevezana frakcija, 1W, spiranje z pufom A, 1E elucijski vrh, spiranje z pufom B, A: 50mM HEPES, 1mM EDTA pH=8,5, B: 50mM HEPES, 1mM EDTA in 1M NaCl pH=8,5. **II) vezava HA pri pH=7,5.** Legenda: 2FT, nevezana frakcija, 2W, spiranje z pufom A, 2E elucijski vrh.: A: 50mM HEPES, 1mM EDTA pH=7,5, B: 50mM HEPES, 1mM EDTA in 1M NaCl pH=7,5, **III) vezava HA pri pH=6,5.** Legenda: 3FT, nevezana frakcija, 3W, spiranje z pufom A, 3E elucijski vrh. A:20mM fosfatni puf, 1mM EDTA pH=6,5, B: 20mM fosfatni puf, 1mM EDTA in 1M NaCl. **IV) vezava HA pri pH=5,5.** Legenda: 4FT, nevezana frakcija, 4W, spiranje z pufom A, 4E elucijski vrh. A:20mM fosfatni puf, 1mM EDTA pH=5,5, B: 20mM fosfatni puf, 1mM EDTA in 1M NaCl pH=5,5.



Slika 18:Dokazovanje HA v frakcijah pri testiranju puferskih sistemov na CIM[®]SO₃.
a) SDS PAGE elektroforeza vzorcev: M: proteinski standardi, naložene frakcije testiranja različnih puferskih sistemov slika 17 I, II, III, IV b)prenos po westernu, pozitivno v frakcijah 2FT, 2L, 3FT, 3L, 4L



Slika 19: Kromatogram vezave HA na CIM[®]SO₃ v MES puferskem sistemu V) MES puferski sistem.
Legenda: 2FT: nevezana frakcija, 2W: spiranje s puffrom A: 20mM MES, 1mM EDTA pH=5,9, Pufer B: 20mM MES, 1mM EDTA in 1M NaCl, pH=5,9.



Slika 20: Dokazovanje HA v frakcijah pri ločevanju na CIM®SO₃ disku v MES puferskih sistemih.
a) SDS PAGE elektroforeza vzorcev: naložene frakcije testiranja MES pufera slike 19 b) prenos po westernu, pozitivno v elucijah 2L, 2E.

Preglednica 5: Rezultati vezave HA na CIM®SO₃ pri različnih pogojih elucije.

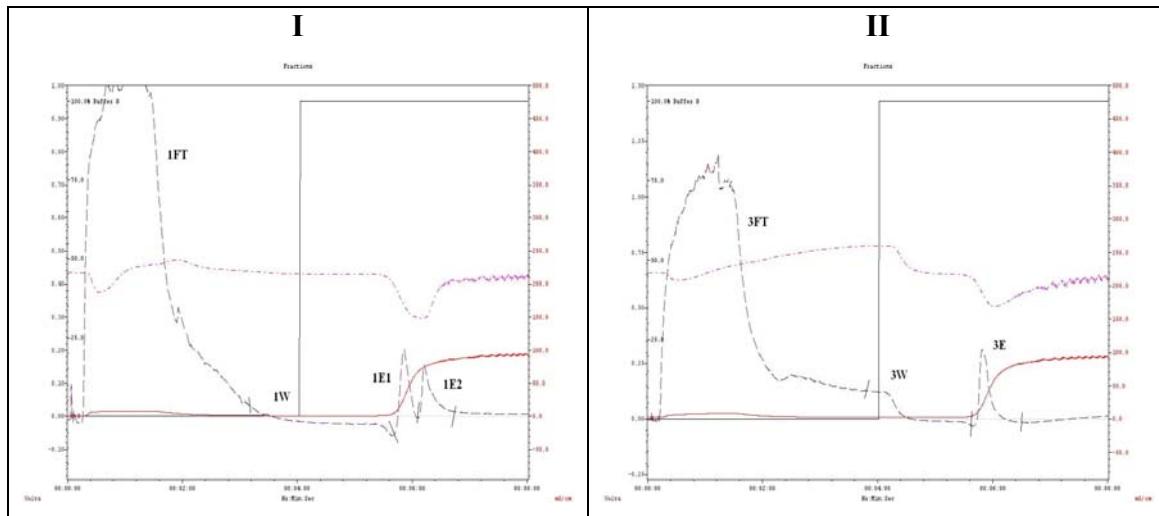
Pogoji vezave	Vezava na CIM®SO ₃	Elucija iz CIM®SO ₃
50mM HEPES, 1mM EDTA, pH=8,5 (slika18, linje I)	-	-
50mM HEPES, 1mM EDTA, pH=7,5 (slika18, linije II)	-	-
20mM Fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=6,5 (slika18, linije III)	-	-
20mM Fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=5,5 (slika18, linije IV)	-	-
20mM MES, 1mM EDTA, pH=5,9 (slika 20, Linije V)	+	+

4.8 OPTIMIZACIJA LOČEVANJA HA DISKU CIM®CM

4.8.1 Optimizacija vezave HA na CIM®CM v različnih puferskih sistemih.

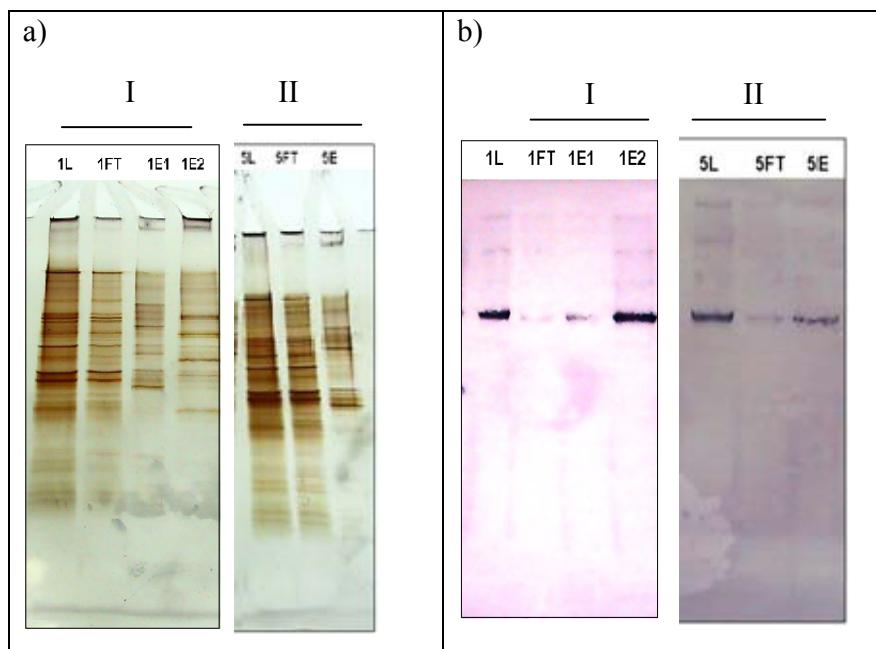
Pri optimizaciji vezave HA na CIM®CM smo uporabili MES in fosfatni puferski sistem pri pH=5,9. Na CIM disk smo nanesli 4 ml virusnega lizata. Proteine smo eluirali z 1 M NaCl. Zbirali smo vse frakcije in testirali s SDS PAGE elektroforezo in s prenosom po westernu. Ugotoviti smo žeeli, pri katerih puferskih sistemih se HA veže na CIM®CM. Pri testiranju vezave HA na disk CIM®CM je pri vseh puferskih sistemih prišlo do vezave

in eluciji HA. V fosfatnem pufru (slika 22, linija III) smo zaznali pozitivno reakcijo tudi v nevezani frakciji (slika 22). V MES puferskem sistemu smo dobili dva elucijska vrha (slika 22, linija I). Po prenosu po westernu (slika 22b) je HA v obeh vrhih. Po SDS PAGE elektroforezi vidimo, da je v vrhu 1E2 manj proteinskih nečistoč kakor v 1E1. Poskušali smo ločiti HA od ostalih proteinov v linearinem gradientu soli. Nanesli smo 20ml 5-krat redčenega virusnega lizata. Eluirali smo v linearinem gradientu soli. Pri ločevanju HA v linearinem gradientu soli nismo zaznali elucijskega vrha (slika 23).



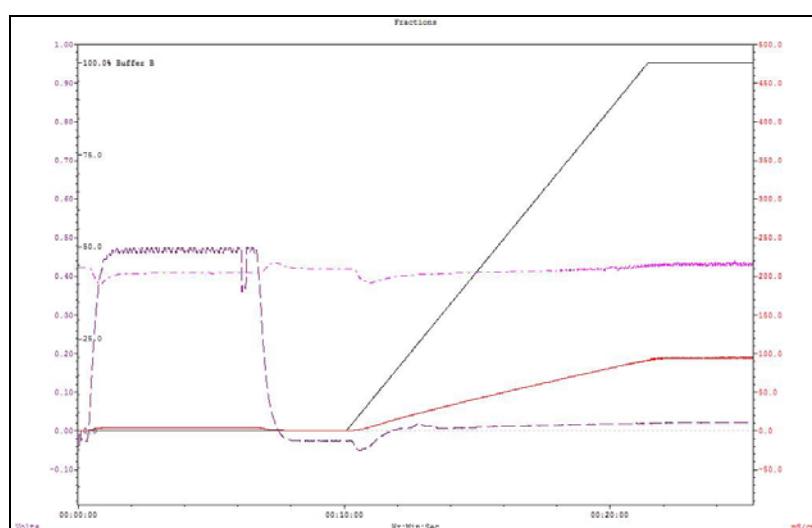
Slika 21: Kromatogrami vezave HA na disk CIM®CM v različnih puferskih sistemih.

I) MES puferski sistem. Legenda: 1FT: nevezana frakcija, 1W: spiranje s pufom A, 1E1, elucijski vrh, E2, elucijski vrh Pufer A:20mM MES, 1mM EDTA pH=5,9. Pufer B:20mM MES, 1mM EDTA in 1M NaCl, pH=5,9 **II) fosfatni puferski sistem.** Legenda: 5FT: nevezana frakcija, 5W: spiranje s pufom A, 5E, elucijski vrh,puffer A: 20mM fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=5,9, B: 20mM fosfatni pufer, 1mM EDTA, 1M NaCl, pH=5,9.



Slika 22: Dokazovanje HA v frakcijah ločevanja HA na CIM®CM disku v puferskih sistemih MES, fosfatni pufer.

a) SDS PAGE elektroforeza vzorcev iz kromatogramov slika 21 I, II, b) prenos po Westernu pozitivni rezultat v frakcije 1L, 1FT, 1E1, 1E2, 3E, 5L, 5FT, 5E



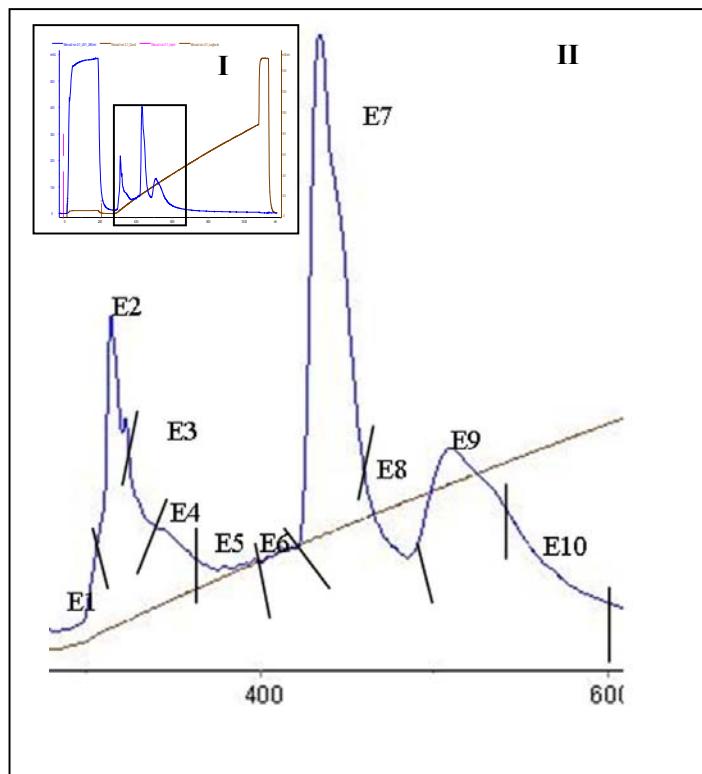
Slika 23: Kromatogram spiranja HA iz diska CIM®CM v linearinem gradientu pufrov A in B.
Pufer A: 20 mM MES, 1 mM EDTA, pH= 5,9; B: 20 mM MES, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, pH=5,9

Preglednica 6: Rezultati vezave HA na CIM®CM v različnih razmerah spiranja

Pogoji vezave	Vezava na CIM®CM	Elucija iz CIM®CM
20mM Fosfatni pufer, 1mM EDTA pH=5,9 (slika 22, linije I)	+	+
20mM MES, 1mM EDTA, pH=5,9 (slika 22, linije II)	+	+

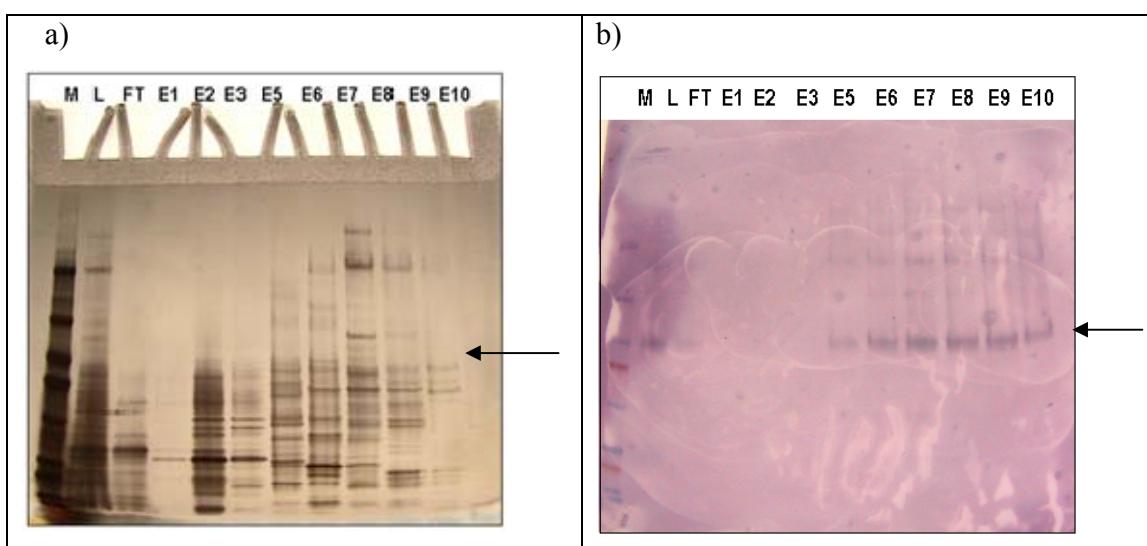
4.9 OSAMITEV HA S KOMBINACIJO KOLONE CIM®QA IN DISKA CIM®CM

Na osnovi ugotovitev, ki so prikazane v poglavjih 4.6. in 4.8 smo se odločili, da bomo za osamitev HA uporabili kombinacijo dveh kolon. Na kolono CIM®QA-8 smo nanesli virusni lizat, ki smo mu dodali do 2% Tween-a 20. HA smo iz kolone CIM®QA-8 spirali z linearnim gradientom pufrov A in B; A: 50 mM HEPES 1mM EDTA, pH=8 in B: 50 mM HEPES, 1mM EDTA z 2M NaCl, pH=8 (Slika 25, Slika 26). Iz kolone CIM®QA-8 smo HA sprali z linearnim gradientom soli. HA se je spral v frakcijah E5-E10 (Slika 24). Te frakcije so poleg HA vsebovale še 25% vseh proteinov nanešenih na kolono (Preglednica 4). V frakciji E7, ki je po čiščenju vsebovala največ HA, smo izmerili le malo manj kot 2% proteinov virusnega lizata (Preglednica 4). Tej elucijski frakciji smo uravnali pH z ocetno kislino ter prevodnost s pufom A: 20 mM MES, 1mM EDTA pH=5,9. Tako pripravljene proteine smo prečrpavali preko diska CIM®CM. Elucija je potekala v stopenjskem gradientu pufra B; 20 mM MES, 1mM EDTA, 1 M NaCl, pH=5,9. Kromatogram osamitve HA iz predhodno očiščenega vzorca (slika 26) ima dva elucijska vrha. Po analizi elucijskih vrhov s SDS PAGE elektroforezo in prenosom po westernu (slika 27), lahko zaključimo, da je HA v obeh elucijskih vrhovih. S specifičnimi protitelesi smo zaznali več prog z molekulsko maso od 140 do 15kDA. V E2 je manj proteinskih nečistoč kakor v E1. Po čiščenju na disku CIM®CM smo sprali 2,2% proteinov nanešenih na disk CIM®CM ozziroma 0,5% proteinov naloženih na CIM®QA (Preglednica 5).



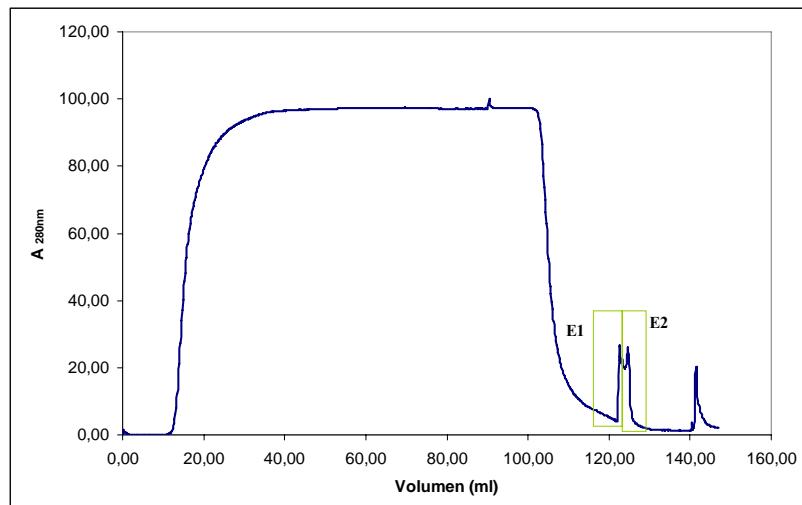
Slika 24: Kromatogram ločevanja HA v na koloni CIM®QA-8 z linearnim gradientom NaCl. I) celoten kromatogram, II) izsek območja linearnega gradiента.

Nalaganje 170 ml virusnega lizata na 8ml CIM®QA kolono, eluiranje proteinov v linearjem gradiantu pufrov in B. Pufer A: 50mM HEPES, 1mM EDTA, pH=8, B: 50mM HEPES, 1mM EDTA z 2M NaCl, pH=8.



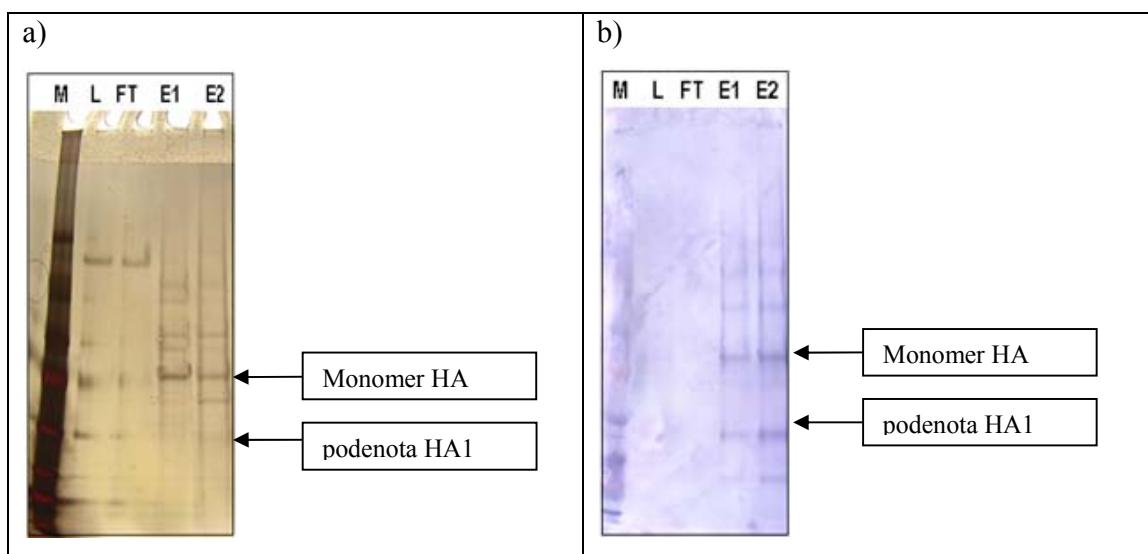
Slika 25: Dokazovanje HA v frakcijah ločevanja HA na koloni CIM®QA z gradientom NaCl.

a) SDS PAGE elektroforeza M: proteinski standardi, 1L: virusni lizat, v redčeno v razmerju 1:1 z pufrom A. od 1E1 do 1E10 so proteinske frakcije eluirane v linearjem gradientu soli. b) prenos po westernu; S puščicam označen monomer HA



Slika 26: Kromatogram spiranja HA iz diska CIM[®]CM.

Legenda: FT nevezana frakcija, W spiranje s pufrom A, E1, prvi elucijski vrh, E2, drugi elucijski vrh. A: 20mM MES, 1mM EDTA, pH=5,9; B: 20mM MES, 1mM EDTA in 1M NaCl, pH=5,9.



Slika 27: Dokazovanje HA v frakcijah po čiščenju na disku CIM[®]CM.

a) SDS PAGE elektroforeza: naloženi proteinski standardi, in frakcije iz diska CIM[®]CM. b) prenos po westernu pozitivna reakcija na HA frakcijah L , E1 in E2

Preglednica 7: Masna bilanca proteinov v frakcijah po čiščenju na koloni CIM® QA .

Vzorec	Koncentracija (µg/ ml)	Volumen (ml)	Masa (µg)	Masna bilanca (%)
L	232,60	160	37209,30	100,00
FT	150,00	160	18000,00	48,38
W 1	16,51	120	429,30	1,15
E1	18,60	26	390,70	1,05
E2	18,60	21	781,40	2,10
E3	147,67	42	6940,70	18,65
E4	67,44	47	2158,14	5,80
E5	46,51	32	1674,42	4,50
E6	59,88	36	2694,77	7,24
E7	29,07	45	726,74	1,95
E8	46,51	25	930,23	2,50
E9	59,88	20	1437,21	3,86
E10	29,07	24	1453,49	3,91

Preglednica 8: Masna bilanca proteinov v frakcijah po čiščenju na disku CIM® CM.

Vzorec	Koncentracija (µg/ ml)	Volumen (ml)	Masa (µg)	Masna bilanca (%)
L	79,2	100,00	7921,296	100,00
FT	26,60	105,00	2792,708	35,26
W	5,7	35,00	198,9815	2,51
E1	18,96	2,00	37,91667	0,48
E2	44,7	3,00	133,9583	1,69

5 RAZPRAVA in SKLEPI

Do sedaj so razvili nekaj različnih kromatografskih metod čiščenja HA virusa influence. Metoda z in dodatkom reducenta omogoča ločitev HA1, HA2 in nukleoproteina (Bucher in sod, 1976). Collins in Knight (1978) sta razvila metodo, ki je poleg velikostno izključitvene kromatografije vsebovala še šibki anionski izmenjevalec (DEAE). Najučinkovitejšo metodo osamitve HA, pa so razvili Wang in sodelavci (2005). Združili so anionsko in kationsko kromatografijo.

Poskušali smo ponoviti metodo združene anionske in kationske kromatografije, ki so jo razvili Wang in sodelavci (2005). Ugotovili smo, da po prenosu po westernu ne zaznamo očiščenega HA. HA se je slabo izpral in elucijski vrhovi so bili zelo nizki (Slika 9). Razlogov za neuspeli prenos metode je lahko več. Namesto detergenta Tergitol-NP9 smo uporabili Tween 20. Oba sta neionska detergenta in predvidevali smo, da se bosta obnašala podobno. Glavna razlika je bila v proizvodnem sistemu za HA, saj so Wang in sodelavci razvili metodo osamitve rekombinantnega HA, pripravljenega v celicah insektov. Razlika je lahko v glikozilaciji, do katere pride pri samem zorenju virusa. Zaradi razlike v glikozilaciji lahko pride do razlik pri ločevanju molekul na osnovi ionske izmenjave (Crommelin in Sindelar, 2002). Razlika je bila tudi v koncentraciji HA v žetvi. Wang in sodelavci (2005) poročajo o 53 µg rekombinantnega HA na mililiter lizata, v našem primeru pa smo koncentracijo ocenili le na 2 µg HA na mililiter virusnega lizata.

Idejo osamitve HA z uporabo anionskih in kationskih kolon, ki so jo razvili Wang in sodelavci (2005), smo prenesli na module CIM®. Kromatografske nosilce UNO Q in SP Sepharose Fast Flow, ki temeljijo na majhnih delcih stacionarne faze, smo zamenjali z monolitnimi kromatografskimi nosilci CIM®QA in CIM®SO3.

Za razbitje virusa smo testirali detergente: NOGA (N-oktanil-beta-glukozamin), Tween 20 in Zwittergent 3-14. Po obdelavi virusa z Zwittergent 3-14 HA nismo zaznali. Ob

uporabi NOGA in Tween 20 smo HA zaznali, zaradi dostopnosti detergenta, cene in enostavne uporabe smo se odločili za Tween 20.

Izoelektrično točko smo izračunali s programom Palabram (Nihil Novus..., 2009). Program s pomočjo aminokislinskih ostankov izračuna izoelektrično točko proteina. Pri tem program upošteva katere aminokisline se pojavljajo na koncih proteina, upošteva ponavljanje aminokislin in prispevek posameznih aminokislin k izoelektrični točki. Izračunali smo, da je izoelektrična točka HA virusa influence A/New Caledonia/20/99 pri pH=6,431.

Izračunano izoelektrično točko smo potrdili z eksperimenti pri različnih pH vrednostih na anionski in kationski koloni. Pri pH=7,5 in 8,5 (slika 13, preglednica 3) se je HA vezal na anionsko kolono CIM®QA. Pri pH vrednosti 6,5 smo zaznali pH v nevezani frakciji (slika 13, preglednica 3). pH vrednost 6,5 je zelo blizu izoelektrične točke, zato se HA ne veže na CIM®QA. Eksperimentalno smo dokazali da se pri pH nižjem od izoelektrične točke HA veže na kationski izmenjevalec (CIM®CM) (slika 22, Preglednica 6). Eksperimentalno smo tudi dokazali, da se pri pH višjem od izoelektrične točke HA ne veže na kationsko kolono (CIM®SO₃) (slika 18, Preglednica 5). Te ugotovitve so v skladu z izračunano izoelektrično točko in podatki v literaturi (Wang in sod., 2005).

Optimizacijo vezave na CIM®QA smo izvedli s pufri z različnimi pH vrednostmi in sicer pri pH=8,5 (Slika 12, I), 7,5 (Slika 12, II), 6,5 (Slika 12, III), 5,5 (Slika 12, IV). Rezultati po prenosu po westernu (slika 13b, Preglednica 3) so pokazali, da se je HA pri pH 7,5 in 8,5 vezal in kasneje tudi eluiral iz kolone CIM®QA, pri pH 6,5 pa je bil HA v nevezani frakciji, saj je pri tej pH vrednosti večino HA nenabitega in se ne veže na CIM®QA. Pri pH 5,5 HA nismo zaznali ne v nevezanih frakcijah ne v elucijskih frakcijah, kar lahko razložimo s spremembo strukture HA in s tem izgubo mest za vezavo protiteles. Z namenom optimizacije ločitve HA smo le-tega eluirali z linearnim gradientom NaCl (slika 16). HA smo zaznali v več elucijskih frakcijah. Poskušali smo zožiti območje elucije HA z različnimi dodatki (npr. izopropanol), vendar brez uspeha (ni prikazano). Takšno obnašanje HA lahko razložimo z hidrofobnostjo metakrilatnega matriksa kolone

in hidrofobnosti HA. HA je transmembranski protein in ima hidrofobno regijo HA2, ki je vstavljena v membrano (Webster in sod., 1992).

Vezavo HA na disk CIM[®]SO₃ smo testirali s pufri z enako sestave kakor za vezavo HA na CIM[®]QA. Na kromatogramih (slika 17 I, II, III, IV) vidimo, da ni značilnega elucijskega vrha. Kljub temu smo zbirali vse frakcije in jih testirali s SDS PAGE elektroforez ter s prenosom po westernu (Slika 17). V elucijskih frakcijah ni, oziroma je zelo malo proteinov. Proteini so samo v nevezanih frakcijah, kjer smo pri pH vrednostih 7, 5 in 8, 5 zaznali tudi HA (slika 18, linije I, II, Preglednica 5). Pri pH vrednostih 5, 5 in 6, 5 (slika 18, linije III, IV, Preglednica 5) HA nismo zaznali v nobeni od frakcij. Pri pH 6, 5 je HA blizu območja izoelektrične točke in se verjetno ne veže na CIM[®]SO₃. Pri pH 5,5 nismo zaznali HA ne v nevezani frakciji ne v elucijski frakciji. Za takšen rezultat je lahko več razlogov. Lahko je prišlo do spremembe strukture HA in s tem izgube mesta za vezavo protiteles. Možno je tudi, da se je HA na CIM[®]SO₃ vezal močno in ga nismo uspeli eluirati iz diska. CIM[®]SO₃ disk smo dodatno preizkusili s pufrom MES s pH 5,9 in zaznali elucijske vrhove (Slika 19V). Frakcije smo analizirali s SDS PAGE elektroforezo in s prenosom po westernu (Slika 20). Ugotovili smo, da se HA veže na CIM[®]SO₃, če uporabimo puf MES (Slika 20, linija V, Preglednica 5). Poleg CIM[®]SO₃ smo testirali še različne puferske sisteme na šibkem kationskem izmenjevalcu CIM[®]CM. V primeru pufra MES smo zaznali izokratsko ločbo, saj je bil HA prisoten v obeh elucijskih vrhovih. Izokratska ločba je lahko posledica kompleksnosti HA in njegove hidrofobne sestave. V fosfatnem pufu se HA ne veže dovolj močno na disk CIM[®]CM, saj smo dobili pozitiven rezultat tako v nevezani frakciji kakor tudi v elucijski frakciji (slika 22, linija III, preglednica 6). Po primerjavi rezultatov SDS-PAGE elektroforeze (Slika 22a) in prenosa po westernu (Slika 22b) smo se odločili za uporabo CIM[®]CM diska in MES pufra saj je ta sistem omogočal največjo ponovljivost. Drugi elucijski vrh je vseboval največ HA in po pregledu gela SDS PAGE elektroforeze tudi najmanj proteinov. Z namenom izboljšati ločbo HA na CIM[®]CM smo vpeljali linearni gradient NaCl, vendar nismo uspeli sprati proteinov. Za ta pojav zaenkrat nimamo razlage.

Na osnovi študija optimizacije vezave HA na različne module CIM[®], smo postavili metodo osamitve HA. Odločili smo se za uporabo kombinacije CIM[®]QA in CIM[®]CM. Najprej smo uporabili smo kolono CIM[®]QA-8, na katero smo naložili virusni lizat (slika 24). Frakciji eluirani iz QA smo uravnali pH in prevodnost ter jo prečrpavali preko CIM[®]CM diska. Vse frakcije smo analizirali s SDS PAGE (slika 27a) in prenosom po westernu (slika 27b). V elucijski frakciji smo ugotovili prisotnost HA (66kDa) in tudi podenote HA1 (50 kDa) (slika 27b). Do cepitve HA pride zaradi znižanja pH vrednosti in prisotnosti proteaz, saj so virus gojili v evkarionskih celicah. Nižanje pH vrednosti vpliva na strukturo HA, pojavi se strukturna sprememba. Ta oblika je bolj dovetna za proteazno cepitev HA na podenoti HA1 in HA2, saj do te pride tudi pri združitvi membran v naravnih procesih (Carr in sod., 1997). Očitno pa so na gelu prisotni tudi drugi, še večji proteini, ki so jih protitelesa specifična za HA prav tako prepozna. Te signale si lahko delno razlagamo s pregrobo obdelavo vzorca ali nespecifičnostjo protiteles oziroma ne dovolj optimizirano metodo detekcije. Podenote HA2 ne zaznamo, ker so protitelesa specifična na zaporedje aminokislin na podenoti HA1.

Z uporabo CIM[®]QA in CIM[®]CM nam je uspelo delno očistiti HA. Obstaja pa še nekaj možnosti za izboljšavo postopka osamitve HA. V nadalnjih raziskavah bi lahko zožili linearni gradient eluiranja HA iz CIM[®]QA. Potrebno je pojasniti zakaj v linearjem gradientu na CIM[®]CM ni proteinov.

Na osnovi naših ugotovitev lahko podamo naslednje sklepe:

- Z uporabo monolitnih nosilcev CIM[®]QA in CIM[®]CM nam je uspelo osamiti hemaglutinin iz virusnega lizata A/New Caledonia/20/99.
- Hemaglutinin se iz diska CIM[®]CM pri 20 mM MES, 1mMEDTA, pH=5,9 eluira izokratsko.
- Očiščeni hemaglutinin je v monomerni obliki, delno pa je razcepljen na podenote HA1 in HA2.

6 VIRI

ABCAM. 2009. Western blotting- a beginner's guide. Cambridge, ABCAM,
[\(http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf\)](http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf) (februar 2009): 13 str.

Bucher D.J., Li S. S-L., Kehoe J.M., Kilbourne E.D. 1976. Chromatographic isolation of the hemagglutinin polypeptides form influenza virus vaccine and determination of their amnio-terminal sequences, Microbiology, 73: 238-242

Carr C. M., Chaudhry C., Kim P. S. 1997. Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. Proceedings of the National Acadamy of Sciences of the United States of America, 94: 14306-14313

CDC. 2009. ABCs of influenza and pandemics, Atlanta, CDC - Centers for Disease control and Prevention.
[\(http://whoisflu.influenza.infocollections.org/documents/s15473e/s15473e.pdf\)](http://whoisflu.influenza.infocollections.org/documents/s15473e/s15473e.pdf) (marec 2009): 74 str.

CIM® Laboratory Columns. 2008., Ljubljana, BIA Separations,
[\(http://www.biaseparations.com/subpage.asp?FolderId=227\)](http://www.biaseparations.com/subpage.asp?FolderId=227) (februar 2009): 1str

Collins J. K., Knight C. A. 1978, Purification of the influenza hemagglutinin glycoprotein and characterization of its carbohydrate components, Journal of Virology, 26: 457-467

Crommelin D. J. A., Sindelar R. D. 2002. Pharmaceutical biotechnology: An introduction for pharmacist and pharmaceutical scientists. 2nd ed. Philadelphia, Taylor and Francis, 2: 64-64
[\(http://books.google.si/books?id=tuQnFZotVBsC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false\)](http://books.google.si/books?id=tuQnFZotVBsC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false) (maj 2009): 1 str.

Fodor E. in Brownlee G. G. 2002. Influenza virus replication v: Influenza. volume 7.

Potter C.W. (ed.), Amsterdam, Elsevier Science, 1: 1-29

Hafiz A., 2005, Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization, Boca Raton, CRC Press, 10-11

http://books.google.com/books?id=hTQlDe1H7Z4C&hl=sl&source=gbs_navlinks_s (maj 2009): 2 str.

Hu Y. C., Luo Y. L., Ji W. T., Chulu J. L.C., Chang P. C., Shieh H., Wang C. Y., Liu H. J. 2006. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system. *Journal of Virological Methods*, 135: 43–48

ICTVdB Management. 2006. 00.046. Orthomyxoviridae. V: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (ed), Columbia University, New York, USA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.046.htm> (junij 2009): 1str.

Kaiser J. 2006. One size fits all Flu vaccine. Palo Alto, Science – AAAS, 312, 5779, 1472 - 1472

<http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/312/5772/380.pdf> (junij 2009): 1 str.

Kapteyn J. C., Drissi S. M., Dijkstra R., Kars C., Tjon J. C.M.S-K, Weverling G.J., Vocht M. L., Kompier R., Montfort B. A. von, Guichoux J.- Y., Goudsmit J., Lagerwerf F. M. 2006. Haemagglutinin quantification and identification of influenza A&B strains propagated in PER.C6® cells: A novel RPHPLC method. *Vaccine*, 24: 3137-3144

Kawasaki T., Takahashi S., Ikeda K. 1985. Hydroxyapatite high-performance liquid chromatography: column performance for proteins. *European Journal of Biochemistry*, 152: 361 – 371

Koren S., 2002. Virusna cepiva in imunski serumi V: Splošna medicinska virologija, Koren S. (ur). 1. ponatis. Ljubljana Medicinski razgledi, 1: 155-160

MMWR - Morbidity and mortality weekly report. 2009. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines. Atlanta, CDC - Centers for Disease Control and Prevention.

<http://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/background.htm> (junij 2009): 1 str.

NCBI. 1995. Influenza virus resource, information search and analysis, Bethesda, NCBI- National Center for Biotechnology Information.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html> (februar 2008): 1 str.

Nihil Novus. 2009. Isoelectric Point "estimator" / calculator. Nihil Novus

<http://www.nihilnovus.com/Palabra.html> (februar 2009): 1str.

Nunc. 2008. Nunclon™ Δ Cell Factory, Roskilde, Nunc

<http://www.nuncbrand.com/en/page.aspx?ID=304> (januar 2009): 1str.

Peterka M., Štrancar A., Banjac M., Kramberger P., Elisabeth M., Muster T. 2008. Methods for virus purifications. International patent application, WO 2008/006780 A1, 31 str.

Radyukhin V. A., Serebryakova M. V., Ksenofontov A. L., Lukashina E. V. in Baratova L. A. 2006. Isolation of influenza virus A hemagglutini C-terminal domain by hemagglutinin proteolysis in octylglukoside micelles. Protein & peptide Letters, 13: 907-913

Silver staining kit protein. 2009. PlusOne Silver Staining Kit, Protein, GE Healthcare

[http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FDFA19E77539CA76C1257628001CF9E6/\\$file/71717700AL.pdf](http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FDFA19E77539CA76C1257628001CF9E6/$file/71717700AL.pdf) (februar 2009): 28 str.

Stevens J., Wilson I.A. 2004. Resurrecting the dead- structural analysis of hemagglutinin from the 1918 pandemic strain. Palo Alto, SSRL Science Highlight. (august 2004)

http://ssrl.slac.stanford.edu/research/highlights_archive/1918flu.html (maj 2009): 1.str

Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Nečina R. 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 76: 49-85

Vlakh E.G., Tennikova T.B. 2009. Applications of polymethacrylate-based monoliths in high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1216, 13: 2637-2650

Wang K., Holtz K. M., Anderson K., Chubet R., Mahmound W., Cox M. M. J. 2005. Expression and purification of an influenza hemagglutinin – one step closer to a recombinant protein based influenza vaccine. Vaccine, 24: 2176-2185

Webster R. G. in Darlington R. W. 1969. Disruption of Myxoviruses whit Tween 20 and isolation of biologically active hemagglutinin an neuroaminidase subunits, Journal of Virology, 4: 182-187

Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kowaoka Y. 1992. Evolution an ecology of influenza A virus. Microbiological Reviews, 56: 152-179

ZAHVALA

Zahvaljujem se podjetju BIA Separations, d.o.o., ki mi je omogočilo izdelavo diplomske naloge. Posebej Molekularno biološkemu oddelku, Matjažu Peterki za pomoč ter svetovanju pri izdelavi diplomske naloge. Marku Jarcu za nesebično pomoč, ko aparature niso delovale. Dr. Barbari Lah, za strokovno pomoč pri delu s celicami in hvala za vse vzpodbudne besede. Marku Banjacu za prve učne ure dela s HPLC-jem.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za sprejeto mentorstvo in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Tom Turku za recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se očetu in mami za vso podporo. Diploma je namenja vama, ki sta mi stala ob strani v vseh teh letih študija, me vzpodbujala in poskrbela, da nisem bila prikrajšana za lepe trenutke tekom študija. Zahvaljujem se vsem prijateljem, zaradi katerih bodo študijska leta ostala nepozaben spomin.