



УДК 577.152.34.14

ТЕХНОЛОГИЧНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ α -ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА. ОЦЕНКА СТАТУСА СВОБОДНЫХ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ И АМИНОГРУПП В ОЧИЩЕННОМ ПРЕПАРАТЕ

© 2001 г. А. И. Сотниченко[#], Д. В. Заболотнев, С. Е. Северин, В. И. Швец*Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии,
113149, Москва, Симферопольский бульвар, 8;

*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 05.02.2001 г. Принята к печати 14.03.2001 г.

Описан новый технологичный метод выделения α -фетопротеина человека (АФП) из сыворотки крови пуповины человека. Метод включает осаждение высокомолекулярных соединений полиэтиленгликолем, аффинную, ионообменную и гель-проникающую хроматографию и позволяет проводить быстрое (48 ч) препаративное выделение индивидуального белка с высоким выходом (до нескольких десятков миллиграмм за цикл) и сохранением нативной структуры (данные иммунохимического анализа). Показано, что в очищенном АФП отсутствуют доступные свободные сульфидрильные группы; восстановление АФП дитиотреитом при 4°C приводит к образованию двух сульфидрильных групп, предположительно принадлежащих остаткам Cys в положениях 18 и 67 домена I молекулы белка. В полученном белке для модификации в мягких условиях *N*-оксисукцинимидным эфиром 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты доступны до 10 свободных аминогрупп.

Ключевые слова: α -фетопротеин; выделение; сыворотка крови пуповины; аминогруппы; дисульфидные связи; восстановление.

ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональный белок α -фетопротеин (АФП) человека используется в диагностике злокачественных новообразований печени [1–3] и пренатальных дефектов развития плода [4, 5], а также при создании конструкций для направленной доставки цитотоксических соединений в раковые клетки [6–11]. Ввиду низкого содержания этого белка в исходном материале и его сходства по физико-химическим свойствам с сывороточным альбумином человека [12, 13] его выделение сопряжено со значительными трудностями. Большинство из описанных в литературе методов позволяют выделять небольшие количества белка, кроме того, предлагаемые условия часто слишком жестки для выделения АФП в нативном состоянии [14–18]. Многие из описанных методов выделения являются вполне адекватными как по количеству, так и по иммунохимическим свойствам полученного белка для использования его в качестве стандарта в иммуноферментном анализе. Однако при использовании АФП в качестве

носителя для доставки цитотоксических препаратов в опухолевые клетки [8–10] необходимы десятки и сотни миллиграммов белка, который при этом должен не только сохранять высокую иммунохимическую активность, но и эффективно взаимодействовать с рецепторами АФП на поверхности опухолевых клеток. Белок также должен сохранять аминогруппы в свободном состоянии. Особенное значение вышеперечисленные параметры приобретают при использовании АФП в предклинических и клинических испытаниях цитотоксических веществ в составе конъюгатов, полученных на его основе. В данной работе описан новый препаративный метод выделения АФП, который отличается технологичностью и отвечает многим из упомянутых требований. Изучены также некоторые химические свойства выделенного АФП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предлагаемый метод выделения включает четыре основные стадии: осаждение высокомолекулярных примесей с помощью полиэтиленгликоля (PEG), аффинную хроматографию на носителе Sepharose CL-4B с ковалентно иммобилизованными моноклональными антителами (МА) к АФП, ионообменную хроматографию на DEAE-носителе и гель-проникающую хроматографию на матрице Sephacryl S-200 HR.

Сокращения: АФП – α -фетопротеин; МА – моноклональные антитела; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; PEG – полиэтиленгликоль 6000; PMSF – фенолметилсульфонилфторид; SPDP – *N*-оксисукцинимидный эфир 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты.

[#]Автор для переписки (тел./факс: (095) 113-61-35; e-mail: foxkaf@online.ru).

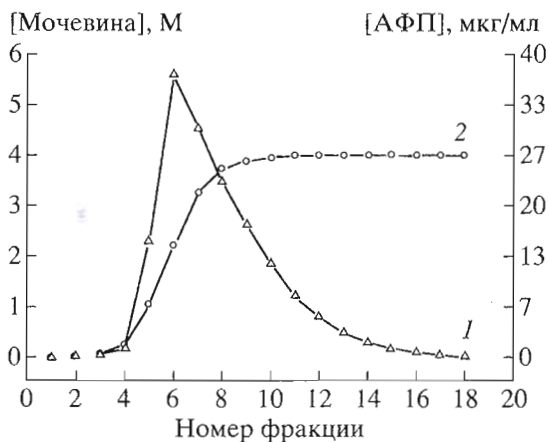


Рис. 1. Профиль элюции АФП с аффинной колонки Sepharose CL-4В с иммобилизованными МА к АФП (2.6×10 см) 4 М раствором мочевины. Во фракциях (10–12 мл) определяли концентрацию белка методом гель-проникающей хроматографии (см. “Эксперим. часть”) (1) и концентрацию мочевины (2) (по показателю преломления элюата).

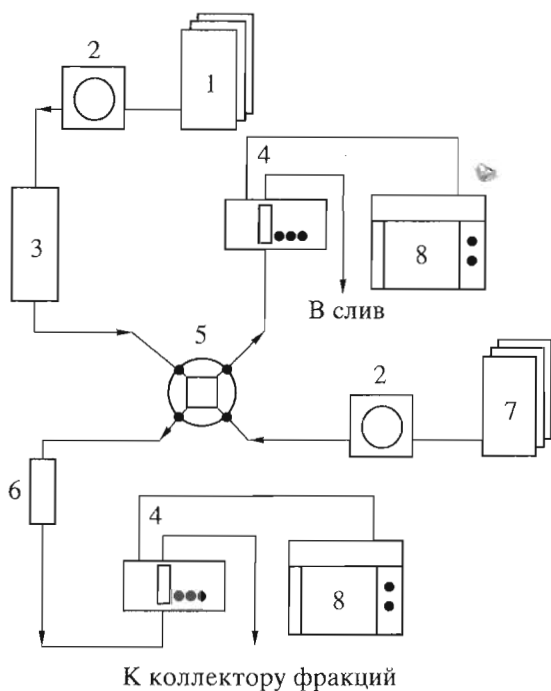


Рис. 2. Технологическая схема выделения АФП. Показаны: емкости с буферными растворами (1 и 7), перистальтические насосы (2), аффинная колонка (3), фотометрические детекторы (4), четырехходовой кран (5), ионообменная колонка (6), самописцы (8), стрелками – направления потоков.

Предложенная схема выделения позволяет отказать от стадий диализа и концентрирования фракций, содержащих целевой белок, после элюции с аффинной колонки и концентрирования после ионообменной колонки. За счет этого значительно возрастает выход белка и сокращается

время выделения. После подачи на аффинную колонку раствора мочевины максимальная концентрация белка в элюате наблюдается при концентрации мочевины 2–3 М (рис. 1). Промывка аффинной колонки 8 М раствором мочевины после выхода основного белкового пика не приводит к элюции дополнительных количеств белка. Применение раствора мочевины с концентрацией 4 М позволяет количественно элюировать АФП с колонки в минимальном объеме буферного раствора (150–200 мл), который непосредственно наносят на ионообменный носитель.

В работе используется колонка небольшого объема (5–8 мл), заполненная слабым анионообменником Fractogel TSK DEAE-650 (М). После подачи элюирующего раствора (4 М мочевины) на аффинную колонку и появления на детекторе начала пика элюируемого белка выходной патрубком детектора с этой колонки с помощью четырехходового крана подсоединяется непосредственно к входной линии уравновешенной ионообменной колонки (рис. 2). После завершения элюции целевого белка с аффинной колонки кран поворачивают в исходное положение и обе колонки промывают соответствующими буферами. Затем на аффинную колонку наносят новую порцию исходного материала, а белок с ионообменной колонки после ее промывки раствором мочевины (4 М) и стартовым буфером вытесняют 0.6 М раствором KCl. Ввиду небольшого объема ионообменной колонки, высокой емкости сорбента и низкой скорости потока ($2.5 \text{ мл/см}^2/\text{ч}$) белок элюируется в небольшом объеме (10–15 мл) и непосредственно наносится на колонку с Sepharul S-200 HR для дальнейшей очистки. Кроме того, ионообменная колонка позволяет при нанесении в мягких условиях отделить АФП от примеси небольшого количества аутоантител чловека и МА, которые смываются с аффинной колонки в процессе ее эксплуатации.

Профили элюции на последней стадии очистки с помощью гель-фильтрации на Sepharul S-200 HR представлены на рис. 3.

На рис. 4 представлены результаты анализа фракции АФП после заключительной стадии выделения (гель-фильтрации) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Можно видеть, что АФП, выделенный при использовании данного метода, представляет собой индивидуальный белок с содержанием основного компонента не менее 97%. Проверка иммунохимических свойств АФП с помощью радиальной иммунодиффузии (M-Partigen- α -Fetoprotein, Boehringer, Германия) показала, что выделенный белок на 90–95% сохраняет иммунологическую активность.

Поскольку до настоящего времени отсутствуют данные о наличии доступных свободных сульфгидрильных групп в АФП, мы провели обработку выделенного белка реагентом Элмана [19]

в стандартных неденатурирующих условиях. Эксперименты показали, что АФП не содержит доступных сульфгидрильных групп.

Сывороточный альбумин человека (ЧСА) и АФП обладают высокой степенью гомологии первичной структуры и относятся к одному семейству белков [20]. Третичная структура АФП до сих пор строго не установлена, но после определения его аминокислотной последовательности было сделано допущение, что доменная структура АФП сходна с таковой для ЧСА [21]. Для АФП, как и для ЧСА, характерно попарное расположение 14 из 32 остатков Cys в цепи АФП (Cys94, Cys95; Cys173, Cys174; Cys250, Cys251 и т.д.), причем, каждый из парных остатков Cys образует дисульфидную связь с одиночным остатком Cys, достаточно отдаленным от него в белковой цепи [22]. Исключения составляют изолированные остатки Cys в положениях 18 и 67 аминокислотной последовательности первого домена и в положениях 365 и 374 второго домена АФП. Эти остатки (18-й и 67-й) достаточно удалены друг от друга в цепи белка и дисульфидная связь между ними формирует 50-членный полипептидный цикл. Было сделано предположение, что дисульфидная связь, образованная этими остатками Cys, может быть более доступной для внешних воздействий, чем прочие дисульфидные связи АФП. При восстановлении АФП дитиотреитом (0.5–30 мМ) при 37°C образуется до 26 свободных сульфгидрильных групп, доступных в неденатурирующих условиях, а при 4°C лишь две свободные сульфгидрильные группы (рис. 5). На основании этих данных можно предположить, что эти группы образовались при восстановлении дисульфидной связи между Cys18 и Cys67. В настоящее время проводится работа по локализации сульфгидрильных групп АФП, образующихся при восстановлении в этих условиях.

С целью определения пригодности выделенного АФП для получения на его основе противоопухолевых препаратов проводили оценку статуса свободных аминогрупп белка с помощью *N*-оксисукцинимидного эфира 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты (SPDP). Этот реагент широко используется для синтеза ковалентных конъюгатов белков с разными лигандами [23, 24]. Поскольку известно, что при гидролизе мочевины в водных растворах образуется цианат аммония, который способен блокировать свободные NH₂-группы белка [25], было важно оценить реакционную способность этих групп в белке. Результаты экспериментов по модификации АФП с помощью SPDP представлены на рис. 6. Можно видеть, что количество модифицированных аминогрупп при использовании соотношении SPDP/АФП (3 : 1) плавно возрастает с увеличением рН инкубационной среды от 1 при рН 6.0 до 2 при рН 8.0 (рис. 6а). При увеличении избытка реагента до 20 моль на

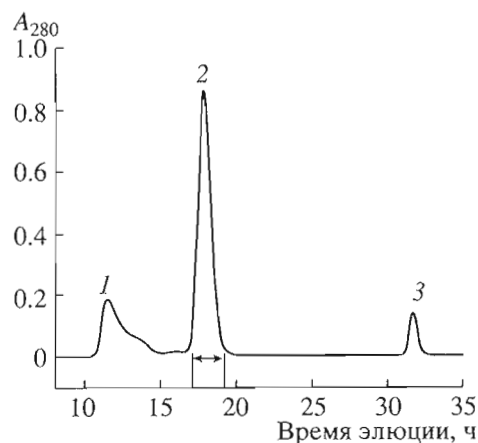


Рис. 3. Очистка АФП на гель-фильтрационной колонке с Sephacryl S-200 HR. Условия см. в “Эксперим. части”; скорость элюции 25 мл/ч. Показаны: свободный объем (1), пик, соответствующий АФП (2) (стрелками показаны границы собираемых фракций), полный объем (3).

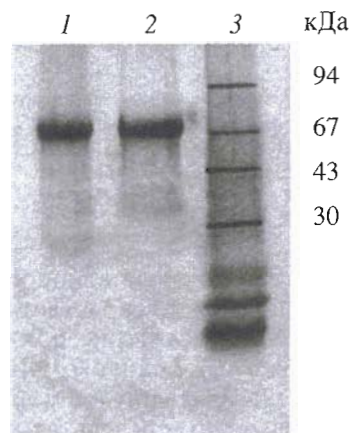


Рис. 4. Электрофореграмма в SDS-ПААГ препарата АФП после гель-фильтрации на Sephacryl S-200 HR, обработанного (1) и необработанного (2) β -меркаптоэтанолом, и белков маркеров молекулярных масс (3). Условия см. в “Эксперим. части”.

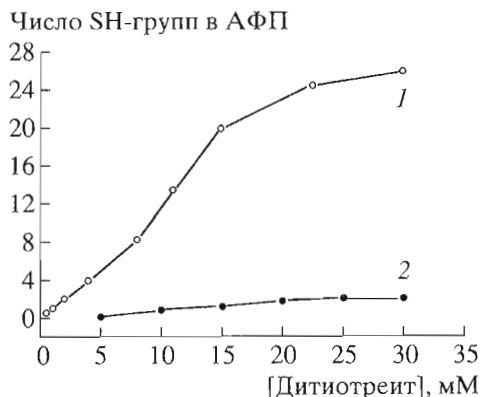


Рис. 5. Восстановление дисульфидных связей в АФП с помощью ДТТ при 37 (1) и 4°C (2). Условия см. в “Эксперим. части”.

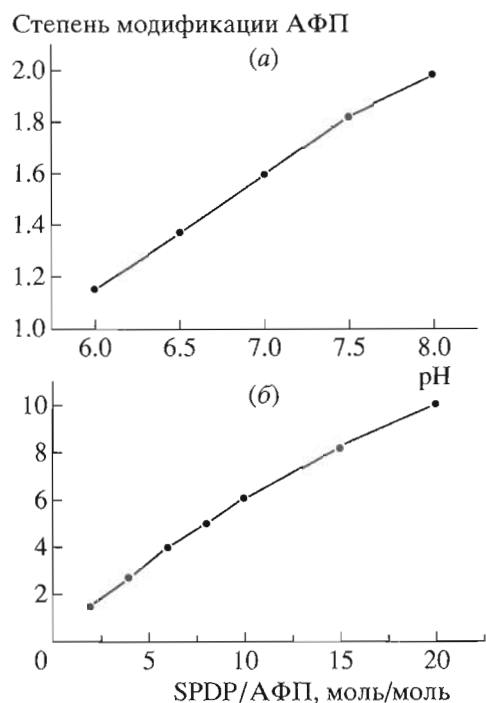


Рис. 6. Зависимость степени модификации АФП с помощью SPDP от pH реакционной среды (при молярном соотношении SPDP/АФП = 3) (а) и от соотношения реагентов (pH 7.5) (б). Условия см. в "Эксперим. части".

1 моль белка количество модифицированных при pH 7.5 NH_2 -групп также возрастает пропорционально избытку SPDP до 10 (рис. 6б). Всего молекула АФП содержит свободную α - NH_2 -группу остатка Thr и 41 ϵ - NH_2 -группу остатков Lys [22]. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что применение 4 М раствора мочевины в буфере, содержащем Трис, для элюции АФП с аффинной колонки сохраняет NH_2 -группы белка свободными для специфичных реагентов, и белок пригоден для получения на его основе ковалентных конъюгатов с различными лигандами.

Предложенный нами метод позволяет проводить препаративное экспресс-выделение АФП в количестве нескольких десятков миллиграмм за один цикл выделения. В описанных условиях полное время выделения составляет не более 48 ч. Мягкие условия и краткие сроки позволяют получать АФП в индивидуальном состоянии с достаточным количеством свободных аминогрупп, что является необходимым условием получения цитотоксических конъюгатов на его основе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали носители для аффинной и гель-проникающей хроматографии: BrCN-активированную Sepharose CL-4B, Sephacryl S-200 HR,

Sephadex G-25 SF (Pharmacia, Швеция), анионообменную смолу Fractogel TSK DEAE-650 (M), азид натрия, фенолметилсульфонилфторид (PMSF), соли, гидроокись натрия, соляную кислоту, мочевины и ацетонитрил (Merck, Германия), 5,5'-дитио-бис(нитробензойную кислоту), BSA, дитиотреит, краситель Coomassie BB G-250, полиэтиленгликоль 6000 (PEG) (Serva, Германия), реактивы для электрофореза в полиакриламидном геле (Bio-Rad Laboratories, США), *N*-окисукцинимидный эфир 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты (SPDP), Трис, детергент Lubrol PX, набор для определения концентрации белка (BCA-kit) (Sigma, США).

МА к АФП выделяли как было описано ранее [8]. Иммунизацию МА на BrCN-активированной Sepharose CL-4B производили по инструкции фирмы-производителя. Концентрацию АФП определяли с помощью бидинхонинового реагента (BCA-kit) и BSA в качестве стандарта. Иммунохимическую активность АФП определяли с помощью наборов для радиальной иммунодиффузии M-Partigen- α -Fetoprotein (Boehringer, Германия) по инструкции производителя. Все растворы готовили на деионизованной воде, полученной на установке для очистки воды Milli-Q (Millipore, США).

1. Выделение АФП (если не указано другое) проводили при 0–4°C из ретроплацентарной сыворотки. Сыворотку получали из крови пуповины человека после нормальных родов при сроках беременности от 32 до 42 недель и после проверки на наличие антител к антигенам гепатитов В и С, сифилиса и ВИЧ, образцы сыворотки, отрицательные по всем этим тестам, обрабатывали непосредственно после получения или замораживали и до использования хранили при –70°C. Перед началом выделения АФП из сыворотки непосредственно или после размораживания (12 ч при 4°C) нерастворимые компоненты удаляли центрифугированием (центрифуга J2-21, ротор JA-14 Beckman, США; 40 мин, 10000 об/мин).

1.1. Фракционирование полиэтиленгликолем. К надосадочной жидкости при равномерном перемешивании и охлаждении льдом добавляли сухой PEG до концентрации 7%. После растворения всего необходимого количества PEG раствор оставляли без перемешивания на 4 ч. Осадок отделяли центрифугированием (40 мин, 10000 об/мин). Надосадочную жидкость осторожно сливали, разбавляли на 20% фосфатно-солевым буфером, содержащим 20 мМ NaH_2PO_4 , 150 мМ NaCl, 0.02% NaN_3 , 0.5 мМ PMSF, pH 7.4 (PBS), и наносили на аффинную колонку (2.6 × 10 см) с МА, специфичными к АФП.

1.2. Аффинная хроматография. После нанесения образца колонку промывали PBS, содержащим 0.1% Lubrol PX до стабилизации базовой линии, затем 0.05 М Трис-HCl-буфером, pH 8.0, до горизонтальной базовой линии, и АФП элюиро-

вали этим же буфером, содержащим 4 М мочевины. Белок в элюате детектировали с помощью проточного фотометра (Uvicord SP, Pharmacia, LKB, Швеция) при 280 нм.

Концентрацию мочевины во фракциях элюата (10–12 мл) определяли с помощью настольного рефрактометра RL3 (PZO, Польша) и концентрацию АФП методом гель-проникающей хроматографии на колонке Superose 12 HR (1 × 30 см) (Pharmacia, Швеция) с детектированием при 220 нм и при скорости потока элюента 0.8 мл/мин (PBS, содержащий 10% (об/об) ацетонитрила); в качестве внешнего стандарта использовали раствор АФП с известной концентрацией.

1.3. Ионообменная хроматография. Раствор, выходящий с аффинной колонки и содержащий АФП, непосредственно наносили на ионообменную колонку (1.6 × 4.0 см) с Fractogel TSK DEAE-650 (M), уравновешенную 0.05 М Трис-НСI-буфером, содержащим 0.02% NaN_3 , pH 8.0. После нанесения всего объема образца колонку промывали одним объемом раствора 4 М мочевины, затем стартовым буфером до горизонтальной базовой линии и белок элюировали этим же буфером, содержащим 0.6 М KCl при скорости потока 2.5 мл/см²/ч.

1.4. Гель-проникающая хроматография. Элюат с ионообменной колонки, содержащий АФП (10–15 мл), инкубировали 1 ч при комнатной температуре и наносили на колонку (2.6 × 150 см), заполненную Sephacryl S-200 HR и уравновешенную PBS. Этот же буфер использовали для проведения разделения при скорости потока 25 мл/ч. Перед проведением гель-фильтрации на колонку наносили 100 мл PBS, содержащего 0.6 М KCl, и после нанесения образца наносили еще 50 мл этого же буфера. Белок отбирали в соответствии с фотометрическим профилем при 280 нм. Фракции, содержащие АФП в мономерной форме (65–75 мл), объединяли, концентрировали на мембране YM-30 (Amicon, Нидерланды) до концентрации белка 2–4 мг/мл, замораживали и лиофильно высушивали. Флаконы после сушки закрывали в атмосфере аргона и белок до использования хранили при –70°C.

2. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) с использованием установки Mini-Protean II (Bio-Rad Labs., США) с градиентной модификацией (4–15% ПААГ) метода Лэммли [26] согласно инструкции фирмы-изготовителя. После окраски с помощью Coomassie BB G-250 гели отмывали от избытка красителя и сушили.

3. Доступные сульфгидрильные группы в АФП определяли с помощью 5,5'-дитиобис(нитробензойной кислоты) по описанной методике [19].

4. Восстановление дисульфидных связей в АФП с помощью дитиотреита. К 0.5 мл раствора АФП в PBS с концентрацией 2 мг/мл, выдержанного в

течение 10 мин при необходимой температуре (37 или 4°C) в термостатируемой ячейке (Multytemp II, LKB, Швеция), добавляли при перемешивании на магнитной мешалке раствор дитиотреита с нужной концентрацией (5–30 мМ). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 мин, затем наносили на колонку с Sephadex G-25 SF, которую элюировали в атмосфере аргона, PBS с pH 7.4, приготовленном на 10% ацетонитриле. Элюент предварительно деаэрировали под вакуумом водоструйного насоса при интенсивном перемешивании. Фракцию белка, выходящую со свободным объемом колонки, собирали в герметично закрытые пробирки в атмосфере аргона. Концентрацию сульфгидрильных групп определяли как указано выше.

5. Модификация свободных аминокрупп АФП с помощью SPDP. АФП в PBS с концентрацией белка 2 мг/мл инкубировали с 3 экв. SPDP 60 мин при комнатной температуре и pH 6.0–8.0. Белок отделяли от избытка SPDP на колонке с Sephadex G-25 SF и по стандартной методике [27] (ϵ_{343} 8080 М⁻¹ см⁻¹) проводили спектрофотометрическое определение концентрации 2-тиопиридона после восстановления пиридилдитиопропионильного производного АФП с помощью дитиотреита.

Модификацию аминокрупп в молекуле АФП осуществляли также при pH 7.5 и количестве SPDP от 2 до 20 моль на 1 моль белка.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы “Разработка противоопухолевой вакцины на основе иммунотоксинов избирательного действия с использованием рецептор-опосредованного эндоцитоза”.

Авторы выражают благодарность В.К. Сологубу и И.А. Коромысловой (МНИИМЭ) за предоставленные моноклональные антитела к АФП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abelev G.I. // Cancer Res. 1968. V. 28. P. 1344–1350.
2. O'Connor G.T., Tatarinov Y.S., Abelev G.I., Uriel J. // Cancer. 1970. V. 25. P. 1091–1098.
3. Ruoslahti E., Seppala M. // Int. J. Cancer. 1971. V. 8. P. 374–383.
4. Brock D.J.H., Sutcliffe R.G. // Lancet. 1972. V. 2. P. 194–197.
5. Seppala M. // Clin. Obstet. Gynecol. 1972. V. 20. P. 737–757.
6. Deutsch H.F. // J. Tumor Mark. Oncol. 1994. V. 9(1). P. 11–14.
7. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Shmyrev I.I., Posypanova G.A., Belousova Yu.V., Sologub V.K., Luzhkov Yu.M., Nakachian R., Andreani J., Severin E.S. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1995. V. 37(2). P. 385–392.

8. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Posynapova G.A., Koromyslova I.A., Shmyrev I.I., Krivonos A.V., Myagkikh I.V., Feldman N.B., Finakova G.V., Katukov V.Yu., Luzhkov Yu.M., Nakachian R., Andreani J., Severin E.S. // *Tumor Targeting*. 1996. V. 2. P. 299–306.
9. Severin S.E., Posynapova G.A., Katukov V.Yu., Shmyrev I.I., Luzhkov Yu.M., Gerasimova G.K., Zhukova O.S., Vorozhtsov G.N., Kaliya O.L., Lukyanets E.A., Severin E.S. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. V. 43. P. 873–881.
10. Северин С.Е., Посыпанова Г.А., Сотниченко А.И., Москалева М.Ю., Фельдман Н.Б., Григорьев М.И., Северин Е.С., Петров Р.В. // Докл. РАН. 1999. Т. 366(4). С. 561–564.
11. Sotnichenko A.I., Severin S.E., Posyanova G.A., Feldman N.B., Grigor'ev M.I., Severin E.S., Petrov R.V. // *FEBS Lett.* 1999. V. 450. P. 49–51.
12. Deutsch H.F. // *Adv. Cancer Res.* 1991. V. 56. P. 253–312.
13. Mizejewski G.J. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1997. V. 215. P. 333–362.
14. Nishi S. // *Cancer Research*. 1970. V. 30. P. 2507–2513.
15. Adinolfi A., Adinolfi M., Cohen S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. V. 251. P. 197–207.
16. Chaturvedi R., Agarkar V., Sharma G.L., Sarma P.U. // *Prep. Biochem. and Biotechnol.* 1998. V. 28. P. 293–303.
17. Nolic J.A., Jancovic M. // *J. Serb. Chem. Soc.* 1994. V. 59(8). P. 525–530.
18. Kapadia G.G., Kortright K.H., Lee S.Y., McIntire K.P., Waldmann T.A. // *Prep. Biochem.* 1979. V. 9. P. 109–132.
19. Ellman G.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 82. P. 70–77.
20. Moro R., Villacampa M.J. // *Tumor. Biol.* 1986. V. 7. P. 115–121.
21. Kioussis D., Eiferman F., van de Rijn P., Gorin M.B., Ingram R.S., Tilghman S.M. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 1960–1967.
22. Morinaga T., Sakai M., Wegmann T.G., Tamaoki T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 80. P. 4604–4608.
23. Carlsson J., Drevin H., Axen R. // *Biochem. J.* 1978. V. 173. P. 723–737.
24. Krolick K.A., Uhr J.W., Slavin S., Vitetta E.S. // *J. Exp. Med.* 1982. V. 155. P. 1797–1809.
25. Dirnhuber P., Schutz F. // *Biochem. J.* 1948. V. 42. P. 628–632.
26. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques*. San Diego; New York; Boston; London; Sydney; Tokyo; Toronto: Academic Press, 1996.

A New Efficient Technology for the Isolation of Human α -Fetoprotein and the Status of Free Sulfhydryl and Amino Groups in the Resulting Preparation

A. I. Sotnichenko*, D. V. Zabolotnev*, S. E. Severin*, and V. I. Shveits**

e-mail: foxkaf@online.ru

*Moscow Research Institute of Medical Ecology, Simferopol' skii bul' v. 8, Moscow, 113149 Russia

**Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

A new preparative method for the isolation of human α -fetoprotein (AFP) from cord blood serum was described. This involves the precipitation of high-molecular compounds with polyethylene glycol and the affinity, ion exchange, and gel permeation chromatographies. Up to several tens of milligrams of the homogeneous AFP can be rapidly (48 h) prepared per isolation cycle in a high yield. The native structure of the isolated AFP was proved by immunochemical analysis. No free sulfhydryl groups were found in the purified AFP, and its reduction with dithiothreitol at 4°C led to the formation of two sulfhydryl groups probably belonging to the Cys18 and Cys67 residues in domain I of the protein molecule. Up to ten amino groups in the purified AFP were shown to be accessible for a mild modification by 3-(2-pyridyldithio)propionic acid *N*-succinimide ester. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cord blood serum; α -fetoprotein, isolation, amino groups, disulfide bond reduction