

خالص سازی آنزیم آلکالین فسفاتاز از جفت انسانی

مهندس محمد آبرومند* - دکتر بیژن فرزامی*

نام علمی آنزیم آلکالین فسفاتاز EC3.1.3.1 Orthophosphor monoester phospho hydrolase می‌باشد. آنزیم آلکالین فسفاتاز از نظر ساختمانی یک گلیکو پروتئین دی مری است که فقط در محیط قلبیایی به کمک یون منیزیم به عنوان فعال کننده عمل می‌کند. این آنزیم در سطح وسیع، در طبیعت پراکنده است. آلکالین فسفات یک آنزیم متصل به غشاء است. هدف از این تحقیق، خالص سازی این آنزیم طی هفت مرحله از جفت است که بعد از تهیه محلول هموژنیت بافت جفت، این بافت تحت عمل استخراج با بوتانل نرمال قرار گرفت و سپس بوسیله فیلتراسیون زلی روی سفادکس G ۲۰۰ و عمل رسوب دادن محلول حاصل با آمونیم سولفات و با استن و در مرحله بعد توسط کروماتوگرافی روی ستون دی اتیل آمینواتیل سلولز (DEAE CELLULOSE -) با گرایانت کلرور سدیم از ستون خارج گردید. در مرحله نهایی، الکتروفورز پره پارتیو (Electrophoresis Preparative) انجام گرفت. فعالیت مخصوص آنزیم به دست آمده از جفت، U/mg ۲۰۱/۹ و فاکتور خالص سازی برای جفت، ۶۱۱/۸ به دست آمد که نشان دهنده جداسازی کامل این آنزیم بود. برای رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز به جای این که از N نفتیل فسفات استفاده شود، از پارانیتر و فنیل فسفات استفاده شد که در محل آلکالین فسفاتاز درژل الکتروفورز، یک باند رنگ زرد طلایی ظاهر شد و خالص سازی این آنزیم را تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی: آلکالین فسفاتاز؛ جفت انسانی؛ کروماتوگرافی؛ الکتروفورز دیسک زلی.

* - عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

* - دانشیار بخش بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

بیش از ۵۰ سال است که آلکالین فسفاتاز در پزشکی شناخته شده است (۱). نام علمی این آنزیم EC3.1.3.1 Orthophosphor monoester phospho hydrolase بوده و در بافت‌ها و ارگان‌های موجودات یوکاریوت مثل پستانداران و بعضی از موجودات پروکاریوتیک مثل باکتری‌ها پیدا شده است (۵ و ۶). آنزیم آلکالین فسفاتاز از نظر ساختمانی یک گلیکو پروتئین دی مری که شامل ۴ یون روی و ۲ یون منیزیم در هر دی مری است (۱). عمل این آنزیم، هیدرولیز منو استرهای فسفات به یک ترکیب آلی الکلی و یک گروه فسفات معدنی در یک محیط قلیایی است (۲). حضور یون منیزیم، به عنوان فعال‌کننده ضروری است (۲). پراکندگی این آنزیم در سطح وسیع در طبیعت است (۳). این آنزیم متصل به غشاء است و در بافت‌هایی مانند کبد، استخوان، کلیه، روده و جفت بیشتر از سایر ارگان‌های دیگر قرار دارد (۱ و ۳). فسفات‌ها نقش مهمی در حمل و نقل قندها و فسفات‌ها از مخاط روده، توبول‌های کلیوی، جفت و استخوان دارند (۳). علاوه بر آن، در رشد و تمایز جنینی، در انتقال مواد اختصاصی بخصوص کلسیفیکاسیون استخوان‌ها با فراهم نمودن فسفات معدنی و قند دخالت دارند و هم‌چنین در متابولیسم سلولی و هیدرولیز پیرو فسفات داخل سلول و جذب انتخابی مواد دخالت دارند (۱ و ۴). رابطه مستقیمی بین آلکالین فسفاتاز و جذب و انتقال چربی وجود دارد (۵ و ۶). بیشتر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سرم کودکان در حال رشد، ناشی از استئوبلاست‌های کندروبلاست‌های استخوان در حال رشد بوده و فعالیت آنزیماتیک آن‌ها حدود ۱۰ بار بیشتر از فعالیت استخوان در افراد بالغ است (۲). آنزیم آلکالین فسفاتاز جفتی به مقدار زیاد در دوازدهمین هفته حاملگی تولید می‌شود. فعالیت الکالین فسفاتاز جفتی در گردن رحم و شش اشخاص سالم کم است (۷ و ۸). آلکالین فسفاتاز جفتی، در حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد مقاوم است. در صورتی که آلکالین فسفاتاز غیرجفتی در این درجه حرارت، غیرفعال می‌شود (۱۰). سنجش آلکالین فسفاتاز در مطالعه دو نوع بیماری، بیماری اسکلتی و بیماری کبدی، اهمیت فراوان دارد (۹).

روش پژوهش

خالص سازی آنزیم آلکالین فسفاتاز در هفت مرحله زیر انجام گرفت. در مرحله اول بعد از شستشو، جفت انسانی را با محلول سالین (محلول ۸/۵ گرم لیتر کلرور سدیم) سرد، و قطعه قطعه نمودن آن، مقدار ۸۳/۳ گرم از بافت فوق را با چهار برابر از بافر A با $\text{pH} = 7.7$ را با دستگاه پوتر هموژن با دور ۷۰۰ RPM گردید (۵)، محلول هموژنیت را با سانتریفوژ یخچال دار در دور ۲۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی برای تعیین نمودن فعالیت آلکالین فسفاتاز و مقدار پروتئین و انجام مراحل بعدی در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۷). در مرحله دوم، ۳۲۰ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱۳۷ میلی‌لیتر از بوتانل (۳۰/۷۰) به آن اضافه گردید. سپس، محلول دوباره با دور ۱۲۵۰۰ g برای مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. ملاحظه شد که در لوله سانتریفوژ سه فاز بوجود آمد. لایه پایینی رسوب بود. لایه وسط حاوی آلکالین فسفاتاز بود و لایه رویی الکل بود که با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی متوجه شدیم که فاقد فعالیت آنزیمی است. عمل دیالیز محلول آنزیمی را به مدت ۴۸ ساعت در مقابل بافر تریس ۱۰ میلی‌مول در لیتر با pH مساوی ۴/۷ به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. در مرحله سوم، برای گرفتن کلیه رسوبات از محلول حاوی آلکالین فسفاتاز، این محلول از ستون ۵ سانتی‌متری سفادکس G ۲۰۰ عبور داده شد. در مرحله چهارم، محلول به دست آمده از مرحله قبل به ۷۵ درصد سولفات آمونیم اشباع رسانیده شده و به مدت ۲ ساعت مخلوط گردید و سپس با دور ۹۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب حاصل را در حجم مساوی از بافر A حل نموده و به مدت ۲۴ ساعت دیالیز گردید (۱). در مرحله پنجم به اندازه هم حجم محلول آنزیمی، استن سرد اضافه گردید. سپس

محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه سانتریفوژ در دور مساوی ۵۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. رسوب که حاوی مقدار زیادی آنزیم آلکالین فسفاتاز بود را در ۲۰ میلی لیتر از بافر A حل گردید.

در مرحله ششم، کروماتوگرافی تعویض با استفاده از EAE - 52 D بر روی ستون کروماتوگرافی به ابعاد ۴۰×۲/۵ سانتی متر $\text{Flowrate} = 2/8 \text{ mi/hv}$ و فراکسیون‌های ۵ MI انجام شد. در مرحله جداسازی، با استفاده از گرادیان پله‌ای با افزایش غلظت نمک در حلال بافر تریس کلراید $\text{pH} = 7/7$ باعث سست شدن اتصالات در خروج مواد از ستون با غلظت ۵۰ میلی گرم گردید که پیک آن بر روی رکورد ثبت شد و سپس با سنجش فعالیت آنزیم در فراکسیون‌های کروماتوگرافی و نمودار حاصل از آن نشان‌دهنده بیشترین میزان فعالیت آنزیم بود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در مراحل خالص‌سازی با استفاده از روش سالکوفسکی و همکاران (۷) همراه با تغییراتی اندازه‌گیری شد. روش سنجش بدین صورت بود که ۹ لوله آزمایش برای نمونه‌ها و یک لوله شاهد انتخاب شدند. به هر کدام از آنها، ۱ میلی لیتر بافر گلیسین - سود ۰/۱ مولار ($\text{P H} = 9/5$)، ۱/۲ میلی لیتر سویسترای پارانیتروفنیل فسفات ۰/۰۰۰۱ ریخته شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به لوله‌های دیگر، به ترتیب ۰/۱ از نمونه‌ها با مقدار پروتئین معین افزوده شد. بعد از مخلوط کردن، بلافاصله به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و تغییرات جذب هر لوله در طول موج ۴۰۵ نانومتر، در مقابل لوله شاهد ثبت گردید و سپس میزان فعالیت آنزیمی را بر mg/ml پروتئین که (توسط روش لوری اندازه‌گیری شد) تقسیم نمودیم و فعالیت آنزیم را بدست آوردیم.

در مرحله هفتم، جهت مشخص نمودن تعداد پروتئین‌های نمونه در هر مرحله و در پیک‌های مختلف که با استفاده از روش (Davis, ۱۹۶۴) (۹) انجام می‌شود، با بکاربردن ژل پلی اکریل آمید و دیسک از دستگاه الکتروفوروز استفاده گردید. در این روش، از دو ژل جداکننده که شامل ژل جداکننده، و ژل توده کننده بود. برای تهیه ژل جداکننده، ۵ میلی لیتر رساننده شد و سپس ۳۰۰ میلی لیتر از محلول C به آن افزوده شد. محلول حاصل وارد لوله‌هایی به طول ۱۲ سانتی متر و به قطر ۱ سانتی‌متر گردید و به کمک اشعه UV پلیمره گردید. (محلول a حاوی بافر تریس - اسید کلریدریک ($\text{PH} = 8/9$))، محلول b حاوی ۲۸ گرم اکریل آمید، ۰/۷۴ گرم بیس اکریل آمید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر و محلول C حاوی آمونیم پر سولفات بود).

جهت تهیه ژل توده کننده، ۲/۵ میلی از محلول d (بافر تریس - اسید کلریدریک با $\text{PH} = 8/9$) با ۳/۱ میلی لیتر از محلول b مخلوط شد؛ حجم آن با آب مقطر به ۱۴/۱ میلی لیتر رسانده شد و سپس ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول C به آن اضافه شد و بلافاصله به طور ۱ سانتی متر روی ژل جداکننده ریخته شد، بعد از پلیمریزه شدن ژل‌ها و افزودن نمونه‌ها روی آن‌ها، الکتروفوروز در بافر تریس - گلیسین ($\text{PH} = 8/3$) در ولتاژ ثابت و شدت جریان متغیر (به ازاء هر لوله ۳ میلی آمپر) بر روی ولتاژ ۱۵۰ ولت به مدت ۶ ساعت انجام شد. ژل‌ها به مدت ۱ ساعت به وسیله محلول رنگ آمیزی (کوماسی بلو ۲ درصد + اتانل ۵۰ درصد + اسیداستیک ۱۰ درصد + ۲- مرکاپتواتانل ۰/۰۵ درصد) رنگ آمیزی شدند. رنگ‌های اضافی از روی ژل‌ها بوسیله محلول رنگ بر (اتانل ۲۰ درصد + اسیداستیک ۵ درصد) زدوده شدند و ژل‌ها برای بررسی در محلول فیکساتور (اسید استیک ۵ درصد) نگهداری شدند. از ژل‌ها عکس برداری شد و با عمل رنگ آمیزی ژل الکتروفوروز با بدست آوردن یک بانده متوجه شدیم که آنزیم خالص شده است. با قطعه قطعه و حل نمودن ژل در بافر ۱ میلی بافر تریس اسید کلریدریک، مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد. که در جدول مربوطه آمده است.

یافته‌ها

نتیجه هموزن ۱۰۰۰۰ میلی گرم توتال پروتئین بود و میزان فعالیت کل آنزیم بر حسب واحد بین المللی ۳۲۲۸ واحد گردید. میزان فعالیت مخصوص آنزیم $0/33 \text{ u/m}$ گردید. این نتیجه برای استخراج 30 V/V درصد $702/55$ میلی گرم توتال پروتئین بود و میزان فعالیت کل آنزیم بر حسب واحد بین المللی 3021 واحد گردید.

میزان فعالیت مخصوص آنزیم $4/3 \text{ u/m}$ شد. در روش استخراج توسط فیلتراسیون ژلی بر روی سفادکس، 200 G ، پس از جمع‌آوری لوله‌های حاوی الکالین فسفاتاز مشاهده شد که میزان فعالیت کل آنزیم بر حسب واحد بین المللی، 2918 واحد بود. میزان فعالیت مخصوص آنزیم $5/9 \text{ u/m}$ شد و مقدار توتال پروتئین $494/57$ میلی گرم بود که در شکل ۳ منحنی مربوطه آمده است. استخراج توسط رسوب با سولفات آمونیم 75 درصد وزنی، مقدار توتال پروتئین $193/8$ میلی گرم بود و میزان فعالیت کل آنزیم بر حسب واحد بین المللی 2345 واحد گردید. میزان فعالیت مخصوص آنزیم $12/1 \text{ u/m}$ شد. در رسوب توسط استن سرد، مقدار توتال پروتئین، $116/9$ میلی گرم بود و میزان فعالیت کل آنزیم بر حسب واحد بین المللی 1859 واحد گردید. میزان فعالیت مخصوص آنزیم $15/9 \text{ u/m}$ شد. پس از جمع‌آوری لوله‌های حاوی الکالین فسفاتاز مشاهده شد، که نتیجه کروماتوگرافی توسط دی اتیل آمینواتیل سلولز، مقدار توتال پروتئین $7/14$ میلی گرم بود. در شکل ۴ منحنی مربوطه آمده است و میزان فعالیت کل آنزیم بر حسب واحد بین المللی 183 واحد گردید. میزان فعالیت مخصوص آنزیم $52/6 \text{ u/m}$ شد. در شکل ۲ منحنی مربوطه آمده است و برای الکتروفوروز، مقدار توتال پروتئین $0/52$ میلی گرم بود و میزان فعالیت کل آنزیم بر حسب واحد بین المللی $105/8$ واحد گردید.

در این صورت میزان فعالیت مخصوص آنزیم $209/9 \text{ u/m}$ گردید، نتایج کلی سنجش در جدول زیر آمده است. الکالین فسفاتاز، درجه خلوص بالایی بدست آمد و نشان‌گر این بود که جفت، فقط یک نوع الکالین فسفاتاز دارد. در این روش، در رنگ‌آمیزی بجای $-N$ نفتیل فسفات، از پارانیتروفنیل فسفات استفاده شد.