

KATARINA B. PAVLOVIĆ  
VOJISLAV N. BOŽANIĆ

Fakultet organizacionih nauka,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd,  
Srbija

STRUČNI RAD

UDK 579.61:616:543.544.5

DOI: 10.2298/HEMIND100630053P

## NOVA KOMBINACIJA METODA ZA IZOLOVANJE I PREČIŠĆAVANJE PERTUSIS TOKSINA IZ KULTURE *Bordetella pertussis*

*U ovom radu prikazana je nova kombinacija različitih tehnika za izolovanje i prečišćavanje pertusis toksina iz kulture Bordetella pertussis, kao i način za optimizaciju mikrobiološke podloge i vremena kultivacije, a s ciljem povećanja produkcije pertusis toksina. Jedinstvenom kombinacijom metoda za izolovanje i prečišćavanje proteina dobijen je relativno visok stepen prečišćenosti pertusis toksina od 80,39% i dobar prinos od 56%. U radu je imunoelektroforezom i visoko afinitetnom tečnom hromatografijom, kao i na osnovu poređenja sa standardom pertusis toksina objavljenim od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO) verifikovano da je izolovan protein pertusis toksin. Zaključak ovoga rada je da navedena nova kombinacija različitih tehnika, uz unete specifične modifikacije, daje dobre rezultate u izolovanju i prečišćavanju pertusis toksina na laboratorijskom nivou, dok razvoj i poboljšanje (scale-up) ove metodologije i uvođenje u proizvodnju mogu biti predmet budućih istraživanja. Zaključak je i da bez obzira na literaturne podatke i preporuke različitih autora, sve metode i uslove koji se primenjuju u jednoj državi (ili regionu) treba ispitati i optimizovati, kako zbog mogućih specifičnosti autohtonih sojeva, tako i zbog veoma dinamičnih promena u ovoj oblasti.*

Veliki kašalj je ozbiljna i izuzetno kontagiozna bolest, širokog spektra simptoma i mogućih komplikacija. Visoki mortalitet i morbiditet koji prelaze jedanaest, odnosno četrdeset procenata ukupnog broja novorođene dece, zabeleženi su među nevakcinisanim stanovništvom [1].

Uzročnik velikog kašlja, akutnog respiratornog oboljenja, jeste bakterija *Bordetella pertussis*. Infekcija počinje pripajanjem bakterije za epitelne ćelije respiratornog sistema, gde se ona razmnožava, ali se ne širi na okolna tkiva niti u krvotok. Bakterija sekretuje veliki broj faktora virulencije, među kojima je najznačajniji pertusis toksin (PT), koji se absorbuje sistemski, deluje kao enzim i menja fiziološke funkcije ciljnih ćelija. Ovaj toksin je direktno ili indirektno odgovoran za najveći broj, ako ne i za sve specifične simptome velikog kašlja [1].

Jedini način prevencije ove bolesti je vakcinacija. Vakcina protiv velikog kašlja se primenjuje u prevenciji ove ozbiljne bolesti jer se njenom primenom postiže aktivna imunizacija dece. Rutinska imunizacija počela je 1933. godine DTP (*Diphtheria, tetanus, pertussis*) vakcinom u SAD [2] i od tada je u upotrebi vakcina koja sadrži celu ćeliju *Bordetella pertussis*. Početnu euforiju zbog izuzetnih rezultata i upadljivog snižavanja broja obolelih, zamenili su briga i polemika u vezi sa ispoljavanjem neželjenih efekata. Nekoliko studija objavljenih početkom devedesetih, dovelo je u vezu ovu vakcinu sa manje značajnim reakcijama kao što su groznica, povišena telesna temperatura, bol na mestu aplikacije, ali i

mnogo ozbiljnijim kao što su hipotonija, hiporefleksija, konvulzije i akutna encefalopatija [3]. Izazvani strah i medijska propaganda doveli su do spontanog odustajanja od vakcinacije celom bakterijskom ćelijom u nekim zemljama, što su lekari ocenili kao mnogo opasnije od same vakcine. Ovo se se ubrzo i potvrdilo jer je odbijanje vakcinacije ubrzalo širenje bolesti [4].

Na sreću, pitanje neželjenih efekata je rešeno. Glavni razlog njihove pojave bila je bakterijska ćelija kao komponenta vakcine. Nova vakcina zove se acelularna, što znači da se cela ćelija više ne koristi. Prvi put je napravljena u Japanu, a upotrebljeni su samo pertusis toksin i značajni delovi bakterije koji stimulišu imuni odgovor, ali ne dovode do sporednih efekata. To su FHA (filamentozni hemaglutinin), i površinski antigeni pertaktin, koji ima zaštitnu ulogu i aglutinogeni (fimbrie) koji su odgovorni za aglutinaciju bakterijskih ćelija u prisustvu odgovarajućih antitela, ali ne dovode do sporednih efekata [5].

Trenutno preporučeni raspored vakcinacije za DTaP (*Diphtheria, Tetanus, acellular Pertussis*) od strane American Academy of Pediatrics (AAP), the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), i American Academy of Family Practice (AAFP) prikazan je u tabeli 1, i isti je kao za ranije korišćenu DTWP (*Diphtheria, Tetanus, whole cell Pertussis*).

Nekoliko studija pod pokroviteljstvom National Institute for Health (NIH) za utvrđivanje imunogenosti i bezbednosti acelularnih pertusis vakcina sprovedeno je istovremeno u šest centara u SAD. Rezultati ovih studija pokazuju da je acelularna pertusis vakcina jednako imunogena i sa manje neželjenih reakcija u poređenju sa vakcinom koja sadrži celu ćeliju *Bordetella pertussis* [6].

Autor za prepisku: K.B. Pavlović, Fakultet organizacionih nauka, Jove Ilića 154, 11000 Beograd, Srbija.  
E-pošta: kpavlovic25@gmail.com  
Rad primljen: 30. jun 2010.  
Rad prihvaćen: 20. septembar 2010.

Iskustvo Japana sa preko 60 miliona doza DTaP od 1981. godine vrlo je pozitivno. DTaP se pokazala u najmanju ruku jednako efikasnom u poređenju sa DTWP, a sa mnogo manje sporednih efekata [7].

Tabela 1. Predloženi kalendar imunizacije protiv difterije, tetanusa i pertusisa za decu u SAD  
Table 1. The recommended immunization schedule for children against diphtheria, tetanus and pertussis in the USA

Doza	Starost, meseci	Vakcina
1	2	DTaP
2	4	DTaP
3	6	DTaP
4	12–18	DTaP
5	48–72	DTaP

Na osnovu potvrđene bezbednosti i imunogenosti acelularnih vakcina ACIP je 2000. revidirao svoj predlog u vezi sa vakcinacijom protiv velikog kašlja. DTaP vakcina je do pre nekoliko godina, po savetu ACIP, korišćena samo kao četvrta i peta doza u seriji, a sada se ona preporučuje za svih pet doza, dok se DTWP ne preporučuje za dalju upotrebu [8].

U Srbiji je i dalje u najvećem broju slučajeva prisutna i primenjivana vakcina sa celom bakterijskom ćelijom.

Osnovni cilj ovog rada bio je izolovanje čistog pertusis toksina definisanjem najpovoljnije kombinacije različitih metoda, a s ciljem da se stvore uslovi za moguću proizvodnju acelularne pertusis vakcine. Osnovna ideja na početku rada bila je optimizacija uslova kultivacije *B. pertussis* i postizanje maksimalne proizvodnje pertusis toksina. Ispitana su dva soja koja su gajena na devet različitih podloga. Autohtoni soj 1772 dao je bolje rezultate od komercijalnog Tohama soja, koji se često preporučuje kao dobar produktor pomenutog proteina [9]. Isto tako, jedan od najčešće korišćenih suplemenata podloga, 2,6-*O*-dimetil ciklodekstrin, bio je manje efikasan od polivinil alkohola u pogledu stimulacije rasta i proizvodnje toksina. U literaturi preporučuje se upotreba polivinil alkohola molekulske mase od 1,6 do 15 kDa [10], dok je u ovom radu korišćen polivinil alkohol molekulske mase 70 kDa, a koji je dao veoma dobre rezultate.

U pogledu vremena kultivacije pokazalo se, nakon ispitivanja oba soja na podlozi sa dodatkom polivinil alkohola i podlozi sa dodatkom 2,6-*O*-dimetil ciklodekstrina, da je optimalno vreme kultivacije 53 h.

Urađeno je taloženje proteina amonijum-sulfatom, pri koncentraciji od 35%, a zatim razdvajanje na koloni hidroksi apatita. ELISA testom praćeno je prisustvo proteina po frakcijama. ELISA test je za potrebe ovoga rada optimizovan, sa različitim koncentracijama fetuina, u različitim puferima, sa različitim dužinama inkubiranja i sa različitim koncentracijama boje.

Napravljen je matriks Fetuin Sepharose, koji je u daljem prečišćavanju dao mnogo bolje rezultate u poređenju sa komercijalnim matriksom. Dobijena je frakcija pertusis toksina čistoće 80,39%, sa prinosom 56%. Čistoća proteinskih frakcija praćena je SDS PAGE elektroforezom. Izolovani pertusis toksin identifikovan je imunoelktroforezom i upoređen je sa standardom Svetske zdravstvene organizacije (WHO). Urađena je i tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC) radi identifikacije pertusis toksina.

## MATERIJALI I METODE

Eksperimentalni deo ovog rada je realizovan na imunohemijskom odeljenju Instituta za imunologiju i virusologiju Torlak, u Beogradu, a u sklopu izrade specijalističkog rada diplomiranog biohemičara Katarine Pavlović (autora ovog rada) na temu „Izolovanje i prečišćavanje pertusis toksina iz kulture *Bordetella pertussis*“.

### Optimizacija podloge s ciljem povećanja proizvodnje pertusis toksina

U ovom eksperimentu određen je optimalni sastav podloge i optimalno vreme kultivacije *B. pertussis* za dobijanje maksimalne količine pertusis toksina. Zasejana su dva proizvodna soja, Tohama soj i autohtoni soj 1772, svaki na po devet podloga i to:

- 1 – klasična CW podloga sa skrobom,
- 2 – CW bez skroba sa Tris-om,
- 3 – CW bez skroba sa 2,6-*O*-dimetil- $\beta$ -ciklodekstrinom (heptakis),
- 4 – CW bez skroba sa polivinil alkoholom 70 kDa,
- 5 – CW bez skroba sa polivinil alkoholom 16 kDa (moviol),
- 6 – CW bez skroba sa prolinom,
- 7 – CW bez skroba sa glutationom,
- 8 – CW bez skroba sa nikotinskom kiselinom i
- 9 – CW bez skroba sa glutaminskom kiselinom.

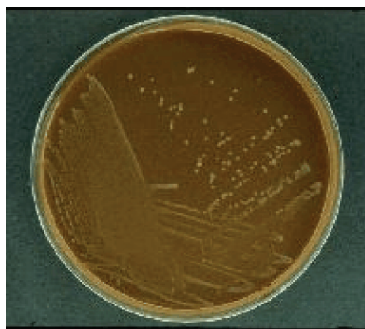
Kultivacija je trajala 48 h. Uzeti su uzorci kultura sa svih podloga. Bakterijski rast praćen je merenjem apsorbance i pH vrednosti. Koncentracija pertusis toksina u svim uzorcima određena je ELISA testom.

Drugi deo eksperimenta odnosio se na optimizaciju vremena kultivacije. Ponovo su ispitana dva soja, ali ovoga puta dve podloge, one koje su u predhodno pomenutom eksperimentu dale najbolje rezultate. Kultivacija je trajala 54 h, a posle 48 h uzorci su uzimani svakih sat vremena i koncentracija PT-a u njima određena je ELISA testom.

### Kultivacija *B. pertussis*

Proizvodni soj 1772, faze I, koji se čuva u liofilizovanom stanju, oživljen je rehidatacijom 1% rastvorom kiselog hidrolizata kazeina i zasejan na čvrstu Bordet Gengou podlogu [9]. Izgled kulture prikazan je na

slici 1. Kultura je presejana u erlenmajere, na tečnu Cohen Wheeler podlogu sa dodatkom polivinil alkohola [11]. Posle kultivacije u erlenmajerima kultura je presejana u Roux boce sa istom podlogom. Pre svakog presejavanja uzete su probe sterilnosti. Problema sa kontaminacijom nije bilo. Rast u Roux bocama prekinut je meriolatom. Zapremina kulture sa podlogom iz svih Roux boca bila je 10000 ml. Posle centrifugiranja supernatant je aspiriran i dobijeno je 600 ml bakterijske suspenzije koja je korišćena za ekstrakciju PT-a.



Slika 1. Kultura *Bordetella pertussis* na Bordet Gengou podlozi.  
Figure 1. *Bordetella pertussis* culture grown on Bordet Gengou media.

### Ekstrakcija antigena *B. pertussis*

Iz 10000 ml centrifugirane kulture *B. pertussis* aspiriran je supernatant do zapremine 600 ml. Dobijenoj bakterijskoj suspenziji snižen je pH sa 8,91 na 3,80 dodavanjem 2 M HCl, uz mešanje. Za zapreminu od 600 ml suspenzije upotrebljeno je 34,20 ml 2 M HCl. Količina HCl koju je potrebno dodati zavisi od gustine suspenzije. Ovako tretirane bakterijske ćelije ostavljene su 72 h na temperaturi  $5 \pm 3$  °C.

Suspenzija je zatim centrifugirana 90 min pri brzini od 2000 obr/min. Supernatant je dekantovan, a precipitat je korišćen za ekstrakciju. Precipitatu je dodat pufer za ekstrakciju (tabela 2), mešan je 10 min magnetnom mešalicom i ostavljen 18 h na temperaturi  $5 \pm 3$  °C. Nakon toga je centrifugiran 60 min pri brzini od 11000 obr/min, ekstrakt je odvojen, a precipitat upotrebljen za ponavljanje ekstrakcije. Ekstrakcija je ponovljena još tri puta. Sva četiri ekstrakta su spojena i dijalizirana u puferu za dijalizu (tabela 3), uz česte promene pufera. Dobijeno je 600 ml ekstrakta.

Tabela 2. Pufer za ekstrakciju (0,05M TrisHCl, 1M NaCl, 3M urea, 0,005M EDTA, pH 8,00)

Table 2. The extraction buffer (0,05M TrisHCl, 1M NaCl, 3M urea, 0,005M EDTA, pH 8,00)

Supstanca	Koncentracija, g/L
TrisHCl	7,88
NaCl	58,44
Urea	180,18
EDTA	1,86

Tabela 3. Pufer za dijalizu (0,02M TrisHCl, 0,1M NaCl, pH 8,00)

Table 3. The dialysis buffer (0,02M TrisHCl, 0,1M NaCl, pH 8,00)

Supstanca	Koncentracija, g/L
Tris-HCl	3,15
NaCl	5,84

Na slici 2 prikazan je tok izolovanja i prečišćavanja pertusis toksina iz kulture *Bordetella pertussis*.

### Sterilna filtracija i koncentrovanje ekstrakta

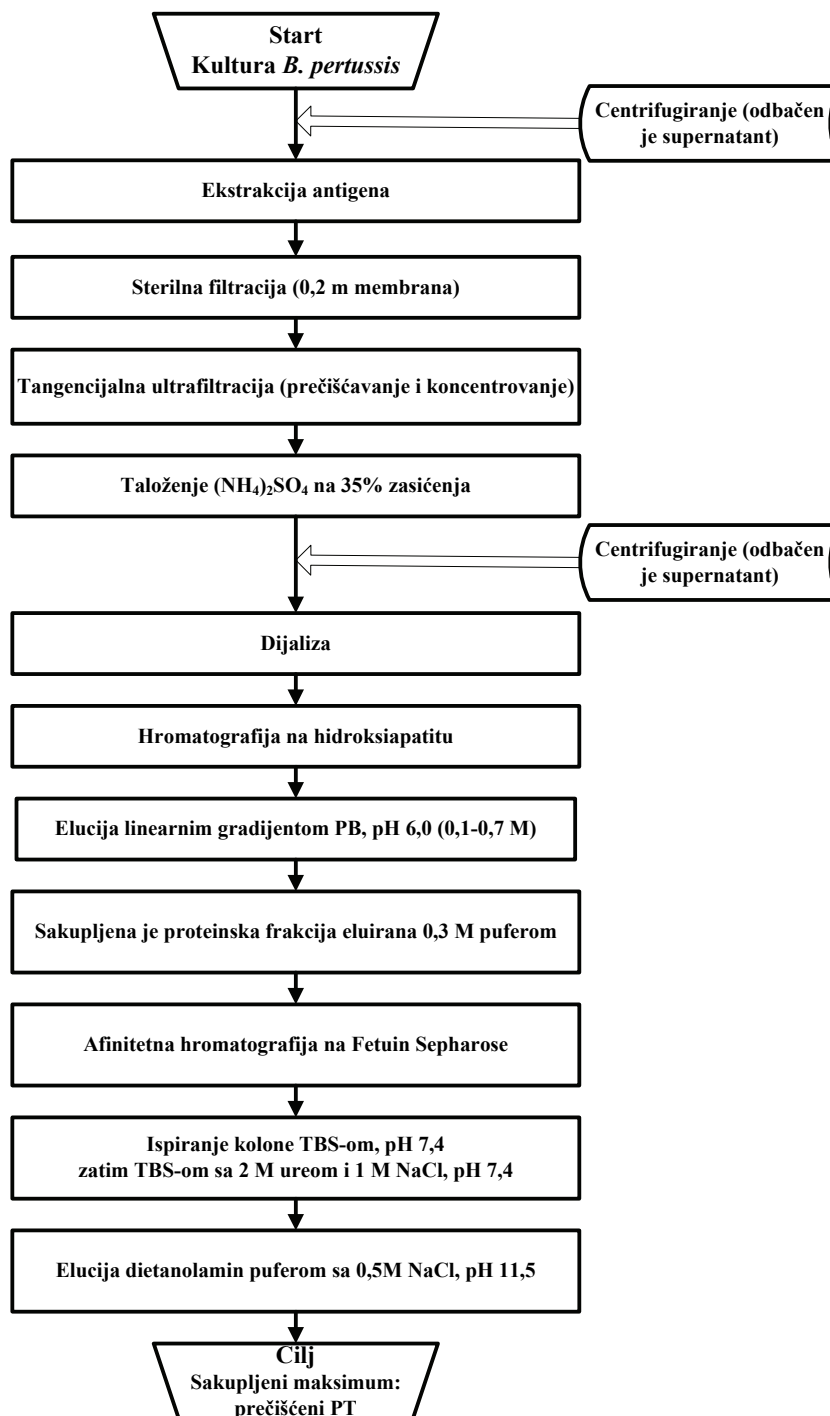
Ekstrakt je bio veoma mutan tako da ga nije bilo moguće odmah sterilno filtrirati, već je bilo neophodno uključiti korak prefiltracije radi razbistravanja. Posle razbistravanja ekstrakt je sterilno profiltrovano. Korišćena je Domnick Hunter kapsula od 0,2  $\mu$ m. 600 ml ekstrakta je koncentrovano tangencijalnom ultrafiltracijom, sistemom Sartocoon micro sa polisulfonskom membranom od 10 kDa na zapreminu od 200 ml.

### Frakciono taloženje amonijum-sulfatom

U ovom radu za frakciono taloženje proteina korišćen je zasićeni rastvor amonijum-sulfata (AS). Po literaturnim podacima [12] preporučuje se taloženje svih proteina sa 74% zasićenja, a zatim postepena ekstrakcija. Ovde nije primenjen takav postupak zato što dobijeni talog nije bio toliko veliki i prilikom pokušaja ekstrakcije vrlo se lako rastvarao, najverovatnije zbog relativno male koncentracije proteina. Zbog toga je primenjen drugi način frakcionog taloženja, a to je postepeno dodavanje zasićenog rastvora amonijum sulfata. Veća količina taloga počela je da se pojavljuje od 25% zasićenja, međutim pri tom zasićenju PT je bio raspoređen i u talogu i u supernatantu. Na 30% zasićenja, više PT-a bilo je u talogu, ali je još uvek jedan deo bio u supernatantu. Na 35% zasićenja ELISA testom je utvrđeno da se celokupna količina toksina nalazi u talogu. Supernatant je odvojen od taloga centrifugiranjem. Koncentracija proteina u 197 ml supernatanta bila je 1,02 mg/ml. Talog je rastvoren do zapremine od 150 ml i izdijaliziran.

### Prečišćavanje proteina hromatografijom na hidroksiapatitu (HAP)

Dobijenih 150 ml rastvora PT-a dijalizirano je u puferu za ekvibraciju kolone hidroksiapatita. Predhodnog dana ekvilibrisana je kolona hidroksiapatita. 150 ml dijalizata je naneto na kolonu. Proteini su eluirani sa četiri eluciona pufera: 0,1, 0,3, 0,5 i 0,7 M PB, pH 6,00. Absorbancija je merena na 280 nm. Za izvođenje hromatografije korišćen je automatizovan Bio Pilot sistem (Amersham Pharmacia). Hromatogram je prikazan na slici 3.



Slika 2. Tok izolovanja i prečišćavanja pertusis toksina iz kulture *Bordetella pertussis*.

Figure 2. Steps in the pertussis toxin isolation and purification from the *Bordetella pertussis* culture.

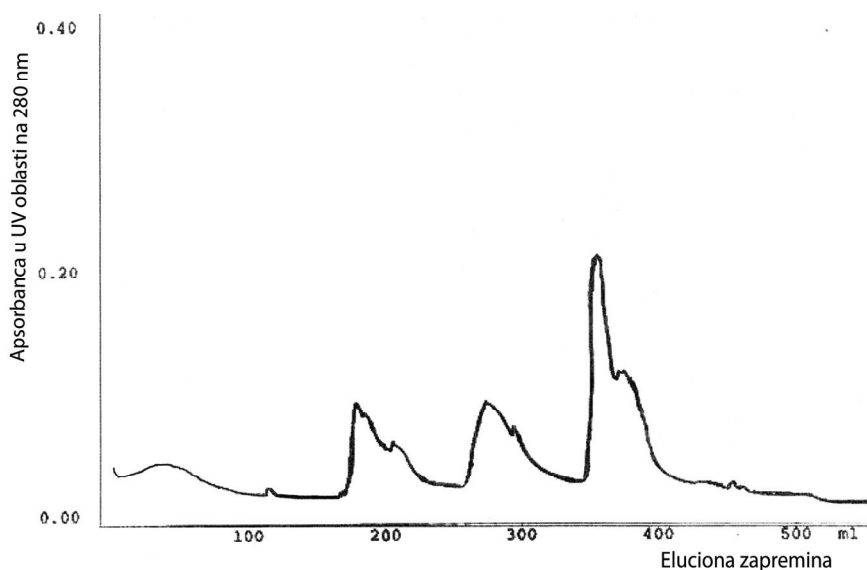
### Priprema afinitetnog matriksa Fetuin Sepharose

Komercijalni matriksi Fetuin Sepharose pokazali su se nepogodnim za eluiranje pertusis toksina koji se za njih veoma čvrsto vezivao. Razlog ove pojave nije utvrđen, ali s obzirom na to da se to ponovilo više puta, za potrebe ovog rada napravljen je matriks. Sepharose CL 4B aktivirana je cijanogen bromidom i za nju je kupovan fetuin. Ovaj matriks dao je veoma dobre rezultate i

pertusis toksin je u aktivnom obliku vrlo jednostavno eluiran sa kolone.

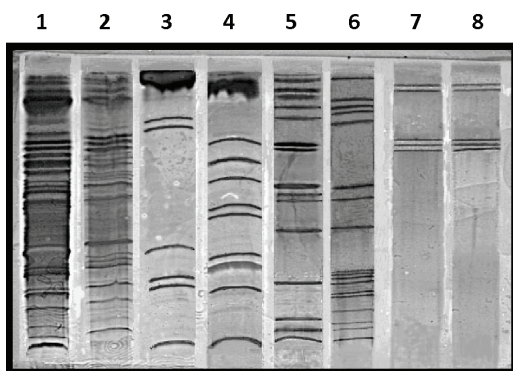
### Izolovanje pertusis toksina hromatografijom na afinitetnoj koloni Fetuin Sepharose

Pripremljeni afinitetni matriks ekvilibrisan je TBS-om. Fetuin Sepharose CL-4B mešana je sa frakcijom 3, eluiranom sa hidroksiapatita, 2 h na 4 °C. Matriksu je



Slika 3. Hromatogram eluiranih proteinskih frakcija sa kolone hidroksi apatita.  
Figure 3. Chromatogram of the eluted protein fractions from hydroxyapatite column.

dodato 16,24 ml frakcije 3, odnosno 0,97 mg pertusis toksina. Smesa je zatim napakovana u kolonu i matriks je nekoliko puta ispran TBS-om. Nevezani proteini eluirani u ovoj frakciji predstavljeni su na slici 4 kao traka 6 gela za SDS PAGE elektroforezu.



Slika 4. SDS PAGE elektroforeza sa proteinskim trakama u različitim fazama izolovanja.  
Figure 4. SDS PAGE electrophoresis with the protein bands, in different phases, during the purification process.

Ispiranje je ponovljeno TBS-om koji sadrži 2 M ureu i 1 M NaCl. U ovom koraku eluiran je deo ukupnih proteina nanetih na kolonu, koji ne prolaze kroz kolonu, već se vezuju, ali manjim afinitetom od PT-a. Ponovljeno je ispiranje TBS-om. PT je eluiran 50 mM diatanolaminom puferom sa 0,5 M NaCl, pH 11,5. SDS-PAGE elektroforetska slika PT frakcije prikazana je u traci 7 na slici 4. Ova frakcija je sakupljena i odmah neutralizovana puferom za neutralizaciju. ELISA testom je potvrđeno prisustvo PT samo u trećoj frakciji i istim testom je određena njegova količina. Dobijeni neutralizovani rastvor PT-a odsoljen je naspram pufera za odsoljavanje i ostavljen je na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Lowry-eva metoda korišćena je za određivanje koncentracije proteina u svim fazama prečišćavanja. BSA (Goveđi serum albumin) upotrebljen je za praviljenje kalibracione prave. Iz jednačine  $y = 0,0049x + 0,0153$  izračunate su koncentracije proteina u ispitivanim uzorcima.

#### Elektroforetska karakterizacija proteina SDS-PAGE elektroforezom

Homogenost proteinskih frakcija u različitim fazama prečišćavanja ispitivana je SDS-PAGE diskontinualnom elektroforezom na Phast sistemu. Koncentracija gela za koncentrovanje bila je 5%, a za razdvajanje upotrebljen je gradijentni gel 10–15%. Koncentracije svih uzoraka bile su oko 0,05 mg/ml. Proteinske trake bojene su srebro-nitratom.

#### Kvalitativno i kvantitativno određivanje PT-a ELISA testom

U ovom radu korišćena je ELISA kao dovoljno osetljiva i efikasna metoda za dokazivanje prisustva PT-a u različitim frakcijama u toku procesa prečišćavanja, a istovremeno i za njegovo kvantifikovanje. Najveći broj ovih testova koristi se kao dijagnostičko sredstvo za određivanje količine antitela na PT u serumima pacijenata. ELISA opisana u ovom radu nije korišćena za određivanje količine antitela na PT, već za identifikaciju i određivanje količine samog toksina. PT je imobilizovan vezivanjem za fetuin kojim je predhodno obložena mikrotitraciona ploča. Korišćene su veće količine fetuina od onih koje se preporučuju zato što su tako dobijeni najbolji rezultati. Zatim su naneti uzorci koji se ispituju na prisustvo PT-a. PT je identifikovan vezivanjem primar-

nog i sekundarnog antitela. Za sekundarno antitelo vezan je enzim alkalna fosfataza koja je identifikovana specifičnim supstratom, a to je *p*-nitro-fenil-fosfat. Izmerena je apsorbancija na 415 nm. Kalibraciona kriva je dobijena korišćenjem razblaženja standarda PT-a Svetske zdravstvene organizacije. Na osnovu kalibracione prave, prikazane na slici 5b, određena je koncentracija PT-a u ispitivanim uzorcima.

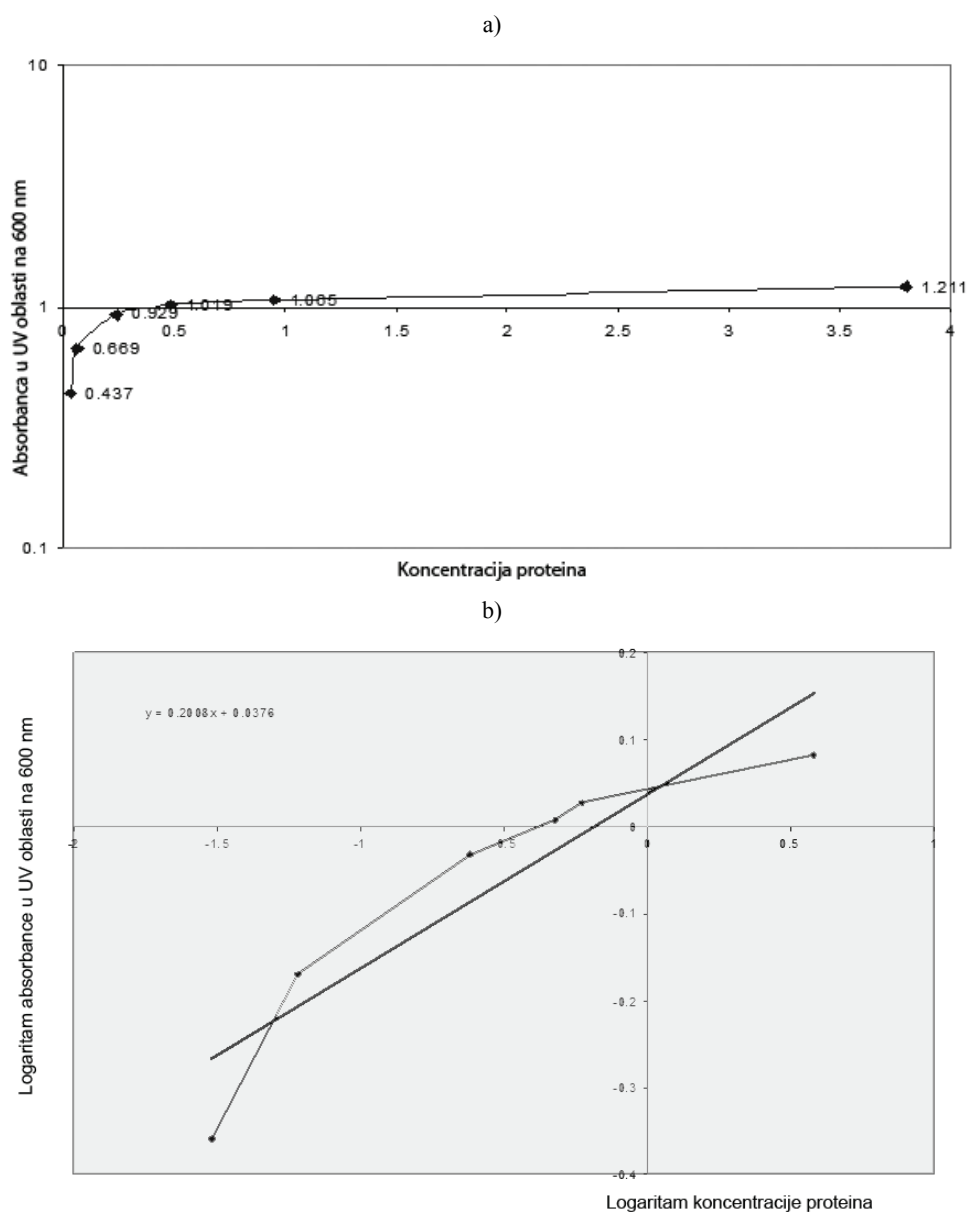
#### Identifikacija antigena imunoelktroforezom

Pored ELISA testa, HPLC-a i SDS-PAGE elektroforeze izolovani protein identifikovan je i imunoelktroforezom. Urađena je imunoelktroforeza sirovog ekstrakta antigena sa početka eksperimenta i predstavljena

je na slici 6. Na drugu ploču za imunoelktroforezu naneti su drugi i treći maksimum sa hromatograma na slici 3 i ova ploča prikazana je na slici 7. Imunoelktroforeza izolovanog pertusis toksina, odnosno treće frakcije sa kolone Fetuin Sepharose i standarda PT-a WHO prikazane su na slici 8 [1,2]. Elektroforetska slika ova dva uzorka prikazana je na slici 9.

#### HPLC – tačna hromatografija visoke efikasnosti

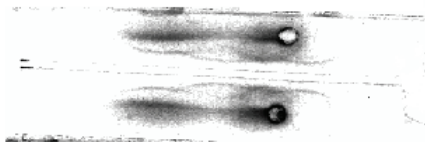
Radi identifikacije i utvrđivanja čistoće izolovanog pertusis toksina urađena je i visoko efikasna tečna hromatografija. Hromatogram izolovanog pertusis toksina, koji je prikazan na slici 10, upoređen je sa hromato-



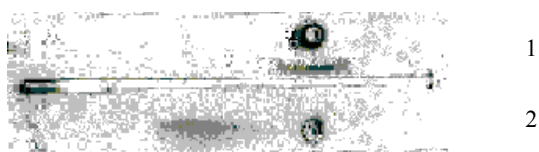
Slika 5. a) Standardna kriva zavisnosti apsorbance u funkciji koncentracije,  $A = f(c)$ , i b) kalibraciona prava zavisnosti logaritma apsorbance u funkciji logaritma koncentracije WHO standarda pertusis toksina.

Figure 5. a) Standard curve of absorbance as a function of concentration,  $A = f(c)$ , and b) of logarithm of concentration by the WHO PT standard.

gramom standarda pertusis toksina (prikazanog na slici 11) Svetske zdravstvene organizacije. Na HPLC kolonu naneto je 500  $\mu$ l dobijenog preparata i 500  $\mu$ l standarda. Koncentracija PT-a u oba uzorka bila je 0,02 mg/ml.



Slika 6. Imunoelektroforeza sirovog ekstrakta antigena sa ovčjim antiserumom na *B. pertussis*.  
Figure 6. Immunoelectrophoresis of the raw antigene extract with sheep antisera to *B. pertussis*.



Slika 7. Imunoelektroforeza HAP maksimum 3 (1 – frakcija III eluirana sa HAP u kojoj se nalazi PT (odgovara traci 5 na slici 4)) i HAP maksimum 2 (2 – frakcija II eluirana sa HAP u kojoj se ne nalazi PT (odgovara traci 4 na slici 4)) Antiserum: ovčji antiserum na *B. pertussis*.  
Figure 7. Immunoelectrophoresis of the HAP maximum 3 (1) and the HAP maximum 2 (2) Antisera: Sheep antisera to *B. pertussis*.



Slika 8. Imunoelektroforeza izolovanog PT-a (1 – precipitirajuća linija izolovanog PT sa kolone Fetuin Sepharose) i WHO standarda PT (2 – precipitirajuća linija PT WHO standarda) Antiserum: ovčji antiserum na *B. pertussis*.  
Figure 8. Immunoelectrophoresis of the isolated PT (1) and the WHO PT standard (2) Antisera: Sheep antisera to *B. pertussis*.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Optimizacija podloge s ciljem povećanja proizvodnje pertusis toksina

U ovom radu ispitivana su dva soja, komercijalni Tohama i autohtoni soj 1772. Sojevi su zasejani na 9 verzija tečne Cohen Wheeler podloga, od kojih je jedna sa skrobom, a preostalih osam bez skroba i svaka sa različitim suplementom. S obzirom na to da su najbolje rezultate dale podloge sa polivinil alkoholom molekulske mase 70 kDa i heptakisom, eksperiment je nastavljen sa ove dve podloge i pomenuta dva soja. Uzorci su uzimani svakih sat vremena od 48 do 54 h kultivacije. Kao rezultat ovog eksperimenta izabran je soj 1772, Cohen Wheeler podloga sa polivinil alkoholom i kultivacija u trajanju od 53 h. U literaturi se preporučuje upo-

treba polivinil alkohola manje molekulske mase, i to između 1,5 i 16 kDa [10]. Dodavanjem polivinil alkohola veće molekulske mase podlozi postignuta je veća proizvodnja PT-a, ne samo u odnosu na drugi polivinil alkohol, već i u poređenju sa heptakisom (dimetil- $\beta$ -ciklodekstrin), koji je po nekim autorima [11] najbolji stimulator proizvodnje PT-a.

### Kultivacija *B. pertussis*

Rast soja 1772, faze I, bio je zadovoljavajući, a izgled kulture je prikazan na slici 1.

### Ekstrakcija antigena *B. pertussis*

Ekstrakcija je uspešno izvedena i od 10000 ml kulture *Bordetella pertussis* dobijeno je 600 ml ekstrakta koncentracije proteina 1,125 mg/ml i koncentracije PT-a 0,0023 mg/ml, što znači da PT čini 0,2% ukupne količine proteina.

### Sterilna filtracija i koncentrovanje ekstrakta

Nakon sterilne filtracije i ultrafiltracije, koncentracija proteina je iznosila 3,34 mg/ml, što znači da su gubici u ovom koraku bili oko 1%.

### Frakciono taloženje amonijum sulfatom

U tabeli 4 prikazane su dobijene koncentracije ukupnih proteina i pertusis toksina u talogu i u supernatantu posle taloženja amonijum sulfatom. U supernatantu je ostalo 200,94 mg proteina, što je 30% u odnosu na količinu od 675 mg u početnom bakterijskom ekstraktu, što znači da je u ovom koraku postignuto prečišćavanje od 30%.

### Prečišćavanje proteina hromatografijom na hidroksiapatitu (HAP)

Dobijene su tri proteinske frakcije koje su predstavljene hromatogramom na slici 3. Na slici 4, u trakama 3, 4 i 5, prikazana je SDS PAGE elektroforeza proteina u ovim frakcijama.

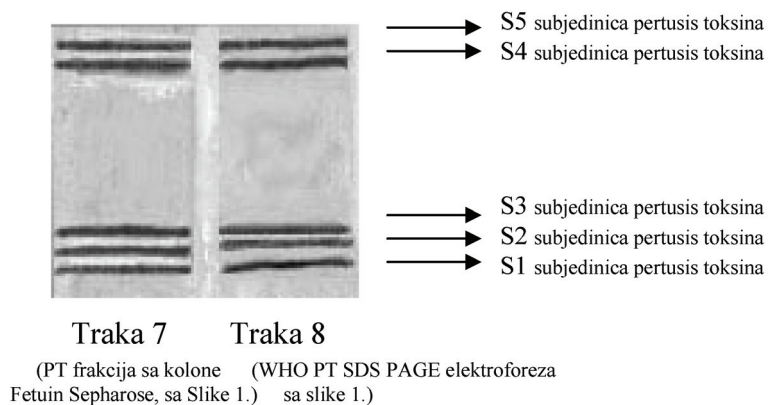
Ukupna zapremina sve tri sakupljene frakcije bila je 68,68 ml. U tabeli 5 date su površine maksimuma, zapremine i koncentracije proteina u ovim frakcijama.

Postignuto je veoma dobro razdvajanje proteina linearnim gradijentom fosfatnog pufera koji je korišćen za eluciju, zato što nema distribucije PT-a između II i III pika. ELISA testom utvrđeno je da se PT nalazi samo u frakciji 3. U tabeli 6 prikazane su koncentracije PT-a u sva tri maksimuma određene ELISA testom.

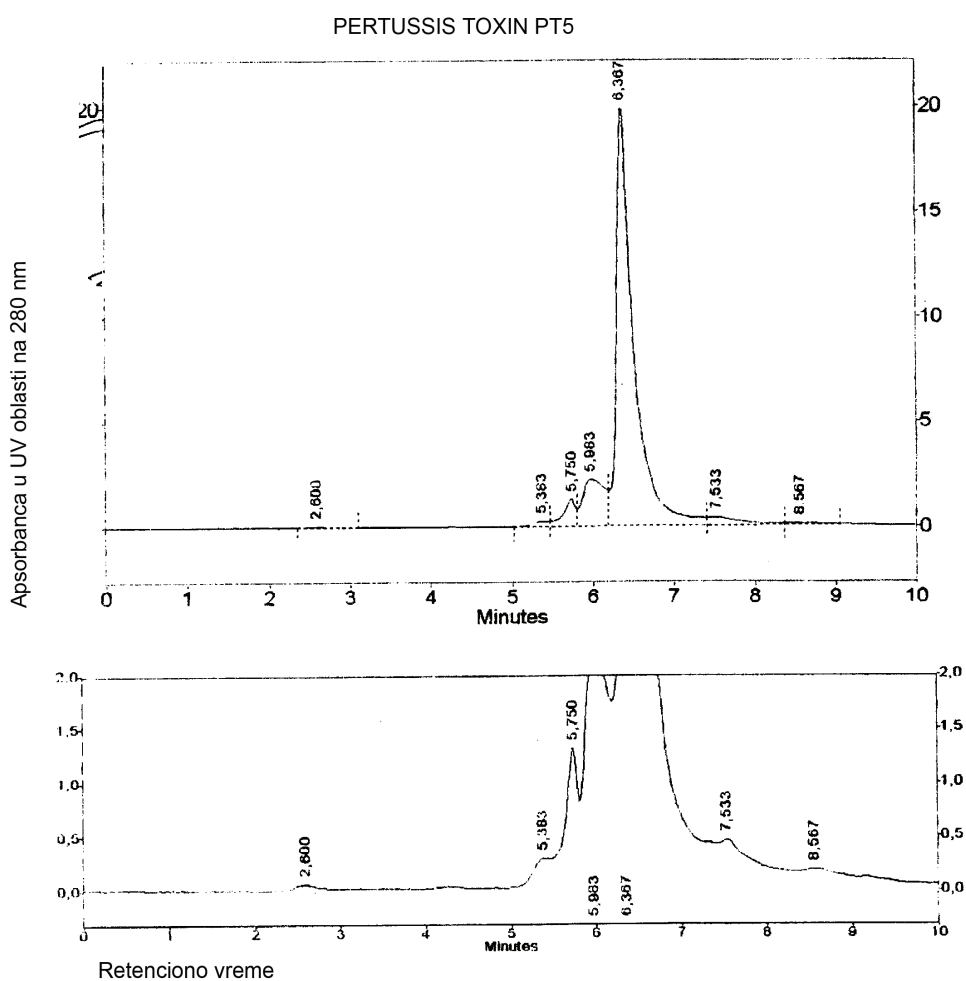
U 600 ml polaznog ekstrakta antigena bilo je ukupno 1,40 mg PT-a, a u 16,24 ml frakcije 3 sa hidroksiapatita 0,97 mg, što predstavlja 69,70% i gubitak PT-a, zaključno sa ovom fazom izolovanja, od 30,30%.

### Prpriprema afinitetnog matriksa Fetuin Sepharose

Napravljeni matriks Fetuin Sepharose dao je daleko bolje rezultate od komercijalnog.



Slika 9. Subjedinice molekula pertusis toksina.  
 Figure 9. Pertussis toxin molecule's subunits.



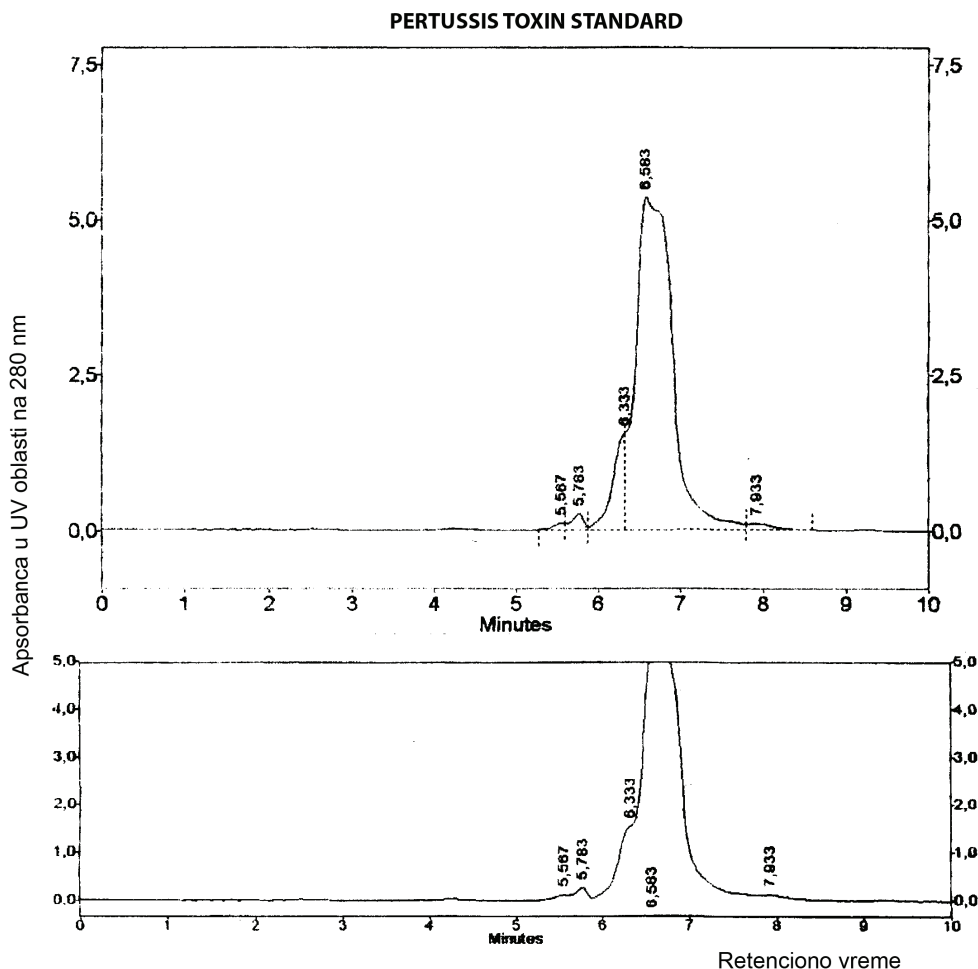
Slika 10. HPLC hromatogram izolovanog pertusis toksina.  
 Figure 10 HPLC chromatogram of the isolated pertussis toxin.

#### Izolovanje pertusis toksina hromatografijom na afinitetnoj koloni Fetuin Sepharose

U tabeli 7 date su koncentracije ukupnih proteina i koncentracije PT-a u sve tri frakcije eluirane sa Fetuin Sepharose.

S obzirom da je u 600 ml ekstrakta antigena na početku izolovanja bilo 1,4 mg PTa, a da je u poslednjoj frakciji sa Fetuin Sepharose njegova količina bila 0,78 mg, prinos PT-a u ovom eksperimentu bio je 56%. Step prečišćavanja izračunat je iz odnosa količine PT-a u poslednjoj frakciji i količine ukupnih proteina u toj frak-





Slika 10. HPLC hromatogram izolovanog pertusis toksina.  
Figure 10. HPLC chromatogram of the isolated pertussis toxin.

ciji koja je iznosila 0,98 mg. Step en prečišćavanja PT-a iznosio je 80,60%. Čistoća PT frakcija potvrđena je i visoko efikasnom tečnom hromatografijom. Hromatogram je prikazan na slici 10. i upoređen je sa hromatogramom standarda WHO koji je prikazan na slici 11.

Tabela 4. Koncentracije ukupnih proteina i PT-a posle prečišćavanja amonijum sulfatom u talogu i u supernatantu  
Table 4. Total protein and the PT concentrations after ammonium sulphate purification step in precipitate and supernatant

Uzorak	Koncentracija ukupih proteina, mg/ml	Koncentracija PT-a, mg/ml
Talog	3,12	0,008
Supernatant	1,02	–

#### Elektroforetska karakterizacija proteina SDS-PAGE elektroforezom

Na slici 4 prikazan je gel sa proteinskim trakama u različitim fazama izolovanja. Brojevima su označeni položaji proteinskih traka.

Tabela 5. Površina maksimuma, zapremina i koncentracija proteina u tri frakcije eluirane sa kolone hidroksiapatita  
Table 5. Peak areas, eluted volumes and the protein concentrations in three fractions eluted from hydroxyapatite column

Pik	Površina, %	Zapremina, ml	Koncentracija proteina mg/ml
I	20,75	19,7	4,93
II	30,26	32,74	4,33
III	48,99	16,24	14,13

Tabela 6. Koncentracije PT-a u tri maksimuma eluirana sa kolone HAP  
Table 6. The PT concentrations in three peaks eluted from hydroxyapatite column

Pik	I	II	III
c(PT) / mg ml <sup>-1</sup>	x	x	0,06

Traka 1 – koncentrovani ekstrakt antigena; traka 2 – supernatant kulture *B. pertussis*; traka 3 – frakcija 1 eluirana sa kolone HAP, predstavljena hromatogramom na slici 3 (odgovara prvom maksimumu na hromatogramu); traka 4 – frakcija 2 eluirana sa kolone HAP (od-

Tabela 7. Koncentracija ukupnih proteina i PT-a u tri frakcije eluirane sa Fetuin Sepharose  
Table 7. Total protein and the PT concentrations in three fractions eluted from Fetuin Sepharose column

Uzorak	Zapremina, ml	Koncentracija ukupnih proteina, mg/ml	Koncentracija PT-a, mg/ml
Nevezana frakcija	10	15,14	–
TBS + 2M urea + 1M NaCl	7,4	10,41	–
PT frakcija	6,4	0,153	0,1225

govara drugom maksimumu na hromatogramu); traka 5 – frakcija 3 eluirana sa kolone HAP (odgovara trećem maksimumu na hromatogramu); traka 6 – nevezana frakcija sa kolone Fetuin Sepharose; traka 7 – PT frakcija sa kolone Fetuin Sepharose; traka 8 – WHO PT standard.

Trake 7 i 8 sa slike 4 u kojima se vide dva uzorka pertusis toksina razdvojenog na subjedinice, prikazane su na slici 9.

#### Kvalitativno i kvantitativno određivanje PT-a ELISA testom

Na osnovu kalibracione prave, prikazane na slici 5b, određena je koncentracija PT-a u ispitivanim uzorcima.

#### Identifikacija antigena imunoelektroforezom

Urađena je imunoelektroforeza sirovog ekstrakta antigena sa početka eksperimenta i predstavljena je na slici 6. Na drugu ploču za imunoelektroforezu naneti su drugi i treći maksimum sa hromatograma na slici 3, i ova ploča prikazana je na slici 7. Imunoelektroforeza izolovanog pertusis toksina, odnosno treće frakcije sa kolone Fetuin Sepharose i standarda PT-a WHO prikazane su na slici 8 [1,2]. Elektroforetska slika ova dva uzorka prikazana je na slici 9. Imunoelektroforezom je dokazano da precipitirajuća linija izolovanog PT-a odgovara precipitirajućoj liniji standarda PT-a WHO.

#### HPLC – Tečna hromatografija visoke efikasnosti

Na osnovu hromatograma može se konstatovati da su retenciona vreme glavnog sastojka preparata PT i standarda WHO vrlo slična (6,367, odnosno 6,583 min), da u izolovanom preparatu PT ima šest sporednih sastojaka (slika 10), dok u WHO standardu ima četiri (slika 11) i da je čistoća dobijenog PT preparata 80,39%, a WHO standarda 88,66%.

#### ZAKLJUČAK

U poslednjih deset godina u razvijenim zemljama primenjuje se isključivo acelularna vakcina za imunizaciju protiv velikog kašlja, s obzirom na to da je dugogodišnjim ispitivanjima potvrđeno da je jednako imunogena, a sa mnogo manje sporednih neželjenih efekata u odnosu na klasičnu vakcinu sa celom bakterijskom ćelijom. Od tada su veoma aktuelna istraživanja koja se odnose na definisanje najjednostavnijeg i najekonomič-

nijeg načina, uz primenu različitih metoda izolovanja i prečišćavanja proteina, za dobijanje pojedinačnih antigena bakterije *Bordetella pertussis*, među kojima se na prvom mestu nalazi pertusis toksin. Ove pojedinačne komponente u različitom sastavu i koncentracijama, svetske kompanije sa razvijenom biotehnoškom proizvodnjom koriste za generisanje svojih formulacija i dobijanje acelularnih vakcina.

U ovom radu postignuto je izolovanje i prečišćavanje pertusis toksina iz jednog autohtonog soja bakterije *Bordetella pertussis*, uz optimizaciju mikrobiološke podloge i dužine kultivacije, kako bi količina pertusis toksina u bakterijskoj ćeliji bila što veća. U daljem radu korišćene su poznate metode i tehnike za izolovanje i prečišćavanje proteina u do sada jedinstvenoj kombinaciji i uz određene modifikacije, a koje su značajno doprinele toku prečišćavanja pertusis toksina i zadovoljavajućem prinosu.

Izolovani pertusis toksin identifikovan je imunoelektroforezom, a poređenjem sa standardom Svetske zdravstvene organizacije utvrđeno je da precipitirajuća linija izolovanog PT-a, odgovara precipitirajućoj liniji standarda.

Urađena je i tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC). Zaključeno je da su retenciona vremena izolovanog PT-a i standarda WHO vrlo slična i da nema sumnje da je izolovan pertusis toksin. Čistoća dobijenog preparata PT iznosila je 80,39%, uz prinos od 56%, dok je čistoća PT standarda bila 88,66%.

S obzirom da je izolovanje antigena *B. pertussis*, a posebno pertusis toksina još uvek oblast intenzivnih istraživanja, zaključak ovog rada je da bez obzira na literaturne podatke i preporuke različitih autora sve metode i uslove rada treba ispitati i optimizovati, kako zbog mogućih specifičnosti autohtonih sojeva, tako i zbog čestih promena laboratorijskih tehnika rada u ovoj oblasti, a koje se odnose na načine izolovanja i prečišćavanja pertusis toksina i drugih antigenih komponenata bakterije *B. Pertussis*.

#### LITERATURA

- [1] M. Pittman, The concept of pertussis as a toxin-mediated disease, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **3** (1984) 467–486.
- [2] Medical Research Council, The prevention of whooping cough by vaccination, *Brit. Med. J.* **1** (1951) 1463–1471.
- [3] C.L. Cody, L.J. Baraff, J.D. Cherry, S.M. Marcy, C.R. Manclark, The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children, *Pediatrics* **68** (1981) 650–60.

- [4] A.H. Griffith, Medicine and the media-vaccination against whooping cough, *J. Biol. Stand.* **9** (1981) 475–482.
- [5] Y. Sato, M. Kimura, H. Fukumi, Development of pertussis component vaccine in Japan, *Lancet* **1** (1984) 122–126.
- [6] National Institutes of Health Pertussis Conference, Acellular pertussis vaccine trials: results and impact on U.S. public health, Washington DC, 1996.
- [7] T. Aoyama, Acellular pertussis vaccines developed in Japan and their application for disease control, *J. Infect. Dis.* **174** (1996) 264–269.
- [8] Center for Disease Control Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Recommendations, Pertussis Vaccination: 2000 Childhood Immunization Schedule, *J. Am. Med. Ass.* **283** (2000) 876–878.
- [9] S.M. Cohen, M.W. Wheeler, Pertussis vaccine prepared with phase I cultures grown in fluid medium, *Am. J. Publ. Health* **36** (1946) 371–376.
- [10] E. Hewlett, J. Wolff, Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization, *J. Bacteriol.* **127** (1976) 890–898.
- [11] A. Imaizumi, Y. Suzuki, S. Ono, H. Sato, Y. Sato, Hep-takis(2,6-O-dimethyl)- $\beta$ -cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I, *J. Clin. Microbiol.* **17** (1983) 781–786.
- [12] A.C. Wardlaw, R. Parton, Pathogenesis and Immunity in Pertussis, John Wiley & Sons, New York, 1988.

## SUMMARY

### NEW COMBINATION OF METHODS FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF PERTUSSIS TOXIN FROM THE *Bordetella pertussis* CULTURE

Katarina B. Pavlović, Vojislav N. Božanić

Faculty of Organizational Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(Professional paper)

In this paper a method for isolation and purification of the pertussis toxin from the cell culture of *Bordetella pertussis* was presented. Pertussis toxin production was enhanced with the optimization of the microbiological media and cultivation time. Relatively high degree of purification of 80,39% and yield of 56% was resulted by the unique combination of the protein isolation and purification methods. Using immunoelectrophoresis and high performance liquid chromatography, in comparison with pertussis toxin WHO standard, it was verified that the protein isolated is indeed pertussis toxin. The conclusion of this paper is that this unique combination of the different techniques along with the specific modifications implemented would give good results in pertussis toxin isolation and purification on laboratory level, while scaling up of this methodology could be the objective of future research. It can also be concluded that, no matter what literature data say and what opinions other authors have, all methods and working conditions should be examined and optimized for the reason of the specificity of the autochthonous species as well as the dynamic changes in this field.

Ključne reči: *Bordetella pertussis* • Pertusis toksin • Acellularna pertusis vakcina • Izolovanje i prečišćavanje pertusis toksina

Key words: *Bordetella pertussis* • Pertussis toxin • Acellular pertussis vaccine • Isolation and purification of pertussis toxin