فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۶، جلد ۱۰، شماره ۱، زمستان۹۵، صفحه ۷۹ تا ۸۶

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

سیمین حسینی[۱]، عطیه مهدوی[۲]، **حامد علیزاده**[۳]

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: ۹۵/۸/۲٤ 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 نشانگان داون در سه‌ماهه اول بارداری در مقایسه با مادران دارای جنین طبیعی کاهش می‌یابد. لذا در این پژوهش تخلیص PAPP–A از سرم خانم های باردار در آستانه زایمان صورت گرفته تا بتوان بر این اساس، در پژوهش های آتی روش ایمونولوژیکی مناسبی را برای اندازه‌گیری غلظت این پروتئین در سرم خانم‌های باردار در سه ماهه‌اول بارداری طراحی نمود.

روش کار: جهت تخلیص PAPP–A سه مرحله کروماتوگرافی که به ترتیب شامل: ژل‌فیلتراسیون به کمک ستون سفادکس، افینیتی کروماتوگرافی به کمک ستون هپارین-سفاروزو افینیتی کروماتوگرافی‌منفی به کمک ستون CNBr – activated sepharose 4B متصل‌شده به ایمونوگلوبولین‌های تولید شده برضد پروتئین‌های تام سرم انسان، بودند انجام گرفت. جهت تهیه ستون افینیتی کروماتوگرافی‌منفی نیاز به تهیه ایمونوگلوبولین برضد پروتئین‌های تام سرم انسان بود که برای این‌منظور، ایمونیزاسیون خرگوش با سرم طبیعی انسان و سپس تخلیص ایمونوگلوبولین تولید شده در طی دو مرحله متوالی افینیتی کروماتوگرافی صورت‌گرفت. پس از انجام مرحله سوم PAPP–A تخلیص‌یافته حاصل گردید.

یافته ها: حجم مخلوط پروتئین های خانم‌های باردار در آستانه زایمان در پیک‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب حدود ٤٤، ٤٠، ٤٠ و ٢٠ میلی‌لیتر بود.

نتیجه گیری: روش اتخاذ شده در این پژوهش موجب به حداقل رساندن شرایط تخریب ساختمان PAPP – A می‌باشد.

واژه های کلیدی: پروتئین پلاسمایی مربوط به دوره بارداری نوع A، کمپلکس PAPP–A ProMBP/، نشانگان داون.

مقدمه

PAPP –A گلیکوپروتئینی است که در سلول‌های سین‌سیتیوتروفوبلاست جفت پستانداران تولید می‌گردد. غلظت این ماده همراه با افزایش مدت بارداری در خون مادر زیاد می شود(۲، ۱). PAPP –A اولین بار در ۱۹۷۴ توسط Lin از سرم خانم های 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 پروتئین اصلی ائوزینوفیلی(ProMBP) نامیده می‌شود(۱۴). زیرواحد PAPP–A به‌صورت هموتترامر بوده و وزن مولکولی هر مونومر آن ۲۰۵ کیلودالتون است(۲،۴). زیرواحدهای کمپلکس – ProMBP/PAPP A با احیای پیوندهای دی‌سولفیدی و دناتوره‌شدن به طور برگشت ناپذیر از یک دیگر جدا می‌گردند(۵، ۳). حدود ۲۸ روز پس از بارداری PAPP–A درجریان خون قابل اندازه‌گیری بوده و تا قبل از پنج هفته اول بارداری غلظت آن به ده میکروگرم‌درلیتر می‌رسد(۶). پس از زایمان در

طی سه تا چهار روز این پروتئین از جریان خون محو می‌گردد. مقادیر آن درجریان خون مادر در سه ماهه‌اول، دوم و سوم به ترتیب ۱/۷، ۱۷ و ۴۰ تا ۶۰ میلی گرم در لیتر اندازه گیری شده است(۷، ۶). در خون مادران بارداری که دارای جنین مبتلا به نشانگان داون می‌باشند، مقدار کمپلکس ProMBP/PAPP - A در سه ماهه‌اول کاهش می‌یابد درحالی‌که از سه ماهه‌دوم به بعد تفاوت چندانی در غلظت آن در خون مادر دارای جنین طبیعی و مادر دارای جنین مبتلا وجودندارد؛ لذا اندازه گیری آن در خون مادر درفاصله ۱۰ تا ۱۳ هفتگی جنین، به عنوان یک تست تشخیص سریع بارداری و نیز به‌عنوان شاخص سلامت جنین ازنظر ابتلا به نشانگان داون اهمیت دارد(۱۰، ۹). این پروتئین توسط دو روش ELISA و رادیوایمونواسی می تواند اندازه‌گیری شود(۱۱، ۳)، لذا به‌منظور میسر نمودن طراحی یک روش ایمونولوژیکی، ابتدا باید بتوان این پروتئین را از خون خانم‌های باردار در آستانه زایمان استخراج نمود که دراین پژوهش جداسازی و تخلیص PAPP–A از خون خانم‌های باردار در سه ماهه‌سوم بارداری پیش از زایمان در طی سه مرحله متوالی کروماتوگرافی صورت گرفته‌است.

مواد و روش ها

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 به‌کار برده شد: ژل سفادکس G200، کیسه دیالیز، پودر تریس، کلرید سدیم، اسید فسفریک، آلبومین سرم گاوی، اتانول۹۵٪، متانول ۹۵٪، اسید استیک گلایسیال، استانداردهای وزن مولکولی ۶۷، ۱۵۰ و ۲۲۰ کیلودالتونی، اسید کلریدریک ۳۷٪، ۲–مرکاپتواتانول، بیس‌آکریل‌آمید، آکریل‌آمید، پر سولفات آمونیوم، سدیم دوسیل سولفات، تترا متیل اتیلن دی آمین، گلیسرول از شرکت Merck آلمان و آگارز، برمو فنول آبی و پودر کوماسی بلو از شرکت Sigma Aldrich تهیه‌شدند.

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، به‌طوری که هر بار پنج تا شش میلی‌لیتر سرم دیالیز شده از ستون گذرانده؛ سپس با انجام آزمایش برادفورد، غلظت پروتئین در قسمت‌های جمع‌آوری‌شده تعیین‌گردید و به‌دنبال آن، از پیک‌های اول، دوم، سوم و چهارم، SDS-PAGE گذاشته تا مشخص گردد پروتئین مورد نظر درکدام یک از پیک‌ها یافت می‌شود.

۲- عبور قسمت‌های مورد نظر حاصل از مرحله قبل، از ستون کروماتوگرافی هپارین-سفاروز: حجم ستون کروماتوگرافی هپارین-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 درنظر گرفته شد. لیگاند به کار رفته دراین ستون، هپارین و میان‌کنش اختصاصی و برگشت‌پذیر میان هپارین و PAPP-A اساس تخلیص PAPP-A توسط این ستون بود. پیک اول حاصل از ستون Sephadex G200 پس از فیلترشدن به این ستون وارد و بافر ۰/۰۳مولار حاوی Tris-HCl NaCl ۰/۱۵مولار با pH ۷/۶ عبور داده‌شد و خروجی ستون در یک بشر جمع‌آوری گردید. سپس بافر Tris-HCl، ۰/۳ مولار حاوی کلرید سدیم ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۶مول با pH معادل ۷/۶ عبور داده‌شد. قسمت‌های حاصل از هریک از غلظت‌های نمکی مختلف بافر جداگانه جمع‌آوری

گردید. افزایش غلظت نمک بافر تا ۰/۳ مول موجب شسته شدن مقدار زیادی از PAPP-A و دیگر پروتئین‌های سرمی متصل‌شده و افزایش غلظت نمک تا ۰/۴ مول به‌طور متعاقب، موجب جداسازی و شستشوی مقدار دیگری از PAPP-A متصل‌شده گردید و در نهایت باقی مانده PAPP-A با افزایش غلظت نمک تا ۰/۶ مول جدا و شسته شد. در هریک 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: به‌منظور تهیه ستون مورد استفاده در مرحله سوم، ایمونیزاسیون خرگوش با سرم طبیعی جهت تولید ایمونوگلوبولین علیه پروتئین های تام سرم انسان صورت‌گرفت؛ سپس جداسازی و تخلیص ایمونوگلوبولین ضدپروتئین‌های تام سرم انسان از سرم خرگوش با استفاده از ستون CNBr-activaed sepharose 4B متصل شده به پروتئین A صورت‌گرفت. 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 هپارین – 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 متصل‌نشده به ستون تعیین‌گردید و با انجام SDS-PAGE از وجود پروتئین PAPP-A در آن اطمینان حاصل شد(۸، ۵، ۴).

نتایج

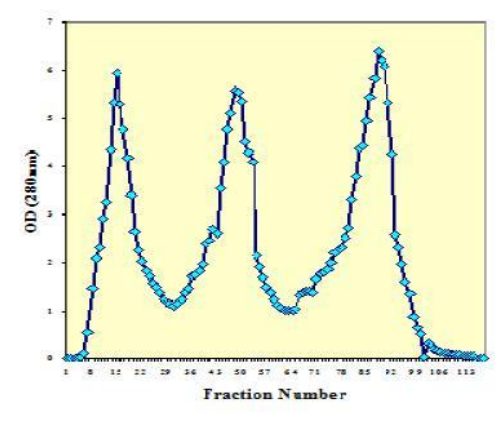
عبور سرم خانم‌های باردار در آستانه زایمان از ستونSephadex G200

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(نمودار۱). 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(شکل۱). لازم به ذکر است در SDS-PAGE در شرایط غیراحیاء، PAPP-A به دو زیر واحد هم‌اندازه(حدود ۴۵۰ کیلودالتون) تبدیل‌شده 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). دراین جا شرایط الکتروفورز به صورت غیراحیاء بوده است.

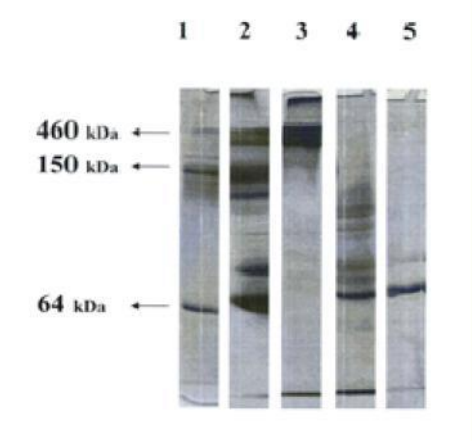
عبور مخلوط قسمت‌های مربوط به پیک اول حاصل از ستون Sephadex G200 از ستون هپارین-سفاروز

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

میلی لیتر، غلظت پروتئین حدود ۱/۴ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر اندازه‌گیری‌شد(شکل ۲).



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

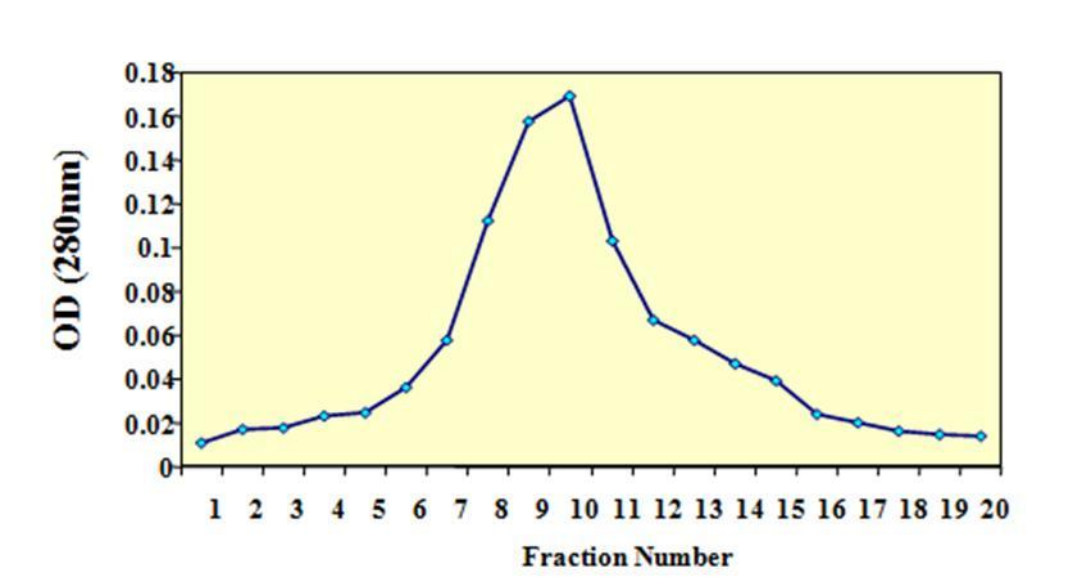


شکل ۲– الگوی SDS-PAGE مربوط به خالص سازی PAPP-A توسط ستون Sephadex G200.

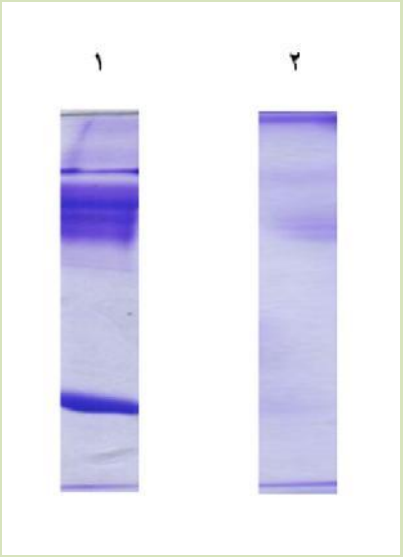
چاهک ۱ : استاندارد وزن مولکولی(فریتین، IgG، آلبومین)، چاهک ۲ : سرم کامل خانم باردار پیش از زایمان، چاهک ۳ : قسمت های مربوط به پیک اول، چاهک ۴ : قسمت های مربوط به پیک دوم، چاهک ۵ : مخلوط قسمت های مربوط به پیک های سوم و چهارم .

عبور نمونه از ستون افینیتی کروماتوگرافی منفی

از این ستون قسمت متصل شده به ستون هپارین – سفاروز که حاصل عبور بافر Tris – HCl با غلظت۰/۰۳ مول حاوی کلریدسدیم ۰/۳ مولار و ۰/۴ مولار بود، عبور داده شد. در این ستون، قسمت‌های متصل‌نشده به ستون، محتوی PAPP–A بوده و آن چه که به ستون اتصال یافت، باقی مانده دیگر پروتئین‌های سرمی بود. حجم کل قسمت‌های غیرمتصل ۲۰ میلی‌لیتر و غلظت پروتئین در آن به روش برادفورد حدود ۱۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. نمودار جذب نوری قسمت‌های غیرمتصل در شکل (۳) و الگوی SDS – PAGE مربوط در شکل(۴) نشان داده شده است.



شکل۳– جداسازی PAPP-A از نمونه خالص‌شده توسط ستون هپارین–سفاروز با استفاده از افینیتی‌کروماتوگرافی برروی ستون CNBr-activated Sepharose 4B متصل‌شده به ایمونوگلوبولین‌های ضد پروتئین‌های تام سرم انسان.



شکل۴– الگوی SDS-PAGE مربوط به ستونCNBr-Activated Sepharose 4B متصل‌شده به آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین‌های تام سرم

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

چاهک ۲: قسمت‌های متصل‌نشده به ستون.

بحث و نتیجه گیری

مزیت روش اتخاذ شده در این پژوهش در به حداقل رساندن شرایط تخریب ساختمانPAPP–A می‌باشد. دلایل استفاده از هر یک از سه مرحله متوالی کروماتوگرافی بدین شرح است: به کمک ستون Sephadex G200، پروتئین PAPP –A از پروتئین‌های سرمی کوچک مولکول جدا گردید. هم چنین بدین وسیله، جداسازی آنتی ترومبین III که یکی از پروتئین‌های سرمی با تمایل زیاد برای اتصال به هپارین می‌باشد از PAPP–A که‌این گلیکوپروتئین نیز به‌طور برگشت‌پذیر با هپارین واکنش‌می‌دهد، صورت‌گرفت؛ در نتیجه بازده ستون هپارین – سفاروز برای تخلیص PAPP–A افزایش یافت(۱۲). از آن جایی‌که PAPP–A درشت مولکول می‌باشد(حدود ۴۵۰ کیلودالتون) در قسمت‌های مربوط به پیک اول این ستون می‌توانست یافت شود، در نتیجه فقط این بخش برای عبور از ستون

هپارین–سفاروز انتخاب گردید(۱۳). با انجام افینیتی کروماتوگرافی به کمک ستون هپارین–سفاروز PAPP–A از برخی دیگر پروتئین‌های درشت مولکول سرمی که در پیک اول حاصل از ستون سفادکس باقی‌مانده و نسبت به هپارین فاقد افینیتی بودند، جدا سازی شد؛ به‌طوری‌که این گروه در قسمت‌های مربوط به بخش متصل‌نشده به ستون خارج گردیدند. گروهی از پروتئین‌های دارای افینیتی کم نسبت به هپارین که فقط در غلظت فیزیولوژیک کلرید سدیم به هپارین متصل می‌شوند، با عبور بافر ۰/۰۳Tris-HCl مول حاوی کلریدسدیم ۰/۳ مول با pH ۷/۶ به همراه مقداری از PAPP – A از ستون جدا گردید. با عبور Tris – HCl با غلظت ۰/۰۳ مول حاوی کلرید سدیم ۰/۴ مول باقی مانده پروتئین‌های متصل شده به هپارین که تمایل بیشتری نسبت به هپارین 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 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 کلریدسدیم 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 متصل‌شده 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 هپارین – 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).

منابع

1.Bersinger, N., Marguerat, P., Pescia, G., Schneider, H. (1995). Pregnancy-associated plasma protein a (PAPP-A): Measurment by highly sensitive and specific enzyme immunoassay,importance of first-trimester serum determinations and stability studies;Reprod. Fertile. 7;1419-142.

2.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.

3.Bersinger, N., Zakher, A., Huber, U., Pescia, G., Schneider, H. (1995). Asensitive enzyme immunoassay for PAPP-A: a possible first trimester method of screening for down syndrome and other trisomies. Gynecology and Obstetrics, 256; 185-192.

4.Bersinger, N., Kloer. A. (1984). PAPP-A in non-pregnant subjects. British Journal Of Obstetrics And Gynecology, 91; 453-456.

5.Byun, D., Mohan, S., Yoo, M., Sexton, C., Baylink, DJ., Qin, X. (2001). PAPP-A accounts for the insulin-link growth factor(IGF) binding protein-4(IGFBP-4) proteolytic activity in human prrgnancy 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). Coparison 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.

Isolation and Purification of Plasma Protein-A from Pregnant Women Serum at The End of 3th Trimester

S. Hoseini[1]., A. Mahdavi[2]., **H. Alizadeh[3]**

1. Biology Teacher, Education Office, 2nd 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

Inroduction & 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 28th 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.