

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

УДК 612.174:311-08

©Коллектив авторов

НОВЫЙ СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЭСТРОГЕН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА ИЗ РЕТРОПЛАЦЕНТАРНОЙ СЫВОРОТКИ

С.А.СЕЛЬКОВ, П.П.ХОХЛОВ

Лаборатория иммунологии Института акушерства и гинекологии РАМН, С.-Петербург.

Предлагается новый способ получения очищенного специфического белка беременности "РАРР-А", количественное определение которого в сыворотке беременных имеет значение в пренатальной диагностике. Предлагаемый способ отличается хорошей воспроизводимостью, легкостью масштабирования. Полученный препарат по физико-химическим и иммунохимическим свойствам идентичен одноименным препаратам других авторов, пригоден в качестве иммуногена и коммерческого стандарта в диагностических наборах.

Ключевые слова: эстроген-связывающий глобулин, ретроплацентная сыворотка, очистка.

ВВЕДЕНИЕ. Эстроген-связывающий глобулин (ЭСГ) был идентифицирован в качестве индивидуального белка в конце 60-х годов [1,2] с развитием техники разделения высокой разрешающей способности. Дано дифференциальное описание белка и показано его отличие от кортизол-связывающего глобулина - КСГ [1,3]. Данный белок фигурирует также под названиями "секс-гормон связывающий глобулин-СГСГ", "тестостерон связывающий глобулин". В англоязычной литературе среди других названий наиболее часто в последнее время встречается "sex hormone-binding globulin". В данной работе мы используем наименование "ЭСГ" как традиционное, лаконичное и достаточно точно соответствующее функциональным свойствам белка.

Интерес к ЭСГ со стороны как биохимиков, так и клиницистов обусловлен несколькими причинами. С одной стороны, весьма высокая аффинность связывания к ряду стероидных половых гормонов делает данный белок перспективным химическим реагентом при создании высокочувствительных тест-наборов для выявления ряда стероидов *in vitro*. Белок также может найти применение для препаративного получения стероидных природных стероидных гормонов методом аффинной хроматографии. С другой стороны, количественное определение ЭСГ как основного специфически связывающего и транспортирующего стероиды белка плазмы крови само по себе представляет ценность в клинической биохимии для диагностических целей. В последнее время интересные результаты получены при выделении данного препарата в чистом виде с помощью метода иммуноаффинной хроматографии в основном с поликлональными антителами к ЭСГ.

В настоящее время в лаборатории иммунологии ИАГ РАМН проводятся исследования научных и технологических разработок, целью которых является создание

технологических схем получения ряда фетальных, плацентарных и других ассоциированных с беременностью белков в высокоочищенной форме. Данная работа, которая касается получения очищенной формы ЭСГ из ретроплацентарной крови является составной частью этого направления исследований.

МАТОДИКА. В качестве исходного материала для выделения целевого белка использовали ретроплацентарную сыворотку. Первичную обработку исходного материала и высаливание общей фракции глобулинов сыворотки крови проводили в соответствии с методикой, описанной нами ранее [4].

Осадок суспендировали в минимальном объеме Трис-НСI буферного раствора с твином 20 (рН 8,0) и диализовали в проточной воде* в течение 72-96 часов до получения отрицательной пробы с хлоридом бария. Колонку 5 x 15 см, заполненную сильным анионообменником уравнивали раствором следующего состава: 0,01 М Трис-НСI, рН 8,6.

Для дробного осаждения белков применяли полиэтиленгликоль ПЭГ-5000 (Ferak, Германия) и сульфат аммония марки "ЧДА" (Росреактив, Россия). Для проведения ионообменной хроматографии использовали сильный анионообменник "Q-Sepharose FF" (Pharmacia, Швеция). После нанесения образца проводили элюцию уравнивающим раствором до падения оптической плотности (280 нм) до фонового уровня, затем элюцию проводили в режиме линейного градиента концентрации NaCl в диапазоне от 0 до 0,5 М, собирали ЭСГ-содержащие фракции, объединяли и подвергали дробному осаждению полиэтиленгликолем. Примесные компоненты осаждали при концентрации 10 % ПЭГ, затем осаждали содержащую целевой компонент фракцию 15 %-ным ПЭГ.

Гельфильтрацию проводили с использованием геля Sephacryl S-400 (Pharmacia, Швеция). Последнюю фракцию подвергали окончательной очистке с помощью металл-хелатной хроматографии. Колонку 1 x 5 см, заполненную "Chelating Sepharose", загружали ионами цинка. Наносили ЭСГ-содержащую фракцию, предварительно растворенную в Трис-НСI буферном растворе (рН 8,0). Элюцию проводили в режиме линейного градиента концентрации глицина от 0 до 1 М. ЭСГ-содержащую фракцию собирали, осаждали 15 % ПЭГ, растворяли в нужном объеме 0,1 М раствора гидрокарбоната аммония, добавляли полиглокин до конечной концентрации 5 % и подвергали лиофильному высушиванию.

Специфическую активность промежуточных и конечного продуктов определяли иммунохимически при помощи стандартной тест-системы для твердофазного иммуноферментного анализа SHBG IEMA TEST (Oy Medix Biochemica AB, Финляндия). Для приготовления рабочих буферных растворов использовали Трис (Serva, Германия) и твин-20 (Merck, Германия). После проведения электрофореза гелевые пластины фиксировали и окрашивали 0,1 % раствором Кумасси ярко-синего в метаноле. Избыток красителя удаляли электрофоретическим способом. Оптические измерения проводили на спектрофотометре "СФ-46". Для проведения аналитического электрофореза использовали акриламид марки 2Х ("Serva", Германия). В ходе каждой стадии выделения и очистки препарата измеряли общее количество белка в образце. Концентрацию белка измеряли по методу Лоури. В ряде случаев для приблизительной оценки общей концентрации белка использовали измерение оптического поглощения раствора при длинах волн 280 нм и 260 нм по Варбургу. Степень чистоты конечного продукта оценивали при помощи нативного электрофореза в полиакриламидном геле и электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. Нативный электрофорез в прерывистой буферной системе проводили на пластинах при концентрации разделяющего геля 15 %, концентрирующего геля - 8 %. Уровень очистки конечного продукта оценивали посредством ПЭГ-электрофореза в нативных и денатурирующих условиях с додецил-сульфатом натрия.

Аффинность в отношении связывания препаратом тестостерона проводили с помощью конкурентного связывания меченного тестостерона (ГИПХ, С.-Петербург, Россия) в соответствии с общепринятой методикой [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Основные этапы выделения препарата представлены на рисунке 1, а количественные характеристики процесса в таблице 1.

Получение и первичная обработка материала. В качестве исходного материала использовали ретроплацентарную сыворотку (РПС), полученную при срочных родах. При использовании РПС в качестве исходного материала значительную трудность представляет получение негемолизированной сыворотки. Особенностью настоящей технологии, как и в ранней работе [4], является то, что для переработки используют только свежий, незамороженный материал.

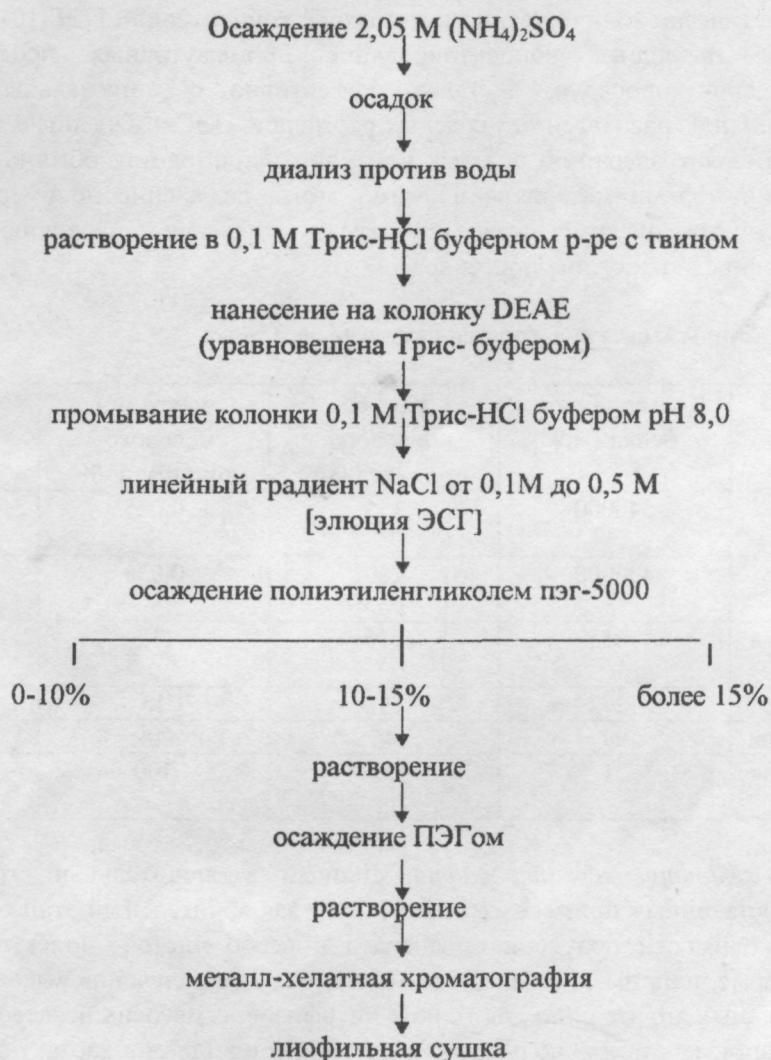


Рисунок.

Принципиальная схема выделения и очистки целевого белка

Использование свежего материала, как обосновывали авторы и ранее, в сочетании с указанными приёмами осаждения глобулинов позволяет избавиться от большей части гемоглобина и продуктов его распада.

Дробное осаждение. ЭСГ, как и остальные глобулины сыворотки крови человека, осаждается практически количественно при концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 50 % насыщения.

Применение солевого осаждения на начальном этапе выделения также вызвано и эффективными консервирующими свойствами сульфата аммония, что позволяет успешно накапливать, длительно хранить и объединять исходный материал.

Разделение посредством анионообменной хроматографии. На данном этапе выделения целевого продукта был применен режим ступенчатого градиента NaCl. При проведении процесса в таком варианте в силу относительно высокого отрицательного заряда ЭСГ значительная часть примесных компонентов элюируется в свободном объеме. Режим ступенчатого градиента позволяет отделить большую часть сопутствующих компонентов и более удобен для масштабного полупроизводственного разделения сложных белковых смесей. К тому же в таком режиме достигается минимальное разбавление целевого продукта.

Полимерное осаждение. Как показали наши исследования, целевой продукт осаждается практически количественно в диапазоне концентраций ПЭГ 10-15 % (табл.1). Это позволяет проводить концентрирование промежуточных продуктов после хроматографических процедур, а также эффективно с минимальными потерями извлекать материал из разбавленных солевых растворов. ПЭГ-осаждение в данном случае по существу заменяет операцию диализа или ультрафильтрации, обычно связанные со значительными потерями материала. Помимо этого, осаждение полимером именно в дробном ступенчатом режиме позволяет отделить целевую фракцию от остатков высокомолекулярных сиалогликопротеидов.

Таблица. Этапы выделения эстроген-связывающего белка.

Основные этапы выделения	Кол-во общего белка (мг)	Кол-во целевого продукта (мг)	Содержание целевого продукта %	Фактор очистки (кратность)
Исходный материал	540000	135	0,025	1
Солевое осаждение	435000	130	0,030	1.2
Анионообменная хроматография	1855	210	11,3	452
ПЭГ-осаждение	1272	190	15	600
Гель-фильтрация	94	45	48	1900
Металл-хелатная хроматография	21	21	100	5000

Металл-хелатная хроматография. Данный заключительный этап позволяет избавиться от остаточных примесных белков. Этот заключительный этап очистки нужен в случае необходимости получения препарата в особо чистой (электрофоретически гомогенной) форме, например, в качестве иммуногена для получения высокоспецифических поликлональных антител или для тонких цитофизиологических исследований. В ряде случаев, как, например, при использовании препарата в виде стандарта, положительного контроля или калибровочного материала без этого этапа можно обойтись.

Физико-химические свойства препарата. Определение молекулярной массы препарата при помощи ПААГ-электрофореза в нативных и денатурирующих условиях (с восстанавливающим агентом и без него) позволяет сделать вывод что полученный препарат имеет молекулярную массу в пределах 100-110 кДа. Обработка денатурирующими агентами приводит к распаду на две, повидимому, идентичные субъединицы молекулярной массой приблизительно по 50 кДа. В денатурирующих и восстанавливающих условиях препарат представлен мономерами около 50 кДа.

Иммунохимические свойства препарата. Препарат не проявляет иммунохимической активности при взаимодействии с антителами к ТБГ (SP-1), и к ассоциированным с беременностью белками РАРР-А и РАРР-В, а также не дает линий преципитации в иммуноэлектрофорезе с антисывороткой к белкам плазмы человека.

Активность препарата в отношении связывания стероидов. Согласно существующим в литературе данным, для получения ЭСГ в очищенной форме распространенным является метод, основанный на связывании искомого белка со стероидами, в особенности с тестостероном. Получается логический замкнутый круг: выделяют целевой продукт путем связывания с тестостероном, а контроль специфической активности конечного продукта проводят опять-таки посредством связывания с тем же тестостероном. В данной работе проведена попытка выделения и очистки ЭСГ с использованием не только специфичных аффинных, но и обычных физико-химических свойств белка. При этом, полученный авторами препарат белка демонстрирует в эксперименте высокую аффинность по отношению к тестостерону.

Данные по определению молекулярной массы и структуры белка в общем совпадают с данными авторов [5], которые получали препарат при помощи биоаффинной (лектинаффинной хроматографии). Аналогичные результаты были получены методом аналитической гель-фильтрации. Очищенный препарат, который элюируется в виде одного пика в районе 50 - 54 кДа, при проведении элюции в 6 М мочеvine дает один пик в районе около 55 -60 кДа.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что:

1. Разработанный метод получения препарата пригоден для получения препарата в препаративных (лабораторных) и пилотных (опытно-экспериментальных) масштабах.
2. Применение в качестве исходного материала РПС, где содержание целевого продукта сравнительно постоянно, а спектр белков ограничен и хорошо известен, позволило достичь высокой воспроизводимости технологии выделения.
3. Наличие этапа предварительной обработки исходного сырья позволяет получить исходный материал со стандартными физико-химическими характеристиками, что позволяет с высокой степенью точности стандартизировать основные этапы выделения целевого продукта.
4. Все этапы выделения и очистки целевого продукта проводят в щадящих условиях, что позволяет максимально сохранить в ходе очистки иммунохимическую, иммунологическую и физиологическую активность препарата.
5. Препарат по своим физико-химическим параметрам соответствует характеристикам авторов, описавшим его под названиями "SHBG" и тестостерон связывающий глобулин (testosteron-binding globulin-"TBG"). Препарат по своим иммунохимическим свойствам соответствует принятому в современной международной практике европейскому иммунохимическому стандарту, его специфическая иммунохимическая активность откалибрована с помощью принятых в международной практике моноклональных антител относительно международного стандарта.

Несмотря на свою многостадийность, разработанная схема выделения препарата обладает сравнительно высокими суммарными количественными показателями, в частности коэффициентом извлечения и итоговым выходом конечного продукта. Эти показатели обеспечиваются благодаря высоким количественным характеристикам каждого отдельного технологического этапа. Наряду с относительной простотой и высокими надежностью и воспроизводимостью каждого этапа, доступностью исходного материала и возможными перспективами создания единой унифицированной схемы получения ряда белков плазмы беременных, настоящую технологию выделения ЭСГ можно считать весьма удачной для получения препаративных, а также более высоко масштабированных количеств препарата.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Mercier-Bodard, C., Baulieu, E.E.* (1968) *E.E.C.R. Acad. Sci. (Paris)*. **267**. 804.
2. *Mercier, C., Baulieu, E.E.* (1968) *Ann. Endocrin. (Paris)*. **29**. 159.
3. *Mercier-Bodard, C., Alfzen, A., Baulieu, E.E.* (1970) (SBP). In: *Karolinska Symposia on research Methods in Reproductive Endocrinology. Steroid assay by protein binding*. Ed. E.Diczfalusy), Stockholm,
4. *Сельков, С.А., Хохлов, П.П.* (1997). *Вопросы медицинской химии*. (в печати).
5. *Bohn, H., Kranz, T.* (1973), *Arch. Gynecol.* **215**, 63-71.
6. *Moore J.W., Bulbrook R.D.* (1988) *Oxford Rev. Reprod. Biol.* **10**.
7. *Dunn J.F., Nisula B.C., Rodbard* (1981) *J. Clin. Endocrin. Metab.* **53** 8-68.
8. *Andersen C.Y.* (1990) *J. Clin. Endocrin. Metab.* **51**. 1375-1381.

A NEW METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF PREGNANCY ASSOCIATED PROTEIN PAPP-A FROM RETROPLACENTAL SERUM.

S.A.SELKOV, P.P.KHOKHLOV

Institute for Obstetrics and Gynaecology, Russian Academy of Medical Sciences, St.-Petersbourg

A new method of obtaining of purified sex-hormone binding globulin SHBG is described. This method provides good reproducibility and large-scaling. The physico-chemical and immunochemical properties of the preparation obtained was identical to the preparations obtained by other authors.

Key Words: pregnancy associated protein, retroplacental serum, purification.