

УДК 577.112.083

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ РЕНАТУРАЦИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. О. А. Шарапова*, М. С. Юркова**, С. М. Андропова**, А. Н. Фёдоров**, С. Е. Северин*, Е. С. Северин**

*Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии, Москва, 117638
e-mail: sharapova_o@hotmail.com

**Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, 117638

Поступила в редакцию 01.03.2011 г.

С-концевой фрагмент человеческого онкофетального белка альфа-фетопротеина (АФП) может быть использован для адресной доставки цитостатиков к раковым клеткам многих видов опухолей. Фрагмент АФП (с 404 по 595 аминокислотный остаток полноразмерного белка) был клонирован и продуцирован в клетках *Escherichia coli*, штамм BL21 (DE3) в виде телец включения. Для получения функционально активного белка необходимо проводить его ренатурацию. Процедура ренатурации третьего домена АФП (rAFP3D) значительно усложняется тем, что данный белок является гидрофобным и содержит большое количество S–S-связей. Была разработана методика ренатурации rAFP3D иммобилизованного на кремниевой металло-хелатной смоле. Выход ренатурированного С-концевого фрагмента составил не менее 60% с чистотой порядка 98%. Разработанная методика была впервые применена для гидрофобного белка с большим количеством S–S-связей. Данный подход может быть применен для эффективной ренатурации других гидрофобных белков с большим количеством дисульфидных связей для научных и практических целей.

Альфа-фетопроtein (АФП) является основным сывороточным белком, характерным для эмбрионального периода развития человека [1]. В норме в постэмбриональный период развития АФП отсутствует в сыворотке крови. Появление этого белка в этот период в сыворотке крови человека указывает на развитие различных опухолевых заболеваний (первичный рак печени, тетракарцинома и пр.) [2, 3]. Методом электронной микроскопии была продемонстрирована трехдоменная организация молекулы АФП [4]. Данный белок проникает в клетку с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза [5]. Белок, играющий роль рецептора для АФП (РАФП), также является онкофетальным белком: он экспрессируется во многих видах раковых клеток, но не в нормальных клетках организма в постэмбриональный период [6, 7]. Существуют данные о том, что конъюгаты природного АФП с цитостатиками избирательно ингибируют рост раковых клеток *in vivo* и *in vitro* [8–10]. Таким образом, наличие специфического взаимодействия АФП со своим рецептором позволяет создавать на основе АФП конъюгаты с цитостатиками для их адресной доставки к раковым клеткам. Такие конъюгаты могут быть исполь-

зованы для создания новых противораковых лекарств, практическое применение которых может значительно улучшить противораковую терапию.

Участок связывания АФП с рецептором находится в третьем домене [11], поэтому для целевой доставки лекарств достаточно использовать рекомбинантный третий домен АФП (rAFP3D) вместо полноразмерного белка. Ранее нами была создана высокоэффективная система для продукции rAFP3D в клетках *Escherichia coli* [12]. Рекомбинантный третий домен продуцировался в тельца включения (ТВ), поэтому для получения функционально активного белка необходимо проводить его ренатурацию [13, 14]. Для практического использования данного белка в крупных масштабах необходимо, чтобы методика его получения была высокоэффективной и с минимальной затратой материалов. Процедура ренатурации третьего домена значительно усложняется тем, что данный белок является гидрофобным и содержит большое количество S–S-связей. Поэтому разработка эффективной методики ренатурации является основной трудностью при получении функционального рекомбинантного третьего домена АФП.

Во время ренатурации образуются частично свернутые белковые молекулы, агрегация которых значительно снижает эффективность процесса. Таким образом, основная задача заключается в сведении к минимуму взаимодействия между та-

Принятые сокращения: АФП – альфа-фетопроtein человека; РАФП – рецептор альфа-фетопроteина; ТВ – тельца включения; rAFP3D – рекомбинантный третий домен альфа-фетопроteина; LB – среда Лаурия–Бертани; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; КД – круговой дихроизм; УЗ – ультразвук.

кими интермедиатами в этом процессе. Традиционно для этого проводят ренатурацию методом разбавления, т.е. при очень низкой концентрации белка [15]. К сожалению, в большинстве случаев такой подход не обеспечивает эффективную ренатурацию гидрофобных и содержащих большое количество дисульфидных связей белков [16].

Альтернативным подходом к сворачиванию белков *in vitro* является сворачивание белков, иммобилизованных на твердой фазе. Суть метода состоит в том, что денатурированный белок иммобилизуют на смоле и затем ренатурируют, удаляя денатурант. Таким образом, в процессе ренатурации молекулы белка изолированы друг от друга и вероятность их агрегации уменьшается. Широко используемой разновидностью ренатурации на твердой фазе является ренатурация белка, иммобилизованного на металло-хелатной смоле. Преимуществом данного метода является то, что белок иммобилизован за счет гистидинового тага, при этом вся белковая молекула может свободно колебаться в растворе во время ренатурации. В то же время гидрофобные взаимодействия между частично свернутыми белковыми молекулами сведены к минимуму.

При ренатурации белков на смоле чаще всего используются матрицы на основе углеводов (агароза, декстроза и пр.). Установлено, что при ренатурации полноразмерного АФП на агарозной смоле большая часть белка необратимо связывалась с матрицей и не элюировалась [17]. Использование в качестве основы для матрицы оксида кремния, как более инертного материала, возможно, позволило бы снизить необратимое связывание белковых молекул со смолой во время ренатурации.

Цель исследования – разработка эффективной методики ренатурации иммобилизованного третьего домена АФП, пригодной для ее практического применения.

МЕТОДИКА

Создание конструкции для продукции третьего домена АФП (гAFP3D) в *Escherichia coli*. Из линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, экспрессирующих белок АФП, была выделена тотальная мРНК [18]. Для создания конструкции были использованы стандартные молекулярно-генетические методики [19]. С помощью реакции обратной транскрипции была синтезирована кДНК, кодирующая полноразмерный белок АФП, которую использовали в качестве матрицы для получения фрагмента гена, кодирующего С-концевой фрагмент белка (остатки 404–595 полноразмерного АФП) – гAFP3D.

В нуклеотидной последовательности, кодирующей гAFP3D, был заменен тандем кодонов

AGG, кодирующих Arg508 и Arg509, на изоакцепторные кодоны CGT и CGC.

При амплификации итоговой нуклеотидной последовательности гAFP3D были использованы следующие праймеры (5'–3'):

GGGAATTCCATATGTACATCCAGGAGAGC-CAAGCATT (прямой) содержит сайт расщепления рестриктазы NdeI (выделено курсивом), за которым следует последовательность нуклеотидов, представляющая 5'-конец С-концевого фрагмента АФП;

AAGAATGTCGACTTAGTGATGGTGATGGTG-ATGGTGCTCTTCAGCAAAGCAGACTTCCCT (обратный) был сконструирован так, что после 23 оснований, комплементарных последовательности 3'-конца С-концевого фрагмента АФП (выделено жирным шрифтом), следовала последовательность, кодирующая 7 гистидинов, комплементарный стоп-кодону триплет TTA и сайт расщепления рестриктазы SalI (выделен курсивом).

Полученная нуклеотидная последовательность была клонирована в модифицированную плазмиду pET11c (“Novagen”, Германия): в полилинкер коммерческой плазмиды были добавлены сайты расщепления рестриктаз SmaI, KpnI, XhoI, SalI [19].

Производство гAFP3D. Полученную плазмиду, содержащую модифицированную последовательность, кодирующую гAFP3D, трансформировали в клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (*E. coli* В F⁻ dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal λ(DE3) (“Novagen”, Германия)). Производство белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогаалактопиранозиды (“Sigma-Aldrich”, США) в конечной концентрации 0.4 mM. Производство проводили при температуре 37°C в течение 3 ч в среде LB (“Sigma-Aldrich”, США) с ампициллином (“Sigma-Aldrich”, США). Индуктор добавляли при оптической плотности культуры 0.5–0.6 D₆₀₀ [19].

После продукции клетки осаждали центрифугированием и осадок хранили при –20°C.

Выделение и очистка телец включения. Осадок клеток после индукции ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ – 1.7 mM KН₂РO₄, 5.2 mM Na₂НРO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) дополнительно содержащем 0.1 M NaCl и 1 mM 4-(2-аминоэтил) бензол-сульфонилфторид (“Melford Lab.”, США) при комнатной температуре. Суспензию обрабатывали ультразвуком (УЗ) 2 раза по 40 с при 0°C. После этого добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 1% и снова обрабатывали УЗ при тех же условиях. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g (“Beckman”, JA-14, Германия). Осадок ресуспендировали в ФСБ, pH 7.4, дополнительно содержащем 0.1 M NaCl и 0.1%-ный дезоксихолат натрия, и обрабатывали УЗ в течение 40 с при 0°C. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин при

12000 g. Осадок ресуспендировали в ФСБ, рН 7.4, и вновь центрифугировали, как описано выше.

Полученный осадок телец включения хранили при -20°C .

Ренатурация гAFP3D, иммобилизованного на кремниевой металло-хелатной смоле. В качестве носителя использовалась кремниевая смола His-Link (“Promega”, США). Осадок телец включения ресуспендировали в солибилизирующем буфере (0.05 M Na_3BO_3 , рН 8.6, содержащем 8 M мочевины, 12 mM β -меркаптоэтанол и 10 mM имидазол). Раствор инкубировали в течение 5 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании до полного растворения осадка. Суспензию центрифугировали 15 мин при 13000 g и 7°C . На смолу HisLink, уравновешенную тем же буфером, наносили супернатант и инкубировали минимум 30 мин при комнатной температуре. Смолу промывали 3 раза по 10 объемов в течение 10 мин ФСБ, рН 8.0, содержащим 8 M мочевины, 12 mM β -меркаптоэтанол и 10 mM имидазол. К смоле добавляли 10-кратный избыток ренатурирующего буфера, содержащего 10 mM имидазол, и инкубировали в течение 4 ч при постоянном перемешивании при 4°C . Белок элюировали 2 раза в течение 10 мин 1 объемом ФСБ, рН 8.0, содержащего 800 mM имидазол, при 4°C . При необходимости белок диализовали против 1000-кратного избытка ФСБ, рН 8.0, при 4°C в течение ночи.

Ренатурированный белок хранили при -20°C .

Выделение и очистка гAFP3D с помощью металло-хелатной хроматографии на агарозной Ni-NTA смоле. Осадок телец включения после очистки растворяли в солибилизирующем буфере (0.05 M Na_3BO_3 , рН 8.6, содержащем 8 M мочевины и 12 mM β -меркаптоэтанол). Раствор инкубировали в течение 5 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании до полного растворения осадка. Суспензию центрифугировали 15 мин при 13000 g и 7°C .

На смолу Ni-NTA (“Qiagen”, США), уравновешенную солибилизирующим буфером, наносили супернатант и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Смолу промывали 30 объемами ФСБ, рН 8.0, содержащего 8 M мочевины и 15 mM имидазол. Белок элюировали ФСБ, рН 8.0, содержащим 8 M мочевины и 0.3 M имидазол.

Ренатурация очищенного гAFP3D методом быстрого разбавления. Очищенный гAFP3D (1–2 мг/мл) ренатурировали быстрым разбавлением при постоянном перемешивании в 100-кратном избытке ренатурирующего буфера (ФСБ, рН 8.0, 5 mM глутатион восстановленный, 1 mM глутатион окисленный) до конечной концентрации 0.01–0.02 мг/мл и инкубировали в течение 2 сут при 4°C при постоянном перемешивании. Далее в ренатурирующий буфер с белком вносили смолу Ni-NTA (на 5 мг белка 1 мл смолы), уравновешен-

ную ренатурирующим буфером, и инкубировали еще 1 сут при перемешивании и 4°C . После этого смолу переносили в колонку, промывали ФСБ, рН 8.0, и элюировали тем же буфером, содержащим 300 mM имидазол. Далее раствор ренатурированного белка диализовали против ФСБ, рН 8.0, при 4°C в течение 1 сут.

Ренатурированный белок хранили при -20°C .

Содержание белка в пробах определяли денситометрией ДДС–ПААГ электрофорезграмм с помощью программного обеспечения OnedScan (“Stratagene”, США). Использовали белковые маркеры молекулярных масс (“Fermentas”, Литва) для оценки относительной электрофоретической подвижности исследуемого белка.

Определение свободных сульфгидрильных групп. Свободные сульфгидрильные группы определяли после процедуры ренатурации по методу Эллмана [20].

Аналитическая хроматография. Гель-фильтрацию проводили на приборе Breeze (“Waters”, США), на колонке BioSuite 450 HR SEC 7.8×300 мм в ФСБ, рН 7.4, при скорости потока 1 мл/мин с детекцией белка при 280 нм. В качестве стандартов молекулярной массы использовали (M, кДа): ферритин (440), бычий сывороточный альбумин (134 и 67 для димера и мономера соответственно), белок человека CD81 (30), лизоцим (14).

Хроматографию в обращенной фазе осуществляли на приборе Breeze (“Waters”, США), на колонке Symmetry300 C4 5 mm 3.9×150 мм, в линейном градиенте ацетонитрила (0–100%, 60 мин) с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 0.5 мл/мин с детекцией белка при 214 и 280 нм.

Круговой дихроизм. Исследование вторичной структуры ренатурированного белка проводили с использованием спектроскопии КД на спектрополяриметре “JASCO-810” (Япония) в диапазоне длин волн от 190 до 250 нм. Значения молярной эллиптичности рассчитывали из уравнения: $[\theta] = [\theta]_{\text{изм}} M_{\text{ост}} / (LC)$, в котором C – концентрация белка (мг/мл), L – длина оптического пути кюветы (мм), $[\theta]_{\text{изм}}$ – измеренная эллиптичность (градусы) и $M_{\text{ост}}$ – средняя молекулярная масса остатка пептида (Да), рассчитанная из его аминокислотной последовательности. Измерения проводили в 1 мм кювете при концентрации белка 0.03 мг/мл в ФСБ, рН 7.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально для ренатурации гAFP3D использовали смолу Ni-NTA, с помощью которой проводили очистку белка в предыдущей работе [12]. К сожалению, белок после ренатурации не элюировался со смолы высокими концентрациями имидазола ни в нативных буферах, ни в растворах с добавлением денатурирующих агентов.

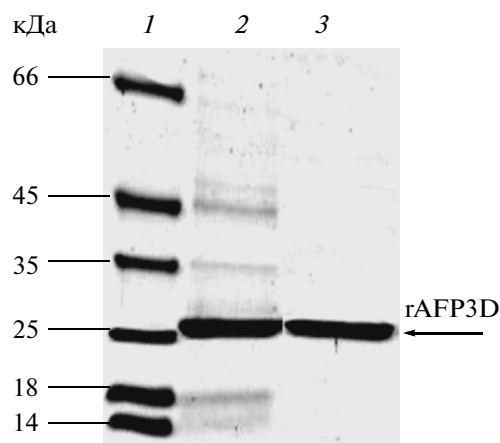


Рис. 1. Электрофоретический анализ (ДДС-ПААГ-электрофорез) rAFP3D до (2) и после (3) ренатурации; 1 – белковые маркеры молекулярных масс.

Исходя из этого, можно заключить, что в процессе ренатурации молекулы белка необратимо связывались с углеводной матрицей смолы – агарозой. Известно, что агароза – это полимер, состоящий из дисахаридов, т.е. достаточно реакционно-активный материал. Возможно, что в процессе ренатурации несвернутые белковые молекулы связываются с агарозой матрицей посредством гидрофобных связей и/или реакционно-способных групп (SH-, NH₂- и т.д.), и поэтому впоследствии не элюируются со смолы.

Другим широко используемым носителем в качестве основы для смол может служить силикагель. По сравнению с агарозой, силикагель является химически инертным материалом. Для ренатурации rAFP3D была использована смола на основе силикагеля HisLink. Состав ренатурирующего буфера был такой же, как при ренатурации разбавлением (см. Методика).

Белок в концентрации 1 мг/мл ренатурировали на смоле в течение 1–24 ч. Наилучший выход ренатурированного белка составил 60% после 4 ч инкубации. Чистота ренатурированного белка составила не менее 98% (рис. 1). По результатам ДДС-ПААГ-электрофореза при нанесении 1 мг белка весь материал связывался со смолой. В элюате после ренатурации анализ показывал наличие 0.6 мг белка. Основные потери rAFP3D происходили в результате необратимого связывания со смолой в процессе ренатурации.

Принято считать, что при ренатурации белка на смоле, упакованной в колонку, увеличение количества наносимого белка коррелирует с уменьшением выхода ренатурации из-за большей агрегации белковых молекул [21]. Причиной этого может быть неравномерное распределение белковых молекул на колонке в процессе нанесения. Локальное повышение концентрации белка в какой-либо части ко-

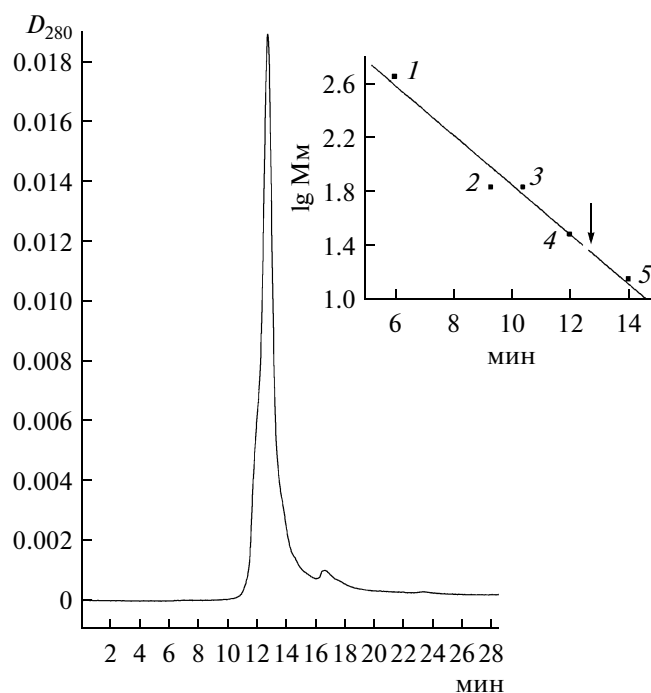


Рис. 2. Гель-фильтрация ренатурированного rAFP3D в ФСБ. Во вставке представлена зависимость времени выхода от молекулярного веса белковых стандартов молекулярной массы: 1 – ферритин (440 кДа), 2 и 3 – бычий сывороточный альбумин, димерная (134 кДа) и мономерная (67 кДа) формы, 4 – человеческий CD81 (30 кДа), 5 – лизоцим (14 кДа). Стрелкой обозначено время выхода rAFP3D.

лонки может способствовать агрегации при переводе в ренатурирующие условия и тем самым уменьшать выход ренатурированного белка [17]. Было изучено влияние количества нанесенного белка на выход ренатурации. Разные количества rAFP3D (0.5–10.0 мг) наносили на один и тот же объем смолы (1 мл) и ренатурировали при одинаковых условиях (см. Методика). Выход ренатурации не зависел от количества нанесенного белка в исследуемом диапазоне и составлял 60–65%. Такой результат можно объяснить тем, что при взаимодействии белка со смолой в пробирке его распределение происходит более равномерно, чем при нанесении на смолу, упакованную в колонку. Как следствие, выход ренатурации не зависит от количества нанесенного белка.

Рассчитанная по времени выхода с колонки при проведении гель-фильтрации молекулярная масса rAFP3D составила 26 кДа, что близко к теоретической. Высокомолекулярные формы и агрегаты отсутствовали в детектируемых количествах (рис. 2). При проведении хроматографии в обращенных фазах в препарате определялся только один пик (рис. 3). Это подтверждает гомогенность выделенного препарата белка. В препарате полученного

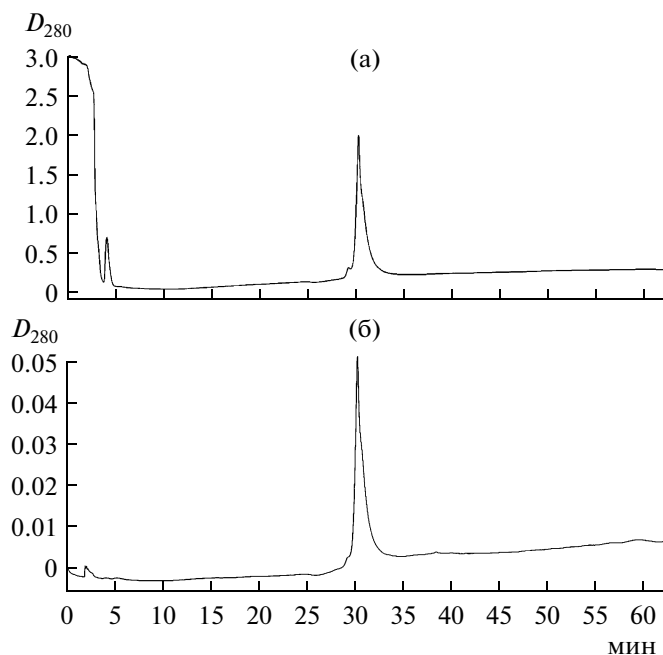


Рис. 3. Хроматография в обращенных фазах ренатурированного gAFP3D. Оптическую плотность измеряли при 214 (а) и 280 (б) нм. Хроматографию осуществляли в линейном градиенте ацетонитрила (0–100%, 60 мин) с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 0.5 мл/мин.

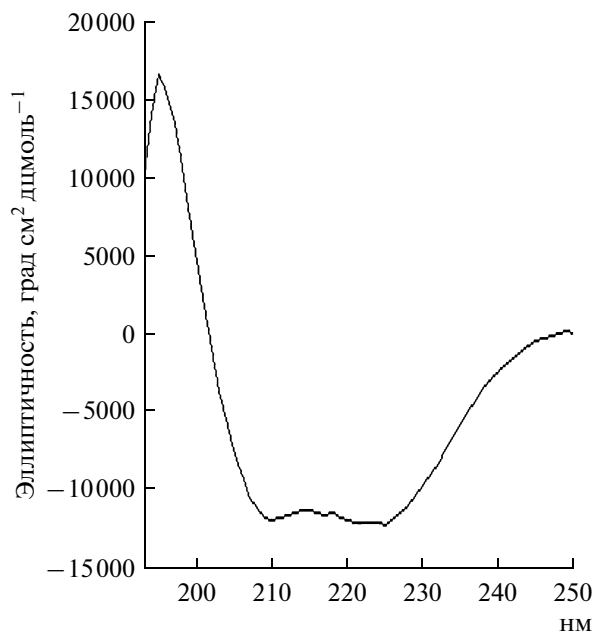


Рис. 4. Спектр кругового дихроизма ренатурированного gAFP3D.

белка отсутствовали свободные сульфгидрильные группы (определяли по методу Элмана).

Вторичная структура ренатурированного gAFP3D была проанализирована методом КД (рис. 4). Анализ показал, что вторичная структура ренатурированного белка состоит преимущественно из α -спиралей, так как профиль КД имеет ярко выраженные пики на 199, 208 и 222 нм. Полученный профиль КД сходен с результатами анализа полноразмерного природного АФП и

функционально активного gAFP3D, ренатурированного разбавлением [12, 22].

Вышеизложенные результаты позволяют предположить, что ренатурированный gAFP3D образовал пространственную структуру, соответствующую таковой в природном АФП.

Для сравнения разных способов ренатурации gAFP3D в качестве контроля была проведена ренатурация разбавлением. Концентрация белка при ренатурации составила 0.01–0.02 мг/мл, выход ренатурированного белка составил 50% с чистотой порядка 95%.

Выходы белка при ренатурации на смоле и разбавлением были близки и составили 60 и 50% соот-

Сравнение экспериментальных параметров ренатурации на смоле и ренатурации разбавлением

Экспериментальный параметр	Смола	Разбавление
Исходное количество gAFP3D, мг	1	1
Объем ренатурирующего буфера, мл	10	100
Время ренатурации, ч	4	48
Концентрация gAFP3D при ренатурации, мг/мл	0.1	0.01
Выход ренатурированного gAFP3D, %*	60	50
Чистота ренатурированного gAFP3D, %*	98	95
Продуктивность ренатурации (мг мл ⁻¹ ч ⁻¹)	0.015	0.01 × 10 ⁻²

* Определяли денситометрией электрофореграмм с помощью программы OnedScan (“Stratagen”, США).

ветственно. Основные различия заключались в необходимом времени ренатурации и количестве ренатурирующего буфера (таблица). Поэтому с точки зрения практического получения белка более адекватным будет сравнение продуктивности ренатурации, которая определялась по уравнению:

$$P = \frac{YM}{Vt100\%}, \quad (1)$$

где P – продуктивность ренатурации ($\text{мг мл}^{-1} \text{ч}^{-1}$), Y – выход ренатурированного белка, %, M – исходное количество белка, взятого для ренатурации, мг, V – объем ренатурирующего буфера, мл, t – время ренатурации, ч.

Значительное превосходство продуктивности ренатурации на смоле по сравнению с ренатурацией разбавлением объясняется меньшим временем инкубации и меньшим объемом ренатурирующего буфера (таблица). При этом чистота белка после ренатурации на смоле была выше, чем при ренатурации разбавлением. Необходимость концентрировать и дополнительно очищать белок после ренатурации разбавлением вносит определенные трудности в процесс получения функционального белка.

Результаты свидетельствуют о том, что ренатурация rAFP3D иммобилизованного на смоле по продуктивности значительно превосходит ренатурацию методом разбавления. Данный способ ренатурации впервые применен с высокой эффективностью для гидрофобного белка с большим количеством дисульфидных связей. Основа смолы, на которой иммобилизовали белок для ренатурации, имела огромное влияние на эффективность процедуры. Использование смолы на основе силикагеля, вместо традиционно используемых агарозных смол, позволило значительно улучшить эффективность ренатурации (от практически 0 до 60%). Использование такой смолы на основе силикагеля для ренатурации иммобилизованных белков, по свойствам сходных с rAFP3D, т.е. гидрофобных и содержащих большое количество дисульфидных связей, может позволить расширить спектр как исследуемых в науке белков, так и применяемых для практических целей.

Приносим благодарность Б.С. Мельнику за измерение спектров кругового дихроизма.

Работа была поддержана грантом РФФИ (№ 09-04-12281-офи_м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergstrand C.G., Czar B. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1956. V. 8. № 2. P. 174.
2. Abelev G.I. // Adv. Cancer. Res. 1971. V. 14. P. 295–358.
3. Gillespie J.R., Uversky V.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1480. № 1–2. P. 41–56.
4. Luft A.J., Lorscheider F.L. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 25. P. 5978–5981.
5. Villacampa M.J., Moro R., Naval J., Faily-Crepin C., Lampreave F., Uriel J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. V. 122. № 3. P. 1322–1327.
6. Geuskens M., Dupressoir T., Uriel J. // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1991. V. 23. № 1. P. 59–66.
7. Ницетов М.Б., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А., Макарова О.В., Степанов В.А., Рогов К.А., Коромылова И.А., Караулов А.В., Северин С.Е., Северин Е.С. // Иммунология. 2005. Т. 26. № 2. С. 122–125.
8. Severin S.E., Posypanova G.A., Shmyrev I.I., 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. № 4. P. 1081–1089.
9. Северин С.Е., Посыпанова Г.А., Сотниченко А.И., Москалева Е.Ю., Фельдман Н.Б., Григорьев М.И., Северин Е.С., Петров Р.В. // Докл. РАН. 1999. Т. 366. № 4. С. 561–564.
10. Ницетов М.Б., Родина А.В., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А., Попова О.Н., Сологуб В.К., Коромылова И.А., Шмырев И.И., Сотниченко А.И., Заболотнев Д.В., Караулов А.В., Северин С.Е. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2001. Т. 3. № 2. С. 19–25.
11. Mizejewski G.J. // Exp. Biol. Med (Maywood). 2001. T. 226. № 5. С. 377–408.
12. Sharapova O.A., Pozdnykova N.V., Laurinavichyuten D.K., Yurkova M.S., Posypanova G.A., Fedorov A.N., Severin S.E., Severin E.S. // Protein Expr. Purif. 2010. V. 73. № 1. P. 31–35.
13. Bowden G.A., Paredes A.M., Georgiou G. // Biotechnology (N.Y.). 1991. V. 9. № 8. P. 725–730.
14. Ventura S., Villaverde A. // Trends. Biotechnol. 2006. V. 24. № 4. P. 179–185.
15. Valejo L.F., Rinas U. // Microb. Cell Fact. 2004. V. 3. № 1. P. 11.
16. Jaenicke R. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1987. V. 49. № 2–3. P. 117–237.
17. Chen Y., Leong S.S. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 24. P. 4877–4886.
18. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 156–159.
19. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 420 с.
20. Ellman G.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.
21. Stempfer G., Höll-Neugebauer B., Rudolph R. // Nat. Biotechnol. 1996. V. 14. № 3. P. 329–334.
22. Leong S.S., Middelbegr A.P. // Biotechnol. Bioeng. 2007. V. 97. № 1. P. 99–117.

High-Efficient Renaturation of Immobilized Recombinant C-Terminal Fragment of Human Alpha-Fetoprotein

O. A. Sharapova^a, M. S. Yurkova^b, S. M. Andronova^b, A. N. Fedorov^b,
S. E. Severin^a, and E. S. Severin^b

^a *Moscow Research Institute of Medical Ecology, Moscow, 117638 Russia*

e-mail: sharapova_o@hotmail.ru

^b *All-Russia Center for Molecular Diagnostics and Treatment, Moscow, 117638 Russia*

e-mail: sharapova_o@hotmail.ru

Received March 1, 2011

Abstract—C-terminal fragment of a human oncofetal alpha-fetoprotein (AFP) may be used in targeted cyto-statics delivery to malignant cells of many tumors. AFP fragment (from 404 to 595 amino acids residues of a full-sized protein) was cloned and produced in *Escherichia coli* cells, BL21 strain (DE3) in the form of inclusion bodies. To obtain a functionally active protein, it is necessary to renature the protein. The renaturation procedure of the AFP third domain (rAFP3D) is considerably complicated by the fact that the protein is hydrophobic and contains a large number of S–S bonds. A renaturation technique of rAFP3D immobilized on silicic metal chelate resin has been developed. The yield of renatured C-terminal fragment was no less than 60% with purity on the order of 98%. The developed technique has been applied for the first time for hydrophobic protein with a large number of S–S bonds. The approach can be applied for efficient renaturation of other hydrophobic proteins with a large number of disulfide bonds for scientific and practical purposes.