مطالعه آنزیم آلکالین فسفاتاز جدید مول هیداتی فرم انسانی

دکتر محمد آبرومند[1]، دکتر بیژن فرزامی[2]، دکتر پروین پاسالار[2]، سید احمد حسینی[3]، دکتر لیلا آل احمدی[4]، علیرضا جعفری[5]

[1] استادیار بخش بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

[2] استاد بخش بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[3] عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی، دانشکده پیرا پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

[4] پزشک عمومی

[5] کارشناس بخش بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

نشانی نویسنده مسؤول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، بخش بیوشیمی، دکتر محمد آبرومند
E-mail: aberumand@yahoo.com

وصول:۸۵/۱۲/۸، اصلاح:۸۶/۴/۳، پذیرش:۸۶/۵/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم آلکالین فسفاتاز (EC: 3.1.3.1) آنزیمی است که در بافت‌ها و ارگان‌های موجودات یوکاریوت مثل پستانداران و بعضی از موجودات پروکاریوتیک مثل باکتری‌ها ساخته می‌شود. از نظر ساختمانی آنزیم، یک گلیکو پروتئین دی‌مری بوده و شامل ٤ یون روی و ۲ یون منیزیم در هر دی مر است. عمل این آنزیم هیدرولیز منو استرهای فسفات به یک ترکیب آلی الکلی و یک گروه فسفات معدنی در یک محیط قلیایی است. آلکالین فسفات یک آنزیم متصل به غشاء است. هدف از این مطالعه، مقایسه آنزیم آلکالین فسفاتاز با آنزیم مول هیداتی فرم انسانی است.

مواد و روش‌ها: در این روش، آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط رسوب با بوتانل، استن، سولفات آمونیم، سفادکس۲۰۰ G، کروماتوگرافی با میل ترکیبی و پره پریتو الکتروفورز خالص گردید.

یافته‌ها: این مطالعه نشان داد که می‌توان این آنزیم را ٦۱۱/۸ بار خالص نمود. فعالیت مخصوص آنزیم به‌دست آمده مساوی ۲۰۱/۹ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بود. مقدار کربوهیدرات این آنزیم ۵/۲ درصد بوده و مشاهده گردید که دمای مناسب برای آنزیم ٤۰ درجه سانتی‌گراد و pH مناسب آن مساوی ۱۰/٤ می‌باشد.

نتیجه‌گیری: آنزیم مول هیداتی فرم انسانی خالص شده دارای دمای مناسب ٤۰ در جه سانتی‌گراد و pH مناسب مساوی ۱۰/٤ می باشد که در مقایسه با آنزیم آلکالین فسفاتاز جفت انسانی (دمای مناسب آن ٤۵ در جه سانتی‌گراد و pH مناسب مساوی ۱۰/۵) متفاوت بوده و از این طریق می توان با مقایسه آن‌ها، به وجود آنزیم مول هیداتی فرم انسانی پی برد. ***(مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره۱۴/شماره ۳ / صص ۱۶۴-۱۵۹).***

واژه‌های کلیدی: *مول هیداتی فرم؛ آنزیم آلکالین فسفاتاز؛ خالص‌سازی.*

مقدمه

نئوپلاسم به هر نوع رشد جدید و غیر طبیعی اطلاق می‌شود، به‌خصوص از آن نوعی که در آن تکثیر سلولی کنترل نمی‌شود و پیشرونده است. نئوپلاسم ممکن

است خوش‌خیم و یا بدخیم باشد. با توجه به این که تشخیص بدخیم بودن آن قبل از مراحل پیش‌رونده آن از آنزیم آلکالین فسفاتاز جفتی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱)، اندازه‌گیری فعالیت این نوع ایزو آنزیم می‌تواند در تشخیص مول هیداتی فرم در مراحل اولیه مؤثر باشد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در مول هیداتی فرم کاهش می‌یابد.

مول هیداتی فرم انسانی به دو بخش عمده تقسیم شده است. نوع کامل ۲n کروموزومی که بدون جنین و عروق خونی می‌باشد و نوع ناقص ۳n کروموزومی که در کنار بافت مولی جنین اتروفیه شده دیده می‌شود (۲). مول هیداتی فرم دارای آنزیم‌های فراوان از جمله مانوزیداز، بتا گالاکتوزیداز، هیالورونیداز و آلکالین فسفاتاز می‌باشد. به‌علاوه، آلکالین فسفاتاز EC:3.1.3.1 از گیاهان (۳,۱۲)، حیوانات (۴,۵,۱۳) انسان (۱۵, ۸ -۶) و میکروارگانسیم‌ها (۹) خالص شده و خصوصیت آن مورد مطالعه قرار گرفته است. این آنزیم در پروسه ذخیره فسفات معدنی نیز نقش دارد (۱۰). در بیمارانی که با کمبود این آنزیم مواجه می‌شوند جنبه ارثی دارد (۱۱). هدف از این مطالعه، مقایسه آنزیم آلکالین فسفاتاز با آنزیم مول هیداتی فرم انسانی است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی لازم: سفادکس G ۲۰۰، DEAE cellulose، اتانل ۹۸ درصد، کوماسی بریلیانت بلو $G_{۲۵۰}$، استاندارد پروتئین با وزن مولکولی بالا، اکریل آمید، بیس آکریل آمید، کربنات سدیم از شرکت Sigma، کلرور سدیم، تریس اسیدکلریدریک، اسیدکلریدریک گلاسیال، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سوکروز، فسفات پتاسیم، بوتانل نرمال، استن، تترا متیل اتیلن دی آمین (TEMD)، برمو فنل بلو، ۲- مرکاپتو اتانل، معرف فولین سیو کالتو، سولفات مس متبلور، تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم از شرکت Pharmacia تهیه گردید.

تهیه هموژن و مرحله رسوب با بوتانل سرد و استن (منهای ۲۰ درجه): ۱۰۰ گرم از بافت مول هیداتی فرم انسانی تمیز شده را وزن نموده، با دستگاه خردکننده (Hemozenazer) با چهار برابر وزن بافت با بافر تریس (۰/۱ مولار، pH=۱۰/۵) خوب خرد نموده و سپس آن را با دور g ۱۲۰۸۵ و به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط ٤ درجه حرارت سانتی‌گراد سا نتریفوژ نموده، محلول رویی فوق را حجم نموده و به اندازه ۷۰ :۳۰ (حجم/حجم) از بوتانل منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد را به صورت قطره قطره در شرایط سرد دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در حالی‌که محلول با همزن مغناطیسی به‌هم می‌خورد به محلول اضافه گردید. سپس آن را با همان دور و درجه حرارت سانتریفوژ نموده، مشاهده گردید که سه لایه به‌وجود آمد: لایه پایینی رسوب، لایه وسط محتوی آنزیم و لایه رویی الکل چربی بودند. لایه رسوبی و لایه رویی دور ریخته شدند ولی لایه میانی حاوی آنزیم آلکالین فسفاتاز اندازه-گیری شده و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۲,۱۳).

۲۰ میلی لیتر از محلول میانی را با ۲۰ میلی‌لیتر از استن سرد منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌صورت قطره قطره در حالی که محلول با هم زن مغناطیسی به‌هم می-خورد، در همان شرایط اضافه گردید. بعد از سانتریفیوژ لایه رسوب و لایه محلول رویی به‌وجود آمد. رسوب در ۲ میلی‌لیتر از بافر تریس حل گردید و مشاهده گردید که محلول حاوی آنزیم بوده و برای مراحل بعدی در شرایط ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱٤,۱۵).

استخراج توسط سولفات آمونیم: ۲ میلی‌لیتر از محلول به‌دست آمده در بافر تریس (۰/۱ مولار، pH ۱۰/۵ =) به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و با ۸۰ درصد سولفات آمونیم اشباع نموده، به مدت ۱/۵ ساعت با همزن مغناطیسی مخلوط نموده و سپس در همان شرایط سانتریفوژ نمودیم. رسوب حاصل را در کمترین حجم سرم فیزیولوژیکی حل نموده و به مدت ۲ روز در مقابل آب مقطر و در نهایت

سرم فیزیولوژیکی دیالیز کرده و در طول این مدت آب مقطر ۹ بار و سرم فیزیولوژیکی ۱ بار تعویض گردید (۱۵).

مرحله عبور از ستون کروماتوگرافی سفادکس ۲۰۰ G: محلول حاوی آنزیم آلکالین فسفاتاز در شرایط ٤ درجه سانتی‌گراد از ستون (۶۰×۱/۵ cm) از ژل سفادکس ۲۰۰- G عبور داده شد (۱۶)، برای عبور پروتئین‌ها از ستون از بافر تریس (۰/۱ مولار، pH=۱۰/۵) استفاده گردید. سرعت خروج محلول از ستون کروماتوگرافی بر روی ستون سفادکس ۲۰۰- G مساوی با ٤ میلی‌لیتر در ۱۰ دقیقه بوده و در این شرایط لوله‌های ۳۰-۲۰ حاوی ٤ میلی‌لیتری از زیادی آنزیم آلکالین فسفاتاز جمع‌آوری گردید. مقدار پروتئین مساوی ۲/۹ میلی‌گرم و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز مساوی ٤٦/٤٧ واحد آنزیمی گردید.

مرحله عبور از ستون کروماتوگرافی DEAE cellulose: مقدار فعالیت آنزیم را در لوله‌های حاوی مقدار زیاد آنزیم آلکالین فسفاتاز جمع‌آوری نموده و سپس مقدار پروتئین و آنزیم آن اندازه‌گیری گردید که در نهایت ۳ میلی‌لیتر پروتئین از مرحله قبل را بر روی ستون (۴۵×۲ cm) عبور داده و لوله‌های حاوی مقدار زیاد آنزیم آلکالین فسفاتاز را جهت اندازه‌گیری پروتئین و آنزیم جمع‌آوری نمودیم.

تخمین پروتئین: غلظت پروتئین به دو روش، یعنی روش لوری و روش جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۱۷,۱۸) و Bovine Serum Albumin (BSA)به‌عنوان پروتئین استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

تخمین کربوهیدرات در آنزیم: برای تخمین کربوهیدرات روش فنل سولفوریک اسید استفاده شد و در این روش، گلوکز به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۱۹).

اندازه‌گیری آنزیم : فعالیت آلکالین با استفاده از سوبسترای پارانیترو فنیل فسفات و بافر تریس (pH ۱۰/۵ ،۰/۱ mM) و اندازه‌گیری پارانیترو فنیلات آزاد شده در طول موج ٤۰۵ نانومتر با استفاده از ضریب جذب ۱۷۷۰۰ برای پارانیترو فنیلات با دستگاه اسپکتروفتومتر PERKIN ELMER UV/VIS Spectrometer Lambda 3 اندازه-گیری گردید (۲۰).

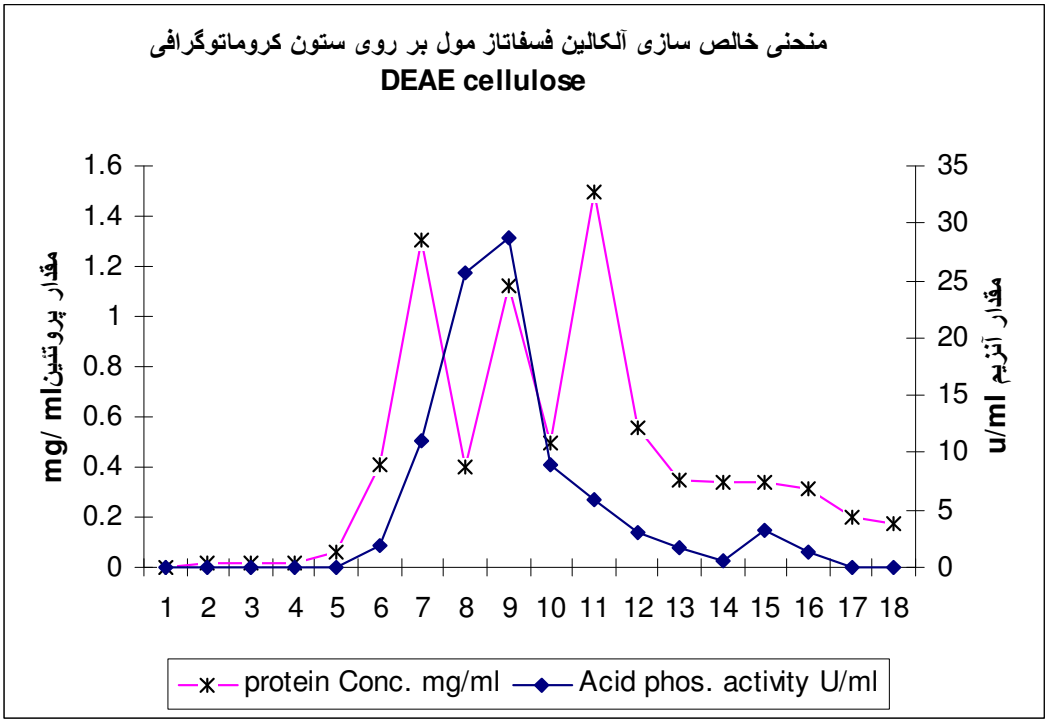
الکتروفورز پلی اکریل آمید ژل صفحه‌ای با سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAG): نمونه مراحل استخراج از ستون کروماتوگرافی توسط الکتروفورز بر پایه ژل ۱۰ درصد اکریل آمید در حضور و عدم حضور SDS به روش .Ornstein L کنترل شد (۲۳-۲۱).

اثر pH و حرارت بر آنزیم آلکالین فسفاتاز: اثر pH بر روی فعالیت آنزیم با استفاده از بافر تریس یک دهم مولار در pH هایی در دامنه ۱۱-۷ انجام گردید و برای اندازه‌گیری حرارت مناسب آنزیم در دامنه (۱۰۰-۰ درجه سانتی‌گراد) از بافر تریس یک دهم مولار در pH=۱۰/۵ استفاده گردید. آنزیم خالص شده برای مدت ۳۰ دقیقه در حرارت‌های مختلف از صفر تا صد اینکوبه شده بود.

یافته‌ها

مقدار پروتئین تام برای فراکشن تولید شده توسط سولفات آمونیم، ستون‌های کروماتوگرافی با تعویض یونی و الکتروفورز به‌ترتیب مساوی ۷/۱٤ و ۰/۵۲ میلی‌گرم بود (نمودار ۱). این آنزیم با ٦۱۱/۸ برابر خالص گردیده و میزان فعالیت مخصوص این آنزیم ۲۰۱/۹ میلی‌گرم بر پروتئین به‌دست آمد (جدول ۱) (میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد بین المللی بیان شده است).

آلکالین فسفاتازخالص شده در نهایت توسط PAGE با به‌دست آمدن یک باند بر روی الکتروفورز با رنگ‌آمیزی نقره‌ای و ژل فیلتراسیون مورد تأیید قرار گرفت (۲۵-۲۱) (شکل۱). مقدار هیدروکربور در این آنزیم برابر با ۵/۲ درصد بود. در pH =۱۰/٤ بیشترین



نمودار ۱: منحنی خالص‌سازی آلکالین فسفاتاز مول بر روی ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز

جدول ۱ : مراحل خالص سازی آلکالین فسفاتاز مول هیداتی فرم

مراحل خالص سازی	میلی گرم کل پروتئین	کل واحد آنزیمی	فعا لیت مخصوص (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین)	درجه خلوص آنزیمی
استخراج با سرم فیزیولوژی	۱۰۰۰۰	۳۲۸۰	۰/۳۳	۱
استخراج با بوتانل	۷۰۲	۳۰۲۱	٤/۳	۱۳
کروماتوگرافی با سفادکس G200	٤۹٤	۲۹۱۸	۵/۹	۱۷/۸۷
استخراج با سولفات آمونیم	۱۹۳	۲۳٤۵	۱۲/۱	۳۶/۶
رسوب با استن	۱۱۶	۱۸۵۹	۱۵/۹	٤۸/۱۸
کروماتوگرافی با دی اتیل آمینو اتیل سلولز	۷/۱٤	۱۸۳	۲۵/۶	۷۶/۸
پره پریتو الکترو فورز	۰/۵۲	۱۰۵/۸	۲۰۱/۹	۶۱۱/۸

فعالیت آلکالین فسفاتاز با ۵ میلی مول از پارانیترو فنیل فسفات به‌عنوان سوبسترا به‌دست آمد. حرارت مناسب برای آنزیم مساوی با ٤۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

بحث

خالص سازی آنزیم لکالین فسفاتاز از مول هیداتی فرم مراحل زیر مثل رسوب با حلال‌های آلی مانند:

۱- بوتانل برای خارج نمودن چربی ها و رنگدانه‌های سلولی.

۲- استن سرد برای رسوب پروتئین‌ها.

۳- رسوب با سولفات آمونیم بر مبنای پیوند هیدروژنی سولفات آمونیم با آب و عدم پیوند هیدروژنی پروتئین با آب به خاطر عدم وجود شرایط به وجود آمدن پیوند هیدروژنی آب و پروتئین‌ها، که باعث رسوب پروتئین‌های

شکل ۲ : SDS الکتروفورز ازآلکالین فسفاتاز خالص شده از مول هیداتی فرم در بافر تریس با pH=۸/۳

با وزن ملکولی کوچک‌تر می گردد.

٤- مرحله عبور از ستون کروماتوگرافی با سفادکس ۲۰۰ – G و مرحله عبور از ستون کروماتوگرافی با تعویض یونی ، در این تحقیق توانستیم خالص بودن آنزیم را به کمک دستگاه الکتروفرورز به اثبات برسانیم.

با توجه به این که تا کنون آنزیم های جفت و مول هیداتی فرم انسانی را مشابه تلقی می کردند و به همین خاطر روشی را برای تشخیص مول هیداتی فرم انسانی از طریق بررسی این آنزیم تا کنون پیشنهاد نشده است . در این تحقیق بر آن شدیم که با توجه به مشابه نبودن این دو آنزیم به دلیل : ۱- وجود کربوهیدرات در آنزیم آلکا لین فسفاتاز مول هیداتی فرم انسانی و عدم وجود آن در آنزیم آلکلین فسفاتاز جفت انسان(۲٦) .

۲- به دلیل وجود دو pH مناسب، متفاوت برای این دو آنزیم (pH مناسب آلکا لین فسفاتاز جفت (۱۰/۳– ٤/۷) ثابت شده است (۲۷) و pH مناسب آلکا لین فسفاتاز مول هیداتی فرم انسانی (pH ۱۰/٤))، این دو آنزیم مشابه نیست .

۳- حرکت الکتروفورزی به وجود مول هیداتی فرم انسانی یکسان نیست.

بنابراین از طریق اندازه گیری pH مناسب و کربوهیدرات و همچنین حرکت الکتروفورزی به وجود مول هیداتی فرم انسانی در روزهای اولیه تشکیل مول هیداتی فرم انسانی در بیماران پی برد.

References

1. Beckstead JH. alkaline phosphatase histochemistry in human germ cell neoplasms . AM J surg pathol . 1983;7(4):341-9
2. Bur GE, Herting At, Faco G, Mckay DG, Adams Ec.Histochemical aspect of hydatidiform mole and choriocarcinoma .obsted Gynecol. 1962 ; 19: 156-181.
3. Aberomand M, Bhide SV. Purification and Characterization of alpha mannosidase from Chickpea seeds.Arch Mol Biol. 2007; 7: 32- 40 .

4. Unakami S, Hirata M, Ichinohe K, Tanimoto Y, Iizuka H. Separation and quantification of serum alkaline phosphatase isozymes in the rat by affinity electrophoresis. Jikken Dobutsu. 1989;38(1):85-8.
5. Terao M, Studer M, Gianni M, Garattini E. Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene. Biochem J. 1990;268(3):641-8.
6. Ohta H. Evaluation of therapeutic intervention on bone mass and turnover through monitoring of biochemical markers of bone turnover. Nippon Rinsho. 2006;64(9):1663-9.
7. Nakayama M, Gorai I, Minaguchi H, Rosenquist C, Qvist P. Purification and characterization of bone-specific alkaline phosphatase from a human osteosarcoma cell line. Calcif Tissue Int. 1998;62(1):67-73.
8. Calam RR, Henry RL, Murano G, Grignol G., Isolation and characterization of canine spleen alkaline phosphatase. Anal Biochem. 1976;71(2):426-35.
9. Glew RH, Heath EC. Studies on the extracellular alkaline phosphatase of Micrococcus sodonensis I Isolation and characterization. J Biol Chem. 1971;246(6):1556-65.
10. Sharma NC, Sahi SV. Characterization of phosphate accumulation in Lolium multiflorum for remediation of phosphorus-enriched soils. Environ Sci Technol. 2005;39(14):5475-80.
11. Culp LA, Lin WC, Kleinman NR, Campero NM, Miller CJ. Tumor progression, micrometastasis, and genetic instability tracked with histochemical marker genes. Prog Histochem Cytochem. 1998;33(3-4): 329-48.
12. Tejera Garcia NA, Olivera M, Iribarne C, Lluch C. Partial purification and characterization of a non-specific phosphatase in leaves and root nodules of Phaseolus vulgaris. Plant Physiol Biochem. 2004 ; 42 (7-8): 585-91.
13. Aberomand M, Soltanzadeh M. Purification and Characterization of Psedocholinesterase from sheep Liver. Arch Mol Biol .2006 ; 6: 253-256.
14. Kusudo T, Sakaki T, Inouye K. Purification and characterization of purple phosphatase PAP1 from dry powder of sweet potato. Biosci Biotechnol Biochem.2003; 67(7):1609-11.

۱۵ – آبرومند محمد،فرزامی بیژن . خالص سازی و تعیین خصوصیات آنزیم آلکالین فسفاتاز از جفت انسان. مجله علمی پژوهشی دانشکده علوم پزشکی سبزوار. ۱۳۸۰: سال ۸، شماره ۲۲۱، صفحات ۳۹-۳۲.

16. Yenigun B, Guvenilir Y. Partial purification and kinetic characterization of phosphatase from garlic seedling. Appl Biochem Biotechnol. 2003; 108: 677-87.
17. Demir Y, Yildirim S, Alayli A, Demir N. Characterization and purification of phosphatase from ancient human bone. Prep Biochem Biotechnol. 2003; 33(4):311-20.
18. Lowry O H , Rosebrough N J , Farr A L, Randall R J. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. J Biol Chem. 1951; 193: 265-356.
19. Sawhney S Y, Bhide SV. Immobilized Mucin: an affinity matrix for the isolation of winged bean acidic and basic lectins. J. Chromtogr. 1990; 503: 2272-2765.
20. Dubois M , Gilles K A , Hamilton J K , Rebers P A, Smith F.Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 1956; 28: 350-356.
21. Olczak M, Watorek W, Morawiecka B. Purification and characterization of phosphatase from yellow lupin (Lupinus luteus) seeds, Biochim Biophys Acta. 1997 ;1341(1):14-25.
22. ORNSTEIN L. Disc electrophoresis Background and theory Ann N Y Acad Sci. 1964;121:321-49
23. Reisfeld A A, Sewis U J, Williams DE. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. Nature.1962; 195:281-283.
24. Williams D E, Reisfeld R A. Disc electrophoresis in polyacryamide gel electrophoresis gels: Extension to new conditions of pH and buffer.Ann N Y Acad Sci. 1964;121:373-81

۲۵ - آبرومند محمد,نابیده شابها . خالص سازی ایزوآنزیم جدید از آلفا مانوزیداز سرم انسانی . مجله علمی پژوهشی دانشکده علوم پزشکی سبزوار، ۱۳۸۵: سال ۱۳، شماره ٤١، صفحات۱۱۵-۱۰۸.

26. Ahmed Z, King EJ. Kinetics of Human Placental alkaline Phosphatase. Clin Chim Acta. 1960; 45: 581-592.
27. Gottlieb AJ, Sussman HH. Human Placental alkaline Phosphatase Molecular wraith and Subunit structure. Biochim Biophys Acta. 1968 ;160(2):167-71.