



УДК 577.112.088.3

## НОВАЯ СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ $\alpha$ -ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА

© 1999 г. А. Ю. Томашевский<sup>#</sup>, В. Н. Уверский\*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН,  
142292, Пущино Московской обл.;

\* Институт биологического приборостроения РАН, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 15.05.98 г. Принята к печати 07.08.98 г.

Предложена новая эффективная схема выделения и очистки  $\alpha$ -фетопротеина (АФП) человека из пуповинной сыворотки. Схема включает четыре последовательных хроматографических этапа на колонках с использованием “голубой” сефарозы (Cibacron Blue), двух металл-хелатных и одной обращенно-фазовой колонок. Она позволяет быстро получать препараты АФП не ниже 98% чистоты, с высоким выходом ~85% и фактором очистки ~10<sup>3</sup>.

*Ключевые слова:* онкоэмбриональный белок;  $\alpha$ -фетопротеин; хроматография металл-хелатная; хроматография обращенно-фазовая.

$\alpha$ -Фетопротеин – мажорный белок плазмы крови зародыша млекопитающих [1, 2]. Концентрация этого гликопротеина, синтезируемого в желточном мешке и печени зародыша, поддерживается в плазме крови эмбриона на высоком уровне в течение всего периода беременности и резко падает вскоре после рождения [1, 2]. В крови здоровых взрослых наблюдаются только следовые количества этого белка [1, 2], а повышение концентрации АФП сопровождается развитием таких заболеваний, как доброкачественные и злокачественные воспаления печени, рак кожи и многие другие [3, 4]. Показано, что изменение концентрации АФП в крови плода в ходе беременности также обусловлено формированием различных пороков плода (дефекты нервной трубки и брюшной полости, синдром Дауна). Таким образом, тестирование концентрации АФП в плазме крови имеет большое диагностическое значение.

Установлено, что АФП в организме выполняет ряд чрезвычайно важных биологических функций – начиная с транспорта гидрофобных лигандов и кончая подавлением иммунного ответа организма матери на развивающийся плод или организма онкологического больного на развивающуюся раковую опухоль [4]. Однако структурные свойства АФП все еще плохо изучены. Очевидно, что для проведения детальных исследований функциональных и структурных свойств АФП (как *in vivo*, так и *in vitro*) необходимы значительные количества хорошо очищенного нативного белка.

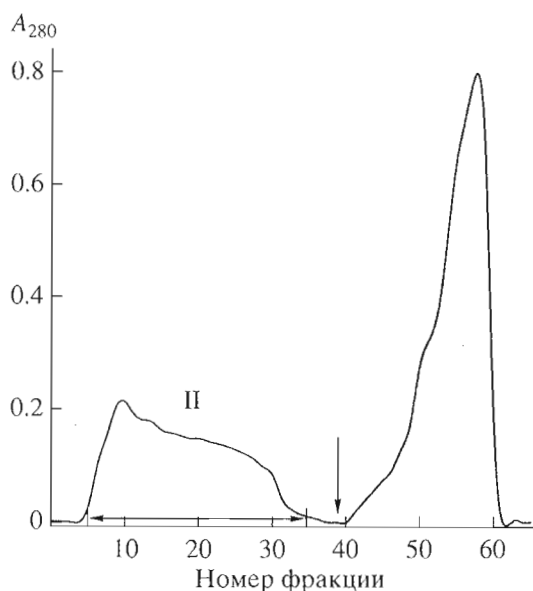
Процесс выделения и очистки АФП осложнен тем, что этот белок близок к сывороточному альбумину (СА) по целому ряду характеристик, таких

как растворимость, молекулярная масса и поверхностный заряд. Для разделения этих белков существует несколько схем. Первая схема основана на использовании различных физико-химических методов разделения белков и включает препаративный электрофорез [5], ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию [6] или аффинную хроматографию на носителях, содержащих ковалентно пришитый конканавалин А (Con A) [7] или краситель Cibacron Blue [8]. Альтернативная схема выделения АФП основана на использовании иммунохимических различий между этим белком и СА. В этом случае выделение АФП осуществляется хроматографически в несколько этапов. При этом, как правило, применяются как положительные (анти-АФП [9–13]), так и отрицательные (анти-СА [14]) иммуноспецифические сорбенты.

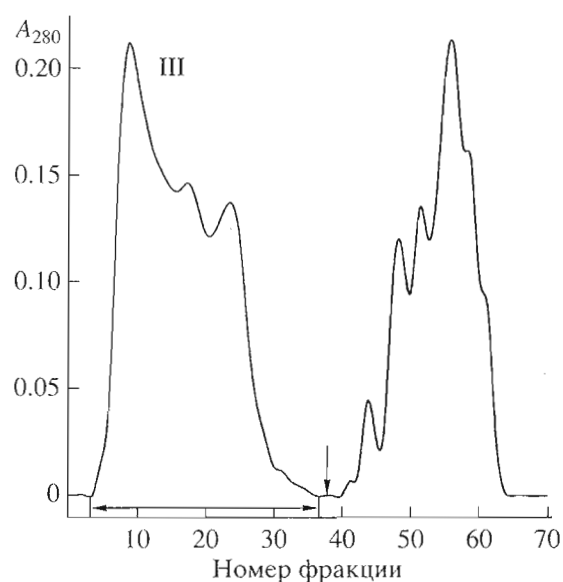
Металл-хелатная аффинная хроматография и обращенно-фазовая жидкостная хроматография находят широкое применение как для выделения и очистки различных полипептидов и белков, так и для исследования структурных свойств белков и проведения анализа их аминокислотного состава [15–17]. Мы использовали эти два вида жидкостной хроматографии в новой схеме выделения и очистки АФП, реализация которой позволит быстро (в течение одной недели) получать существенные количества этого белка.

**Выделение и очистка АФП из сыворотки пуповины зародыша человека.** АФП из сыворотки пуповины зародыша человека выделяли с помощью аффинной хроматографии с использованием “голубой” сефарозы и металл-хелатных носителей, уравновешенных растворами солей Cu<sup>2+</sup> или Ni<sup>2+</sup>. На последней стадии очистки белка бы-

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: tom@ibpm.serpukhov.su).



**Рис. 1.** Хроматография суммарных белков плазмы крови на колонке с "голубой" сефарозой. Условия см. в разделе "Эксперимент. часть". Объем фракций 200 мл. Указаны границы объединенной фракции, содержащей АФП (раствор II). Стрелкой указан момент добавления 1 М NaCl.

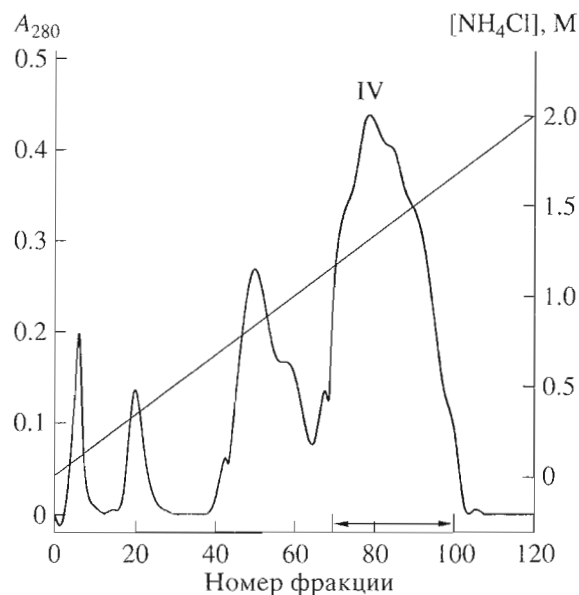


**Рис. 2.** Профиль элюции фракции АФП (рис. 1, фракция II) с металл-хелатной колонки с сефарозой 4В-Ni<sup>2+</sup>. Условия см. в разделе "Эксперимент. часть". Объем фракций составлял 200 мл. Указаны границы объединенной фракции, содержащей АФП (раствор III). Стрелкой указан момент добавления 100 мМ EDTA.

ла использована обращенно-фазовая хроматография. Процедура выделения и очистки АФП подробно рассмотрена в разделе "Эксперимент. часть". Профили элюции, полученные на разных стадиях очистки, приведены на рис. 1-4.

В таблице суммированы результаты каждого из этапов очистки АФП. Видно, что на двух первых стадиях целевой продукт элюируется практически без разбавления в свободном объеме колонки, тогда как большинство примесных белков (в том числе и заметная часть СА) удерживаются на колонке. На этих этапах происходит 4-кратное уменьшение концентрации примесных белков. Пропускание продукта через металл-хелатную колонку, заряженную ионами меди (третья стадия), увеличивает относительную концентрацию АФП до ~50%. Поскольку на этом этапе элюирование АФП осуществляется в линейном градиенте концентрации хлористого аммония, то автоматически происходит и концентрирование целевого продукта (объем раствора, содержащего АФП, уменьшается почти в 50 раз). Необходимо особо подчеркнуть и тот факт, что по результатам иммуноэлектрофоретических и иммунохимических методов анализа на данном этапе очистки более 50% оставшегося примесного белка составляет СА (рис. 4, см. ниже). Финальная стадия очистки – обращенно-фазовая хроматография – позволяет получать гомогенные препараты АФП со степенью чистоты не менее 98%. Что касается потерь целевого продукта в процессе выделения, то на каждой из стадий очистки терялось ~4% АФП.

**Эффективность очистки АФП.** Особо остановимся на анализе эффективности очистки АФП, которая контролировалась такими методами как нативный и денатурирующий гель-электрофорез, ракетный иммуноэлектрофорез, ELISA-тест,



**Рис. 3.** Профиль элюции АФП (рис. 2, фракция III) с металл-хелатной колонки с сефарозой 4В-Cu<sup>2+</sup>. Условия см. в разделе "Эксперимент. часть". Объем фракций составлял 5 мл. Указаны границы объединенной фракции, содержащей АФП (раствор IV).

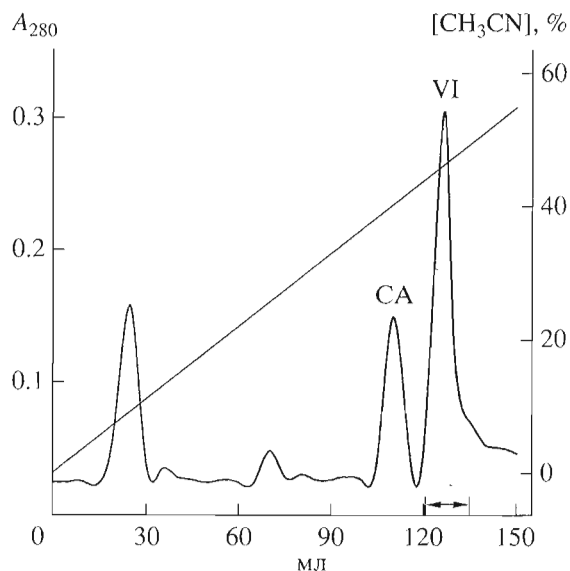


Рис. 4. Профиль элюции АФП (раствор V) с обращенно-фазовой колонки. Условия см. в разделе "Эксперимент. часть". Указаны границы объединенной фракции, содержащей АФП (раствор VI) и пик СА.

обращенно-фазовая хроматография и гель-фильтрация. Согласно этим тестам степень чистоты полученного препарата составила не менее 98%.

В качестве примера на рис. 5 приведены результаты проверки чистоты выделенного белка с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Факт элюции очищенного АФП единственным пиком (рис. 5а) говорит о гомогенности полученного образца белка. Однако само по себе это наблюдение не могло быть использовано в качестве критерия чистоты целевого продукта. Действительно, нами было показано (см. выше), что перед последней стадией очистки большую часть примесных белков составляет СА. Как уже говорилось, сходство основных физико-химических свойств этого белка и АФП является главной трудностью очистки последнего. Поэтому вполне вероятно, что эти белки имеют также и схожее сродство к обращенно-фазовому сорбенту. Для

Количественные характеристики стадий очистки АПФ из пуповинной сыворотки человека

Препарат (раствор)	Объем	Содержание, мг/мл		Степень чистоты, %
		Суммарного белка	АПФ	
I	4.8 л	50.0	0.05	0.10
II	6.0 л	12.5	0.04	0.32
III	7.2 л	8.0	0.032	0.40
IV	150 мл	3.0	1.45	48.3
VI	60 мл	3.57	3.5	>98.0

проверки этого предположения исследовали подвижность коммерческого препарата СА человека и эквимольной смеси этого белка и АФП. Результаты данных исследований представлены на рис. 5б и в, соответственно. Из рисунка видно, что АФП и СА существенно отличаются по хроматографической подвижности (максимумы соответствующих пиков наблюдаются при ~47 и ~41% ацетонитрила). Следует отметить также, что пик с максимумом при ~41% ацетонитрила наблюдался и в профиле, полученном на последней стадии очистки (рис. 4). Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что нами получен гомогенный высокоочищенный препарат АФП.

Целесообразнее остановиться на последней стадии очистки АФП на широкопористом обращенно-фазовом носителе RPSC в градиенте концентрации ацетонитрила при pH 2.0. Нельзя исключить, что такие достаточно жесткие условия могут значительно влиять как на структурные свойства белковой молекулы, в частности на ее уникальную третичную структуру, так и на степень насыщения получаемого препарата природными лигандами (ненасыщенными жирными кислотами). Данный вопрос был детально исследован в ряде наших работ [19–24]. Оказалось, что молекулы АФП в препаратах, получаемых по предлагаемой схеме, обладают жесткой кооперативно плавящейся третичной структурой и содержат по крайней мере часть природных лигандов.

Следует отметить, что хотя в литературе описаны различные схемы очистки АФП [5–14], все они имеют некоторые ограничения. Например, колонки с иммуносорбентами (как положительными, так и отрицательными) имеют ограниченную емкость [4]. Если же использовать носители с низкой аффинностью, то конечный выход продукта невысок. В то же время, для элюции АФП с высокоаффинных носителей необходимо применять растворы сильных хаотропных агентов высоких концентраций, например 8 М раствор мочевины. Очевидно, что такая процедура может заметно повлиять на структуру очищенного белка. При использовании традиционных хроматографических подходов (ионообменная хроматография, гель-фильтрация и др.) при очистке АФП происходит существенное разбавление растворов белка, к тому же выход очищенного препарата обычно не очень высок. Этим недостатком лишен метод очистки АФП с использованием аффинной хроматографии на носителях с иммобилизованным Соп А [7], но этот подход может быть эффективно использован только на строго определенных этапах развития зародыша, поскольку сродство АФП к Соп А сильно меняется в процессе эмбриогенеза [4]. Действительно, было показано, что на ранних стадиях развития плода в плазме крови зародыша содержится незначительное количество АФП, способного эффектив-

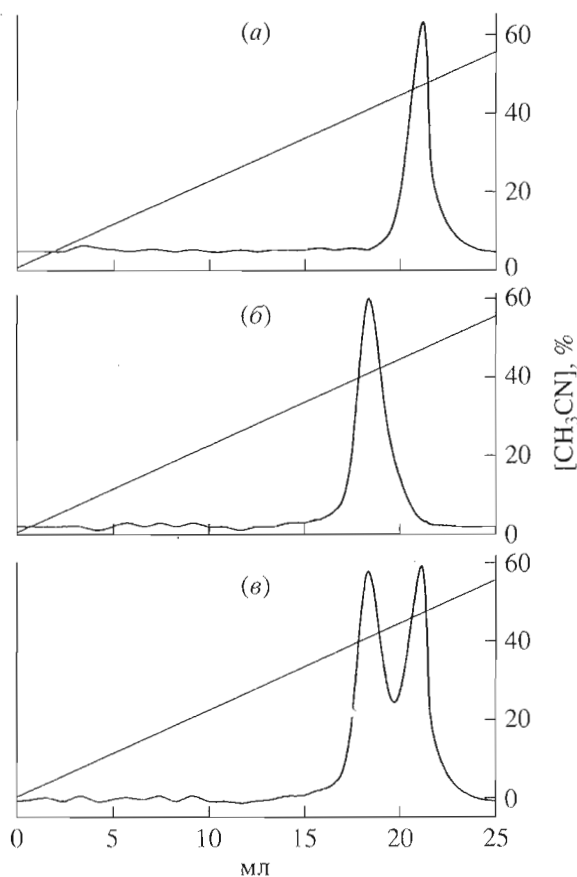
но взаимодействовать с Con A [4, 18]. Максимальное количество Con A-реактивного белка наблюдается приблизительно на третьем месяце развития плода, в дальнейшем же его концентрация существенно снижается [4, 18].

Подчеркнем, что при всей упоминавшейся в вводной части схожести физико-химических характеристик АФП и СА, в свойствах молекул этих белков все же существует ряд различий. Так, известно, что сродство СА к “голубой” сефарозе заметно выше, чем сродство АФП к данному носителю, в то же время СА значительно уступает АФП в способности связывать ионы двухвалентных металлов и является несколько менее гидрофобным белком. Данные различия и взяты за основу предлагаемой нами схемы выделения и очистки АФП. Из приведенных в работе результатов следует, что такая схема практически лишена перечисленных выше ограничений и позволяет быстро получать гомогенные препараты АФП (фактор очистки  $\sim 10^3$ ) с достаточно высоким выходом ( $\sim 85\%$ ).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: сефарозу 4В, иминодиуксусную кислоту, боргидрид натрия, трихлоруксусную кислоту, эпихлоргидрин, соли и антитела (Sigma), реагенты для электрофореза (Bio-Rad), обращенно-фазовую колонку RPSC C-3 ( $0.1 \times 25$  см, Beckman). Работу с использованием обращенно-фазовой хроматографии проводили на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC, LKB-Pharmacia), состоящей из двух насосов 2150 HPLC Pump, контроллера 2152 HPLC Controller и регистрирующей ячейки 2158 Uvicord (LKB-Pharmacia). Для очистки белка использовали препаративную колонку C-3 Ultrapore (Beckman, США) ( $2.15 \times 25$  см); скорость элюции составляла 2.0 мл/мин. Для оценки степени чистоты препарата использовали аналитическую обращенно-фазовую колонку C-3 Ultrapore (Beckman, США) ( $25 \times 0.46$  см); скорость элюции 0.5 мл/мин. При хроматографии на “голубой” сефарозе и сефарозе 4В-Ni<sup>2+</sup> элюция осуществлялась самотеком. Хроматографию на колонке с сефарозой 4В-Cu<sup>2+</sup> проводили со скоростью 2.5 мл/мин, используя перистальтический насос 2132 Micro Perrex (LKB-Pharmacia). Во всех случаях регистрацию вели с помощью регистрирующей ячейки 2158 Uvicord SD (LKB-Pharmacia), а для сбора фракций использовали коллектор 2211-SuperRac (LKB-Pharmacia).

**Идентификацию АФП и проверку качества препарата** осуществляли с использованием стандартного метода ракетного иммуноэлектрофореза [25]. Качество очистки полученного препарата белка тестировали, используя ряд стандартных физико-химических и иммунохимических методов, таких, как гель-фильтрация, обращенно-фа-



**Рис. 5.** Анализ чистоты АФП с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Приведены профили элюции препарата АФП, очищенного по предлагаемой методике (а); коммерческого препарата СА (б); смеси очищенного препарата АФП и коммерческого препарата СА (1 : 1 по весу) (в). Элюцию осуществляли в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–55%) в буфере, содержащем 1 мМ триэтиламин и 0.1% трихлоруксусную кислоту, рН 2.0. Скорость элюции 0.5 мл/мин.

завая хроматография, нативный и денатурирующий (SDS) электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноблоттинг и ELISA-тест с антителами против человеческого сывороточного альбумина, трансферрина и  $\alpha$ -антитрипсина.

**Приготовление носителей для металл-хелатной аффинной хроматографии.** Эпоксидноактивированный носитель – сефарозу 4В получали, используя эпихлоргидрин, методом, предложенным в работе [16].

“Голубую” сефарозу (Cibacron Blue сефарозу 4В) получали путем насыщения эпоксидноактивированной сефарозы 4В красителем Cibacron Blue по методике, предложенной в работе [8]. Полученный сорбент был упакован в колонку ( $24 \times 32$  см). Непрореагировавший краситель удаляли, используя PBS-буфер (20 мМ натрий-фосфат, 150 мМ NaCl, рН 7.5).

Металл-хелатные носители получали из эпоксиактивированной сефарозы 4В. С этой целью данный носитель обрабатывали иминодиуксусной кислотой, как описано в работе [16], и упаковывали в стеклянные колонки: 14 × 16 см – для сефарозы 4В-Ni<sup>2+</sup> или 6 × 40 см – для сефарозы 4В-Cu<sup>2+</sup>. Активированную смолу насыщали ионами Ni<sup>2+</sup> или Cu<sup>2+</sup>, пропуская через колонку растворы NiCl<sub>2</sub> или CuSO<sub>4</sub> (3–5 мг/мл). Несвязанные ионы металлов вымывали, пропуская через колонку большие объемы PBS-буфера (20 и 10 л для сефарозы 4В-Ni<sup>2+</sup> и сефарозы 4В-Cu<sup>2+</sup>, соответственно).

**Процедура очистки АФП.** *Первая стадия – очистка на колонке с “голубой” сефарозой.* Пуповинную сыворотку (5.0 л) в течение 30 мин центрифугировали при 40000 об/мин. Супернатант фильтровали через 0.45-мкм мембрану (NA, Millipore). В результате получали 4.8 л прозрачного раствора (I) с концентрацией суммарного белка плазмы крови ~50 мг/мл и концентрацией АФП – 0.05 мг/мл. Иными словами, в исходном растворе относительная концентрация АФП не превышала ~0.1% суммарного белка (таблица).

Полученный раствор (I) самотеком пропускали через колонку с “голубой” сефарозой, уравновешенную PBS-буфером (рис. 1). Было установлено, что АФП элюируется в свободном объеме колонки. Часть примесных белков связывалась с носителем колонки, их элюировали добавлением 1 М NaCl.

Содержащие АФП фракции были собраны и объединены в объеме ~6 л (раствор II), при этом концентрация суммарного белка уменьшилась до 12.5 мг/мл, а концентрация АФП осталась практически неизменной (0.04 мг/мл). Таким образом, после первого этапа очистки относительная концентрация АФП увеличилась до ~0.3% суммарного белка (таблица).

*Вторая стадия – очистка на колонке с сефарозой 4В-Ni<sup>2+</sup>.* Раствор II самотеком пропускали через металл-хелатную колонку с сефарозой 4В-Ni<sup>2+</sup>, предварительно уравновешенную буфером А (20 мМ натрий-фосфат, 1.5 М NaCl, pH 7.2). Элюцию проводили самотеком тем же буфером (рис. 2). Результаты иммуноэлектрофореза показали, что в данных условиях АФП также не связывается с носителем колонки. Как и на первом этапе очистки часть примесных белков взаимодействовала с носителем колонки. Их элюировали буфером А с добавлением 100 мМ EDTA.

Фракции, содержащие АФП, были собраны и объединены в объеме 7.2 л (раствор III). Концентрация суммарного белка в растворе III составила 8.0 мг/мл, а концентрация АФП – 0.032 мг/мл. Таким образом, на втором этапе очистки относительная концентрация целевого продукта возросла до ~0.4% суммарного белка (таблица).

*Третья стадия – очистка на колонке с сефарозой 4В-Cu<sup>2+</sup>.* Раствор III наносили на металл-хелатную колонку с сефарозой 4В-Cu<sup>2+</sup>, предварительно уравновешенную буфером А, с которой связывался АФП и ряд примесных белков. Элюцию осуществляли в градиенте концентрации хлористого аммония (0–2 М) в том же буфере (рис. 3). Скорость элюции составляла 2.5 мл/мин.

В данных условиях АФП элюировался относительно узким пиком (рис. 3). Объем фракции, содержащей целевой продукт (раствор IV) составил ~150 мл с концентрацией суммарного белка 3 мг/мл, при этом концентрация АФП возросла до 1.45 мг/мл. Третий этап очистки повысил относительную концентрацию АФП более чем в 10 раз – до ~50% суммарного белка (таблица).

*Четвертая стадия – очистка обращенно-фазовой хроматографией.* АФП из раствора IV высаживали добавлением сульфата аммония (440 г/л). Далее осадок растворяли в 20 мл PBS-буфера, содержащего 1 мМ триэтиламина и 0.1% трихлоруксусную кислоту (раствор V). Очистку обращенно-фазовой хроматографией проводили в 4 приема. По 5 мл раствора V наносили на обращенно-фазовую колонку С-3, уравновешенную буфером, содержащим 1 мМ триэтиламин и 0.1% трихлоруксусную кислоту, pH 2.0. Элюцию АФП осуществляли в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–55%) со скоростью 2.0 мл/мин. АФП элюировался симметричным пиком с максимумом концентрации ацетонитрила 46.5% (рис. 4). Фракции, содержащие очищенный белок, собирали и объединяли (раствор VI, 60 мл) (таблица).

Раствор VI концентрировали в ультрафильтрационной системе Minitan и пропускали через колонку PD-10 с сефадексом G-25 для замены буфера с ацетонитрилом на PBS-буфер.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 97-04-48044) и INTAS-РФФИ (№ 95-1278).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Halbrech I., Klibanski C. // Nature. 1956. V. 178. P. 794–795.
2. Ruoslahti E., Seppala M. // Nature. 1972. V. 235. P. 161–162.
3. Abelev G.I. // Adv. Cancer Res. 1971. V. 28. P. 295–358.
4. Deutsch H.F. // Adv. Cancer Res. 1991. V. 56. P. 253–312.
5. Tecce M.F., Terrana B. // Anal. Biochem. 1988. V. 169. P. 306–311.
6. Parmelee D.C., Evenson M.A., Deutsch H.F. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. P. 2114–2119.
7. Page M. // Can. J. Biochem. 1973. V. 51. P. 1213–1215.

8. Birkenmeier G., Usbeck E., Kopperschlager G. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 136. P. 264–271.
9. Nishi S. // *Cancer Res.* 1970. V. 30. P. 2507–2513.
10. Adinolfi A., Adinolfi M., Cohen S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. V. 251. P. 197–207.
11. Ruoslahti E., Seppala M. // *Int. J. Cancer.* 1971. V. 7. P. 218–225.
12. Hirai H., Tsukada Y., Koji T., Ishii N., Kaneda H., Kasai Y. // *Protides Biol. Fluids.* 1983. V. 31. P. 757–765.
13. Kapadia G.G., Kortright K.H., Lee S.Y., McIntire K.R., Waldmann T.A. // *Prep. Biochem.* 1979. V. 9. P. 109–132.
14. Balig M.M. // *Anal. Biochem.* 1980. V. 101. P. 200–203.
15. Lönnerdal B., Kleen C.L. // *J. Appl. Biochem.* 1982. V. 4. P. 203–208.
16. Porath J., Olin B. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. P. 1621–1630.
17. Sulkowski E. // *Trends Biotechnol.* 1985. V. 3. P. 1–7.
18. Ruoslahti E., Engwall E., Pekkala A., Seppala M. // *Int. J. Cancer.* 1978. V. 22. P. 515–520.
19. Uversky V.N., Kirkitadze M.D., Narizhneva N.V., Potekhin S.A., Tomashevski A.Yu. // *FEBS Lett.* 1995. V. 364. P. 165–167.
20. Киркитадзе М.Д., Нарижнева Н.В., Томашевский А.Ю., Потехин С.А., Уверский В.Н. // *Биоорг. химия.* 1996. Т. 22. С. 408–414.
21. Нарижнева Н.В., Иванова Т.В., Томашевский А.Ю., Уверский В.Н. // *Молекуляр. биология.* 1997. Т. 31. С. 1128–1133.
22. Narizhneva N.V., Uversky V.N. // *Protein and Peptide Letters.* 1997. V. 4. P. 243–249.
23. Uversky V.N., Narizhneva N.V., Ivanova T.V., Tomashevski A.Yu. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 13638–13645.
24. Uversky V.N., Narizhneva N.V., Ivanova T.V., Kirkitadze M.D., Tomashevski A.Yu. // *FEBS Lett.* 1997. V. 410. P. 280–284.
25. Laurell C.B. // *Anal. Biochem.* 1966. V. 15. P. 45–52.

## A New Scheme for the Isolation and Purification of Human $\alpha$ -Fetoprotein

A. Yu. Tomashevskii\*\* and V. N. Uverskii\*\*

\*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

\*\*Institute of Biological Instrument Making, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

A new efficient scheme for the isolation and purification of human  $\alpha$ -fetoprotein from human cord serum was proposed. Sequential chromatography on four columns (Cibacron Blue Sepharose, two metal chelate, and one reversed-phase) helped rapidly prepare  $\alpha$ -fetoprotein samples of high purity (no less than 98%; purification factor  $\sim 10^3$ ) in high yields ( $\sim 85\%$ ).

*Key words:*  $\alpha$ -fetoprotein, metal chelate chromatography, oncofetal protein, reversed-phase chromatography

# To whom correspondence should be addressed; e-mail: tom@ibpm.serpukhov.su.