

Metody izolowania, oczyszczania i renaturacji rekombinowanych białek otrzymywanych w bakteriach *Escherichia coli*

Andrzej Szczepanek¹
Andrzej Płucienniczak^{1,2}

1. Wstęp

Metody rekombinacji DNA umożliwiają otrzymywanie znacznych ilości cennych polipeptydów dla celów klinicznych (szczepionki, leki) i przemysłowych (enzymy). Otrzymane tą drogą białka są najczęściej znacznie tańsze od izolowanych z naturalnych źródeł. Techniki inżynierii genetycznej mogą też być jedynym sposobem otrzymania pewnych polipeptydów. Umożliwiają na przykład otrzymanie stabilnych białek prekursorowych, których pozyskiwanie ze źródła naturalnego jest niemożliwe, gdyż są bardzo szybko modyfikowane po translacji. Otrzymane białka prekursorowe mogą być cennym źródłem informacji o procesach prowadzących do powstania dojrzałej cząsteczki tych białek (1,2).

Jako organizmy gospodarza do ekspresji obcych (rekombinowanych) genów wykorzystuje się bakterie, drożdże, rośliny oraz hodowle komórek owadzych i ssaczy.

Spośród bakterii do ekspresji obcych genów najczęściej wykorzystywana jest *Escherichia coli*. Dla potrzeb inżynierii genetycznej wykorzystuje się defektywne mutanty K-12 i χ 1776 o ograniczonej możliwości przeżycia poza warunkami laboratoryjnymi.

Wektory plazmidowe wprowadza się do komórek *E. coli* bezpośrednio poprzez transformację. Do ekspresji genów kodujących pożądane białka wykorzystywane są najczęściej promotory bakteryjne *lac*, *trp*, *tac* oraz *P_l* faga λ . Zastosowanie promotora *P_l* regulowanego termolabilnym represorem pozwala na włączenie ekspresji genu po namnożeniu bakterii poprzez czasowe podwyższenie temperatury hodowli. Umożliwia to otrzymanie białek, których obecność w komórce hamuje podziały komórkowe (3,4,5).

Ekspresja obcych genów w *E. coli* może prowadzić do znacznej nadprodukcji oczekiwanego polipeptydu, dochodzącej do 50% całkowitej zawartości białka w komórce (6,7).

¹ Zakład Badawczo-Wdrożeniowy i Inżynierii Genetycznej Terpol w Sieradzu, Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA.

² Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi.

Rekombinowane białko może być wytwarzane w postaci wolnej, gdy w wektorze ekspresyjnym bezpośrednio po sekwencjach regulacyjnych zaczyna się gen kodujący pożądaną białko. Często jednak w przypadku niewielkich polipeptydów i białek o właściwościach toksycznych dla bakterii nie można uzyskać bezpośrednio ekspresji wprowadzonego genu. Ponadto wysoka aktywność proteolityczna bakterii skierowana przeciwko obcemu białku może powodować jego całkowitą degradację w ciągu kilku minut (8). Wydajną ekspresję można w tych przypadkach osiągnąć poprzez dołączenie sekwencji kodującej oczekiwane białko do genu kodującego białko bakteryjne (lub jego część), stanowiące rodzaj nośnika. Białka powstałe w wyniku ekspresji tak skonstruowanych genów określa się jako fuzyjne, hybrydowe lub chimeryczne. Jako białka nośnikowe wykorzystywane są najczęściej enzymy (lub ich fragmenty) naturalnie występujące w komórkach *E. coli*: β -galaktozydaza (9), galaktokinaza (10), β -laktamaza (11) lub białko kodowane przez gen *CII* faga λ (5). Białka fuzyjne osiągają najczęściej wysoki poziom ekspresji, a ponadto są znacznie bardziej odporne na proteolizę od polipeptydów otrzymanych w stanie wolnym.

Dodatkowe sekwencje dołączane są również w celu efektywnego oczyszczenia białka fuzyjnego za pomocą chromatografii immunopowinowactwa (złożone z immobilizowanymi przeciwciałami), chromatografii powinowactwa typu enzym:substrat (złożone z immobilizowanym substratem) lub chromatografii typu *metal chelate affinity chromatography* (złożone z immobilizowanym jonem metalu).

Ekspresja genów w postaci białek fuzyjnych pociąga za sobą konieczność oddzielenia właściwego polipeptydu od fragmentu nośnikowego. W tym celu w miejscu łączenia obu części białka fuzyjnego wprowadza się (na etapie konstrukcji wektora ekspresyjnego) aminokwasy tworzące wiązania rozpoznawane przez specyficzne proteazy lub ulegające łatwo hydrolizie chemicznej (6) (tab. 1). Hydroliza enzymatyczna jest bardziej specyficzna od chemicznej (nie występuje rozrywanie przypadkowych wiązań peptydowych), ale znacznie bardziej kosztowna.

Białka otrzymane w postaci fuzji z białkiem nośnikowym nie zawsze wymagają oddzielenia od nośnika, np. białka fuzyjne złożone z fragmentów białek wirusowych i β -galaktozydazy stosowano jako antygeny w testach diagnostycznych służących do oznaczania przeciwciał przeciw wirusowi HIV (12). W przypadku niewielkich polipeptydów połączenie z większym białkiem nośnikowym zwiększało ich immunogenność przy otrzymywaniu przeciwciał (13).

Rekombinowane białka otrzymywane w *E. coli* mogą być wydzielane do cytoplazmy, przestrzeni periplazmatycznej oraz na zewnątrz komórki bakteryjnej, pozostając w formie rozpuszczalnej lub częściej w postaci nierozpuszczalnych agregatów zwanych ciałkami inkluzyjnymi (ang. *inclusion bodies*). Białka wydzielane poza komórkę bakteryjną są na ogół rozpuszczalne, ale poziom ekspresji nie przekracza najczęściej 1% całkowitej zawartości białka w komórce *E. coli*. Białka wydzielane do cytoplazmy częściej tworzą ciałka inkluzyjne niż białka wydzielane do periplazmy (14).

TABELA 1
STOSOWANE METODY ROZCINANIA BIAŁEK FUZYJNYCH (6)

Rozrywane wiązanie peptydowe	Czynnik trawiący
↓ —Met—X—	bromocyjan
↓ —Asp—Pro—X—	hydroliza kwaśna (pH = 2)
↓ —Asn—Gly—X—	hydroksyloamina
↓ —Ile—Glu—Gly—Arg—X—	czynnik Xa
↓ —Arg(Lys)—X—	trypsyna
↓ —Pro α-2 kolagen—X—	kolagenaza
↓ —(Asp) ₄ —Lys—X—	enterokinaza
↓ His—Pro—His—Pro—His—Pro—X—	aminopeptydaza IV
↓ —X—Arg—Arg—Arg—Arg	karboksypeptydaza B

X — dowolny aminokwas.

Nie udało się dotychczas ustalić warunków, które powodują, że jedne rekombinowane białka otrzymywane w *E. coli* są rozpuszczalne, a inne tworzą ciała inkluzyjne (15). Nie jest również w pełni poznany mechanizm tworzenia ciałek inkluzyjnych.

Rozpuszczalność rekombinowanych białek otrzymywanych w *E. coli* nie jest związana z ich pochodzeniem. W przeglądowej pracy Kene i Hartleya z 34. białek pochodzących z bakterii (w tym z *E. coli*), wirusów, drożdży i ssaków, otrzymywanych w komórkach *E. coli* tylko 11 pozostawało w supernatancie po odwirowaniu lizatu bakteryjnego. Nie stwierdzono również korelacji między rozpuszczalnością otrzymywanych białek a zastosowanym promotorem. Na rozpuszczalność nie ma wpływu również masa cząsteczkowa polipeptydu — ciała inkluzyjne tworzy zarówno ludzki komplement C5a o masie 8 kDa, jak i rewertaza wirusa HIV o masie 66 kDa. Tworzenie przez rekombinowane białko nierozpuszczalnych agregatów nie jest też spowodowane jego nadprodukcją. Aspartaza otrzymywana w formie rozpuszczalnej w *E. coli* stanowiła aż 30% całkowitej masy białek w komórce. Również fuzja nierozpuszczalnego białka z dobrze rozpuszczalnym białkiem nośnikowym nie zawsze daje rozpuszczalny produkt. Na rozpuszczalność białek otrzymywanych w *E. coli* również, jak się wydaje, nie ma wpływu zawartość wiązań dwusiarczkowych (nawet białka nie zawierające cystein mogą być nierozpuszczalne) oraz ich hydrofilowo/hydrofobowy charakter (7).

Rozpuszczalność rekombinowanych białek maleje w sposób istotny wraz

ze wzrostem procentowej zawartości proliny w białku (16), co można tłumaczyć brakiem u *E. coli* eukariotycznego enzymu biorącego udział w potranslacyjnej modyfikacji polipeptydów, izomerazy *cis-trans* prolylo-peptydylowej (ang. *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*, PPI) (17).

Obniżenie temperatury hodowli bakterii z 37 do 30°C może prowadzić do znacznego zwiększenia rozpuszczalności otrzymanego białka (ludzki interferon $\alpha 2$ i γ) nawet z 18 (hodowla w 37°C) do 95% (hodowla w 30°C) (17).

Przybycien i współ. zaobserwowali zmiany struktury II-rzędowej β -lakta-mazy otrzymywanej z ciałek inkluzyjnych w bakteriach *E. coli* hodowanych w temperaturze 37 i 42°C.

W wyższej temperaturze następował ubytek struktury α helisy na korzyść struktury β , która *in vitro* sprzyja agregacji łańcuchów polipeptydowych (18).

Moore i współ. zaobserwowali wzrost rozpuszczalności rekombinowanego białka wraz ze wzrostem żywności pożywki zastosowanej do hodowli bakterii. Bakterie *E. coli* hodowane we wzbogaconej pożywce wytwarzały dwukrotnie więcej aktywnej dezaminazy deoksycytydylanu faga T4 niż hodowane w standardowej pożywce LB (pożywka wg Luria-Bertani), a dziewięciokrotnie więcej w stosunku do pożywki minimalnej M9. Podobny efekt uzyskano również w przypadku ludzkiej dezaminazy dCMP, endonukleazy faga T4 i muteiny syntetazy tymidylanu (19).

Dwukrotny wzrost rozpuszczalności ludzkiego hormonu wzrostu uzyskano, gdy w *E. coli* obok plazmidu zawierającego gen hormonu wzrostu, jednoczesnej ekspresji poddawano plazmid kodujący bakteryjne białko DnaK (20). Białko to wraz z innymi białkami *E. coli* z grupy białek szoku termicznego (DnaJ, GrpE, GroEL, GroES), określanych w literaturze jako *chaperonin proteins*, bierze udział w budowaniu prawidłowej konformacji polipeptydów syntetyzowanych w *E. coli* (21), a *in vitro* zapobiega tworzeniu agregatów w trakcie renaturacji zdenaturowanych polipeptydów (22).

Pozytywne rezultaty uzyskano również przy jednoczesnej ekspresji w *E. coli* karboksylazy rybulozodwufosforanu i białek GroEL i GroES (23).

Przyczyną nierozpuszczalności białek otrzymywanych w *E. coli* może być to, że często są to wybrane fragmenty białek (np. zawierające ważne antygenowo epitopy), które same nie są zdolne do utworzenia prawidłowej, natywnej konformacji.

W przypadku białek eukariotycznych otrzymywanych w *E. coli* tworzenie się ciałek inkluzyjnych może wynikać z różnic w funkcjonowaniu aparatu translacji u Eukariota i Prokariota.

U Prokariota translacja jest ściśle powiązana z transkrypcją i zachodzi znacznie szybciej niż w komórkach eukariotycznych. Bakteryjny mRNA jest nietrwały i jest poddawany translacji *in statu nascendi* w kompleksie transkrypcyjno-translacyjnym.

Według C. Schein przyczyny formowania się rekombinowanych białek eukariotycznych w ciałka inkluzyjne mogą być następujące (17):

— wysoka lokalna koncentracja białka w komórce *E. coli* prowadząca do niespecyficznego agregacji łańcuchów polipeptydowych,

— brak kompartmentacji w komórce bakteryjnej co powoduje, że synteza białka zachodzi w środowisku o potencjale redukującym, w którym nie mogą powstać mostki dwusiarczkowe, niezbędne do utworzenia prawidłowej konformacji białka,

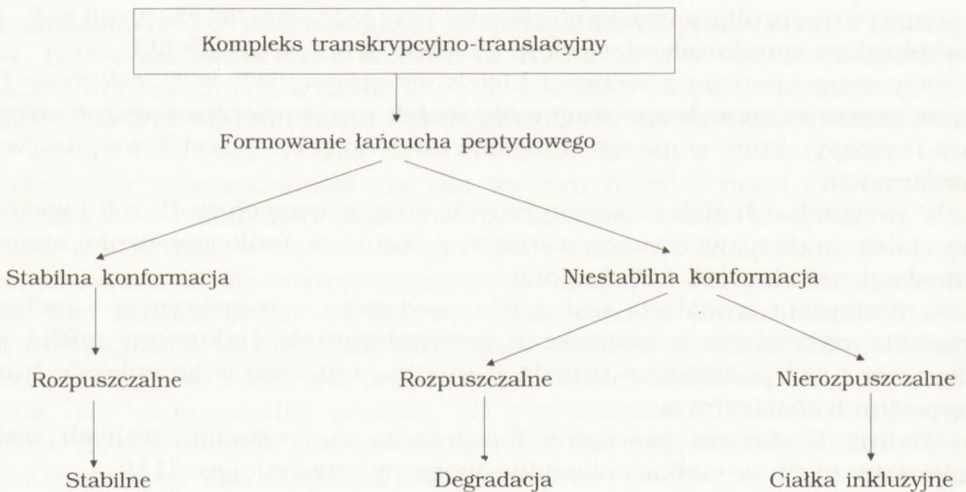
— brak eukariotycznych enzymów biorących udział w procesie formowania się łańcucha polipeptydowego (białkowej izomerazy dwusiarczkowej — PDI, izomerazy *cis-trans* prolylo-peptydylowej — PPI, tioredoksyny) i jego potranslacyjnej modyfikacji (fosforylacji, glikozylacji),

— sztywność łańcucha polipeptydowego i nietrwałość trzeciorzędowej struktury większości białek sprzyjają agregacji.

Autorka wymienia jako mniej prawdopodobną przyczynę wysokie tempo syntezy białek u *E. coli*, za którym nie nadąża proces składania łańcucha polipeptydowego.

Fakt uzyskania rekombinowanego białka w postaci ciałek inkluzyjnych ma również niepodważalne zalety. Ciałka inkluzyjne zawierają prawie czyste białko (nawet do 95%) w formie łatwej do wyizolowania z bakterii. Ponadto białko zagregowane w postaci ciałek inkluzyjnych jest znacznie bardziej odporne na proteolizę niż białka rozpuszczone w cytoplazmie. Często wysoka aktywność proteolityczna skierowana przeciwko otrzymywanemu białku powoduje, że bardzo krótki czas półtrwania białka w komórce nie pozwala w ogóle na jego wyizolowanie. Pozytywny rezultat można uzyskać przez zastosowanie mutantów *E. coli lon* i *htpR* nie posiadających dwóch aktywności proteolitycznych (7).

Według Kane i Hartleya, gdy rekombinowane białka otrzymywane w *E. coli* uzyskują stabilną konformację są rozpuszczalne i nie ulegają degradacji, a gdy konformacja jest niestabilna to o ile są rozpuszczalne, ulegają szybko degradacji, a nierozpuszczalne tworzą ciała inkluzyjne (rys. 1) (7).



Rys. 1. Losy rekombinowanych białek w komórkach *Escherichia coli* (7).

W białkach syntetyzowanych w *E. coli* pierwszym aminokwasem jest formylowana metionina, która w naturalnych białkach bakterii po usunięciu grupy formylowej jest odłączana przez aminopeptydazy. W białkach rekombinowanych otrzymywanych w *E. coli* początkowa metionina jest deformylowana, ale nie zawsze ulega odłączeniu. N-końcowa metionina stanowi dodatkową determinantę antygenową nie występującą w naturalnym białku, co może obniżać jego wartość użytkową. Konieczne jest wówczas enzymatyczne usunięcie początkowej metioniny *in vitro* (6).

Na podstawie badania sekwencji białek zarówno eukariotycznych jak i prokariotycznych ustalono, że warunkiem odłączenia N-końcowej metioniny *in vivo* przez aminopeptydazy *E. coli* jest występowanie na drugiej pozycji aminokwasu o krótkim łańcuchu bocznym (Gly, Ala, Cys, Ser, Thr, Val, Pro) (6). Reguła ta nie potwierdziła się w przypadku ludzkiej interleukiny 2 (6) i szczurzej hydroksylazy fenyloalaninowej (24) otrzymywanych w *E. coli*. W obu przypadkach na drugiej pozycji występowała alanina, a mimo to odpowiednio 90 i 25% otrzymanych łańcuchów polipeptydowych zachowało N-końcową metioninę. Przyczyną może być niewystarczająca aktywność aminopeptydazowa *E. coli* przy dużej nadprodukcji rekombinowanego białka (25).

2. Systemy sekrecji rekombinowanych białek poza komórkę *E. coli*

2.1. Otrzymywanie białek wydzielanych do przestrzeni periplazmatycznej

Poziom ekspresji rekombinowanych białek wydzielanych do przestrzeni periplazmatycznej jest najczęściej znacznie niższy niż w przypadku białek pozostających w cytoplazmie (14). Sekrecja rekombinowanego białka do periplazmy zwiększa znacznie prawdopodobieństwo otrzymania rozpuszczalnego, stabilnego i aktywnego produktu (17). Oksydacyjny potencjał środowiska w przestrzeni periplazmatycznej sprzyja stabilizacji wiązań dwusiarczkowych w łańcuchach polipeptydowych (26). Białka wydzielone do periplazmy są w mniejszym stopniu narażone na degradację proteolityczną, gdyż w przestrzeni periplazmatycznej stwierdzono tylko 2 aktywności proteolityczne (7), np. proinsulina zlokalizowana w periplazmie jest 10 razy bardziej stabilna w porównaniu z otrzymaną w cytoplazmie *E. coli* (14). Znacznie łatwiejsze jest również wyizolowanie rekombinowanych białek z przestrzeni periplazmatycznej niż z cytoplazmy.

W celu uzyskania sekrecji do przestrzeni periplazmatycznej do sekwencji właściwego polipeptydu musi być dołączony peptyd sygnałowy, który zostaje odcięty w czasie przechodzenia polipeptydu przez błonę cytoplazmatyczną. Znana jest sekwencja aminokwasowa 13. peptydów sygnałowych pochodzących z prekursorów białek zlokalizowanych w periplazmie i zewnętrznej otoczce *E. coli*. Peptydy sygnałowe *E. coli* mają długość 20 – 40 aminokwasów i zawierają silnie hydrofobową sekwencję o dużej konserwatywności (27,28).

Do sekrecji rekombinowanych białek otrzymywanych w *E. coli* najczęściej stosuje się sekwencje sygnałowe pochodzące z bakteryjnych enzymów periplazmatycznych: β -laktamazy (*ampC*) (11,29) i alkalicznej fosfatazy (*phoA*) (30), a także z integralnych białek błony cytoplazmatycznej: OmpA (*ompA*) (31,32), OmpF (*ompF*) (33), LamB (*lamB*) (26) oraz ciepłostabilnej enterotoksyny II (34, 35), białek wiążących rybozę (RBP) i maltozę (MBP) (36).

Zastosowanie sekwencji sygnałowych eukariotycznych białek sekrecyjnych najczęściej nie powoduje wydzielenia pożądanego polipeptydu poza cytoplazmę (14). Pozytywne wyniki uzyskano natomiast, gdy zastosowano sekwencje sygnałowe protein A i G ze *Staphylococcus aureus* (37,38).

Nie zawsze dołączenie peptydu sygnałowego do rekombinowanego białka powoduje jego sekrecję, np. ludzki tkankowy aktywator plazminogenu z przyłączoną sekwencją sygnałową alkalicznej fosfatazy (*phoA* z *E. coli*) nadal tworzył ciała inkluzyjne w cytoplazmie (39). Przyczyną może być tendencja do agregacji długich odcinków hydrofobowych zawartych w sekwencjach sygnałowych białek prekursorowych (40).

Na sekrecję białek do periplazmy duży wpływ ma struktura pierwszorzędowa otrzymywanego białka. Pojedyncze zamiany aminokwasów, zwłaszcza w N-końcowej części cząsteczki, mogą całkowicie zahamować sekrecję na zewnątrz komórki (41). Sprzyja natomiast sekrecji ujemny ładunek (duża zawartość aminokwasów dwukarboksylowych) oraz hydrofilowy charakter otrzymywanego białka (17). Polipeptydy dołączane do sekwencji sygnałowych białek sekrecyjnych *E. coli* powinny mieć długość zbliżoną do białek z których pochodziły sekwencje sygnałowe (33).

Sekwencje sygnałowe przyłączone do rekombinowanych białek najczęściej ulegają całkowitemu odcięciu przez proteazy w czasie przechodzenia przez błonę cytoplazmatyczną, tak że na stronę periplazmy przechodzą tylko „dojrzałe” białka. W niektórych przypadkach dołączone do bakteryjnego peptydu sygnałowego „obce” sekwencje powodują zahamowanie odcinania peptydu sygnałowego. Wówczas na zewnętrzną stronę błony cytoplazmatycznej może przedostawać się mieszanina „dojrzałych” i „niedojrzałych” (z peptydem sygnałowym) łańcuchów (26) lub też sekrecja zostaje całkowicie zahamowana, a powstające prekursory ulegają agregacji (40).

Rekombinowane białka wydzielane do periplazmy najczęściej pozostają w formie rozpuszczalnej. W nielicznych przypadkach mogą formować w periplazmie ciała inkluzyjne o nieregularnej strukturze (42).

Powstanie bardziej wydajnych i uniwersalnych metod uzyskiwania rekombinowanych białek wydzielanych poza komórkę *E. coli* będzie możliwe wraz z rozwojem badań nad mechanizmem transportu i sekrecji nowo tworzonych białek u tej bakterii.

Wykrycie u *E. coli* rybonukleinowych kompleksów analogicznych do cząstek rozpoznających sekwencję sygnałową (SRP — *signal recognition particle*) u Eukariota, pozwala przypuszczać, że mechanizm transportu białek z rybosomów na zewnątrz cytoplazmy *E. coli* jest bardzo podobny do transportu eukariotycznych białek sekrecyjnych przez błonę retikulum endoplazmaty-

cznego (43). W skład SRP-podobnych cząstek *E. coli* (stała sedymentacji 11 S) wchodzi 4,5 S RNA i białko Ffh o masie 48 kDa.

W błonie cytoplazmatycznej *E. coli* stwierdzono występowanie białka FtsY, pełniącego funkcję SRP-receptora (ang. *docking protein*). Badania *in vivo* sekrecji białek periplazmatycznych *E. coli* (β -laktamazy, alkalicznej fosfatazy, LamB, białek wiążących rybozę-RBP i maltozę-MBP) potwierdzają udział białka Ffh w transporcie i wydzielaniu nowo tworzonych polipeptydów na zewnątrz błony cytoplazmatycznej (36). Poznanie specyficzności SRP-podobnych kompleksów u *E. coli* w stosunku do sekwencji bakteryjnych peptydów sygnałowych umożliwi opracowanie sztucznych sekwencji sygnałowych o dużej sile wiązania SRP, które będzie można wykorzystać do transportu i sekrecji rekombinowanych białek (44).

2.2. Otrzymywanie białek wydzielanych do pożywki

Sekrecja poza komórkę *E. coli* do pożywki, z uwagi na łatwość oczyszczenia, jest najbardziej korzystnym sposobem otrzymywania rekombinowanych białek. Białka wydzielane do pożywki zachowują ponadto natywną, rozpuszczalną konformację (14). Podstawowym ograniczeniem jest najczęściej bardzo niski poziom ekspresji otrzymywanych w ten sposób rekombinowanych białek, często nie przekraczający 0,02% całkowitej zawartości białka w komórce *E. coli* (wydajność ok. 1 – 2 mg z 1 l pożywki) (45,46). Wydajność ekspresji powyżej 1% całkowitego białka *E. coli* pozwala na zastosowanie metody na skalę przemysłową (14,47).

Mechanizm sekrecji rekombinowanych białek poza komórkę (do pożywki) nie jest jeszcze w pełni poznany i, jak się wydaje, jest bardziej złożony w porównaniu z sekrecją do przestrzeni periplazmatycznej (14). Wykorzystanie stosowanych w przemyśle systemów sekrecji białek z innych mikroorganizmów (bakterie gramdodatnie i drożdże) (48) do sekrecji poza komórkę *E. coli* rekombinowanych białek nie zawsze daje pozytywne rezultaty, np. fuzja ludzkiego insulinopodobnego czynnika wzrostu II (IGF-II) z sekwencją sygnałową i domeną Z proteiny A była wydzielana do pożywki z komórek *Staphylococcus aureus*, a w przypadku ekspresji w *E. coli* ulegała degradacji w cytoplazmie (49).

Seqwencja sygnałowa jest niezbędna do przeniesienia białka przez błonę cytoplazmatyczną do przestrzeni periplazmatycznej, ale nie ma dowodów na to, że jest potrzebna do wydzielania białka na zewnątrz komórki. Przypuszcza się, że o lokalizacji dojrzałego białka (czy ma pozostać w periplazmie, czy zostać wydzielone na zewnątrz komórki) może decydować informacja zawarta w jego N-końcowej sekwencji (50). Według Marston warunkiem wydzielania rekombinowanego białka do pożywki może być podobieństwo jego N-końcowej części do autentycznego polipeptydu wydzielanego przez *E. coli* (14).

Sekrecję rekombinowanych białek do pożywki uzyskano w przypadku ekspresji w *E. coli* białek fuzyjnych złożonych z:

— ludzkiego insulinopodobnego czynnika wzrostu I (IGF-I) i sekwencji sygnałowej oraz domeny Z proteiny A ze *S. aureus* (38,51),

- β -endorfiny i peptydu sygnałowego białka OmpF (14),
- łańcucha $\alpha\alpha$ -fibrynogenu i peptydu sygnałowego β -laktamazy (14),
- ludzkiego hormonu wzrostu i białka uwalniającego bakteriocynę (52).

3. Metody izolowania rekombinowanych białek z komórek *E. coli*

3.1. Izolowanie białek z przestrzeni periplazmatycznej

W celu uwolnienia rekombinowanego białka wydzielonego do przestrzeni periplazmatycznej należy usunąć zewnętrzną ścianę bakteryjną nadtrawiając warstwę mureinową lizozymem, a następnie poddając bakterie działaniu związków chelatujących (np. EDTA) lub szokowi osmotycznemu (53). Komórki bakteryjne przyjmują wówczas postać sferoplastów. Jeżeli otrzymywane białko występuje w periplazmie w formie rozpuszczalnej, sferoplasty i elementy ściany komórkowej można usunąć za pomocą wirowania. Otrzymane w ten sposób białko ulega w nieznacznym stopniu zanieczyszczeniu białkami bakteryjnymi, gdyż w periplazmie występuje tylko 4% całkowitego białka *E. coli* (6). Białka uwolnione z periplazmy są w niewielkim stopniu narażone na degradację proteolityczną, ponieważ większość aktywności proteolitycznych *E. coli* związana jest z cytoplazmą (7).

3.2. Izolowanie białek z cytoplazmy

Uwolnienie białka z cytoplazmy *E. coli* wymaga zniszczenia struktury zarówno ściany komórkowej jak i błony cytoplazmatycznej. W tym celu stosuje się najczęściej metody mechaniczne, takie jak: przeciskanie zamrożonych bakterii w prasie Frencha, sonikację, homogenizację w wysokociśnieniowym homogenizatorze Manton-Gaulina lub wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie (6,53). Z uzyskanego lizatu bakterii, po odwirowaniu, dalszemu oczyszczaniu poddaje się supernatant, gdy rekombinowane białko jest rozpuszczalne lub osad, gdy występuje w postaci ciałek inkluzyjnych. Białko występujące w supernatancie jest zanieczyszczone rozpuszczalnymi białkami pochodzącymi głównie z cytoplazmy, natomiast osad ciałek inkluzyjnych zawiera struktury ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej wraz z większością białek periplazmatycznych (głównie OmpA, OmpC i OmpF).

Lizę komórek *E. coli* można również przeprowadzić za pomocą roztworów mocznika, chlorowodoru guanidyny, NaOH (powyżej 0,01 M) lub silnych detergentów jonowych jak SDS i deoksycholan sodowy. Związki te powodują denaturację białek, dlatego lizę chemiczną stosuje się w przypadku polipeptydów otrzymywanych w postaci ciałek inkluzyjnych, które w tych warunkach ulegają rozpuszczeniu. Stosowane są również kombinacje metod fizycznych i chemicznych, np. sonikacja bakterii w roztworze chlorowodoru guanidyny lub mocznika.

Wyeliminowanie zanieczyszczenia izolowanego białka związkami zawartymi w przestrzeni periplazmatycznej można uzyskać pozabawiając najpierw bakterie ściany komórkowej, jak w przypadku izolowania białek z periplazmy. Otrzymane sferoplasty, zawierające nienaruszone rekombinowane białko, ulegają łatwo lizie pod wpływem niewielkich stężeń detergentów niejonowych. W ten sposób można otrzymać ciała inkluzyjne pozabawione większości zanieczyszczeń, gdyż po odwirowaniu lizatu sferoplastów zanieczyszczenia cytoplazmatyczne pozostają w supernatancie (1,54,55).

Lizaty komórek *E. coli* mają wysoką aktywność proteolityczną nawet w niskich temperaturach, dlatego roztwory w których przeprowadza się lizę bakterii powinny zawierać inhibitory proteaz. Najczęściej stosowany jest fluorek fenylometylosulfonowy, EDTA, rzadziej aprotynina, leupeptyna i pepstatyna A (24).

W celu zmniejszenia lepkości lizatu kwasy nukleinowe można wytrącić siarczanem streptomycyny (56) lub zdegradować za pomocą rybonukleazy A i deoksyrybonukleazy I (57).

4. Metody oczyszczania rekombinowanych białek produkowanych w *E. coli*

4.1. Oczyszczanie białek wydzielanych do pożywki

Rekombinowane białka wydzielane są z komórek *E. coli* do pożywki w niskim stężeniu ok. 1 – 2 mg/l. Po oddzieleniu bakterii przez wirowanie białko można wytrącić z klarownej pożywki za pomocą wysalania siarczanem amonowym. Stosowano również liofilizację pożywki, a następnie oczyszczano białko od niskocząsteczkowych zanieczyszczeń za pomocą sączenia molekularnego (53). Ostateczne oczyszczenie białka przeprowadza się metodami chromatograficznymi.

Skuteczne, jednostopniowe oczyszczanie rekombinowanych białek z pożywki można uzyskać stosując metodę według Stáhla i współ. wykorzystującą właściwości proteiny A i G ze *Staphylococcus aureus* do specyficznego wiązania przeciwciał IgG i albuminy ludzkiej (37). Pożądane białko otrzymywane jest w postaci fuzji z dimerem domeny Z proteiny A (wiąże przeciwciała IgG) lub dimerem domeny B proteiny G (wiąże albuminę surowicy ludzkiej). Białko fuzyjne zawierające fragment ZZ lub BB oczyszcza się bezpośrednio z pożywki za pomocą chromatografii powinowactwa na Sepharose związanej z IgG lub ludzką albuminą. W przypadku niestabilnych białek (ulegających degradacji w komórkach *E. coli*) autorzy proponują jednoczesne przyłączenie peptydów ZZ i BB do obu końców właściwej sekwencji (rys. 2). Tak skonstruowane białka fuzyjne były znacznie bardziej stabilne w porównaniu do fuzji tylko z peptydem ZZ. Oczyszczano je za pomocą chromatografii podwójnego powinowactwa do IgG i albuminy ludzkiej związanych z Sepharose. W ten sposób udało się otrzymać ludzką proinsulinę, ludzki insulinopodobny czynnik wzrostu II, receptor ludzkich limfocytów T i szczurzą izomerazę dwusiarczkową (37).

Z	Z	OTRZYMYWANY POLIPEPTYD	B	B
---	---	------------------------	---	---

Rys. 2. Schemat cząsteczki białka fuzyjnego zawierającego dimery domen Z i B ze *Staphylococcus aureus* (37).

4.2. Oczyszczanie białek otrzymywanych w komórkach *E. coli* w formie rozpuszczalnej

Rekombinowane białka otrzymywane w cytoplazmie lub przestrzeni periplazmatycznej *E. coli* w formie rozpuszczalnej najczęściej zachowują natywną i stabilną konformację łańcucha polipeptydowego (14), dlatego wymagają stosowania łagodnych, niedenaturujących metod izolowania i oczyszczania.

Białka izolowane z przestrzeni periplazmatycznej są tylko w nieznacznym stopniu zanieczyszczone białkami bakteryjnymi w przeciwieństwie do białek izolowanych z cytoplazmy, które po lizie komórek uzyskuje się wraz z rozpuszczalnymi białkami *E. coli*. Do oczyszczania rekombinowanych białek z puli zanieczyszczeń bakteryjnych wykorzystuje się frakcjonowanie siarczanem amonowym oraz szereg metod chromatograficznych (6,53).

W wielu przypadkach niewielkie ilości oczyszczonego polipeptydu uzyskano po zastosowaniu kilku rozdzielów chromatograficznych np.:

— 100 µg oczyszczonej proteazy wirusa HIV-1 uzyskano z 18 g wilgotnej masy bakteryjnej w wyniku frakcjonowania supernatantu uzyskanego po lizie bakterii za pomocą chromatografii jonowymiennej na QAE-Sepharose, chromatografii opartej na oddziaływaniach hydrofobowych (heksylo-agaroz), chromatografii jonowymiennej na kolumnie Mono S (System FPLC, Pharmacia) i końcowym sączeniu molekularnym na Superose 6 (System FPLC, Pharmacia) (58),

— 100 µg oczyszczonej odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 z 1 l hodowli uzyskano w wyniku kolejnych chromatografii odwirowanego lizatu komórkowego na fosfocelulozie, DEAE-Sephacel, fenylo-Sepharose i kolumnie Mono Q (System FPLC, Pharmacia) (57).

Niska wydajność i wysokie koszty tak złożonych procedur oczyszczania białek otrzymywanych w *E. coli* powoduje, że nadają się do stosowania tylko na skalę laboratoryjną.

Oczyszczenie rybonukleazy z trzustki wołu i hydroksylazy fenyloalaninowej z wątroby szczura osiągnięto już po dwóch rozdzielach chromatograficznych. Rybonukleazę po wyekstrahowaniu z periplazmy oczyszczano chromatograficznie na kationitach: S-Sepharose i kolumnie Mono S (System FPLC, Pharmacia) (59).

Hydroksylaza fenyloalaninowa po wysoleniu siarczanem amonowym z lizatu bakteryjnego była dalej oczyszczana chromatograficznie na fenylo-Sepharose, a następnie zagęszczana na DEAE-celulozie (24).

Ponad 95% czystości białko Tat wirusa HIV-1 otrzymano za pomocą sączenia molekularnego na Superose 12 (System FPLC, Pharmacia). Przed chromatografią białko było wysolone z odwirowanego lizatu 30% nasyceniem siarczanu amonowego (60).

Białko kapsydu wirusa HIV-1 (p24) oczyszczono, wysalając supernatant po lizie bakterii siarczanem amonowym, a następnie rozdzielając chromatograficznie na DEAE-celulozie (61). Również po jednokrotnej chromatografii na DEAE-celulozie uzyskano 95% oczyszczenie aldolazy kwasu N-acetyloneuraminowego, po wcześniejszym wysoleniu siarczanem amonowym z rozpuszczalnej frakcji lizatu komórkowego (25).

Wydajne jednostopniowe oczyszczanie rekombinowanych białek otrzymywanych w *E. coli* można uzyskać za pomocą chromatografii immunopowinowactwa. Przyłączając przeciwciała skierowane przeciwko otrzymywanemu białku do złoża chromatograficznego, np. cyjanobromowanej Sepharose lub agarozy związanej z proteiną A ze *Staphylococcus aureus* (Protein A-Sepharose, Pharmacia; Affi-Gel Protein A, Bio-Rad) można z lizatu bakteryjnego wydzielić pożądane białko za pomocą metody chromatografii immunopowinowactwa (38,62,63,64). Jeżeli przeciwciała takie są niedostępne (nie ma innych poza metodami inżynierii genetycznej możliwości uzyskania białka, np. w przypadku niektórych białek prekursorowych), można określone białko otrzymać w postaci fuzji z innym znanym białkiem, przeciwko któremu przeciwciała są łatwo dostępne, np. z β -galaktozydazą. Białko fuzyjne można wówczas oczyścić chromatograficznie na kolumnie zawierającej immobilizowane przeciwciała przeciwko β -galaktozydazie. Po rozcięciu cząsteczki białka fuzyjnego usuwa się β -galaktozydazę z powstałej mieszaniny za pomocą powtórnej chromatografii na tym samym złożu (62).

Równie skuteczną metodą oczyszczania rekombinowanych białek jest chromatografia powinowactwa typu enzym:substrat. W tym celu pożądany polipeptyd należy otrzymać w postaci fuzji z enzymem lub jego fragmentem wykazującym zdolność do wiązania substratu (53). Tak skonstruowane białko fuzyjne można oczyścić z lizatu bakteryjnego za pomocą chromatografii powinowactwa, z substratem lub analogiem substratu związanym na fazie stałej. Po hydrolizie białka fuzyjnego w ten sam sposób usuwa się część enzymatyczną. Do oczyszczania rekombinowanych białek za pomocą chromatografii powinowactwa typu enzym:substrat wykorzystywano reakcje: β -galaktozydazy z aminofenylotigalaktosem (APTG) (9,56), S-transferazy glutationu z glutationem (65,66,67), acetylotransferazy chloramfenikolu z chloramfenikolem (53).

Dołączenie do otrzymywanego białka sekwencji polihistydynowej umożliwia oczyszczenie otrzymanej fuzji za pomocą chromatografii powinowactwa typu *metal chelate affinity chromatography* na złożu z immobilizowanym jodem metalu (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) (68,69).

Połączenie fibroblastycznego czynnika wzrostu z autolizyną ze *Streptococcus pneumoniae*, której C-końcowa część wykazuje wysokie powinowactwo do trzeciorzędowych amin umożliwiło skuteczne oczyszczenie tak powstałej fuzji na DEAE-Sepharcel (70).

Do oczyszczenia proteazy wirusa HIV wykorzystano powinowactwo tego enzymu do inhibitora, pepstatyny A związanej z agarozą (71,72).

4.3. Oczyszczanie białek otrzymywanych w komórkach *E. coli* w postaci ciałek inkluzyjnych

Ciałka inkluzyjne tworzą się w wyniku agregacji białek, które w wyniku syntezy w komórkach *E. coli* przyjmują niestabilną, zdenaturowaną konformację (7). Ciałka inkluzyjne formowane w cytoplazmie mają regularną budowę, są duże (średnica ok. 1 μm), najczęściej pojedyncze, położone centralnie lub peryferycznie w komórce (73,74). W mikroskopie kontrastowofazowym są widoczne jako silnie załamujące światło złogi (53). Periplazmatyczne ciała inkluzyjne są mniejsze od cytoplazmatycznych i mają nieregularną strukturę (42). W ciałkach inkluzyjnych poza rekombinowanym białkiem wykryto obecność 16S i 23S rRNA, plazmidowego DNA, białek bakteryjnych: podjednostek polimerazy RNA, czynników translacji EF-Tu, białek rybosomalnych L7, L12, białek związanych z błoną cytoplazmatyczną OmpA, OmpC, OmpF oraz fosfolipidów błonowych i soli nieorganicznych (7,75,76). Nie stwierdzono natomiast znaczących ilości białek uczestniczących w składaniu łańcucha polipeptydowego (ang. *chaperonin proteins*) SecB i GroEL (42). Ciałka inkluzyjne mają dużą gęstość płynną, dlatego po uwolnieniu z komórek *E. coli* można je oczyścić od składników struktur komórkowych (fragmentów ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej wraz ze związanymi białkami bakteryjnymi) za pomocą wirowania w gradiencie gęstości sacharozy (1,42,54, 77). W oczyszczonych ciałkach inkluzyjnych zawartość rekombinowanego białka może osiągać 95% ich masy. Ilość i skład związków zanieczyszczających (białek, fosfolipidów i kwasów nukleinowych) w dużym stopniu zależy od sposobu ekspresji białka i warunków hodowli bakterii (77). Istotne jest ustalenie czy zanieczyszczenia bakteryjne są wbudowywane w strukturę ciałek inkluzyjnych w trakcie ich powstawania, czy też powstają w wyniku niespecyficznego adsorbpcji na powierzchni ciałek inkluzyjnych w trakcie lizy komórek. Zagadnieniom powstawania i budowy ciałek inkluzyjnych poświęcone są prace prowadzone przez zespół G.Georgiou nad ekspresją w *E. coli* β -laktamazy (18,42,77). β -laktamaza, w zależności od warunków ekspresji, tworzy w *E. coli* ciała inkluzyjne w cytoplazmie lub w periplazmie przy czym znaczna część białka pozostaje w formie rozpuszczalnej. Ciałka inkluzyjne β -laktamazy otrzymane w periplazmie zawierały wyższy poziom zanieczyszczeń niż cytoplazmatyczne. Poziom zanieczyszczeń ciałek cytoplazmatycznych zależny był również od warunków hodowli bakterii. Ilość zanieczyszczeń zwiększała się wraz ze wzrostem temperatury i pH hodowli. W przeprowadzonych badaniach za pomocą mikroskopu elektronowego wykazano, że ciała inkluzyjne periplazmatyczne i cytoplazmatyczne o dużej zawartości zanieczyszczeń miały nierówną porowatą powierzchnię w przeciwieństwie do cytoplazmatycznych o małej ilości zanieczyszczeń, których powierzchnia była zwarta i gładka. Analiza składu molekularnego ciałek inkluzyjnych dowodzi, że w określonych warunkach agregacja β -laktamazy jest wysoce specyficzna. Zanieczyszczenia występujące w ciałkach inkluzyjnych niespecyficzenie adsorbują się na ich powierzchni w trakcie lizy komórek, dlatego ciała o porowatej strukturze powierzchni

TABELA 2
ROZPUSZCZANIE CIAŁEK INKLUZYJNYCH ZAWIERAJĄCYCH REKOMBINOWANE BIAŁKA
W ROZTWORACH CHLOROWODORKU GUANIDYNY (79)

Białko	Liczba wiązań dwusiarcz- kowych	Stężenie GuHCl mol/L	Czynnik redukujący (mmol/L)	pH	Czas rozpusz- czenia (h)	Tempera- tura (°C)
fragment immunoglobuliny	5	6	DTT:300	8,5	1	pokojowa
fragment immunoglobuliny łańcuch immunoglobuliny	2	7,6	2-ME:100	8,0	1	37
kinaza kreatyniny	15	7,6	2-ME:100	8,0	1	37
T-PA	2	7	DTT:100	8,0	1	pokojowa
T-PA	17	7	2-ME:50	7,5	24	4
T-PA	17	6	DTE:400	8,6	3	25
T-PA	17	6	DTE:200	8,6	2,5	25
T-PA mutant	12	7	2-ME:100	7,5	24	4
T-PA domena „kringle 2”	3	7	DTT:200	8	12	pokojowa
T-PA domena „kringle 2”	3	6	DTT:5	8	12	pokojowa
urokinaza	6	5	—	8	12	4
prourokinaza	12	6	2-ME:50	8,5	12	pokojowa
albumina surowicy ludzkiej	17	7	2-ME:100	7,5	—	4
ludzka insulina	3	6	2-ME:140	—	1	—
ludzka insulina	3	7	DTP:1	7,9	—	—
kurzy hormon wzrostu	2	6	—	8,5	—	—
wołowy hormon wzrostu	2	6	—	8,5	—	—
wołowy hormon wzrostu	2	6	—	8	80	pokojowa
hormon wzrostu węgorza	2	5	—	8	2	4
ludzka interleukina 2	1	8	DTT:10	8,5	1	37
ludzka interleukina 2	1	7	—	7	1	4
ludzka interleukina 2	1	6	2-ME:14	8	2	pokojowa
ludzka interleukina 4	3	6	2-ME:14	8	2	pokojowa
ludzka interleukina 4	3	5	GSH:2 i GSSG:0,2	8	1	pokojowa
ludzka interleukina 6	2	6	—	8,3	—	—
wieprzowa fosfolipaza A ₂	7	6	Na ₂ SO ₃ :300	8	0,3	4
ludzki M-CSF	9	7	2-ME:25	7,5	4	pokojowa
ludzka angiogenina	3	7	2-ME:100	7,5	—	—
TGF- α	3	7	—	—	—	—
ludzki IGF-I	3	6	2-ME:10	—	—	—

M-CSF, czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; TGF- α , transformujący czynnik wzrostu α ; IGF-I, insulinopodobny czynnik wzrostu; T-PA, tkankowy aktywator plazminogenu; DTT, ditiotretitol; DTE, dithioerytrytol; DTP, ditiopropanol; 2-ME, 2-merkaptoetanol; GSH, zredukowany glutation; GSSG, utleniony glutation.

zawierają więcej zanieczyszczeń. Potwierdzeniem tej tezy jest to, że w wielu przypadkach zanieczyszczenia te można usunąć bez niszczenia struktury ciałek inkluzyjnych za pomocą płukania w łagodnym detergencie, np. 50 mM roztworem oktyloglukozy (77).

Za pomocą kolejnych ekstrakcji roztworem detergentu jonowego (deoksy-cholan sodu), niejonowego (oktyloglukozą) i soli chiałotropowej (KSCN) usunięto białka zanieczyszczające z ciałek inkluzyjnych zawierających białko kodowane przez ludzki egzon *c-myc* (3). Metoda ta zastosowana do oczyszczania ciałek inkluzyjnych zawierających peptydy kodowane przez gen *env* wirusa HIV-1 spowodowała, że do roztworu oktyloglukozy i KSCN wyekstrahowały się białka wirusowe z częścią zanieczyszczeń (5).

Z ciałek inkluzyjnych zawierających wołowy hormon wzrostu białka zanieczyszczające wyekstrahowano roztworami mocznika o rosnącym stężeniu od 0,5 do 2 M (78).

TABELA 3

ROZPUSZCZANIE CIAŁEK INKLUZYJNYCH ZAWIERAJĄCYCH REKOMBINOWANE BIAŁKA W ROZTWORACH MOCZNIKA (79)

Białko	Liczba wiązań dwusiarcz-kowych	Stężenie mocznika mol/L	Czynnik redukujący (mmol/L)	pH	Czas rozpuszczania (h)	Temperatura (°C)
ludzki M-CSF	9	8	DTT:10	—	0,5	pokojsowa
prochymozyna	3	8	—	8	1	pokojsowa
chymozyna	3	7,5	—	7,5	—	—
kozia α -laktoglobulina	3	8	DTT:1	7,5	—	—
T-PA	17	8	—	8,5	—	—
chrzanowa peroksydaza C	4	8	DTT:30	—	1	30
mysi EGF	3	8	DTT:1	8,3	—	—
łańcuch immunoglobuliny fragment	15	7	DTT:2	8	—	—
immunoglobuliny lizozym jaja kurzego	2	9	2-ME:20	10,8	—	—
rybonukleaza A	4	8	2-ME:500	8,6	2	40
trzustki wołu	4	8	2-ME:25	8	1	—
hormon wzrostu łososia	2	7	—	—	—	—

M-CSF — czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; T-PA — tkankowy aktywator plazminogenu; EGF — epidermalny czynnik wzrostu; DTT — ditiotreitól; 2-ME — merkaptotetanól.

Dalsze oczyszczanie rekombinowanych białek zawartych w ciałkach inkluzyjnych możliwe jest po ich rozpuszczeniu. W tym celu najczęściej stosuje się stężone roztwory mocznika, chlorowodoru guanidyny, rzadziej detergenty jonowe jak: siarczan dodecyłu sodu, deoksy-cholan sodu i sarkozyl oraz ekstrakcję w wysokim (pH>9) lub niskim (pH<3) pH (53,77,79). Rozpuszczanie

białek zawartych w ciałkach inkluzyjnych ułatwia redukcja wiązań dwusiarczkowych. Jako czynniki redukujące dodawane do roztworów rozpuszczających ciałka inkluzyjne stosowane są: 2-merkaptoetanol, ditiopropanol, ditiotreitrol i ditioterytrol. Przykłady rozpuszczania ciałek inkluzyjnych w roztworach chlorowodoru guanidyny i mocznika przedstawiono w tab. 2 i 3.

Roztwory rekombinowanych białek uzyskane po rozpuszczeniu ciałek inkluzyjnych poddawane są dalszemu oczyszczaniu za pomocą metod chromatograficznych, podobnie jak w przypadku białek rozpuszczalnych, z tą różnicą, że rozdzielny chromatograficzny muszą być przeprowadzane w obecności czynnika utrzymującego białko w formie rozpuszczalnej. Oczyszczone białka poddawane są następnie renaturacji.

5. Metody renaturacji białek izolowanych z ciałek inkluzyjnych

Rozpuszczenie białek zawartych w ciałkach inkluzyjnych w roztworach o właściwościach denaturujących powoduje, że po ich oczyszczeniu konieczne jest odtworzenie natywnej konformacji łańcuchów polipeptydowych. Jeżeli otrzymane polipeptydy wykazują aktywność enzymatyczną lub hormonalną, skuteczność renaturacji można określić poprzez porównanie z aktywnością enzymatyczną (hormonalną) polipeptydów uzyskanych z naturalnych źródeł. W przypadku białek nie wykazujących aktywności biologicznej, np. białek strukturalnych, potwierdzeniem poprawności uzyskanej konformacji białka może być reakcja z przeciwciałami (zwłaszcza monoklonalnymi) uzyskanymi na bazie polipeptydu otrzymanego z naturalnego źródła. W przypadkach, gdy weryfikacja struktury białka jest niemożliwa dąży się do uzyskania polipeptydu w formie rozpuszczalnej w roztworach umożliwiających jego dalsze zastosowanie, np. w soli fizjologicznej. Rozpuszczenie białka w roztworach denaturujących (mocznik, chlorowodorek guanidyny) może być przyczyną nieodwracalnych zmian w strukturze białka (14).

Oczyszczone chromatograficznie białka, otrzymane z ciałek inkluzyjnych po usunięciu czynnika warunkującego rozpuszczalność (np. po oddializowaniu mocznika), najczęściej ulegają agregacji i wypadają z roztworu. Można temu zapobiec poprzez znaczne rozcieńczenie białka przed usunięciem czynnika rozpuszczającego. Za bezpieczne uważa się stężenie białka poniżej 20 $\mu\text{g/ml}$ (80). W przypadku ludzkiej interleukiny 2 agregacji zapobiegało dopiero rozcieńczenie do stężenia 1 $\mu\text{g/ml}$ (81). Tak duże rozcieńczenie powoduje znaczny wzrost objętości roztworu otrzymanego białka, co uniemożliwia zastosowanie technologii na większą skalę. Z kolei zagęszczanie rozcieńczonych roztworów białek, np. za pomocą metody ultrafiltracji często prowadzi do agregacji i wytrącenia z roztworu (17).

Renaturację rekombinowanych białek z roztworów denaturujących, takich jak mocznik i chlorowodorek guanidyny można przeprowadzić poprzez znaczne rozcieńczenie (100- 200-krotne) lub dializę wobec roztworu renaturującego. Niewielkie polipeptydy mogą renaturować z dużą wydajnością samo-

rzutnie po usunięciu czynnika denaturującego (53). Trudności związane z renaturacją rekombinowanych białek rosną wraz ze wzrostem długości łańcucha polipeptydowego i zawartością mostków dwusiarczkowych.

Według Marston na wydajność renaturacji rekombinowanych białek mają wpływ następujące czynniki (53):

- szybkość przechodzenia z warunków denaturujących do renaturujących,
- stopień oczyszczenia renaturowanego białka,
- stężenie białka,
- skład jonowy i pH roztworu renaturującego,
- obecność czynników redukujących i utleniających wiązania dwusiarczkowe.

Przejsie z warunków denaturujących — według autorki — nie powinno następować zbyt szybko. Korzystna jest dwustopniowa renaturacja. W pierwszym stadium renaturacji białko osiąga konformację zbliżoną do natywnej, a w drugim całkowicie natywną. Zgodnie z tą zasadą renaturowano prekursor cielejącej chymozyny z 8 M mocznika do roztworu o pH 10,7 (częściowa renaturacja), a po 15 – 30 minutach inkubacji do roztworu o pH 8,0 gdzie następowała pełna renaturacja (82).

Zanieczyszczenie otrzymanywanego białka innymi polipeptydami może znacznie obniżyć wydajność renaturacji. Z tego względu korzystne jest wcześniejsze oczyszczenie białka.

Znaczne rozcieńczenie renaturowanego białka daje przewagę oddziaływaniom wewnątrzcząsteczkowym, sprzyjającym uzyskaniu właściwej konformacji polipeptydów. W stężonych roztworach białek znaczenia nabierają oddziaływania między łańcuchami polipeptydowymi prowadzące do agregacji i wypadania białka z roztworu.

Siła jonowa roztworu renaturującego nie może być zbyt niska, gdyż sprzyja to agregacji polipeptydów. Umiarkowanie alkaliczne pH roztworu (najczęściej wykorzystywany jest zakres pH 7,5 – 8,5) predysponuje do wymiany wiązań dwusiarczkowych.

W skrajnie alkalicznym pH następuje samorzutna izomeryzacja wiązań dwusiarczkowych. Z kolei silnie kwaśne pH (≈ 2) utrzymuje wolne grupy tiolowe w białku w formie zredukowanej (53).

W celu wyeliminowania agregacji łańcuchów polipeptydowych, które uzyskały nieprawidłową konformację (są mniej stabilne od prawidłowych łańcuchów) do roztworów renaturujących dodawany jest mocznik lub L-arginina w stężeniach nie przekraczających 1 M (83,84). Niskie stężenia mocznika i L-argininy nie hamują aktywności większości enzymów, co umożliwia kontrolowanie renaturacji otrzymanego białka.

Obecność detergentów niejonowych znosi oddziaływania hydrofobowe między łańcuchami polipeptydowymi, które mogą być przyczyną agregacji białka. Najczęściej stosowane są: Tween 80, Triton X-100 i oktyloglukozyna (39).

Odtworzenie właściwej struktury mostków dwusiarczkowych ma zasadnicze znaczenie dla odzyskania właściwej konformacji zdenaturowanych łańcu-

chów polipeptydowych. Białka zagregowane w ciałkach inkluzyjnych mają najczęściej niewłaściwą, przypadkową strukturę wiązań dwusiarczkowych (17). W czasie rozpuszczania ciałek inkluzyjnych poddaje się je redukcji (2-merkaptometanolem, ditiopropanolem, ditiotreitolem lub dithioerytrole), a następnie odtwarza we właściwej strukturze w czasie renaturacji. W małych polipeptydach odtworzenie prawidłowej struktury następuje najczęściej samorzutnie po usunięciu ze środowiska czynników denaturujących i redukujących, jak np. w przypadku renaturacji β -endorfiny (53). Większe białka zawierające kilka wewnętrznych wiązań dwusiarczkowych wymagają do ich prawidłowego odtworzenia obecności niskocząsteczkowych reagentów zawierających grupy tiolowe w formie zredukowanej i utlenionej. Wzajemna proporcja formy zredukowanej i utlenionej powinna być tak dobrana by stworzyć właściwy potencjał oksydoredukcyjny dla tworzenia i wymiany wewnętrznych wiązań dwusiarczkowych (84). Jako formę utlenioną stosuje się utleniony glutation, a wolne grupy tiolowe wprowadza się w postaci ditiotreitolu, dithioerotolu, cysteiny lub zredukowanego glutationu. Wydajność renaturacji wiązań dwusiarczkowych zależy od dobrania właściwych proporcji i stężeń związków tiolowych i renaturowanego polipeptydu. Ważne są również pH i temperatura roztworu.

W pracy Buchnera i Rudolpha ustalono optymalne parametry renaturacji fragmentu F_{ab} mysich przeciwciał otrzymanych w postaci ciałek inkluzyjnych (85). Sprawdzono dwa układy redox: glutation zredukowany i utleniony oraz ditiotreitole i utleniony glutation. Optymalne dla prawidłowego formowania się mostków dwusiarczkowych było stężenie 5 mM zredukowanego glutationu i 0,5 mM utlenionego lub 3 mM ditiotreitolu i 4 mM utlenionego glutationu. Najwyższą wydajność renaturacji uzyskano przy stężeniu białka równym 20 $\mu\text{g/ml}$, temperaturze 10°C i 0,4 M stężeniu L-argininy, przy pH roztworu renaturującego w zakresie 7,8–8,2. Czas przy którym połowa białka została zrenaturowana wynosił 15 godzin. Kryterium poprawności struktury białka była zdolność do kompetycji naturalnych przeciwciał mysich w teście typu ELISA.

Parametry renaturacji muszą być eksperymentalnie ustalone dla każdego rodzaju renaturowanego białka, np. optymalne stężenia zredukowanego i utlenionego glutationu dla ludzkiej interleukiny 6 wynosiły odpowiednio 2 mM i 0,2 mM (83), a dla białka fuzyjnego złożonego z egzotoksyny A (*Pseudomonas*) i fragmentu F_v ludzkiej IgG po 1 mM (86).

Do renaturacji wiązań dwusiarczkowych rzadziej stosowana jest technika sulfitolizy. W metodzie tej następuje konwersja grup tiolowych i wiązań dwusiarczkowych w białku do pochodnych S-sulfonowych, z czym związane są zmiany konformacyjne i wzrost elektroujemności białka. Umożliwia to łatwe oczyszczenie S-sulfonowych pochodnych białek za pomocą metody chromatografii jonowymiennej na złożach anionowych (87). Wiązania dwusiarczkowe ulegają odtworzeniu podczas inkubacji w roztworze alkalicznym (pH 10) w obecności cysteiny (88).

Białka odpowiedzialne za formowanie mostków dwusiarczkowych w komórkach eukariotycznych: tioredoksyna i białkowa izomeraza dwusiarczkowa

zastosowane *in vitro* do formowania mostków dwusiarczkowych w rekombinowanych białkach nie dały spodziewanych efektów (17). Również zawartość natywnych polipeptydów nie zwiększyła się, gdy zastosowano nadprodukcję *in vivo* izomerazy dwusiarczkowej i izomerazy *cis-trans* prolylo-peptydylowej poprzez koekspresję tych enzymów z rekombinowanym białkiem (89). Natomiast, w wyniku koekspresji i kosekrecji do perioplazmy bakteryjnej izomerazy dwusiarczkowej (produkt ekspresji genu *dsbA*) uzyskano cztertnastokrotny wzrost aktywności roślinnego inhibitora α -amylazy/trypsyny (5 wewnętrznych wiązań dwusiarczkowych) w perioplazmie *E. coli*. Warunkiem prawidłowego formowania się mostków dwusiarczkowych inhibitora *in vivo* była obecność w pożywce zredukowanego glutationu (optymalne stężenie 5 mM) (90).

W przypadku białek nie wykazujących aktywności biologicznej poprawność uformowania się mostków dwusiarczkowych w łańcuchach polipeptydowych można sprawdzić za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (53). Rozdziałowi poddaje się próbkę białka nieredukowaną i białko, w którym wiązania dwusiarczkowe zredukowano za pomocą 2-merkaptotetanolu. Jeżeli w próbce nie poddanej redukcji wystąpią frakcje o wyższej masie cząsteczkowej niż białko ze zredukowanymi grupami tiolowymi, stanowi to dowód na powstanie międzycząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych. Tego typu nieprawidłowe wiązania dwusiarczkowe są przyczyną tworzenia się agregatów (multimerów) łatwo wypadających z roztworu. Ocenę wyników może uniemożliwić występowanie w preparacie zanieczyszczeń białkowych. Interpretacja możliwa jest wówczas po przeniesieniu białek z żelu poliakrylamidowego na nitrocelulozę i uwidocznieniu właściwych białek z zastosowaniem techniki *western blot*.

Renaturacja wiązań dwusiarczkowych między podjednostkami białek złożonych stwarza dodatkowe trudności związane z koniecznością ustalenia właściwych proporcji poszczególnych łańcuchów polipeptydowych w roztworze renaturującym. Osiągane wydajności renaturacji są najczęściej bardzo niskie, np. renaturowano otrzymane niezależnie lekkie i ciężkie łańcuchy ludzkiej IgG w funkcjonalne przeciwciało z wydajnością 3–5% (91). Udało się natomiast z dużą wydajnością odtworzyć RNA polimerazę *E. coli* z niezależnie otrzymanych podjednostek α , β , β' i σ , której aktywność była zbliżona do aktywności enzymu naturalnego (92).

Glikol polietylenowy dodany do roztworu renaturującego znacznie zwiększa wydajność renaturacji poprzez zapobieganie agregacji łańcuchów polipeptydowych o pośredniej, częściowo natywnej konformacji (93). Metoda zastosowana do renaturacji białek o różnych masach cząsteczkowych (ludzkiego interferonu γ — 19 kDa, ludzkiej deoksyrybonukleazy — 31 kDa i ludzkiego tkankowego aktywatora plazminogenu — 72 kDa) wymagała ustalenia optymalnych proporcji stężenia białka i glikolu polietylenowego. Dla interferonu γ największą wydajność renaturacji uzyskano, gdy stosunek molowy białka do glikolu polietylenowego w roztworze renaturującym wynosił 2:1. W przypadku deoksyrybonukleazy najkorzystniejszy był stosunek 10:1, a dla tkankowego aktywatora plazminogenu 20:1. Proporcje te ustalono dla glikolu po-

lietylenowego o masie 3,35 kDa. Glikol polietylenowy o masie 8 kDa zwiększał wydajność renaturacji przy niższym stężeniu i w innych proporcjach w stosunku do białka (94).

Carlson i Yarmush uzyskali 360% wzrost wydajności renaturacji zredukowanej S-proteiny (aktywny enzymatycznie fragment rybonukleazy A z trzustki wołu, zawierający 4 wiązania dwusiarczkowe) w wyniku dodania do roztworu renaturującego, zawierającego po 1,5 mM zredukowanego i utlenionego glutationu, przeciwciał monoklonalnych przeciwko S-proteinie lub rybonukleazie A (95). Przy 5 μM stężeniu przeciwciał 95% białka uzyskiwało natywną konformację po 24-godzinnej inkubacji.

Białka *E. coli* indukowane szokiem temperaturowym (DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES) uczestniczą *in vivo* w formowaniu struktury nowo tworzonych łańcuchów polipeptydowych (*chaperonin proteins*) (96). Zastosowane *in vitro* do renaturacji zdenaturowanych białek, zapobiegają ich agregacji i ułatwiają uzyskanie natywnej konformacji przez łańcuchy polipeptydowe (97). DnaK i GroEL wykazują *in vitro* wysokie powinowactwo do zdenaturowanych łańcuchów polipeptydowych, zapobiegając ich agregacji. Nie wiążą się natomiast do polipeptydów o natywnej konformacji.

Langer i współ. badali *in vitro* oddziaływania białek DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES z dwoma białkami: zredukowaną karboksymetylolaktoglobuliną i siarkotransferazą tiosiarczanową. Białka te zdenaturowane chlorowodorkiem guanidyny przyjmują różne konformacje łańcuchów polipeptydowych: karboksymetylolaktoglobulina strukturę rozciągniętą, a siarkotransferaza postać nieuporządkowanego kłęбка. Autorzy zaproponowali model sukcesywnego działania bakteryjnych białek szoku temperaturowego, w którym DnaK przyłącza się do zdenaturowanych łańcuchów polipeptydowych. DnaJ działając synergistycznie zwiększa powinowactwo DnaK do renaturowanego białka, następnie za pośrednictwem GrpE polipeptyd o częściowo natywnej, pośredniej konformacji zostaje przeniesiony na kompleks GroEL/ES, gdzie uzyskuje ostateczną, natywną strukturę (21). Aktywność białek DnaK i GroEL warunkuje obecność ATP i Mg^{2+} .

DnaK i kompleks GrpEL/ES mogą zwiększać poziom renaturacji polipeptydów również niezależnie. Renaturacja zdenaturowanego białka fuzyjnego złożonego z egzotoksyny A (*Pseudomonas*) i fragmentu Fv ludzkiej IgG, otrzymanego w *E. coli* w postaci ciałek inkluzyjnych wymagała zastosowania dużego nadmiaru DnaK w stosunku do renaturowanego białka (60:1). GroEL wykazywało natomiast optymalne działanie w proporcjach stechiometrycznych 1:1 (86). Optymalne stężenie ATP dla działania DnaK wynosiło 10 μM , a dla GroEL 1 mM. Podobnie wysoki nadmiar DnaK (80:1) był wymagany do renaturacji nieaktywnej polimerazy RNA (98). Ponadto DnaK stymuluje *in vitro* tworzenie wiązań dwusiarczkowych przez białkową izomerazę dwusiarczkową (86).

W badaniach nad renaturacją siarkotransferazy tiosiarczanowej zaobserwowano, że dodanie do roztworu renaturującego samego GroEL powoduje stabilizację białka w konformacji nieuporządkowanego kłęбка. Renaturacja białka nie zachodzi wówczas w ogóle, lub na poziomie niższym niż renaturacja

spontaniczna (bez udziału GroEL). Warunkiem wydajnej renaturacji jest dodanie GroES i obecność ATP i Mg^{2+} (99).

Kompleks GroEL/ES zwiększał *in vitro* poziom renaturacji w przypadku: prekursora β -laktamazy (100), syntetazy cytrynianowej (101), karboksylazy rybulozodwufosforanu (102) i represora faga λ (103).

Problemom renaturacji rekombinowanych białek poświęcona jest praca przeglądowa Fischera i współ. (79) oraz publikacja zbiorowa pod redakcją Georgiou i de Bernardez-Clark (104).

Literatura

- Hrabec E., Hrabec Z., Płucienniczak G., Skorupa G., Szczepanek A., Płucienniczak A., Uznański B., Wilk A., Okruszek A., Koziołkiewicz M., Guga P., Stec W.J., (1992), *Gene*, 117, 259 – 263.
- Vernet T., Tessier D.C., Laliberté F., Dignard D., Thomas D.Y., (1989), *Gene*, 77, 229 – 236.
- Psallidopoulos M.C., Seth A., duBois G.C., Fisher R.J., Papas T.S., (1989), *Gene Anal. Techn.* 6, 47 – 56.
- Lautenberger J.A., duBois G.C., Samuel K.P., Seth A.K., Showalter S.D., Schweinfest C.W., Zweig M., Papas T.S., (1990), *Human Retroviruses*, Ed. Liss A.R., Inc., New York, 85 – 95.
- Samuel K.P., Seth A., Zweig M., Showalter S.D., Papas T.S., (1988), *Gene*, 64, 121 – 134.
- Sharma S.K., (1986), *Separation Science and Technology*, 21, 701 – 726.
- Kane J.F., Hartley D.L., (1988), *Trends Biotechnol.*, 6, 95 – 101.
- Varshavsky A., (1992), *Cell*, 69, 725 – 735.
- Ullman A., (1984), *Gene*, 29, 27 – 31.
- Ng V.L., Chiang C.S., Debouick Ch., McGrath M.S., J. (1989), *Clin. Microbiol.*, 27, 977 – 982.
- Korant B.D., Rizzo Ch.J., (1990), *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 371, 271 – 275.
- Müller R., Glathe H., Lang H., Simon H., Clausnitzer R., Petzold G., Dittmann S., (1991), *J. Virol. Meth.*, 34, 141 – 148.
- Löwenadler B., Jansson B., Paleus S., Holmgren E., Nilsson B., Moks T., Palm G., Josephson S., Philipson L., Uhlén M., (1987), *Gene*, 58, 87 – 97.
- Marston F.A.O., (1986), *Biochem. J.*, 240, 1 – 12.
- Wilkinson D.L., Harrison R.G., (1991), *Bio/Technol.*, 9, 433 – 448.
- Schein C.H., Noteborn M.H.M., (1988), *Bio/Technol.*, 6, 291 – 294.
- Schein C.H., (1989), *Bio/Technol.*, 7, 1141 – 1149.
- Przybycien M.T., Dunn J.P., Valax P., Georgiou G., (1994), *Protein Eng.*, 7, 131 – 136.
- Moore J.T., Uppal A., Maley F., Maley G.F., (1993), *Protein Express. Purif.*, 4, 160 – 163.
- Blum P., Velligan M., Lin N., Matin A., (1992), *Bio/Technol.*, 10, 301 – 304.
- Langer T., Lu Ch., Echols H., Flanagan J., Hayer M.K., Hartl F.U., (1992), *Nature*, 356, 683 – 689.
- Mendoza J.A., Rogers E., Lorimer G.H., Horowitz P.M., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 13044 – 13049.
- Goloubinoff P., Gatenby A.A., Lorimer G.H., (1989), *Nature*, 337, 44 – 47.
- Citron B.A., Davis M.D., Kaufman S., (1992), *Protein Express. Purif.*, 3, 93 – 100.
- Lilley G.G., von Itzstein M., Ivanic N., (1992), *Protein Express. Purif.*, 3, 434 – 440.

26. Klein K.B., Hill S., Devine S.C., Rowold E., Smith C.E., Galosy S., Olins P.O., (1991), *Bio/Technol.*, 9, 869 – 872.
27. Oliver D.B., (1987), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. Ed. Neidhardt A.R., American Society for Microbiology, Washington, 56 – 69.
28. Hirst T.R., Welch R.A., (1988), *TIBS*, 13, 265 – 269.
29. Kadonaga J.T., Cautier A.E., Straus D.R., Charles A.D., Edge M.D., Knowles J.R., (1984), *J. Biol. Chem.*, 259, 2149 – 2154.
30. Hoffman C.S., Wright A., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5107 – 5111.
31. Morikawa Y., Moore J.P., Jones I.M., (1990), *J. Virol. Meth.*, 29, 105 – 114.
32. Takagi H., Morinaga Y., Tsuchiya M., Ikemura H., Inouye M., (1988), *Bio/Technol.*, 6, 948 – 950.
33. Stader C.H., Silhavy T.J., (1990), *Methods Enzymol.*, 185, 166 – 187.
34. Carter P., Kelley R.F., Rodrigues M.L., Snedecor B., Covarrubias M., Velligan M.D., Wong W.L.T., Rowland A.M., Kotts C.E., Carver E., Yang M., Bourell J.H., Shepard H.M., Henner D., (1992), *Bio/Technol.*, 10, 163 – 167.
35. Chang J.Y.-H., Pai R.C., Bennett W.F., Bochner B.R., (1989), *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 335 – 337.
36. Phillips G.J., Silhavy T.J., (1992), *Nature*, 359, 744 – 746.
37. Ståhl S., Nygren P.-Å., Uhlén M., (1991), *Methods in Protein Sequence Analysis*, Eds. Jörnvall/Höög/Gustavsson, Birkhäuser Verlag, Basel, 313 – 320.
38. Samuelsson E., Wadensten H., Hartmanis M., Moks T., Uhlén M., (1991), *Bio/Technol.*, 9, 363 – 366.
39. Sarmientos P., Dushesne M., Denéfle P., Boiziau J., Fromage N., Delporte N., Parker F., Lelièvre Y., Mayaux J.-F., Cartwright T., (1989), *Bio/Technol.*, 7, 495 – 501.
40. Geracsh L.M., (1989), *Signal sequences. Biochem.*, 28, 923 – 930.
41. Li P., Beckwith J., Inouye H., (1988), *Proc. Natl. Sci. USA*, 85, 7685 – 7689.
42. Bowden G.A., Paredes A.M., Georgiou G., (1991), *Bio/Technol.*, 9, 725 – 730.
43. Rapoport T.A., (1991), *Nature*, 349, 107 – 108.
44. Luirink J., High S., Wood H., Giner A., Tollervey D., Dobberstein B., (1992), *Nature*, 359, 741 – 743.
45. Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K.-I., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G., Miyake T., (1985), *Proc. Natl. Sci. USA*, 82, 7212 – 7216.
46. Hsiung H.M., Mayne N.A., Becker (1986), *Bio/Technol.*, 4, 991 – 995.
47. Josephson S., Bishop R., (1988), *Trends Biotechnol.*, 6, 218 – 224.
48. Nicaud J.M., Mackman N., Holland I.B., (1986), 3, 255 – 270.
49. Uhlén M., Abrahmsén L., (1989), *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 340 – 341.
50. Ghayeb J., Kimura H., Takahara H., Hsiung H., Masai Y., Inouye M., (1984), *EMBO J.*, 3, 2437 – 2442.
51. Moks T., Abrahmsén L., Österlöf B., Josephson S., Östling M., Enfors S.-O., Perrson I., Nilsson B., Uhlén M., (1987), *Bio/Technol.*, 5, 379 – 382.
52. Hsiung H.M., Cantrell A., Luirink J., Oudega B., Veros A. J., Becker G.W., (1989), *Bio/Technol.*, 4, 991 – 995.
53. Marston F.A.O., (1987), *DNA cloning: A practical approach*, Ed. Glover D.M., IRL Press, Oxford, 3, 95 – 137.
54. Szczepanek A., Plucienniczak A., Karwowska S., Kalinowska B., Guga P., (1990), *Zgłoszenie patentowe*, UP RP, nr P 287433.
55. Lin K.-h., Cheng S.-y., (1991), *BioTechniques*, 11, 748 – 749.
56. Germino J., Gray J.G., Charbonneau H., Vanaman T., Bastia D., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6848 – 6852.
57. Unge T., Ahola H., Bhikhabhai R., Bäckbro K., Lövgren S., Fenyö E.M., Honigman A., Panet A., Gronowitz J.S., Strandberg B., (1990), *AIDS Res. Hum. Retrovirus.*, 6, 1297 – 1303.
58. Margolin N., Dee A., Lai M., Vlahos Ch.J., (1991), *Prep. Biochem.*, 21, 163 – 173.

59. Tarragona-Fiol A., Taylorson Ch.J., Ward J.M., Rabin B.R., (1992), *Gene*, 118, 239 - 245.
60. Armengaud J., de Nuova Perez L., Lamay P., Masson J.-M., (1991), *FEBS Lett.*, 282, 157 - 160.
61. Ehrlich L.S., Agresta B.E., Carter C.A., (1992), *J. Virol.*, 66, 4874 - 4883.
62. Carroll S.B., Laughon A., (1987), *DNA cloning: A practical approach*, Ed. Glover D.M., IRL Press, Oxford, 3, 138 - 170.
63. Löwenadler B., Nilsson B., Abrahamson L., Moks T., Ljungqvist L., Holmgren E., Paleus S., Josephson S., Philipson L., Uhlén M., (1986), *EMBO J.*, 5, 2393 - 2398.
64. Wells P.A., Beiderman B., Garlick R.L., Lyle S.B., Martin J.P., Herberg J.T., Meyer H.F., Henderson S.L., Eckenrode F.M., (1993), 18, 341 - 357.
65. Smith D.B., Johnson K.S., (1988), *Gene*, 67, 31 - 40.
66. Campbell D., Valentijn A.J., Berka J.L.A., (1990), *Mol. Cell. Endocrinol.*, 73, 83 - 91.
67. Ray M.V.L., van Duyne P., Bertelsen A.H., Jakson-Matthews D.E., Sturmer A.M., Merkle D.J., Consalvo A.P., Young S.D., Gilligan J.P., Shields P.P., (1993), *Bio/Technol.*, 11, 64 - 70.
68. Hochuli E., Döbeli H., Schacher, (1987), *J. Chromatog.*, 411, 177 - 184.
69. Cross S.H., Charlton J.A., Nan X., Bird A.P., (1994), *Nature Genetics*, 6, 236 - 244.
70. Ortega S., García J., Zazo M., Varela J., Muñoz-Willery I., Cuevas P., Giménez-Gallego G., (1992), *Bio/Technol.*, 10, 795 - 798.
71. Rittenhouse J., Turon M.C., Helfrich R.J., Albrecht K.S., Weigl D., Simmer R.L., Mordini F., Erickson J., Kohlbrenner W.E., (1990), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 60 - 66.
72. Wondrak E.M., Luis J.M., Mora P.T., Oroszlan S., (1991), *FEBS Lett.*, 280, 347 - 350.
73. Taylor G., Hoare M., Gray D.R., Marston F.A.O., (1986), *Bio/Technol.*, 4, 553 - 557.
74. Moriya H., Kaneko J., Nakamura S., Osumi M., (1991), *J. Electron Microsc.*, 40, 364 - 367.
75. Mitraki A., King J., (1989), *Bio/Technol.*, 7, 690 - 697.
76. Hart R.A., Rinas U., Bailey J.E., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 12728 - 12733.
77. Valax P., Georgiou G., (1993), *Biotechnol. Prog.*, 9, 539 - 547.
78. Schoner R.G., Ellis L.F., Schoner B.E., (1985) *Bio/Technol.*, 3, 151 - 154.
79. Fischer B., Sumner I., Goodenough P., (1992), *Biotechnol. Bioengineer.*, 41, 3 - 13.
80. Jaenicke R., Rudolph R., (1989), *Protein structure: A practical approach*, Ed. Creighton T.E., Oxford University Press, UK, 191 - 223.
81. Weir M.P., Sparks J., (1987), *Biochem. J.*, 245, 84 - 91.
82. Marston F.A.O., Lowe P.A., Doel M.T., Schoemaker J.M., White S., Angal S., (1984), *Bio/Technol.*, 2, 800 - 804.
83. Yasukawa K., Saito T., (1990), *Biotechnol. Lett.*, 12, 419 - 424.
84. Buchner J., Pastan I., Brinkmann U., (1992), *Anal. Biochem.*, 205, 263 - 270.
85. Buchner J., Rudolph R., (1991), *Bio/Technol.*, 9, 157 - 162.
86. Buchner J., Brinkmann U., Pastan I., (1992), *Bio/Technol.*, 10, 682 - 685.
87. Patrick J.S., Lagu A.L., (1992), *Anal. Chem.*, 64, 507 - 511.
88. Furman T.C., Epp J., Hsiung H.M., Hoskins J., Long G.L., Mendelsohn L.G., Schoner B., Smith D.P., Smith M.C., (1987), *Bio/Technol.*, 5, 1047 - 1051.
89. Knappik A., Kребber C., Plückthun A., (1993), *Bio/Technol.*, 11, 77 - 83.
90. Wunderlich M., Glockshuber R., (1993), *J. Biol. Chem.*, 24547 - 24550.
91. Cabilly S., Riggs A.D., Pande H., Shively J.E., Holmes W.E., Rey M., Perry L.J., Wetzrl R., Heyneker H.L., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3273 - 3277.
92. Borukhov S., Goldfarb A., (1993), *Protein Express. Purif.*, 4, 503 - 511.
93. Cleland J.L., Randolph T.W., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 3147 - 3153.

94. Cleland J.L., Builder S.E., Swartz J.R., Winkler M., Chang J.Y., Wang D.I.C., (1992), 10, 1013 - 1019.
95. Carlson J.D., Yarmush M.L., (1992), Bio/Technol., 10, 86 - 90.
96. North G., (1991), Nature, 354, 34 - 435.
97. Seckler R., Jaenicke R., (1992), FASEB J., 6, 2545 - 2552.
98. Skowrya D., Georgopoulos C., Zyliz M., (1990), Cell, 62, 939 - 944.
99. Martin J., Langer T., Boteva R., Schramel A., Horwich A.L., Hartl F.-U., (1991), Nature, 352, 36 - 42.
100. Laminet A.A., Ziegelhofer T., Georgopoulos C., Pluckthun A., (1990), EMBO J., 9, 2315 - 2319.
101. Buchner J., Schmidt M., Fuchs M., Jaenicke R., Rudolph R., Schmid F.X., Kiefhaber T., (1991), Biochemistry, 30, 1587 - 1591.
102. Goloubinoff P., Christelle S.T., Gatenby A.A., Lorimer G.H., (1989), Nature, 342, 884 - 889.
103. Gaitanaris G.A., Papavassiliou A.G., Rubock P., Silverstein S.J., Gottesman M.E., (1990), Cell, 61, 1013 - 1020.
104. Georgiou G., de Bernardez-Clark E., (1991), *Protein refolding*. American Chemical Society, Washington, 1 - 229.

Methods for isolation, purification and renaturation of recombinant proteins obtained in *Escherichia coli* bacteria

Summary

Escherichia coli is the most useful bacterial species applied to genetic engineering in recombinant proteins production process. The supply of many polipeptides which potential clinical or industrial use is often limited by their low natural availability. Overexpressed polipeptides may either be located in the cytoplasm and periplasm of *E. coli* or secreted through the cell membrane into the growth medium. Foreign proteins can be expressed in *E. coli* cells directly or as fusion proteins with prokaryotic sequences. Frequently, the overexpressed proteins accumulate in the bacterial cytoplasm or periplasm in the form of insoluble inclusion bodies.

This review considers isolation, purification, solubilization and renaturation of recombinant proteins from *E. coli* cells, which is still a serious methodological and technical problem.

Key words:

E. coli, genetic engineering, inclusion bodies, protein purification, protein renaturation.

Adres do korespondencji:

Andrzej Szczepanek, Zakład Badawczo-Wdrożeniowy i Inżynierii Genetycznej TERPOL, Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne SA, ul. POW 57, 98-200 Sieradz.