

人胎盘耐热性碱性磷酸酶的分离纯化及其性质的研究*

沈波 肖为红 俞惠新

(江苏省原子医学研究所, 无锡 214063)

关键词 人胎盘耐热性碱性磷酸酶(P-HSAP), P-HSAP 的性质, P-HSAP 的纯化, 碱性磷酸酶

人胎盘耐热性碱性磷酸酶(placental heat stable alkaline phosphatase, P-HSAP)是一种高度对热稳定的碱性磷酸酶(AP)同工酶^[1], 分子量为130000, 由两个相同的亚基组成。P-HSAP由合体滋养细胞合成后分泌进入母体血液, 孕妇血清中P-HSAP的活性变化是有规律的^[2-4], 可以作为胎盘功能监测的指标。目前P-HSAP也已作为精原细胞肿瘤的标志物被广泛采用^[5]。制备高纯度P-HSAP是建立定量检测方法的前提。本文报道从人胎盘中纯化P-HSAP的方法以及对其一些性质的研究。

1 材料和方法

1.1 材料 人胎盘由解放军第101医院提供; DEAE-DE52, Sephadex G-200为Pharmacia产品; CM52为Whatman产品; 考马斯亮蓝G25为Fluka产品; 等电点标准为LKB产品; 十二烷基硫酸钠(SDS)、苯基磷酸二钠为上海化学试剂商店进口分装; 其它试剂均为国产分析纯和生化试剂。

1.2 AP活力测定 主要参考鲍氏法^[6]测定, 但有较大改进。以苯基磷酸钠为底物, 反应缓冲液为0.04mol/L巴比妥缓冲液, pH9.6, 于37℃保温15min后用三氯醋酸除去蛋白质, 吸取0.1ml上清加入定磷试剂, 经45℃保温10min后在660nm进行比色。酶的活力单位(U)定义为在此条件下每min产生1μg无机磷的酶量为1U。

1.3 蛋白质含量测定 用考马斯亮蓝G250测定^[7], 略加改进(所加考马斯亮蓝试剂的体积增加1倍), 牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), SDS-PAGE和等电聚焦(IEF) 均按LKB2117电泳手册进行。

1.5 酶的分离纯化^[8-10] 胎盘的预处理和正丁醇抽提按文献[8]进行。将正丁醇抽提液加热至65℃并保持10min后离心除去热变性蛋白, 所得上清为热

变性抽提液。

热变性抽提液对缓冲液A(0.01 mol/L Tris-HCl, pH7.6, 0.001mol/L MgCl₂, 0.01mmol/L ZnCl₂)充分透析后上DEAE-DE52柱(1.6cm×20cm), 线性梯度洗脱(含0—0.3mol/L NaCl的缓冲液A), 分部收集, 合并酶活力峰, 浓缩后对缓冲液C(0.01mol/L 柠檬酸-柠檬酸三钠 pH 6.0, 0.001mol/L MgCl₂, 0.01mmol/L ZnCl₂)透析4h后上CM52柱(1.6cm×17cm), 用缓冲液C洗脱, 分部收集, 合并酶活力峰。浓缩后直接上Sephadex G-200柱(2.6cm×80cm), 用缓冲液A洗脱, 合并酶活力峰, 分装、冻干。

1.6 氨基酸组成分析 纯P-HSAP用6mol/L HCl回流水解24h后, 在日立835-50型氨基酸自动分析仪上进行分析。

2 结果与讨论

2.1 酶的分离纯化 人胎盘组织经正丁醇抽提、热变性处理、离子交换柱层析(图1和2)和凝胶过滤(图3)等步骤获得P-HSAP, 酶的最终比活为4379U/mg, 酶活力回收为57.9%。

表1 P-HSAP 的分离纯化

步骤	总活力(U)	总蛋白(mg)	比活(U/mg)	回收(%)
正丁醇抽提液	291000	2560	113.7	100
热变性抽提液	270900	980	276.4	93.1
DEAE 柱层析	186400	62.5	2982.4	64.1
CM 柱层析	174470	50.2	3475.5	60.0
Sephadex G-200 层析	168600	38.5	4379.2	57.9

表中数据为两次提取的平均值, 每次提取所用胎盘的重量为300g。

* 卫生部青年科学研究基金资助项目。

收稿日期: 1991-10-04 修回日期: 1992-01-07

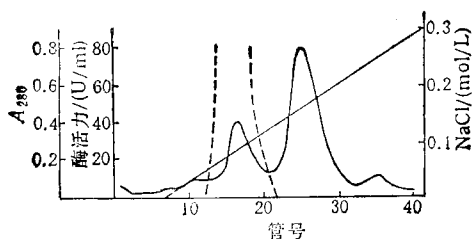


图 1 DEAE 柱层析纯化 P-HSAP
实线: 蛋白浓度 A_{280} ; 虚线: 酶活力 U/ml

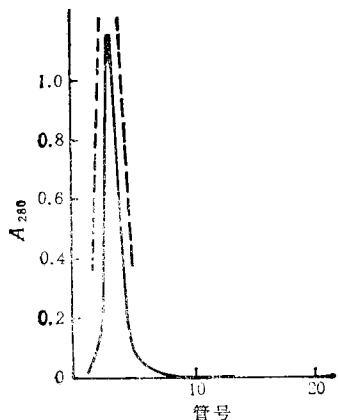


图 2 CM 柱层析纯化 P-HSAP
实线: 蛋白浓度 A_{280} ; 虚线: 酶活力 U/ml

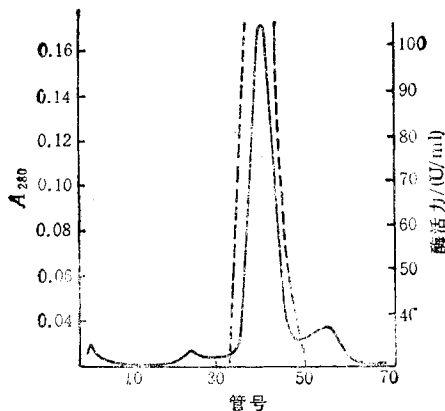


图 3 Sephadex G-200 纯化 P-HSAP
实线: 蛋白浓度 A_{280} ; 虚线: 酶活力 U/ml

2.2 酶学性质 由本法制备的 P-HSAP, 以苯基磷酸二钠为底物, 测得其米氏常数 K_m 为 2.5×10^{-3} mol/L, 最适反应 pH 为 10.5 左右^[11], 最适反应温度在 65°C 左右。

2.3 酶的理化性质 用 Sephadex G-200 柱层析测定 P-HSAP 的分子量约为 130000 (图 4), 用 SDS-PAGE 测得其亚基分子量为 65000 (图 5), 说明由两个相同的亚基组成, 与文献报道^[8]相符。

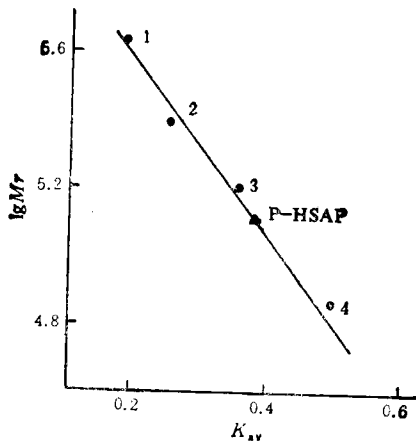


图 4 凝胶过滤法测定 P-HSAP 的分子量
1. 铁蛋白 (440000); 2. 过氧化氢酶 (230000); 3. 醛缩酶 (160000); 4. 牛血清白蛋白 (75000)



图 5 P-HSAP 的 SDS-PAGE 图谱
A: 低分子量标准, 从上到下依次为 94000, 67000, 43000, 30000 和 17500. B: P-HSAP

以等电点标准蛋白 (pI 4.5—5.8) 为标准, 用薄层等电聚焦电泳测得 P-HSAP 的等电点为 4.6, 与文献报道^[11]一致。

使用同一稀释酶液和反应体系, 将酶分别置 65°C, 75°C 和 90°C 保温 30, 60, 90, 120, 150 和 180 min 后测定酶活力, 以 A_{660} 值对保温时间作图 (图 6), 表明 P-HSAP 对热较稳定, 纯酶在 65°C 保温 3h, 活性仍保留 80% 以上; 当温度提高到 90°C 时活性很快丧失。另外纯酶在室温放置一和二个月后测定活性, 发现活性并未明显下降。

2.4 酶的纯度和氨基酸组成 PAGE 和 SDS-PAGE 均显示本法制备的 P-HSAP 为一条带。P-HSAP 的氨基酸组成见表 2。

文献报道应用正丁醇抽提, pH, 丙酮, 硫酸铵分级分离, 离子交换柱层析和凝胶过滤, 从人肠^[12]、肝^[13, 14]、胎盘^[8-10]等组织中可以纯化到电泳纯的高活

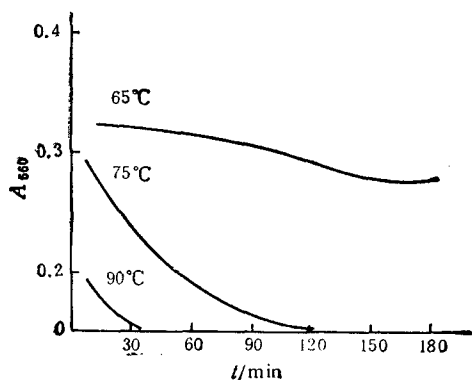


图6 P-HSAP的热稳定性

表2 P-HSAP的氨基酸组成

氨基酸	百分含量	氨基酸	百分含量
Asp	10.43	Leu	6.67
Thr	5.16	Tyr	1.50
Ser	3.80	Phe	4.52
Glu	9.09	Lys	6.73
Gly	4.60	NH ₂	—
Ala	5.88	His	2.66
Cys	1.96	Arg	5.93
Val	5.34	Trp	—
Met	1.19	Pro	4.08
Ile	4.77		

性 AP。作者在此基础上进行了改进，利用 P-HSAP 的耐热性^[1]，采用 65℃ 加热变性正丁醇抽提液，除去大量杂蛋白，上清液透析后直接进行离子交换和凝胶过滤纯化，省却了 pH，丙酮和硫酸铵的分级沉淀步骤，避免了酸碱、有机溶剂对酶活力的影响，缩短了纯化周期，产品纯度为电泳纯。65℃ 的加热变性可以有效地使 P-HSAP 与组织非特异型和肠型 AP 分开，因为后两种 AP 同工酶在 65℃ 时完全变性失活^[1]。通过本法制备的 P-HSAP 由两个相同的亚基组成，亚基分子量为 65000，等电点为 4.6，以苯基磷酸二钠为底物的 K_m 值为 $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ，其最适反应 pH 为 10.5 左右，

最适反应温度为 65℃ 左右，特别是该酶对热的稳定性很高，在 65℃ 保温几个小时仍保留大部分活力，室温放置二个月活性未见下降。这一热稳定性在应用上具有较大价值。

参 考 文 献

- Onica D, Rosendahl K, aldenlind L. Inherited occurrence of a heat stable alkaline phosphatase in the absence of malignant disease. *Clin Chim Acta*, 1989; 180: 23
- Arnold K T C. *Placental junction test*. Berlin: Springer, 1982; 32—38
- 徐宏里,朱凤全,阎国来等. 测定孕妇血中胎盘酶判断胎盘功能. *中华妇产科杂志*, 1988; 23: 262
- 刘建,凌萝达,顾美礼等. 高危妊娠孕妇血清 AKP, HS-AP, LAP r-GT 沉淀的临床意义. *中华妇产科杂志*, 1989; 24: 66
- Fishman W H. The advancement of alkaline phosphatase isoenzyme. *Clin Biochem*, 1990; 23: 99
- 上海医学化验所主编. 临床生化检验(上). 上海: 科学技术出版社, 1979; 351—356
- Scopes R K. *Protein purification*. New York: Springer-Vrelag, 1982: 266
- Holmgren P A, Stigbran T. Purification and partial characterization of two genetic variants of placental alkaline phosphatase. *Biochem Genetics*, 1976; 14: 777
- Doellgast G T, Fishman W H. Purification of human placental alkaline phosphatase. *Biochem J*, 1974; 141: 4405
- Greene P J, Sussman H H. Structural comparison of ectopic and normal placental alkaline phosphatase *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973; 70: 2936
- Sugiura M, Isobe M, Hirano K *et al.* Comparison of properties of human intestinal and placental alkaline phosphatase. *Chem Pharm Bull*, 1975; 23: 1542
- Sugiura M, Isobe M, Hirano K *et al.* Purification of human intestinal alkaline phosphatase. *Chem Pharm Bull*, 1975; 23: 1537
- Sugiura M, Hirano K, Iimo S *et al.* Purification and properties of human liver alkaline phosphatase. *Chem Pharm Bull*, 1975; 23: 2369
- Bandger K, Sussman H H. Structural evidence that human liver and placental alkaline phosphatase isoenzymes are coded by different genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 2201