



УДК 577.112.856.088.2

© 1994 О. Е. Трубецкая, Т. А. Муранова,
О. И. Резникова, Г. В. Афанасьева, К. Ю. Резников

НОВАЯ ДВУХСТАДИЙНАЯ СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
 α_1 -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА (ОРОЗОМУКОИДА).
ОРОЗОМУКОИД ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С БРОМИСТЫМ ЭТИДИЕМ

Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН,
г. Пушкино Московской обл., 142292

Ключевые слова: α_1 -кислый гликопротеин, орозомукоид, белки острой фазы.

С помощью фенольной депротеинизации человеческой сыворотки крови с последующей очисткой электрофорезом в агарозном геле выделен гомогенный препарат α_1 -кислого гликопротеина (орозомукоида) с выходом 0,15—0,3 мг белка/мл сыворотки. В отличие от других белков сыворотки и родственных белков грызунов человеческий орозомукоид интенсивно окрашивается специфическим для нуклеиновых кислот красителем бромистым этидием. При этом человеческий орозомукоид не содержит прочно связанной ДНК и не взаимодействует ни с чужеродной фаговой, ни с эндогенной сывороточной ДНК. Изменение углеводной части молекулы не влияет на его способность связывать краситель. Это свойство, по-видимому, определяется особенностями аминокислотной последовательности орозомукоида. Анализ первичной структуры триптических пептидов выделенного α_1 -кислого гликопротеина позволяет предположить наличие новой, третьей изоформы этого белка в сыворотке крови человека.

α_1 -Кислый гликопротеин (орозомукоид, AGP), секретируемый гепатоцитами [1] и лимфоцитами [2, 3], относится к группе так называемых белков острой фазы. Концентрация AGP в сыворотке крови увеличивается в несколько раз при воспалениях, инфекциях, злокачественных новообразованиях [1, 4]. Точная функция AGP и причины повышения его концентрации в сыворотке при развитии заболеваний неизвестны. Биосинтез AGP регулируется стероидными гормонами и лимфокинами [5]. Считается, что этот белок участвует в регуляции иммунного ответа организма [6, 7]. В физиологической концентрации человеческий орозомукоид ингибирует пролиферацию *in vitro* лимфоцитов, но не злокачественных клеток, AGP и его производные подавляют как гуморальные, так и клеточные функции лимфоцитов [6]. Существует сильная гомология (75%) между AGP и иммуноглобулинами [1].

Сокращения: AGP — α_1 -кислый гликопротеин, орозомукоид, трис — тетраметиламинометан, НК — нуклеиновые кислоты, TFA — трифторуксусная кислота.

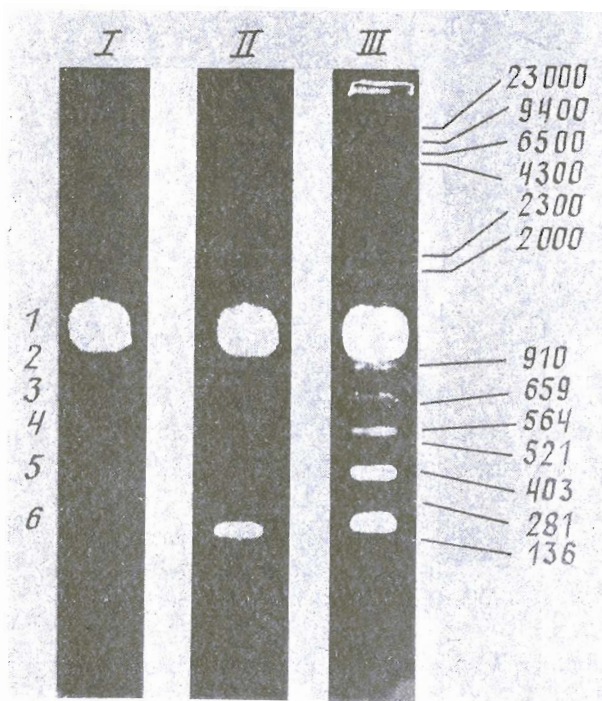


Рис. 1. Электрофорез в 1% агарозном геле нуклеопротеинового материала, выделенного из 3 мл сыворотки здоровых доноров (I, II, III). Справа приведены размеры фрагментов ДНК (п. о.) *Hind*III-рестрикта ДНК фага λ и *Alu*I-рестрикта pBR322. 1—6 — фрагменты в порядке увеличения их электрофоретической подвижности. Здесь и на рис. 3, 5 и 6 окрашивание геля бромистым этидием

Молекулярная масса AGP 40 кДа. Это один из наиболее обогащенных углеводами гликопротеинов сыворотки (~45% углеводов по массе). Характерной особенностью белка является микрогетерогенность, обусловленная как генетическим полиморфизмом (обнаружен кластер генов *agp-A*, *agp-B* и *agp-B'*, кодирующих AGP-1- и AGP-2-изоформы белка, различающиеся аминокислотной последовательностью [8]), так и различной посттрансляционной модификацией полипептидной цепи [1].

Целью настоящей работы была разработка нового метода выделения человеческого орозомукоида и исследование его физико-химических свойств. В предыдущих работах [9, 10] нами была применена фенольная депротенинизация для выделения в одну стадию гомогенного препарата орозомукоида из цельной сыворотки крови мыши. Фенольная депротенинизация ранее использовалась рядом авторов для отделения протеогликанов и гликопротеинов, остающихся в водной фазе, от негликозилированных белков, переходящих в фенольную фракцию [11—14].

После обработки сыворотки крови человека фенолом и хлороформом основная масса негликозилированных белков переходила в органическую фазу; материал из водной фракции, содержащей нуклеиновые кислоты и гликопротеины, осаждали этанолом и анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с окраской бромистым этидием. Было проанализировано 49 препаратов сыворотки крови здоровых доноров, причем в каждом из них была обнаружена интенсивно окрашенная диффузная полоса 1 с кажущимся размером около 1000 п. о. (рис. 1, I—III). В 23 случаях препараты не содержали других фрагментов, окрашивающихся бромистым этидием (рис. 1, I), в 18 случаях кроме полосы 1 был

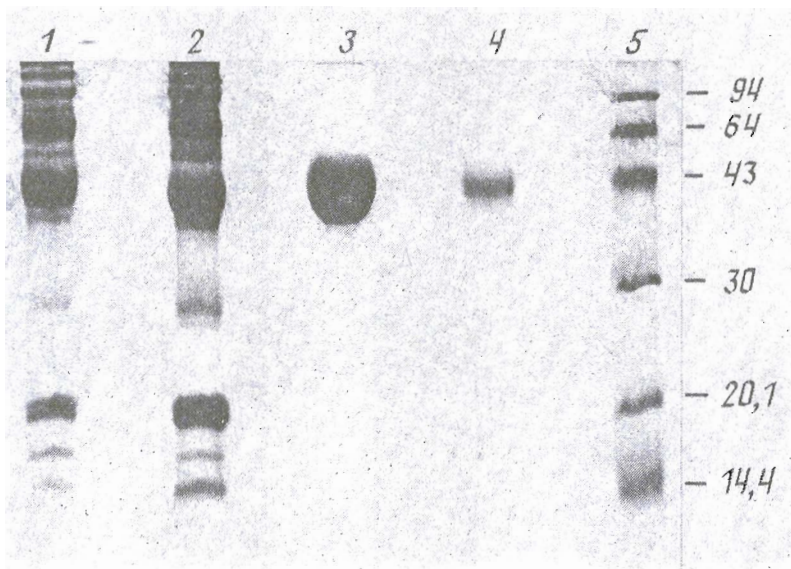


Рис. 2. Электрофорез в 15% ПААГ с окраской кумасси R-250 фенольных препаратов I и III с рис. 1 (1, 2) и 40-кДа белка, элюированного с агарозного геля (3, 4). Указаны молекулярные массы (кДа) белковых стандартов (5)

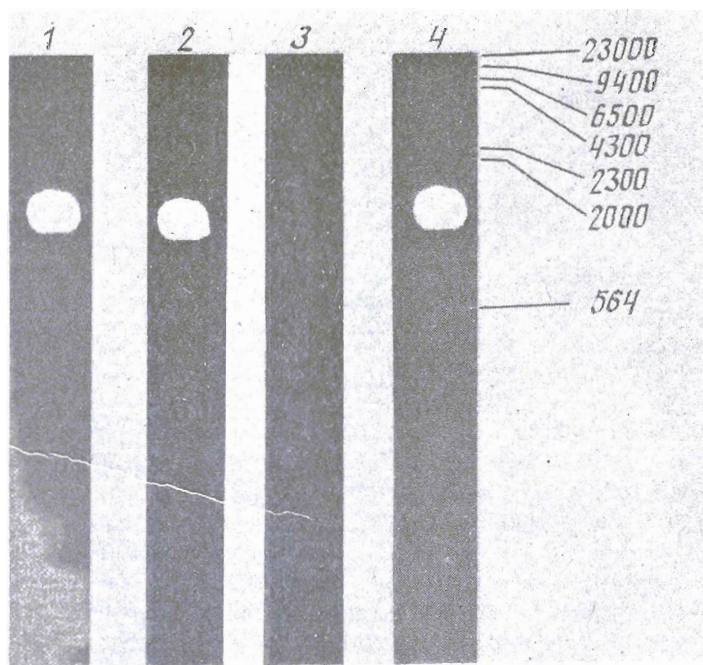


Рис. 3. Электрофорез в 1% агарозном геле 50 мкг препарата 40-кДа белка, выделенного электроолюцией из агарозного геля (1), с добавлением РНКазы (2), протеиназы К (3) и ДНКазы (4). Приведены размеры фрагментов ДНК (п. о.) *Hind*III-рестрикта ДНК фага λ

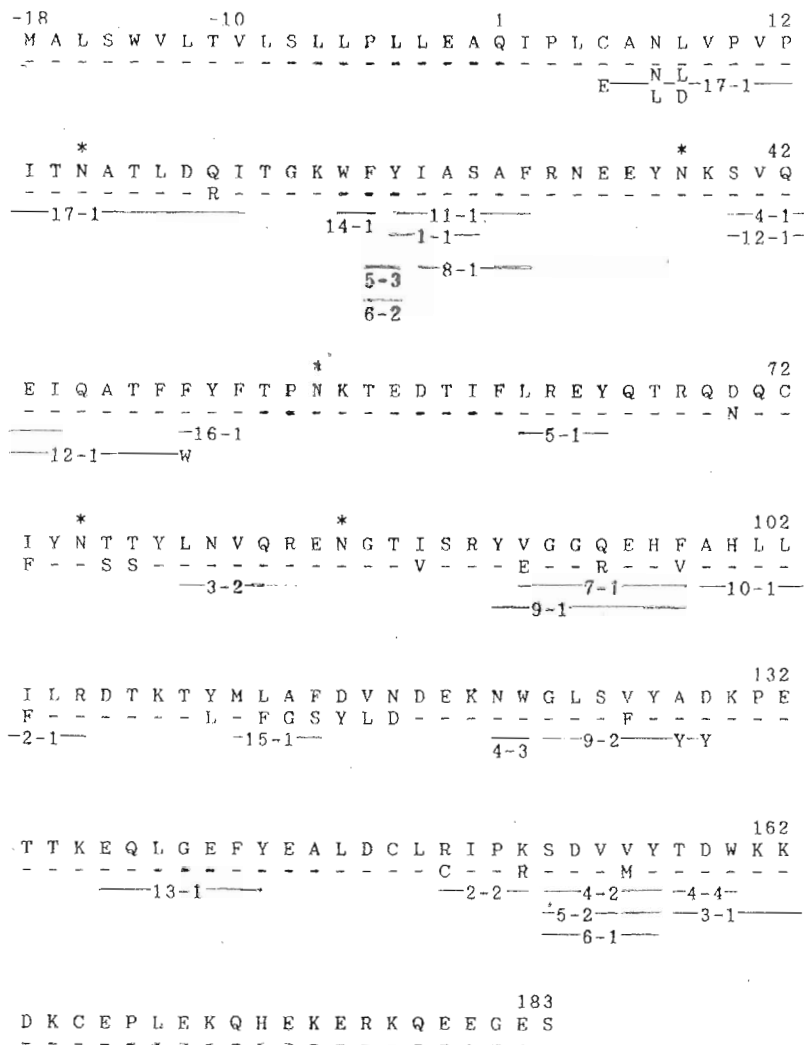


Рис. 4. Аминокислотные последовательности человеческих белков AGP-1 и AGP-2, выведенные из структуры соответствующих кДНК [8]. Для изоформы AGP-2 приведены только отличающиеся от AGP-1 аминокислоты. Показаны пептиды, полученные в результате триптического гидролиза окрашивающегося бромистым этидием 40-кДа белка из сыворотки крови человека. Звездочками отмечены гликозилированные остатки аспарагина

идентифицирован еще один фрагмент с размером $\sim 180-200$ п. о. (рис. 1, II), в 8 случаях препараты сыворотки крови здоровых доноров содержали до 6 окрашивающихся бромистым этидием фрагментов (рис. 1, III). Чтобы установить природу выделенного материала, препараты обрабатывали ДНКазой, РНКазой и протеиназой К. Ни один из идентифицированных фрагментов не расщеплялся РНКазой, фрагменты 2—6 с размером, кратным длине нуклеосомного повтора (180—200 п. о.), расщеплялись ДНКазой, наиболее интенсивно окрашенная диффузная полоса 1 с кажущимся размером ~ 1000 п. о. исчезала только после обработки препарата протеолитическими ферментами.

Концентрация ДНК в сыворотке здоровых доноров колебалась от 0 до 1 мкг/мл сыворотки. Характерный набор фрагментов сывороточной ДНК человека с размером, кратным длине нуклеосомного повтора, указывает на то, что они образовались в результате апоптоза (программируемой клеточной гибели), со-

Аминокислотная последовательность триптических пептидов 40-кДа белка, выделенного из нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови человека

Пептид	Аминокислотная последовательность	Кол-во пептида, пмоль	Идентифицирован в цепи
T-1-1	YIAS	2000	AGP-1, -2
T-2-1	ILR	2000	AGP-1
T-2-2	RIPK	4000	AGP-1
T-3-1	TDWKK	740	AGP-1, -2
T-3-2	LVNQR	1250	AGP-1, -2
T-4-1	SVQEI	3200	AGP-1, -2
T-4-2	SDVVY	6900	AGP-1
T-5-2			
T-6-1			
T-4-3	NW	1200	AGP-1, -2
T-4-4	TDW	1000	AGP-1, -2
T-5-1	LREY	1880	AGP-1, -2
T-5-3	FY	1500	AGP-1, -2
T-6-2			
T-7-1	VGGQEHF	3400	AGP-1
T-8-1	IASAF	3000	AGP-1, -2
T-9-1	YVGGQEHF	750	AGP-1
T-9-2 **	GLSVYYY	2000	—
T-10-1	AHLL	300	AGP-1, -2
T-11-1	YIASAF	600	AGP-1, -2
T-12-1 **	SVQEIQATFW	630	—
T-13-1	EQLGEFY	400	AGP-1, -2
T-14-1	WF	1800	AGP-1, -2
T-15-1	MLAF	8000	AGP-1
T-16-1	FYF	450	AGP-1, -2
T-17-1**	EAL ^{NL} _{LD} VPVPIT*ATLDQI	1200	—

* Аминокислота не идентифицирована, по структуре — гликозилированный остаток аспарагина.

** Отмечены пептиды, содержащие замены в сравнении с AGP-1 и AGP-2 (см. рис. 4).

провожающего структурные перестройки в организме [15]. Интенсивность окрашивания бромистым этидием полосы 1 при электрофорезе была примерно одинаковой во всех исследованных образцах. Материал из этой полосы был извлечен из геля с помощью электроэлюции и представлял собой гомогенный белок с молекулярной массой 40 кДа (рис. 2). Аликвоты белка обрабатывали РНКазой, ДНКазой и протеиназой К. По данным электрофореза в 15% ПААГ, исследуемый белок полностью расщеплялся протеолитическими ферментами, свободными от ДНКаз, при этом также исчезало окрашивание бромистым этидием при электрофорезе в 1% агарозном геле (рис. 3). На окрашивание белка специфическим для НК красителем не влияла обработка РНКазой или ДНКазой. Таким образом, полученный при электроэлюции из 1% агарозного геля сывороточный 40-кДа белок, окрашивающийся бромистым этидием, не содержит заметных количеств ДНК.

Анализ аминокислотной последовательности нескольких триптических пептидов (таблица, рис. 4) позволил идентифицировать его в качестве α_2 -кислого гликопротеина (орозомукоида). Выход белка составлял 0,15—0,3 мг/мл сыворотки. Способность человеческого орозомукоида связывать бромистый этидий не зависела

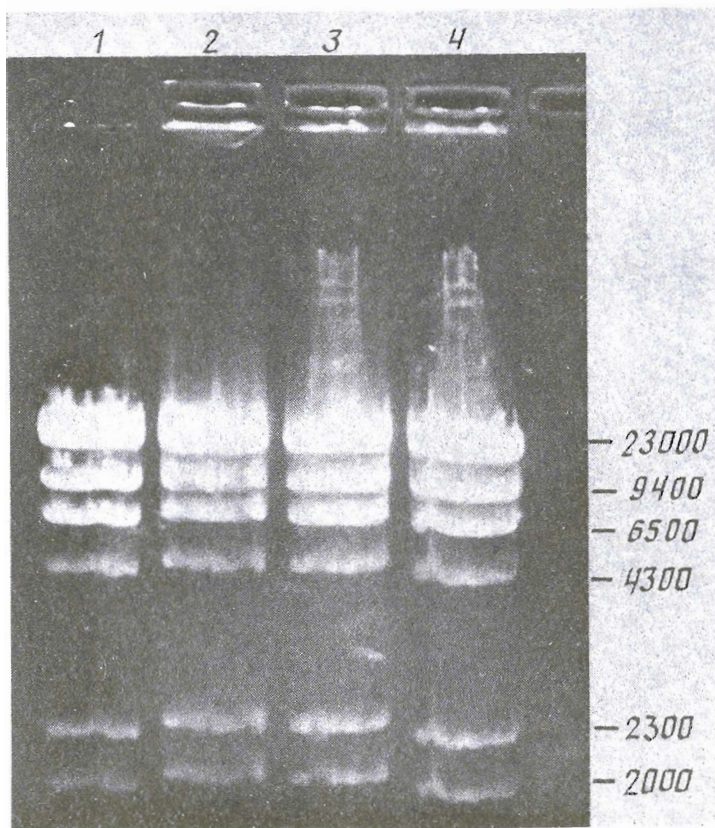


Рис. 5. Электрофорез в 1% агарозном геле *Hind*III-рестрикта ДНК фага λ (1) с добавлением 3 мкг (по белку) сыворотки здорового донора (2), нуклеопротеиновой фракции, выделенной из той же сыворотки (3), и гомогенизированного орозомукоида, полученного электроосаждением из агарозного геля (4). Справа приведены размеры больших фрагментов ДНК (п. о.)

от способа выделения белка. Так, коммерческий препарат орозомукоида, выделенный с помощью ионообменной хроматографии по стандартной методике [16], взаимодействует с бромистым этидием с той же интенсивностью, что и выделенный при фенольной депротеинизации сыворотки. Не менее 5 мкг человеческого орозомукоида детектируется окраской бромистым этидием в условиях электрофореза. Способность связывать специфический для НК краситель бромистый этидий является уникальным свойством человеческого орозомукоида. Так, выделенные и проанализированные нами орозомукоиды мыши, крысы и кролика не окрашивались бромистым этидием, как и другие белки сыворотки крови человека.

При обработке человеческого орозомукоида нейраминидазой, приводящей к удалению нейраминовых кислот, изменялась электрофоретическая подвижность белка, но не изменялась его способность взаимодействовать с красителем. Соп-А-связываемая и Соп-А-несвязываемая фракции орозомукоида нормальной сыворотки человека, различающиеся молекулярными массами, изоэлектрическими точками и моносахаридным составом [17], обладали одинаковой способностью связывать бромистый этидий (данные не приводятся). Таким образом, в наших экспериментах показано, что препараты орозомукоида с измененным составом углеводных компонентов сохраняли способность связывать бромистый этидий.

В предыдущей работе [9] нами было показано, что при развитии малярии

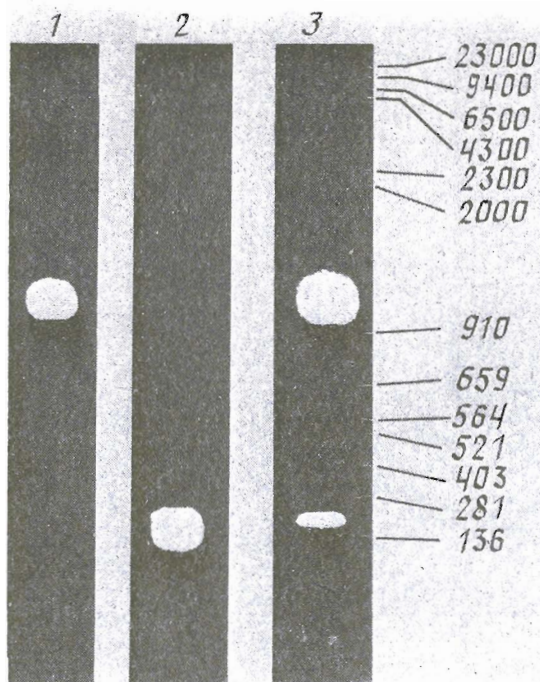


Рис. 6. Электрофорез в 1% агарозном геле фенольного препарата II с рис. 1, выделенного из 3 мл сыворотки здорового донора (3), фенольного препарата, выделенного из 10 мл той же сыворотки, истощенной на колонке с иммобилизованными антителами против орозомукоида (2) и орозомукоида, снятого с колонки глициновым буфером (1). Приведены размеры фрагментов ДНК (п. о.) *Hind*III-рестрикта ДНК фага λ и *Acl*I-рестрикта pBR322

у мышей параллельно с увеличением концентрации орозомукоида увеличивалось содержание сывороточной ДНК, а по данным работы [18] человеческий орозомукоид взаимодействует с тимусной ДНК теленка. Ранее [19—21] в сыворотке крови человека было обнаружено около 20 ДНК-связывающих белков, большинство из которых не идентифицированы. Поэтому нами была предпринята попытка выяснить, обладает ли человеческий орозомукоид ДНК-связывающей активностью.

При добавлении к нативной сыворотке или фенольному препарату сыворотки фрагментов, полученных расщеплением ДНК фага λ рестриктазой *Hind*III, был обнаружен сдвиг электрофоретической подвижности фрагментов ДНК, указывающий на наличие в исследуемых препаратах сыворотки ДНК-связывающих белков. Однако гомогенный орозомукоид, полученный электроэлюцией из агарозного геля, а также коммерческий препарат, выделенный с помощью ионообменной хроматографии, не изменял электрофоретическую подвижность фрагментов ДНК фага λ (рис. 5).

В следующем эксперименте сыворотку человека истощали на аффинной колонке с иммобилизованными кроличьими поликлональными моноспецифическими антителами против орозомукоида, выделенного из агарозного геля электроэлюцией и, следовательно, не содержащего сывороточной ДНК. В истощенной сыворотке был обнаружен набор фрагментов сывороточной ДНК с размером 180—200 п. о. С колонки с помощью глицинового буфера смывали орозомукоид, не содержащий фрагментов ДНК (рис. 6).

Проведенные эксперименты показывают, что орозомукоид не обладает ДНК-связывающей активностью. Исследуемый белок не взаимодействует ни с чужеродной ДНК фага λ , ни с эндогенной сывороточной ДНК. По-видимому, способность связывать бромистый этидий обусловлена лишь его специфической

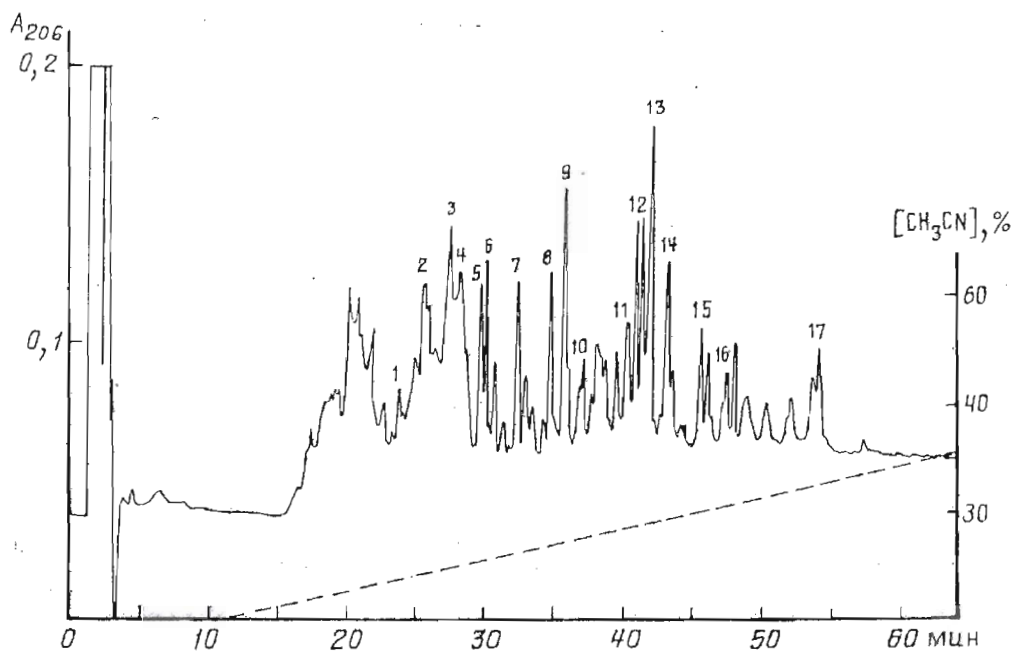


Рис. 7. Разделение пептидов триптического гидролизата окрашивающегося бромистым этидием 40-кДа белка из сыворотки крови человека методом ВЭЖХ на колонке (0,46 × 15 см) с носителем Ultrasphere-ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA. Здесь и на рис. 8 скорость элюции 1,2 мл/мин, штриховая линия обозначает изменение концентрации ацетонитрила

пространственной структурой, зависящей от особенностей его аминокислотной последовательности.

Нами была исследована аминокислотная последовательность орозомукоида, выделенного фенольной депротеинизацией из сыворотки одного здорового донора. Препарат белка обрабатывали трипсином. При разделении гидролизата с помощью ВЭЖХ на колонке Ultrasphere-ODS было получено 17 фракций (рис. 7), каждую из которых подвергали рехроматографии на той же колонке (рис. 8). Аминокислотную последовательность выделенных пептидов устанавливали автоматической деградацией по методу Эдмана (таблица). В общей сложности из триптического гидролизата было выделено и отсквенировано 23 пептида, покрывающих более 50% аминокислотной последовательности зрелого белка (рис. 4). Значительная часть полученных пептидов образовалась в результате расщепления по остаткам ароматических и гидрофобных аминокислот, что, по-видимому, можно объяснить высоким содержанием примесной химотриптической активности в используемом препарате фермента. Пять из 23 проанализированных пептидов принадлежат исключительно изоформе AGP-1, 14 пептидов перекрывают области, идентичные для обеих изоформ. Не было найдено ни одного пептида, принадлежащего исключительно AGP-2-изоформе. Пептид T-9-2 идентичен соответствующему пептиду изоформы AGP-1, за исключением замены остатков аланина и аспарагиновой кислоты на тирозин, фракция T-17-1 включает в себя два пептида, различающиеся аминокислотами в положениях 3 и 4, причем одна из последовательностей соответствует изоформе AGP-1, а другая не была ранее идентифицирована. В пептиде T-12-1 вместо фенилаланина на С-конце обнаружен триптофан, причем в гидролизате присутствует также трипептид T-16-1, полностью соответствующий изоформе AGP-1 (с фенилаланином в данном положении).

Приведенные данные позволяют утверждать, что в исследованном препарате сыворотки кроме изоформы AGP-1 присутствует новая, ранее не идентифици-

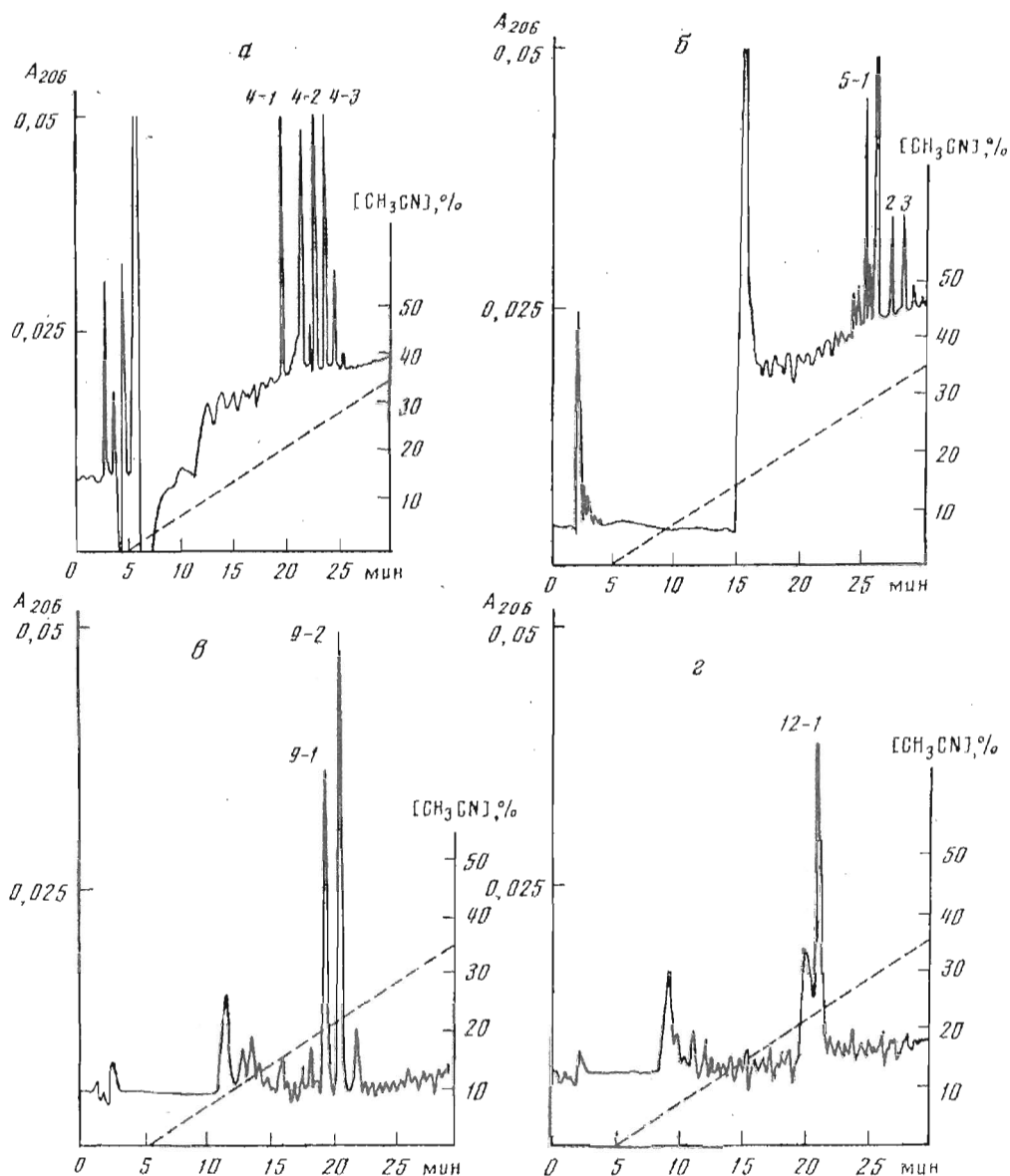


Рис. 8. Разделение фракций 4 (а), 5 (б), 9 (в) и 12 (г) (см. рис. 7) с помощью ВЭЖХ на колонке ($0,46 \times 15$ см) с носителем Ultrasphäre-ODS в градиенте концентрации ацетонитрила в 10 мМ CH_3COONH_4 , pH 5,7

рованная форма белка, содержащая замены по крайней мере в положениях 7(N \rightarrow L), 8(L \rightarrow D), 49(F \rightarrow W), 128(A \rightarrow Y) и 129(D \rightarrow Y) (рис. 4).

При сравнении аминокислотной последовательности изоформ человеческого орозомукоида с мышинными, выведенными из соответствующих нуклеотидных последовательностей [8, 22, 23], нами было обнаружено, что человеческие белки имеют три делеции в С-концевой области полипептидной цепи по сравнению с мышинными (рис. 9). Можно допустить, что именно эти особенности первичной структуры определяют необычную пространственную организацию человеческого орозомукоида, обуславливающую его способность связывать бромистый этидий.

		30	60
AGP1 BALB/c	MAIHTVLIILSLLPLLEAGNPEHANTIGEPITNETLSWLSDKWFFMGAAFRKLEIYRQAI		
AGP2 BALB/c	MAIHMILVMVLSLLPLLEAGNPEHVNTIGEPITNETLSWLSDKWFFIGAAVLNPDYRQEI		
AGP1A M.car.	MAIHMILVMVLSLLPLLEAGNPEHVNTIGEPITNETLSWLSDKWFFIGAAVLNPDYRQEI		
AGP2A M.car.	MAIHTVLIIMVLSLLPLLEAGNPEHVNTIGEPITNETLGVLSDKWFFMGAAFRKLEIYRQAI		
AGP1X M.car.	MAIHMILVMVLSLLPLLEAGNPEHVNTIGEPITNETLGVLSDKWFFIGAAVLNPDYRQEI		
AGP3X M.car.	MAIHTVLIIMVLSLLPLLEAGNPEHVNTIGEPITNETLGVLSDKWFFMGARFRKLEIYRQAI		
		29	59
AGP1 Hum.	MAISWVLTIVLSLLPLLEAGIPLCANLVP*VPIITNATLDQITCKWFFYIASAFRNEEYKNSV		
AGP2 Hum	MAISWVLTIVLSLLPLLEAGIPLCANLVP*VPIITNATLDRIITCKWFFYIASAFRNEEYKNSV		

		90	120
1	QTMQSEFFFYLIITNLINDTIELRESQTIIGDQCVYNSTHVGFGRENGTFSKVEGGVETFAHL		
2	QKTMVFFFNLIITNLINDTIELREYHTIDDDHCVYNSTHVGFGRENGTFSKVMGGVKIFADL		
3	QKMGVFFFNLIITNLINDTIELREYHTIDDDHCVYNSTHVGFGRENGTFSKVMGGVKIFADL		
4	QMMQTEFFFYLIITNLINDTIELRESQTIIGDQCVYNSTHVGFGRENGTFSKVEGGVETFAHL		
5	QKMGVFFFNLIITNLINDTIELREYHTIDDDHCVYNSTHVGFGRENGTFSKVMGGVKIFADL		
6	QMMQTEFFFYLIITNLINDTIELRESQTIIGDQCVYNSTHVGFGRENGTFSKVEGGVETFAHL		
		89	119
7	QELGATFFYFIPNKTEDTIFLREYGTIRQDQCIYNTTYLVNQGRENGLISRVVGGGVEHFAHL		
8	QELGATFFYFIPNKTEDTIFLREYGTIRQNQCIFYNSSYLVNQGRENGLISRVVGGGVEHFAHL		

		150	180
1	IVLRKHGAFMLAFDLKDEKKRGLSLYAKRFDITPELREVFQKAVTHVGMDESEIIFVDWK		
2	IVLRKHGAFMLAFDLKDEKKRGLSLNAKRFDITPELREVFQKAVTHVGMDESEIIFVDWK		
3	IVLRKHGAFMLAFDLKDEKKRGLSLNAKRFDITPELREVFQKAVKHVGMDESEIIFVDWK		
4	IVLRKHGAFMLAFDLNDFKKRGLSLYAKRFDMTLELREVFQKAVKHVGMDESEIIFVDWK		
5	IVLRKHGAFMLAFDLKDEKKRGLSLNAKRFDITPELREVFQKAVKHVGMDESEIIFVDWK		
6	IVLRKHGAFMLAFDLNDFKKRGLSLYAKRFDMTLELREVFQKAVKHVGMDESEIIFVDWK		
		149	179
7	LILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLSVYADKHEITTKKQIGEFYALDCLRIPKSDVVYTDWK		
8	LFLRDTKTIIDFGSYLDDEKNWGLSVYADKHEITTKKQIGEFYALDCLCIPRSDVVYTDWK		

		207
1	KDKCGGQEKQLELEKQETKKDP EEGQA	
2	KDKCSQQEKQLELEKQETKKDP EEGQA	
3	KDKCGGQEKQLELEKQETKKDP EEGQA	
4	KDKCGGQEKQLELEKQETKKDP EEGQA	
5	NHKCGGQEKQLELEKQETKKDP EEGQA	
6	KDKCGGQEKQLELEKQETKKDP EEGQA	
		201
7	KDKCFPLEKQH***EK*RK*EECES	
8	KDKCFPLEKQH***EK*RK*EECES	

Рис. 9. Сравнение аминокислотных последовательностей мышинных (строки 1—6) и человеческих (строки 7—8) α_1 -кислых гликопротеинов, выведенных из структур соответствующих кДНК [8, 22, 23]. Идентичные аминокислоты обведены прямоугольниками, делеции обозначены звездочками

Экспериментальная часть

В работе использовали трис, акриламид, бисакриламид, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин и персульфат аммония (Reanal, Венгрия), агарозу и сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция), ДНКазу I, РНКазу А, бромистый этидий, адьювант Фрейнда (Sigma, США), трипсин (Boehringer, США), ацетонитрил (Merck, ФРГ), TFA (Pierce, США), нейраминидазу (Millipore, США), остальные реактивы отечественного производства марки о. с. ч., фенол и этанол дважды перегнанные. Соп-А-связываемая и Соп-А-несвязываемая фракции электрофоретически и иммунохимически чистого α_1 -кислого гликопротеина нормальной сыворотки человека были любезно предоставлены С. Д. Шиян (ИБХ РАН, лаборатория химии углеводов).

В работе использовали сыворотку крови здоровых доноров. Сыворотку хранили при -20°C .

α_1 -Кислый гликопротеин выделяли фенольной депротеинизацией с последующей очисткой электрофорезом в 1% агарозном геле. Сыворотку крови человека разводили вдвое ТЕ-буфером (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ EDTA), добавляли равный объем фенола, встряхивали 5 мин при 20° С, центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин для расслоения фаз, водную фазу собирали, еще раз обрабатывали смесью фенол—хлороформ (1 : 1) и хлороформом. К водной фазе добавляли 1/10 объема 3 М ацетата натрия, рН 5,2, и 2,5 объема этанола. Раствор оставляли на 1 сут при -20° С, осадок собирали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 мин, промывали 70% этанолом, сушили, растворяли в необходимом объеме ТЕ-буфера и фракционировали электрофорезом в 1% агарозном геле в трис-боратном буфере по методу [24] с окрашиванием бромистым этидием. Электроэлюцию орозомукоида из агарозного геля в лунку проводили как описано в [24]; элюированный материал осаждали 2,5 объемами этанола в присутствии 0,3 М ацетата натрия, рН 5,2.

Отдельные порции нуклеопротеиновой фракции сыворотки крови или выделенного электроэлюцией орозомукоида обрабатывали ДНКазой, РНКазой и протеиназой К согласно [24] с последующим анализом аликвот электрофорезом в 1% агарозном геле с окраской бромистым этидием.

Обработку орозомукоида нейраминидазой проводили в 0,1 М ацетате натрия, рН 5,5, в течение 1 ч при 37° С с последующим анализом аликвот электрофорезом в 15% ПААГ в присутствии SDS с окраской кумасси R-250 [25] и 1% агарозном геле с окраской бромистым этидием. К 1 мг белка добавляли 0,5 ед. акт. фермента.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [26] и по данным аминокислотного анализа.

Концентрацию ДНК в растворе определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм.

Кроличью антисыворотку получали по стандартной схеме трехкратной инъекцией с интервалом в 1 мес 0,5 мг орозомукоида, выделенного электроэлюцией из агарозного геля. Моноспецифические поликлональные антитела получали с использованием аффинного сорбента с иммобилизованным орозомукоидом. Иммобилизацию орозомукоида или антител на ВгСN-активированную сефарозу проводили в 0,1 М NaHCO₃, рН 8,5, в течение 1 ч. В реакцию брали белок из расчета 1 мг на 1 мл геля. За иммобилизацией следили по поглощению раствора при λ 280 нм.

Аффинную хроматографию на сефарозе 4В с иммобилизованными моноспецифическими антителами против орозомукоида проводили по следующей методике. Через колонку (10 мл геля), уравновешенную 10 мМ трис-НСl-буфером, рН 7,5, содержащим 0,15 М NaCl, несколько раз пропускали 10 мл нативной человеческой сыворотки до полного удаления из нее α_1 -кислого гликопротеина. Истощенную сыворотку обрабатывали фенолом и хлороформом, как описано выше, и анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Орозомукоид смывали с колонки 0,1 М глицин-НСl-буфером, рН 3,0, концентрировали, осаждали 2,5 объемами этанола и анализировали с помощью электрофореза в агарозном и полиакриламидном гелях.

Взаимодействие сывороточных белков с чужеродной ДНК оценивали по их способности изменять электрофоретическую подвижность *Hind*III-фрагментов ДНК фага λ при электрофорезе в 1% агарозном геле. К 3 мкг *Hind*III-фрагментов ДНК фага λ , растворенных в 20 мкл буфера для связывания (10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ EDTA, 10 мМ MgCl₂), добавляли препараты нативной сыворотки, фенольной сывороточной фракции или гомогенного орозомукоида, содержащие 3—10 мкг суммарного белка. Смесь инкубировали 30 мин при 20° С и анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Триптический гидролиз 10 нмоль белка проводили 4 ч при 37° С в 0,1 М NH₄НСO₃, рН 8,3, при фермент-субстратном соотношении 1 : 25. Гидролиз останавливали замораживанием при -20° С с последующей лиофилизацией.

ВЭЖХ образовавшейся смеси пептидов осуществляли на колонке (0,46 × 15 см) с обращенной фазой Ultrasphere-ODS (Altex, США). Образец наносили на колонку в виде раствора в исходном буфере (0,1% TFA, pH 2,0, или 10 mM CH₃COONH₄, pH 5,7). Элюцию пептидов осуществляли градиентом концентрации ацетонитрила в 0,1% TFA, pH 2,0, или 10 mM CH₃COONH₄, pH 5,7.

Аминокислотную последовательность пептидов устанавливали автоматической деградацией по Эдману при помощи белкового секвенатора (Model 477 A, Applied-Biosystems, США), образец наносили на стеклянный фильтр, обработанный полибренном. Идентификацию («on-line») фенилтиогидантоиновых (Pth) производных аминокислот осуществляли на Pth-анализаторе (Model 120 A, Applied-Biosystems, США) в стандартных условиях. Количество пептидов определяли по выходу Pth-производного аминокислоты, отщепляемой на первом шаге.

Авторы выражают благодарность канд. хим. наук В. Е. Заграничному и канд. хим. наук В. Н. Пашкову (ФИБХ РАН) за ценные замечания в ходе выполнения и обсуждения работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmid K. // The Plasma Proteins. N. Y.: Acad. Press, 1975. V. 1. № 4. P. 183—228.
2. Gahmberg C. G., Andersson L. C. // J. Exp. Med. 1978. V. 148. № 2. P. 507—521.
3. Stefanini G. F., Mazzetti M., Piccinini G. C., Capelli S., Baraldini M., Gasbarrini G. // Biochem. Int. 1989. V. 19. № 2. P. 397—403.
4. Kremer J. M. H., Willing J., Janssen L. H. M. // Pharm. Revs. 1988. V. 40. № 1. P. 1—47.
5. Heinrich P. C., Castell J. V., Andus T. // Biochem. J. 1990. V. 265. № 3. P. 621—636.
6. Bennett M., Schmid K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 10. P. 6109—6113.
7. Cheresch D. A., Haynes D. H., Distasio J. A. // Immunology. 1984. V. 51. № 3. P. 541—548.
8. Dente L., Pizzi M. G., Metspalu A., Cortese R. // ЕМВО J. 1987. V. 6. № 8. P. 2289—2296.
9. Трубецкая О. Е., Тимеева Г. Р., Афанасьева Г. В., Резников К. Ю., Садовников В. Б., Селюченко О. А., Липкин В. М. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 42—46.
10. Трубецкая О. Е., Белогрудов Г. И., Данилов А. В., Тимеева Г. Р., Афанасьева Г. В., Муранова Т. А., Липкин В. М. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 1. С. 47—52.
11. Michon J. // Nature. 1962. V. 193. № 4820. P. 83—84.
12. Marchesi V. T., Andrews E. P. // Science. 1971. V. 174. № 4015. P. 1247—1248.
13. McBain J. A., Mueller G. C. // Anal. Biochem. 1990. V. 188. № 1. P. 203—213.
14. Howe C., Lloyd O., Lee L. T. // Meth. Enzymol. 1972. V. XXVIII. B. P. 236—245.
15. Fesus L. // Immunol. Lett. 1991. V. 30. № 3. P. 277—282.
16. Laurent P., Miribel L., Bienvenu J., Vallve C., Arnaud P. // FEBS Lett. 1984. V. 168. № 1. P. 79—83.
17. Шиян С. Д., Исаилов В. В., Бовин Н. В., Новикова Л. И., Алешикин В. А. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 663—670.
18. Tunis M., Weinfeld H. // Arch. Biochem. and Biophys. 1960. V. 87. № 2. P. 210—216.
19. Katsunuma T., Tsuda M., Rusumi T., Ohkubo T., Mitomi T., Nakasaka H., Tajima T., Yokoyama S., Kamiguchi H., Kobayashi K., Shinoda H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 93. № 2. P. 552—557.
20. Parsons R. G., Longmire R. L., Hoch S. O., Hoch J. A. // Cancer Res. 1977. V. 37. № 3. P. 692—695.
21. Ohkubo T., Tsuda M., Yamamura M., Matsumoto M., Kamiguchi H., Katsunuma T. // Tokai J. Exp. Med. 1982. V. 7. № 3. P. 331—336.
22. Lee S.-C., Chang C.-J., Lee Y.-M., Lei H.-Y., Lai M.-Y., Chen D.-S. // DNA. 1989. V. 8. № 4. P. 245—251.
23. Prowse K. R., Baumann H. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 18. P. 10201—10209.
24. Маннатиус Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 479.
25. Laemmli U. K. // Nature. 1979. V. 227. № 5259. P. 680—684.
26. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 2. P. 265—275.

Поступила в редакцию
28.X.1993
После доработки
25.V.1994

*O. E. Trubetskaya, T. A. Muranova, O. I. Reznikova,
G. V. Afanasieva, K. Yu. Reznikov*

**NEW TWO-STEP PURIFICATION OF HUMAN α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN (OROSOMUCOID). OROSOMUCOID BINDS
ETHIDIUM BROMIDE**

*Branch of the M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Pushchino, Moscow Region*

Key words: α_1 -acid glycoprotein, orosomucoid, AGP, acute phase blood serum proteins.

Human α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid, AGP) was purified to homogeneity by a two-step procedure using phenol and chloroform deproteinization of serum with subsequent preparative electrophoresis on agarose gel. It was obtained 0.15—0.3 mg of protein from 1 ml of serum. Human α_1 -AGP binds ethidium bromide but not DNA. Neither other human serum proteins nor mice and rat α_1 -AGP bind ethidium bromide. This property of human orosomucoid depends on its amino acid sequence rather than on the carbohydrate part of the molecule.