

琼脂糖等电聚焦法快速测定碱性磷酸酶同工酶

王 玻 邓 君 杨振华



摘要 本研究的目的是建立高灵敏度分离碱性磷酸酶同工酶的方法,具体采用琼脂糖等电聚焦法分离其同工酶,电泳前先用神经氨酸苷酶对几种组织提取液和病人血清进行处理。该法可将肝、骨、小肠以及胎盘同工酶分离出多条区带,具有操作简单、灵敏度和分辨率高、重复性好的优点。

关键词 碱性磷酸酶同工酶 琼脂糖等电聚焦 神经氨酸苷酶

Rapid determination of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose isoelectric focusing

Wang Bo, Deng Jun and Yang Zhenhua

Laboratory, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Abstract The objective of our study was to develop a high resolving power method to detect alkaline phosphatase isoenzymes. Isoelectric focusing for separating alkaline phosphatase isoenzymes was established. Treated by neuraminidase, alkaline phosphatase isoenzymes both in several kinds of human tissues and patient serum can be separated into several bands simultaneously. The method demonstrated high resolving power, high sensitivity and good reproducibility.

Key words Alkaline phosphatase isoenzymes Agarose isoelectric focusing Neuraminidase

碱性磷酸酶(ALP)广泛存在于人体各种组织器官中,如肝脏、骨、小肠、胎盘、肾、肺等,它们至少来源于四种不同的基因位点,自从报道存在 ALP 以来,此酶一直用于诊断肝、骨的疾病。

目前已有多种不同的方法分离 ALP 同工酶,如醋酸纤维薄膜电泳法^[1]、琼脂糖电泳法^[2]、聚丙烯酰胺电泳法^[3]、聚丙烯酰胺等电聚焦(IEF)法^[4]以及免疫学法^[5]等,但这些方法要么无法很好分离肝和骨同工酶;要么灵敏度和重复性较差,从而使得应用受到限制。本研究的目的是建立一种高灵敏度、高分辨率分离各种 ALP 同工酶并定量测定的方法。

1 材料和方法

1.1 仪器

等电聚焦(IEF)采用 LKB-2117 多用途电泳仪,扫描使用日本常光公司的 Micon-20 光密度扫描仪。

1.2 试剂

40%两性电介质(pH3.0~9.5)由军事医学科学院生产,琼脂糖为 Pharmacia 公司生产,甘油为北京市燕京制药厂生产,山梨醇由浙江永嘉精细化工厂生产, α -萘磷酸钠为 Rothe 公司生产,固兰 B 盐为 Fluka 公司生产,神经氨酸苷酶为 Sigma 公司生产,蛋白标准品为 Pharmacia 公司生产。

作者单位:100730、北京医院检验科

作者简介:王玻,男,1985年毕业于苏州医学院,1991年获协和医科大学医学硕士学位,现为北京医院检验科助理研究员。曾获卫生部和北京市科技成果三等奖各一项,发表论文20余篇,现为国家自然科学基金某课题负责人

1.3 试剂配制

阳极电极溶液:0.2 mol/L 柠檬酸钠溶液;
阴极:0.5 mol/L 乙醇胺溶液。

基质液:a-萘磷酸钠 30 mg 溶于 10 ml
10.5%二乙醇胺,加入 2%硫酸镁溶液 200 ul。

呈色剂:固兰 B 盐 5mg 溶于 pH4.7 的乙
酸缓冲液 1ml 中。

神经氨酸苷酶处理标本:溶解一瓶神经氨
酸苷酶(10 U/瓶,TypeV)于 1 ml 磷酸氢二钠/
柠檬酸缓冲液(259 mmol/L, pH4.0)中。每
40ul 样本加 10ul 神经氨酸苷酶溶液,37℃水浴
15 分钟,此溶液在 25℃时为 pH5.8~6.0。

1.4 组织提取和酶的测定

人体组织来源于一例心肌梗塞死亡病人的
尸解,其肝脏功能、肾脏功能均正常,胎盘组织
来源于正常分娩的人体胎盘。

1.4.1 骨组织的提取:将所取骨组织在低温下
完全粉碎,每克骨组织加 4 ml Tris 缓冲液
(pH7.4, 10 mmol/L),用组织捣碎机在低温搅
拌后加入等体积的正丁醇,在室温下轻轻振荡
两小时后离心(4℃, 13 000 g, 30 分钟),将有机
相再次离心(4℃, 60 000g, 30 分钟),取上清
液,置-20℃低温保存。

1.4.2 肝脏、小肠和胎盘组织的提取:将组织
剪成小碎块,每克组织加 4 ml Tris 缓冲液
(pH7.4, 10 mmol/L),用组织捣碎机在低温下
粉碎,其它步骤同骨组织的提取。

1.4.3 总 ALP 活性测定:采用酶动力学方法,
试剂为中生公司生产的 ALP 临床诊断试剂,反
应温度 37℃,用日立 7150 全自动生化分析仪
测定(正常值范围 20~100 U/L)。

1.5 实验方法

制胶:模具准备:取玻璃板两块(11 cm×13
cm),将 0.5 mm 厚的橡胶隔片放在两块玻璃
板之间,用夹子将两块玻璃板夹紧。

胶液配制:取琼脂糖 0.1 g,硫酸锌
0.008g,加去离子水 5 ml,煮沸 15 分钟,加
50%甘油 5 ml 混合,待温度降至 70℃左右时,
加两性电解质 0.8 ml。

灌胶:将胶液注入模具的两块玻璃板之间,
15 分钟后移去上方玻璃板,将胶板置于 4℃保
存待用。

神经氨酸苷酶处理样本:每 40 ul 样本加
神经氨酸苷酶 10 ul,37℃水浴 15 分钟。

等电聚焦:将胶板置于电泳槽的冷却板上,
阴极和阳极电极条分别用相应的电极液润湿,
放在相应的位置上,加样滤纸位置离阴极端
2.5 cm 处,加样前预电泳 15 分钟,其上限电压
2000V,上限电流 50 mA,功率 5W。等电聚焦条
件:上限电压 700V,上限电流 50mA,功率
15W,6℃,80 分钟;聚焦 20 分钟时,去掉加样
滤纸。

呈色与扫描:IEF 结束后,在胶面均匀涂布
1.5 ml 基质液,放 45℃温箱温育 25 分钟后,用
流水冲去多余的基质液,加入 0.5 ml 新配制的
呈色液,待区带呈现清楚后,用光密度计扫描,
滤光片 570 nm,狭缝 1 mm,光密度计自动打印
图谱,并给出每一峰的百分比。

等电点的测定:在对组织提取液进行 IEF
时,同时对蛋白标准品进行测定,聚焦结束后将
带有蛋白标准液的凝胶片切割下来,进行考马
斯亮蓝染色,将其与同时进行 IEF 的 ALP 同
工酶区带进行比较,得出各区带的等电点。

2 结果

2.1 灵敏度和准确性

将一例骨转移癌患者血清(总酶活性 550
U/L,热失活法测骨 ALP 同工酶所占比例为
60%)神经氨酸苷酶处理后用本法在同一块
板上进行 IEF,结果见表 1。

表 1 ALP 同工酶神经氨酸酶处理后进行
IEF 的线性范围

活 性 (U/L)	区 带					
	1	2	3	4	5	6
550	4.3	7.2	10.3	19.7	22.5	36.0
275	4.5	7.1	9.9	20.1	21.5	36.9
138	4.7	7.4	10.2	19.9	22.3	35.5
$M \pm s$	4.5± 0.2	7.2± 0.2	10.1± 0.2	20.7± 1.4	22.1± 0.5	36.1± 0.7
CV(%)	4.4	2.7	2.0	6.8	2.3	1.9

2.2 精密度

将上面标本进行精密度测定,每块板加 7 个样本,并在相同的条件下进行 3 块板的测定,所测批内和批间的变异系数均小于 10%,表明本法具有良好的精密度。

2.3 神经氨酸苷酶的处理

样本经神经氨酸苷酶处理前后进行 IEF 的区带数目及等电点存在差异:肝和骨 ALP 易受神经氨酸苷酶的作用,小肠同工酶不受神经氨酸苷酶的作用,胎盘同工酶受其作用较小,结果见表 2。

表 2 几种组织提取液和病人血清的等电点的测定(pH3~9.5)

神经氨酸苷酶处理前							
LAP	BAP	FAP	IAP	病人 1	病人 2	病人 3	病人 4
4.4—4.8	6.2—6.7	4.8	5.2	4.4—5.2	4.8—5.4	4.5—4.8	4.4—4.8
5.4		5.7	6.4				5.9
		6.6	6.8				6.6
		7.4	7.4				6.9
			7.6				
神经氨酸苷酶处理后							
5.8		5.4	5.1	5.8	6.6	5.8	5.8
6.1	7.0—7.4	6.1	6.5	6.5	6.8	6.3	6.5
6.6		7.0	6.8	6.7	7.0	6.6	6.7
6.9		7.6	7.4	7.0	7.6		7.0
			7.6	7.4			
				7.6			

注: LAP 组织肝 ALP 同工酶; BAP 组织骨 ALP 同工酶; FAP 组织胎盘 ALP 同工酶; IAP 组织小肠 ALP 同工酶; 病人 1 为骨转移癌患者; 病人 2 为毛细管支气管患者; 病人 3 为梗阻性黄疸、胰头癌患者; 病人 4 为肾癌患者。

2.4 正常值

对 40 例正常人(年龄范围: 20~61 岁, 39 ± 10 岁)血清样本进行测定, 经神经氨酸苷酶处理前为一条压缩良好的肝带和一条弥散的骨带; 处理后为两条向阳极泳动速度减慢的、压缩良好的两条区带, 结果见表 3。

表 3 40 例正常人 ALP 总活性及同工酶结果($M \pm s$)

例数	总 ALP 活性(U/L)	ALP 同工酶(%)	
		LAP	BAP
男: 20	70.9 ± 17.3	79.5 ± 1.3	20.5 ± 1.3
女: 20	76.3 ± 12.4	76.9 ± 1.8	23.1 ± 1.6
合计 40	73.6 ± 1.5	80.6 ± 1.6	19.4 ± 1.6

3 讨论

薄层聚丙烯酰胺凝胶 IEF 法对于 ALP 同工酶的分析具有较琼脂糖电泳等其他方法更高

的灵敏度和分辨率, 能够将 ALP 同工酶分离出更多的区带, 但它的操作较为复杂, 而以琼脂糖作为支持物进行 IEF, 具有以下优点: (1) 制胶和电泳的时间较短且操作简单; (2) 易于染色、吹干和保存; (3) 具有与聚丙烯酰胺 IEF 相似的高灵敏度。目前国外亦有报导用 IEF 分离 ALP 同工酶, 但其实验结果不理想, 有的产生了区带扩散导致分辨率下降^[6], 有的虽可分离出 10~20 条区带^[7], 但其结果不能被肯定或重复。

我们所建立的经过改进的琼脂糖 IEF 法, 在琼脂糖中加入了一定浓度的甘油和少量的锌离子, 使方法的灵敏度、重复性和分辨率均得以提高, 并消除了因 pH 梯度不稳定所导致的区带不规则和出现“假区带”, 这也是本实验的独特之处。加入一定量的甘油使分离效果明显改善的原因在于甘油是小分子物质, 进入琼脂糖

凝胶后,添塞了琼脂糖分子之间的空隙,增加了胶的硬度,防止了区带扩散,而且甘油不会抑制ALP的活性,不和两性电解质结合,对pH梯度也无影响。另外,我们还发现,甘油浓度在一定的范围内,可使制胶后凝胶收缩现象减少,且更易保存胶片。为了证实锌离子的作用,我们制备一块加锌离子和一块不加锌离子的凝胶板,在相同的条件下进行电泳,发现不加锌离子胶板所得区带的颜色比加了锌离子的浅,而且有的低活性区带甚至消失,说明锌离子在IEF分离ALP同工酶中起着重要的作用,它可避免酶的失活。

Stinson等^[7]报道肝脏、骨、小肠、胎盘组织中都仅存在一条ALP同工酶区带,经神经氨酸苷酶处理后仍不能区分区带是来源于肝还是骨;Henry^[6]等报道在四种组织提取液(肝、骨、小肠和胎盘)中ALP同工酶区带均为两条,经神经氨酸苷酶处理后,骨和胎盘ALP只是提高了等电点,但仍为扩散的区带;Elkhardt^[8]报道胎盘提取液仅存在一条区带($pI=4.6$);Lo等^[9]发现人类胎盘组织有两条区带($pI=4.23$ 和 4.24)。采用本法对经神经氨酸酶处理过的标本进行IEF,发现胎盘ALP有四条区带,小肠ALP有五条区带,肝ALP有四条区带,而骨ALP有一条区带。

从表2可以看到,组织提取液和病人血清标本的肝和骨ALP同工酶区带经神经氨酸苷酶处理前后的等电点具有一定差异,这是因为神经氨酸苷酶可切割ALP侧链的唾液酸残基,使分子所带负电荷减少,从而使区带向阳极泳动速度减慢;而小肠同工酶由于不含唾液酸残

基,故而经神经氨酸苷酶处理后区带位置无变化。

总之,本法对于分离ALP同工酶较以往的方法在分离效果、分辨率、重复性以及分离的区带数方面均有很大的改进,是进一步探讨ALP同工酶意义的较好方法。

参 考 文 献

- 1 Miura Matsuzaki, Sakigichi Sekine. Placental AP in an omental tumor. Clinica Chimica Acta, 1986, 83~88.
- 2 Peaston Cooper. Affinity electrophoresis of AP isoenzymes. Clin Chem, 1986, 32: 235~236.
- 3 Skillen DJ, Harrison H. Serum AKP of intestinal origin detection by acrylamide gel electrophoresis and l-p-bromotetramisole inhibition compared. Clin. Chem, 1980, 26(6): 786.
- 4 Rosendahl K, Waldenlind L, Oinica D. Microheterogeneity of serum alkaline phosphatase isoenzymes as revealed by isoelectric focusing. Clinica Chimica Acta, 1987, 168: 297~306.
- 5 Baltazar GJ, Shuva A, Julia J, et al. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase. Clin Chim, 1995, 41(11): 1560~1566.
- 6 Henry J, Cleeve W, Diane C. Isoelectric focusing of human tissue alkaline phosphatase isoenzymes in agarose gel. Clinica Chimica Acta, 1984, 137: 333~340.
- 7 Stinson RA, Seargeant LE. Comparative studies of pure alkaline phosphatase from five human tissues. Clinica Chimica Acta, 1981, 110: 261~272.
- 8 Elkhardt R. Purification of human placental alkaline phosphatase by isoelectric focusing. Clinical Chimica Acta, 1974, 50: 405~412.
- 9 Lo JS, Kellen JA. Demonstration of the subunit structure of human placental alkaline phosphatase by isoelectric focusing Enzyme, 1971, 12: 635~641.

欢迎订阅中国骨质疏松杂志