

## جداسازی و تخلیص پروتئین پلاسمایی نوع A از سرم خانم‌های باردار در پایان سه ماهه سوم

سیمین حسینی<sup>۱</sup>، عطیه مهدوی<sup>۲</sup>، حامد علیزاده<sup>۳</sup>

۱- دبیر زیست شناسی ناحیه ۲ کرج، البرز، ایران.

۲- استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان، ایران.

۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. Hamedalizadeh1986@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۸

### چکیده

زمینه و هدف: پروتئین پلاسمایی مربوط به دوره بارداری نوع PAPP-A، گلیکوپروتئینی است که در طی بارداری در سلول‌های سین‌سیتیوتروفوبلاست جفت ساخته می‌شود و غلظت آن در سرم مادر همراه با پیشرفت مدت بارداری، افزایش می‌یابد. از آن جایی که غلظت آن ۲۸ روز پس از بارداری قابل اندازه‌گیری است. مقدار این پروتئین تنها در خون مادران دارای جنین مبتلا به نشاتگان داون در سه ماهه اول بارداری در مقایسه با مادران دارای جنین طبیعی کاهش می‌یابد. لذا در این پژوهش تخلیص PAPP-A از سرم خانم‌های باردار در آستانه زایمان صورت گرفته تا بتوان بر این اساس، در پژوهش‌های آتی روش ایمونولوژیکی مناسبی را برای اندازه‌گیری غلظت این پروتئین در سرم خانم‌های باردار در سه ماهه اول بارداری طراحی نمود.

روش کار: جهت تخلیص PAPP-A سه مرحله کروماتوگرافی که به ترتیب شامل: ژل فیلتراسیون به کمک ستون سفادکس، افینیتی کروماتوگرافی به کمک ستون هپارین-سفاروزو افینیتی کروماتوگرافی منفی به کمک ستون CNBr - activated sepharose 4B متصل شده به ایمونوگلوبولین‌های تولید شده بر ضد پروتئین‌های تام سرم انسان، بودند انجام گرفت. جهت تهیه ستون افینیتی کروماتوگرافی منفی نیاز به تهیه ایمونوگلوبولین بر ضد پروتئین‌های تام سرم انسان بود که برای این منظور، ایمونیزاسیون خرگوش با سرم طبیعی انسان و سپس تخلیص ایمونوگلوبولین تولید شده در طی دو مرحله متوالی افینیتی کروماتوگرافی صورت گرفت. پس از انجام مرحله سوم PAPP-A تخلیص یافته حاصل گردید.

یافته‌ها: حجم مخلوط پروتئین‌های خانم‌های باردار در آستانه زایمان در پیک‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب حدود ۴۴، ۴۰، و ۲۰ میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: روش اتخاذ شده در این پژوهش موجب به حداقل رساندن شرایط تخریب ساختمان PAPP-A می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین پلاسمایی مربوط به دوره بارداری نوع A، کمپلکس PAPP-A ProMBP، نشاتگان داون.

### مقدمه

پروتئین اصلی اتوزینوفیلی (ProMBP) نامیده می‌شود (۱۴). زیرواحد PAPP-A به صورت هموترامر بوده و وزن مولکولی هر مونومر آن ۲۰۵ کیلودالتون است (۲،۴). زیرواحدهای کمپلکس ProMBP/PAPP-A با احیای پیوندهای دی‌سولفیدی و دناتوره شدن به طور برگشت ناپذیر از یک دیگر جدا می‌گردند (۵، ۳). حدود ۲۸ روز پس از بارداری PAPP-A در جریان خون قابل اندازه‌گیری بوده و تا قبل از پنج هفته اول بارداری غلظت آن به ده میکروگرم در لیتر می‌رسد (۶). پس از زایمان در

PAPP-A گلیکوپروتئینی است که در سلول‌های سین‌سیتیوتروفوبلاست جفت پستانداران تولید می‌گردد. غلظت این ماده همراه با افزایش مدت بارداری در خون مادر زیاد می‌شود (۱، ۲). PAPP-A اولین بار در ۱۹۷۴ توسط Lin از سرم خانم‌های باردار جدا گردید (۳). PAPP-A از نظر ساختمان بیوشیمیایی، کمپلکسی متشکل از دو نوع رشته مختلف در مقادیر یکسان مولی به نسبت ۲:۲ است. یک نوع از این رشته‌ها تحت عنوان زیرواحد PAPP-A و دیگری تحت عنوان پیش‌ساز

بیس آکریل آمید، آکریل آمید، پر سولفات آمونیوم، سدیم دوسیل سولفات، تترا متیل اتیلن دی آمین، گلیسرول از شرکت Merck آلمان و آگارز، برموفول آبی و پودر کوماسی بلو از شرکت Sigma Aldrich تهیه شدند.

### روش کار

مراحل زیر به صورت پی‌درپی به منظور تخلیص PAPP-A از سرم خانم‌های باردار انجام شد:

۱- عبور سرم خانم‌های باردار از ستون کروماتوگرافی **Sephadex G200**: حجم ستون مورد استفاده در این مرحله ۵۵۰ میلی‌لیتر بود که از آن سرم خانم‌های بارداری که در آستانه زایمان بودند عبور داده شد، به طوری که هر بار پنج تا شش میلی‌لیتر سرم دیالیز شده از ستون گذرانده؛ سپس با انجام آزمایش برادفورد، غلظت پروتئین در قسمت‌های جمع‌آوری شده تعیین گردید و به دنبال آن، از پیک‌های اول، دوم، سوم و چهارم، SDS-PAGE گذاشته تا مشخص گردد پروتئین مورد نظر در کدام یک از پیک‌ها یافت می‌شود.

۲- عبور قسمت‌های مورد نظر حاصل از مرحله قبل، از ستون کروماتوگرافی هیپارین-سفاروز: حجم ستون کروماتوگرافی هیپارین-سفاروز مورد استفاده، ۵ میلی‌لیتر و ابعاد ۱/۶×۲/۵ سانتی متر و محدوده pH بافرهایی که مناسب عبور از این ستون بودند بین ۵ تا ۱۰ در نظر گرفته شد. لیگاند به کار رفته در این ستون، هیپارین و میان‌کنش اختصاصی و برگشت‌پذیر میان هیپارین و PAPP-A اساس تخلیص PAPP-A توسط این ستون بود. پیک اول حاصل از ستون Sephadex G200 پس از فیلتر شدن به این ستون وارد و بافر Tris-HCl ۰/۳ مولار حاوی NaCl ۰/۱۵ مولار با pH ۷/۶ عبور داده شد و خروجی ستون در یک بشر جمع‌آوری گردید. سپس بافر Tris-HCl، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۶ مول با pH معادل ۷/۶ عبور داده شد. قسمت‌های حاصل از هریک از غلظت‌های نمکی مختلف بافر جداگانه جمع‌آوری

طی سه تا چهار روز این پروتئین از جریان خون محو می‌گردد. مقادیر آن در جریان خون مادر در سه ماهه اول، دوم و سوم به ترتیب ۱/۷، ۱۷ و ۴۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شده است (۷، ۶). در خون مادران بارداری که دارای جنین مبتلا به نشانگان داون می‌باشند، مقدار کمپلکس ProMBP/PAPP - A در سه ماهه اول کاهش می‌یابد در حالی که از سه ماهه دوم به بعد تفاوت چندانی در غلظت آن در خون مادر دارای جنین طبیعی و مادر دارای جنین مبتلا وجود ندارد؛ لذا اندازه‌گیری آن در خون مادر در فاصله ۱۰ تا ۱۳ هفتگی جنین، به عنوان یک تست تشخیص سریع بارداری و نیز به عنوان شاخص سلامت جنین از نظر ابتلا به نشانگان داون اهمیت دارد (۹، ۱۰). این پروتئین توسط دو روش ELISA و رادیوایمونواسی می‌تواند اندازه‌گیری شود (۱۱، ۳)، لذا به منظور میسر نمودن طراحی یک روش ایمنولوژیکی، ابتدا باید بتوان این پروتئین را از خون خانم‌های باردار در آستانه زایمان استخراج نمود که در این پژوهش جداسازی و تخلیص PAPP-A از خون خانم‌های باردار در سه ماهه سوم بارداری پیش از زایمان در طی سه مرحله متوالی کروماتوگرافی صورت گرفته است.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه مواد

در این پژوهش از یک خرگوش ماده ۴ ماهه نیوزیلندی که از انیستیتو پاستور تهیه گردیده بود، استفاده شد. نمونه‌های سرم خانم‌های باردار در آستانه زایمان از بیمارستان آیت الله طالقانی کرج تهیه گردید. هم چنین برای انجام مراحل و روش‌های مورد استفاده مواد ذیل به کار برده شد: ژل سفادکس G200، کیسه دیالیز، پودر تریس، کلرید سدیم، اسید فسفریک، آلبومین سرم گاوی، اتانول ۹۵٪، متانول ۹۵٪، اسید استیک گلاسیال، استانداردهای وزن مولکولی ۶۷، ۱۵۰ و ۲۲۰ کیلودالتونی، اسید کلریدریک ۳۷٪، ۲-مرکاپتواتانول،

و با انجام SDS-PAGE از وجود پروتئین PAPP-A در آن اطمینان حاصل شد (۸، ۵، ۴).

### نتایج

#### عبور سرم خانم‌های باردار در آستانه زایمان از ستون Sephadex G200

حدود شش میلی لیتر نمونه سرم خانم‌های باردار که در پایان دوره بارداری خود بودند از ستون سفادکس G200 عبور داده شد و جذب نوری قسمت‌های دو میلی‌لیتری حاصل در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید (نمودار ۱). غلظت پروتئین در پیک‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۲/۷، ۲/۹، ۲/۸ و ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. حجم مخلوط قسمت‌های مربوط به هر یک از پیک‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب حدود ۴۴، ۴۰، ۴۰ و ۲۰ میلی‌لیتر بود. الگوی SDS-PAGE مربوط به هر یک از پیک‌های آن نیز نشان داده شده است (شکل ۱). لازم به ذکر است در SDS-PAGE در شرایط غیراحیاء، PAPP-A به دو زیر واحد هم‌اندازه (حدود ۴۵۰ کیلودالتون) تبدیل شده که تقریباً برابر جرم مولکولی فریتین می‌باشد. در شرایط احیایی، زیر واحدهای دایمری PAPP-A می‌توانند به زیر واحدهای مونومری تبدیل گردند (با جرم مولکولی ۲۰۵ کیلو دالتون). در این جا شرایط الکتروفورز به صورت غیراحیاء بوده است.

#### عبور مخلوط قسمت‌های مربوط به پیک اول حاصل

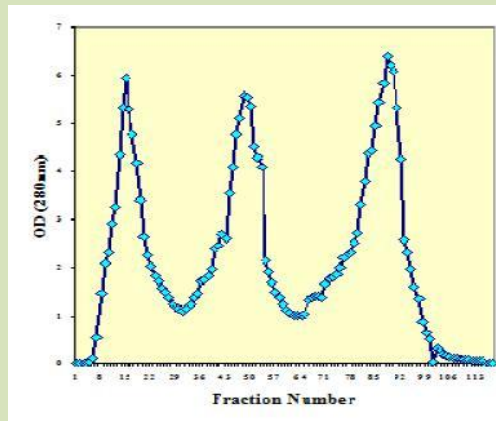
از ستون Sephadex G200 از ستون هیپارین-سفاروز پیک اول حاصل از ستون Sephadex G200 از ستون هیپارین-سفاروز عبور داده شد. حجم هر یک از قسمت‌های متصل شده به ستون هیپارین-سفاروز که حاصل شستشو با بافرهای Tris-HCl با غلظت ۰/۰۳ مول حاوی کلرید سدیم ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۶ مول بود، حدود ۴۵ میلی لیتر و غلظت پروتئین در هر یک از آن‌ها به ترتیب حدود ۴۹۰، ۲۶۰ و ۴۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تعیین گردید. در قسمت غیر متصل شده با حجم تقریبی ۴۵

گردید. افزایش غلظت نمک بافر تا ۰/۳ مول موجب شسته شدن مقدار زیادی از PAPP-A و دیگر پروتئین‌های سرمی متصل شده و افزایش غلظت نمک تا ۰/۴ مول به طور متعاقب، موجب جداسازی و شستشوی مقدار دیگری از PAPP-A متصل شده گردید و در نهایت باقی مانده PAPP-A با افزایش غلظت نمک تا ۰/۶ مول جدا و شسته شد. در هر یک از قسمت‌های حاصل، غلظت پروتئین به روش برادفورد تعیین و توسط SDS-PAGE پروتئین مورد نظر ردیابی شد؛ سپس هر یک از قسمت‌های حاصل، جداگانه علیه آب مقطر و بعد Tris-HCl با غلظت ۳۰ میلی مول حاوی کلرید سدیم ۰/۱۵ مول با pH ۷/۶ دیالیز گردید (۳).

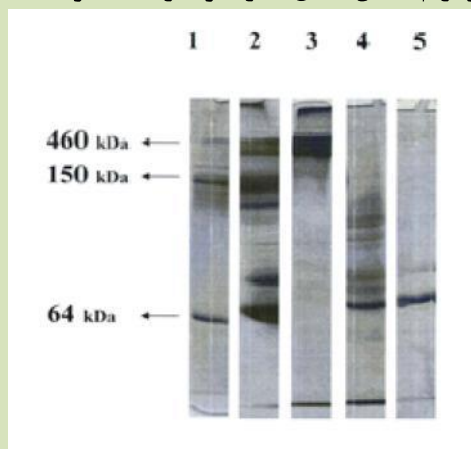
#### ۳- عبور قسمت‌های مورد نظر حاصل از مرحله دوم

از ستون افینیتی کروماتوگرافی منفی: به منظور تهیه ستون مورد استفاده در مرحله سوم، ایمونیزاسیون خرگوش با سرم طبیعی جهت تولید ایمونوگلوبولین علیه پروتئین‌های تام سرم انسان صورت گرفت؛ سپس جداسازی و تخلیص ایمونوگلوبولین ضد پروتئین‌های تام سرم انسان از سرم خرگوش با استفاده از ستون CNBr-activaed sepharose 4B متصل شده به پروتئین A صورت گرفت. با استفاده از ایمونوگلوبولین ضد پروتئین‌های تام سرم انسان تخلیص و ستون افینیتی کروماتوگرافی منفی متصل شده به این پروتئین تهیه گردید، سپس قسمت‌های حاصل از ستون هیپارین - سفاروز که توسط بافرهای Tris-HCl با غلظت ۰/۰۳ مول حاوی کلرید سدیم ۰/۳ مول و ۰/۴ مول به دست آمده بود، پس از دیالیز علیه بافر Tris-HCl با غلظت ۰/۱ مول با pH ۸، حاوی کلرید سدیم ۰/۱۵ مول و سپس صاف شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرون، از ستون ساخته شده عبور داده شد. پس از آن به روش برادفورد غلظت پروتئین در قسمت‌های متصل نشده به ستون تعیین گردید

میلی لیتر، غلظت پروتئین حدود ۱/۴ میلی گرم در هر میلی لیتر اندازه گیری شد (شکل ۲).



شکل ۱- کروماتوگرام حاصل از ژل فیلتراسیون بر روی ستون Sephadex G200.



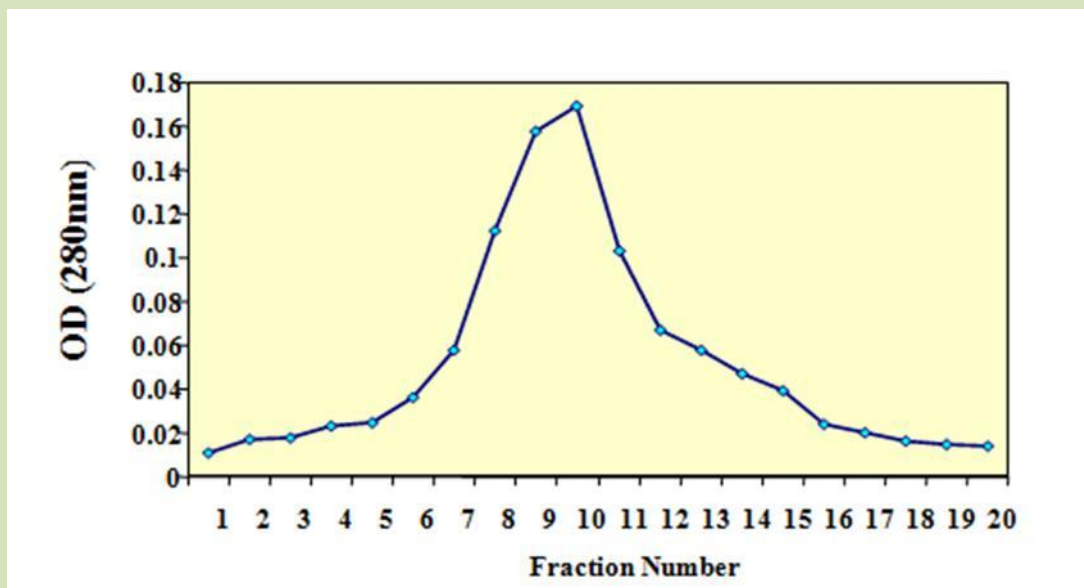
شکل ۲- الگوی SDS-PAGE مربوط به خالص سازی PAPP-A توسط ستون Sephadex G200.

چاهک ۱: استاندارد وزن مولکولی (فریتین، IgG، آلبومین)، چاهک ۲: سرم کامل خانم باردار پیش از زایمان، چاهک ۳: قسمت های مربوط به پیک اول، چاهک ۴: قسمت های مربوط به پیک دوم، چاهک ۵: مخلوط قسمت های مربوط به پیک های سوم و چهارم.

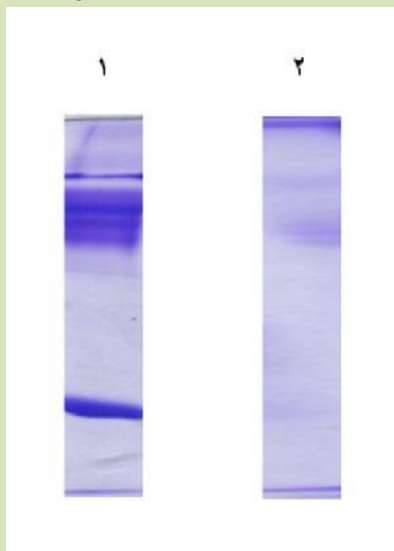
#### عبور نمونه از ستون افینیتی کروماتوگرافی منفی

از این ستون قسمت متصل شده به ستون هپارین - سفاروز که حاصل عبور بافر Tris - HCl با غلظت ۰/۰۳ مول حاوی کلرید سدیم ۰/۳ مولار و ۰/۴ مولار بود، عبور داده شد. در این ستون، قسمت های متصل نشده به ستون، محتوی PAPP-A بوده و آن چه که به ستون اتصال یافت، باقی مانده دیگر پروتئین های سرمی بود. حجم کل

قسمت های غیرمتصل ۲۰ میلی لیتر و غلظت پروتئین در آن به روش برادفورد حدود ۱۵ میکروگرم در هر میلی لیتر اندازه گیری شد. نمودار جذب نوری قسمت های غیرمتصل در شکل (۳) و الگوی SDS - PAGE مربوط در شکل (۴) نشان داده شده است.



شکل ۳- جداسازی PAPP-A از نمونه خالص شده توسط ستون هیپارین-سفاروز با استفاده از افینیتی کروماتوگرافی بر روی ستون CNBr-activated Sepharose 4B متصل شده به ایمونوگلوبولین های ضد پروتئین های تام سرم انسان.



شکل ۴- الگوی SDS-PAGE مربوط به ستون CNBr-Activated Sepharose 4B متصل شده به آنتی بادی های ضد پروتئین های تام سرم

چاهک ۱: استاندارد وزن مولکولی (فریتین IgG و آلبومین).

چاهک ۲: قسمت های متصل نشده به ستون.

پروتئین های سرمی با تمایل زیاد برای اتصال به هیپارین می باشد از PAPP-A که این گلیکوپروتئین نیز به طور برگشت پذیر با هیپارین واکنش می دهد، صورت گرفت؛ در نتیجه بازده ستون هیپارین - سفاروز برای تخلیص PAPP-A افزایش یافت (۱۲). از آن جایی که PAPP-A درشت مولکول می باشد (حدود ۴۵۰ کیلودالتون) در قسمت های مربوط به پیک اول این ستون می توانست یافت شود، در نتیجه فقط این بخش برای عبور از ستون

### بحث و نتیجه گیری

مزیت روش اتخاذ شده در این پژوهش در به حداقل رساندن شرایط تخریب ساختمان PAPP-A می باشد. دلایل استفاده از هر یک از سه مرحله متوالی کروماتوگرافی بدین شرح است: به کمک ستون Sephadex G200، پروتئین PAPP-A از پروتئین های سرمی کوچک مولکول جدا گردید. هم چنین بدین وسیله، جداسازی آنتی ترومبین III که یکی از

توسط روش برادفورد ۱۰ تا ۱۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تعیین شده بود اما به دلیل آن که نتیجه SDS-PAGE مربوطه وجود PAPP-A را در این قسمت تأیید ننمود، این قسمت کنار گذاشته شد قسمت غیر متصل شده نیز چون فاقد PAPP-A بود، کنار گذاشته شد و فقط مخلوط قسمت های حاصل از غلظت کلرید سدیم ۰/۳ و ۰/۴ مول از ستون افینیتی مرحله بعد عبور داده شدند و بدین ترتیب PAPP-A که توان اتصال به ایمونوگلوبولین‌های ستون را نداشت در بخش غیر متصل شده خارج گردید. بدین صورت از حدود ۳۴/۲ گرم پروتئین موجود در مخلوط قسمت-های حاصل از غلظت نمکی ۰/۳ و ۰/۴ مول به دست آمده از ستون هیارین - سفاروز، ۲۸۰ میکروگرم پروتئین PAPP-A به دست آمد؛ به عبارت دیگر از هر شش میلی لیتر سرم خانم‌های باردار، حدود ۲۸۰ میکروگرم PAPP-A حاصل گشت؛ چنان چه مقدار پروتئین PAPP-A حدود ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر در سرم مادر در پایان سه ماهه سوم بارداری در نظر گرفته شود، پس در هر شش میلی لیتر سرم مورد آزمایش، باید حدود ۳۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر پروتئین PAPP-A وجود داشته باشد که حدود ۲۸۰ میکروگرم (۹۳٪) آن استخراج گشته‌است (۱۵، ۱).

هیارین-سفاروز انتخاب گردید (۱۳). با انجام افینیتی کروماتوگرافی به کمک ستون هیارین-سفاروز PAPP-A از برخی دیگر پروتئین‌های درشت مولکول سرمی که در پیک اول حاصل از ستون سفادکس باقی‌مانده و نسبت به هیارین فاقد افینیتی بودند، جدا سازی شد؛ به طوری که این گروه در قسمت‌های مربوط به بخش متصل‌نشده به ستون خارج گردیدند. گروهی از پروتئین‌های دارای افینیتی کم نسبت به هیارین که فقط در غلظت فیزیولوژیک کلرید سدیم به هیارین متصل می‌شوند، با عبور بافر Tris-HCl ۰/۳ مول حاوی کلرید سدیم ۰/۳ مول با pH ۷/۶ به همراه مقداری از PAPP-A از ستون جدا گردید. با عبور Tris-HCl با غلظت ۰/۳ مول حاوی کلرید سدیم ۰/۴ مول باقی‌مانده پروتئین‌های متصل شده به هیارین که تمایل بیشتری نسبت به هیارین داشتند و باقیمانده PAPP-A جدا شدند (۱۲). چنان چه مقداری از PAPP-A هم چنان در اتصال با ستون باقی مانده بود، با عبور بافر Tris-HCl با غلظت ۰/۳ مول حاوی کلرید سدیم ۰/۶ مول با pH ۷/۶ از آن جدا و خارج شد. اما همان طور که در الگوی SDS-PAGE مربوطه (شکل ۳) مشاهده گردید، هیچ باند پروتئینی مشخصی در آن دیده نشد. با آن که غلظت پروتئین موجود در این پیک

#### منابع

- Bersinger, N., Marguerat, P., Pescia, G., Schneider, H. (1995). Pregnancy-associated plasma protein a (PAPP-A): Measurement by highly sensitive and specific enzyme immunoassay, importance of first-trimester serum determinations and stability studies; *Reprod. Fertile.* 7; 1419-142.
- Bersinger, N., Meisser, A., Bessou, T., Seguin, P., Birkhäuser, M.H. (1999). Production and characterization of monoclonal antibodies against PAPP-A. *Molecular Human Reproduction*, 5; 675-681.
- Bersinger, N., Zakher, A., Huber, U., Pescia, G., Schneider, H. (1995). A sensitive enzyme immunoassay for PAPP-A: a possible first trimester method of screening for down syndrome and other trisomies. *Gynecology and Obstetrics*, 256; 185-192.
- Bersinger, N., Kloer, A. (1984). PAPP-A in non-pregnant subjects. *British Journal Of Obstetrics And Gynecology*, 91; 453-456.
- Byun, D., Mohan, S., Yoo, M., Sexton, C., Baylink, DJ., Qin, X. (2001). PAPP-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86(2); 854-874.



6. Chemnitz, J. (1986). Comparison of different antibody preparation against PAPP-A for use in localization and immunoassay studies. *Br J Obstet Gynecol*, 93; 916-923.
7. Claus, O., Sand, O., Kristensen, T., Kristensen, L., Sottrup-Jensen, L. (1994). Isolation and characterization of circulating complex between human PAPP-A and proform of eosinophil major basic protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1201; 415-423.
8. Doonan, S. (1996). Protein purification protocols. Human Press, Chapter 25; 255-268.
9. Danoon, S. (1996). Protein purification protocols. Human Press. Chapter 29; 305-312.
10. Gianazza, E., Arnaud, P. (1982). A general method for fractionation of plasma proteins, dye-ligand affinity chromatography on immobilized cibacron blue F3-GA. *Biochem. J.*, 201; 129-136.
11. Hourvitz, A., Widger, AE., Filho, FL., Chang, RJ., Adashi, EY., Erickson, GF. (2000). PAPP-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea ; *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(12); 4916-4919.
12. Laursen, Lisbeth S., Michael, T., Overgaard, R.S., Henning, B. (2001). Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS letters*, 504( 1-2); 36-40.
13. Overgaard, M.T., Haaning, J., Boldt, H.B., Olsen, I.M., Laursen, L.S., Christiansen, M. (2000). Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40); 31128-31133.
14. Paul, B. (1979). Purification and characterization of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A). *Archives of Gynecology*, 227(4); 315-326.
15. Qin, Xuezhong., Jon, E. (2006). "Pregnancy-associated plasma protein-A increases osteoblast proliferation in vitro and bone formation in vivo." *Endocrinology*, 147(12); 5653-5661.

---

Archive of SID

# Isolation and Purification of Plasma Protein-A from Pregnant Women Serum at The End of 3<sup>th</sup> Trimester

S. Hoseini<sup>1</sup>, A. Mahdavi<sup>2</sup>, **H. Alizadeh**<sup>3</sup>

1. Biology Teacher, Education Office, 2<sup>nd</sup> District, Karaj. Iran.

2. Department of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan. Iran.

3. Young Researchers and Elite Club, zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan. Iran.

Hamedalizadeh1986@yahoo.com

Received:2016.14. 11

Accepted: 2017. 28. 1

## Abstract

**Introduction & Objective:** Pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) is a glycoprotein that mainly is produced by the syncytiotrophoblast of human placenta throughout pregnancy and secreted in increasing amounts into the maternal serum as pregnancy progresses. Since PAPP-A level in maternal serum is measurable after 28<sup>th</sup> day of pregnancy and in the first trimester of pregnancies affected by fetal Down's syndrome, maternal serum concentrations of PAPP-A were found to be significantly lower than the level observed in normal pregnancies, it's level can be considered as a test for detection of early pregnancy and is a good marker for healthy of fetus.

**Material and Methods:** : So accordingly, future studies of immunological method suitable for measuring the concentration of the protein in the serum of pregnant women in trimester designed. After collection of late pregnancy sera, purification of PAPP-A was done by three step of chromatography procedure as: Gel filtration by column of Sephadex G200, Affinity chromatography by column of heparin-Sepharose, Negative affinity chromatography by CNBr-activated Sepharose 4B coupled to anti-total human serum proteins.

**Results:** Then, immunoglobulin against purified PAPP-A was produced by immunization of rabbit with purified PAPP-A and purification of it was done by two step procedure of affinity chromatography. After the third stage of purification of PAPP-A was obtained.

**Keywords:** PAPP-A, PAPP-A ProMBP Complex, Down's Syndrome.