

ALKALEN FOSFATAZ

I. ALP enzim seperasyonu ve purifikasyonu

Dr. Hüseyin T. SESSİZ (x)

ÖZET

Alkalen fosfataz enzim kaynağı olarak dana ince barsakları kullanıldı. Yöntemlerde modifikasyonlar da uygulanmak suretiyle i-ALP enzim proteini separe edildi; separasyon boyunca enzim aktivitesi göstermeyen proteinler uzaklaştırılarak purifikasyon temin edildi.

Seperasyon ve purifikasyon için başlıca Morton yöntemi (1,2) değiştirilerek kullanıldı. i-ALP enzimi % 26 verimle 564 kat saflaştırıldı.

GİRİŞ VE AMAÇ

Alkalen fosfataz enzimi üzerinde çalışabilmek için herşeyden önce enzimin yeteri kadar mevcut olması gerekmektedir. Ayrıca kinetik çalışma da yapılmak istendiğinden enzimin oldukça saflaştırılmış olması zorunludur. Ticari olarak istenilen saflıkta enzimi bulmak zordur. Bu bakımdan enzimin bizzati araştırıcı tarafından elde edilmesi lazımdır.

Biz yavru dananın ince barsağını seçtik. İnsandaki gibi hemen aynı fonksiyonu gören bu enzim, mezbahada kesimde anne karnından çıkan yavru danaların ince barsaklarında bol bir kaynak olarak mevcuttu. Böylece yeteri enzim eldesi sağlanabildi.

YÖNTEMLER

Mezbahada kesimden hemen sonra dana ince barsakları toplandı. Mezenterik membranları uzaklaştırıldı. Sıfır derecenin altındaki soğuk şartlarda (Kışın bölgesel tabii şartlar dolayısıyla soğutma kaplarına çoğu kez ihtiyaç olmamıştır),

(x) : Atatürk Üniversitesi Tıp Fak. Biokimya Kürsüsü Doçenti.

laboratuvara getirildi. İnce barsakların mukozası orta boy mantar delicinin yuvarlak keski içeresinden geçirilerek sıyırmak suretiyle kolayca ayrıldı (modifikasyon) Mukozanın otolizine mani olmak yönünden ilk işlemler süratla gerçekleştirildi. (Orijinalde tüm barsaklar makasla kesiliyordu). Biz sadece mukozayı sıyıyarak gereksiz işlemleri attık. Mukoza dışında barsaklarda aktivite kalmadı.

KADEME 1: Suda Homojenizasyon

Mukoza, hacminin üç katı 0°C'ta suda dağıtıldı. 1N NaOH ilâvesiyle dikkatlice pH 7,5'a ayarlandı. Sıcaklık 0°C üstüne çıkmayacak şekilde homojenizatörde 45 000 devirde iki dakikada parçalandı. Buchner hunisinde iyice yıkanarak nötür hale getirilmiş süzgeçten süzülerek yağlar ve çözünmeyen agregatlar uzaklaştırıldı. Süzüntüler 0°C de toplandı. Çökeltide % 10'dan fazla ALP aktivitesi yoktu.

KADEME 2: Asidik Çöktürme

Soğuk süzöntü 2 M asetat tampon (pH 4) ilâvesiyle pH'5'e ayarlanarak tekrar 0°C de 45 (dakika) bekletildi. pH 5'te oluşan çökelti alındı, birinci hacmini 8/9'u kadar 0,15 M NaCl içeresinde dağıtıldı. Süspansiyon 0,5 M Na₂CO₃ ile pH 7,5'a ayarlandı. 0-2 C° de bir gece nazikçe manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. pH 5'de aynen çöktürüldü, çevrildi, çökelti alındı. Bu kademedeki üst sıvı berraktır. İçeresinde çözünür protein bulunmaz.

Çökelti ikinci defa aynı miktar, fakat bu kez su içinde dağıtılarak yıkandı. Bu yolla iyonik güçleri azaltılmış ve çözünür proteinin eser miktarı da temizlenmiş oluyor. Aynen çevrilerek çökelti alındı, ilk hacmin 5/9'u kadar suyu (0°C) dağıtıldı.

KADEME 3: (Modifiye) n-Butanol Ayırması

İlk hacmin 2/9'i kadar n-butanol, 15 dakika içeresinde devam lı pervaneli karıştırıcı ile karışmakta olan sudaki süspansiyona ilâve edildi. Hemen 1800 g'de 30 dakika çevrildi. Bu suretle enzim proteini n-butanol tabakasına geçmiş oluyor. Vacuette pompa ile bu üst tabaka emildi. Whatman No:1 süzgeç kağıdından (önceden Buchner hunisinde yıkanmış) süzüldü.

(Orijinal yöntemdeki 38°C de 5 dakikalık ısıtma işlemi kaldırılmıştır. Aktivite kaybına sebep oldu. Selektif ısı denatürasyonunu sonraki kademeye aldı). Süzöntü pH 8,5'a ayarlandı 0°C'ta bir gece bekletildi, yine süzüldü.

KADEME 4: Asetonla Çöktürme (Modifiye)

Süzöntü pH 6,4'e ayarlandı. -5°C'a soğutuldu. Enzim, -5°C'de sadece aseton ile süzöntünün % 60 hacmine kadar ilâve edilerek çöktürüldü. Bir gece -15° de beklettikten sonra üst sıvı emilerek atıldı. Enzim çökeltisi -7°C de çevrile-

rek (4000 g,20 dakika) elde edildi, -15 de önce susuz aseton ve sonra anestetik eterle yıkandı.

Desikatörde, H₂SO₄ üzerinde, buz dolabında daha sonraki saflaştırma kademeleri için ultrafiltre edilen nümune depolanıp saklanabilir. Yeterli miktar elde edildiğinde kurutma işlemine girilmeden saflaştırmaya devam edilebilir. (Orijinal yöntemdeki % 10 eter ilâvesi çöktürme işlemlerinden çıkarıldı. Sadece aseton ile çöktürüldü. Santrifugasyon için 4000 g denenerek uygun bulundu (yöntemde belirtilmemiş). Kurutma işlemi N₂ gazı akımı yerine ultrafiltre edilerek gerçekleştirildi (3).

KADEME 5: Amonyum Sülfat Ayrımı

% 60 (v/v) asetonunda toplanan çökelti 0,05 M veronal-HCl (pH 7,7) 50 ml. tamponda çözüldü. Bu çözelti 3000 g'de 20 dakika çevrildi. Çözünmeyen artıklar uzaklaştırıldı. (Çözme işlemi pH 6,4 yerine 7,7 tercih edildi).

Berrak üst sıvı katı (NH₄)₂SO₄ ile % 46 doyunluğa getirildi. 24 saat bekletilerek çökelti toplandı. Çökeltinin üst sıvıları toplanarak birleştirildi, daha ileri (NH₄)₂SO₄ ayırımına tabi tutuldu. Doygunlukları; % 46-60, % 60-70 % 70-80, % 90-100 olan (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonlarında ayırımı tabi tutuldu. Herbir çökelti için -5°C'de 3 saat beklendi. Bu çökelti redistile suda çözüldü ve bir gece suya karşı dializ edildi. % 70-80, % 80-90 doyunluktaki çökelti ayrı toplandı ve küçük miktar 0,05 M veronal -HCl (pH 7,7)'de çözüldü. Aktivite, en çok % 46-60, % 60-70, % 70-80 doyunluktaki çökelti de görüldü. Çökeltilerin aktif fraksiyonları birleştirilerek işleme devam edildi. Mevcut hacmin % 40'ı kadar aseton (-5°C) ilâve edildi. Üstte yüzen hafif çökelti atıldı. Aseton % 50 oluncaya kadar ilâveye devam edildi.

Bu % 50 aseton çökeltisi kademe 6'daki gibi tamponda çözüldü ve dializ edildi. (Saflaştırma işlemlerinin bu kademesinde Morton yönteminde bulunmayan bu ayırım ilâve edildi).

KADEME 6: Dializ

Kademe 5'te elde edilen enzim, minimum miktar 0,05 M veronal-HCl pH 7,7 lik tamponda çözüldü. Aynı pH'da 0,015 M magnezyum asetata karşı (4 saat, 4° de) dializ edildi. Mevcut hacmin % 35-48'i arasında aseton ilâvesiyle -5°C de enzim çöktürüldü. 0,05 M pH 7,7 veronal-HCl tamponunda çözümlenerek cam distile suya karşı 0°C de organik ve inorganik solventlerden arıncaya kadar (4-5 saat) dializ edildi. Dializ süresi aktivite kaybı olmayacak sürede ayarlandı. (Morton'da belirtilmemiş. Daha uzun süreler aktiviteyi azaltıyor).

KADEME 7: Selektif Isı Denatürasyonu

Dializat 0,05 N asetik asit ile pH 4,9'a ayarlandı. 48°C de iki dakika tutuldu. 0,5 magnezyum asetatın dializattaki magnezyum konsantrasyonu, 0,015 M o-

luncaya kadar katıldı. pH 6,4'e ayarlandı. Bundan sonraki safhada liyofilize edilerek, kolan kromatoğra filerine geçildi.

BULGULAR

Enzim proteininin, diğer proteinlerle birlikte daha küçük bir alana ayrılması için proteinlerin asidik çöktürülmesinden yararlanıldı. 2M asetat tampon (pH 4) ile enzim proteininin pH 5'de kontrollü bir şekilde denatüre edilmeden çöktürülmesi, proteinlerin bir elde toplanmasında ilk işlem olup, saflaştırma, protein fazlalığı nedeniyle azdır.

Dana ince barsağı-alkalen fosfataz enzim proteininin ayrılmasında esas işlem n-bütanol kademesinde yürütülür. Enzim proteini membrana bağlı bir enzim olduğu için n-bütanol, lipidprotein bağlarının çözülmesinde yardımcı olur. Enzim hemen hemen kantitatif olarak n-bütanol tabakasına geçer. Bu nedenle en fazla saflaştırma işlemine olanak sağlayan kademe budur. Saflaştırma oranı kaba ekstreye kıyasla 50 defa artmıştır.

Asetonla çöktürme, muhtelif % karışım miktarlarında ve çalışılan ortamdaki mevcut proteinler içerisinde enzim proteinini ayırmada diğer bir protein ayırımı olarak tatbik edildi.

Burada protein çökeleği soğukta elde edildi ve soğukta daha yüksek devirde çevrilerek yaklaşık bir öncesine kıyasla iki misli civarında daha saflaştı.

Morton saflaştırma işlemlerine, amonyum sülfatın çeşitli doyunluklarındaki ayırımı dahil edildi, spesifik aktivite artırıldı. Amonyum sülfattaki en aktif fraksiyonlar üzerinden yine soğukta bu kere biraz daha fazla asetonda çöktürme yapılabildi.

Dializ kademesinde proteinden küçük moleküller dializ torbalarından rahatlıkla ayrıldı ve bu arada Mg^{++} iyonları da aktivite kaybını önledi. Dializattan asetonda çöktürmesi ile ayrılan enzim selektif olarak pH 4,9 da (ki daha aşağılara düşmesine müsaade edilmeden) 48°C ısı denatürasyonuna iki dakika süreyle bırakıldı.

SONUÇ

Tablo I Dana İnce Barsak Alkalen Fosfatazının Saflaştırılmasına Ait Bulgular.

Kademe	V(ml)	Aktivite		Prot. mg/ml.	Sp Akt.		Verim %	Saflaşma Oranı
		İ.Ü./ml/dk	T.Ü		İ.Ü./mg	Prot		
1) Suda Homojenizasyon	1500	1,02	1530	18,00	0,056	100	1	
2) Asidik Çöktürme	575	2,04	1173	8,00	0,255	76,7	4,6	
3) n-Butanol Ayrımı	220	5,0	1100	1,76	2,840	71,8	50,7	
4) Asetonal Çöktürme	150	6,3	945	1,05	6,000	61,8	107,1	
5) Amonyum Sülfat Ayrımı	60	11,2	750	0,96	10,790	49,0	192,8	
6) Dializ	28	15,8	442	0,75	21,060	28,9	376,1	
7) Selektif Isı Denatürasyonu (48°C, 2 dakika)	20	22,1	398	0,70	31,590	26,0	564,2	

Açıklama: Sp. Akt. Spesifik aktivite

Prot. Protein

T.Ü. : Toplam aktivite ünite olarak

I.Ü: Uluslararası ünite, mikro M/ml/dk.

TARTIŞMA

Dana ince barsak-ALP'ı tayinlerimizde değişik Bessey-Lowry-Brock yöntemleriyle aktiviteyi İ.Ü./ml/dk. cinsinden kullanmamıza karşın bir kısım araştırmacılar kendi yöntemlerine özgü üniteleri kullanmışlardır. Karşılaştırma olanağı bakımından bu birimleri uluslararası aktivite birimi içerisinde hesaplamalardaki bilinen yöntemleri kullanarak (4,5) değerlendirmeye çalışacağız.

Morton'un n-butanol ayrımını kullanan King-Ahmed'de (6) bu saflaşma oranı bizim amonyum sülfat ayırımına tekabül eden kademedeki, 25,6 İ.Ü./mg. Prot. dir; bizde 10,79 İ.Ü./mg. Prot. dir. (Bunda ve diğer araştırmalardaki aktivite dönüşümleri, aktivite birimleri tarif edilen yöntemlerde yapılabilmektedir). King-Ahmed'e göre 1 Morton ünitesi = 57 King-Armstrong (K.A) ünitesine eşittir. Morton ve King-Armstrong spesifik aktivite birimlerini mg. azotu başına kendi üniteleri cinsinden hesaplamışlardır. Dializ kademesinde spesifik aktivite bizde 21,06 İ.Ü./mg. Prot. iken King'de 38,3 İ.Ü. mg. Prot. elde edilmiştir.

Morton'un orijinal yönteminde kendisinin eriştiği spesifik aktivite 32,5 İ.Ü./mg. Prot. lik bir aktiviteye eşleniktir. Bu spesifik aktivite bizde 31,59 değerindedir ve selektif ısı denatürasyonuna tekabül eder.

Behal daha ince barsağından 33,6 İ.Ü./mg. Prot. spesifik aktivitede enzim elde etti. Safılaştırılmaları bize göre düşüktür. Ancak çalışmalarında sadece değişik ALP tayin yöntemleri için maksimum aktivite karşılaştırılması yapıp herhangi bir kinetiğe girilmemiştir (7). Danimarkalı araştırmacılar kemik ve karaciğer ALP'ı çalışmalarını Reaction Rate Analyzer'de inhibisyon ve ısı denemeleri için serumdan

100 İ.Ü./L'lik spesifik aktivitede saf enzim elde ettiler. Saflaşma oranı verilmeyen bu çalışmadaki spesifik aktiviteleri bizim bulgularımızın çok çok altındadır (8).

Moss-1967 (9) saflaştırma yolunu vermedikleri insan dokularından karaciğer için 340 kat ince barsak için 135 kat, Eaton-Moss-1968 (10) kemik için 670 kat saflaştırma ile aktivasyon ve Km denemeleri yapmışlardır. Triptik dijesyon ile dokudan ALP enzimi ayıran Schales (11) böbrek ALP'ını 7,2 İ.Ü./gr. doku aktivitede % 39 verimle elde etti.

Dana ince barsak ALP izoenzimimizin saflığı ve saflaşma oranları, kinetik çalışmalar yapan muhtelif araştırmacıların değerleriyle çalışma yöntemlerine göre bir uyum göstermektedir.

Kinetik çalışmalara girmeyen araştırmacıların saflaştırmalarının çok üstünde saflaştırma yapılmıştır.

Saflaştırma işlemlerinde Hoag, plesental ALP için 130 kat, Lehmann-1975 karaciğer antiserumunu 41 İ.Ü./mg. Prot. spesifik aktivitede 188 kat saflıkta elde ettiler (12,13).

Elde ettiğimiz dana ince barsak ALP izoenzimimizin kinetik araştırmalarda kullanılabileceği, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında anlaşılmaktadır.

SUMMARY

I. The ALP Enzyme Separation and Purification

The small intestines from young calves are used as the source of alkaline phosphatase enzyme. Intestinal -ALP enzyme proteins have been separated by means of modified methods. The purification is obtained by eliminating all of the proteins which have no enzyme activity during separations.

For the methods of separations and purifications, the Morton's methods (1,2) are used by some modifications. i-ALP enzymes have been purified 564 times with a yield 26 per cent.

KAYNAKLAR

- 1- MORTON, R.K.: The Purification of Alkaline Phosphatases of Animal Tissues.: Excerpta Med. Biochem., 57: 595, 1974.
- 2- MORTON, R.K.: Separation and Purification of Enzymes. Associated with Insoluble Particles. Nature London. 166: 1092, 1095 1950.
- 3- EVERALL, P.H., WRIGHT G.H.: Pressure Ultra-Filtration of Protein Containing Fluids. The Journal of Medical Laboratory Technology. 15: 209, 1958.

- 4- GRADWOHL'S Clinical Laboratory Methods and Diagnosis; Vol 1,7 th Ed.,
Mosby St. Louis, Mo., 1970.
- 5- SEGEL, I.H.: Biochemical Calculations. John Wiley Inc. , Newyork, 1968.
- 6- AHMED, Z., KING, E.J.: Pufication of Placental Alkaline Phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta. 40: 320, 1960.
- 7- BEHAL, F.J., CENTER, M.: Heterogeneity of Calf Intestinal Alkaline
Phosphatase. Arch. Biochem., 110: 500-505 ,1965.
- 8- GERHARDT, W., NIELSON, L. , NIELSON, V., STATLAND, B.E.:
Routine Measurements of Liver and Bone Alkaline Phosphatase'in
Human Serum: Differential Inhibition by L- Phenylalanine and
Carbamide (Urea) on The LKB 8600 Reaciton Rate Analyzer.
Clinica Chimica Acta. 53: 281-290, 1974.
- 9- MOSS, D.W., EATON, R.H., SMITH, J.K. WHITBY, L.G.: Bichem. J.
53:102- 1967.
- 10- EATON, R.H.) MOSS., D.W.: Enzymology, 35: 31, 1968.
- 11- SCHALES, O., ARAI, K.: Preparation and Properties of Highly Purified
Alkaline Kidney Phosphatase., Achives of Biochem. and Biophysics.
83: 152-160, 1959.
- 12- HOAG, S., CHARM, S., RAAM, S.: Optimal conditions for isolating hu-
man placental alkaline phosphatase by immunosorption. Immunoc-
hemistry. 12: 833-837, 1975.
- 13- TASHWELL, H.F., JEFFERS, D.M.: Isoenzymes of serum alkaline phosph-
hatase in hepatobiliary and skaletal disaese. The American Journal
of Clinical Pathology. 40: 349-356, 1963.