

Trennung der Isoenzyme einer alkalischen Phosphatase aus Rindergalle

Von

M. Peterlik

Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 14. Mai 1965)

Es wird eine einfache Methode beschrieben, mit deren Hilfe es möglich ist, die in der Galle vorkommenden Isoenzyme der alkalischen Phosphatase ohne größeren Aktivitätsverlust weitgehend zu reinigen und zu trennen. Sie unterscheiden sich sowohl durch ihr Molekulargewicht als auch durch ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Sie erweisen sich nach Elektrophorese in Stärkegel als einheitlich.

A simple method is described which allows to separate and purify the isoenzymes of bile alkaline phosphatase to an high extent without major loss of activity. The isoenzymes differ in molecular weight and in electrophoretic mobility. Starch gel electrophoresis proves them free from impurities.

Zur Ausarbeitung einer zuverlässigen Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase (AP) in der Galle¹ war es notwendig, über eine Enzympräparation zu verfügen, welche die in der Galle vorkommende AP in möglichst reiner Form enthalten sollte. Bei deren Isolierung sollte dem Vorhandensein von Isoenzymen Rechnung getragen werden — einer Tatsache, auf die *Estborn*² hingewiesen hatte. Ihm war auch eine Teilung der menschlichen Galle in zwei Fraktionen gelungen, die beide Phosphatase-Aktivität aufwiesen³.

In der vorliegenden Arbeit soll nun eine Methode beschrieben werden, die es gestattet, die Isoenzyme der AP aus Rindergalle zu trennen und weitgehend zu reinigen.

¹ M. Peterlik, Z. klin. Chem., im Druck.

² B. Estborn, Nature [London] **184**, 1636 (1959).

³ B. Estborn, Z. klin. Chem. **2**, 53 (1964).

Material und Methoden

800 ml frischer Rindergalle, die auf $+ 2^{\circ}\text{C}$ abgekühlt worden waren, wurden in 4,0 l Methanol—Äther [(peroxidfrei), 2:3 (v/v)], die auf $- 20^{\circ}\text{C}$ gebracht worden waren, langsam eingerührt, wobei $- 5^{\circ}\text{C}$ nicht überschritten wurden. Nach 3stdg. Stehen bei $- 20^{\circ}\text{C}$ wurde die Fällung bei dieser Temp. abzentrifugiert und dann in 70 ml eines 0,05*m*-Glykokoll—NaOH-Puffers (pH = 10,5) aufgenommen. Die restlichen Mengen Methanol und Äther wurden im Vak. bei Zimmertemp. entfernt.

Nach $\frac{1}{2}$ stdg. kräftigen Schütteln wurde das Unlösliche abzentrifugiert und 3mal mit je 20 ml Pufferlösung in gleicher Weise extrahiert. Nach dem letzten Zentrifugieren wurden die 130 ml des vereinigten Überstandes, der die gesamte enzymatische Aktivität enthielt, bei $- 20^{\circ}\text{C}$ mit 300 ml 94proz. Äthanol versetzt. Die Fällung blieb 24 Stdn. bei dieser Temp. stehen und wurde nach dem Abzentrifugieren in 50 ml des Glykokoll—NaOH-Puffers aufgenommen.

Diese Lösung wurde 48 Stdn. bei 4°C gegen destill. Wasser dialysiert. Der pH-Wert fiel dadurch auf 6,0. Die bei diesem pH unlöslichen Proteine konnten leicht abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bei 37°C im Vak. auf rund 10 ml eingengt.

Eine weitere Reinigung erfolgte durch Gelfiltration: Eine Säule (3 \times 90 cm) wurde mit Sephadex G-200 gefüllt; als Elutionsmittel diente der erwähnte 0,05*m*-Glykokoll—NaOH-Puffer. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml aufgefangen. Je 0,05 ml derjenigen Fraktionen, die eine Absorption bei 280 $\mu\mu$ aufwiesen, wurden zur qualitativen Feststellung der enzymatischen Aktivität verwendet und in geeigneter Weise vereinigt (Abb. 1).

Die so erhaltenen Lösungen A und B wurden 48 Stdn. bei 4°C gegen destill. Wasser dialysiert und bei 37°C im Vak. auf je 10 ml eingengt.

B wurde mittels präparativer Papierelektrophorese weiter gereinigt. Verwendet wurde eine Apparatur nach *Graßmann* und *Hannig*⁴ (Elphor-Va-Gerät der Fa. Bender und Hobein, München). Als Laufmittel diente ein Glykokoll—NaOH-Puffer vom pH = 10,5 und einer Ionenstärke $\mu = 0,06$. Die Klemmenspannung betrug bei einem Stromdurchfluß von 10 mA 300 V. Als Trägermaterial diente Chromatographiepapier 2040 bm der Fa. Schleicher & Schüll. Die Auftragsgeschwindigkeit wurde mit 0,11 ml/Stde. gewählt. Nach Beendigung der Trennung wurde in den einzelnen Fraktionen die Absorption bei 280 $\mu\mu$ und die enzymatische Aktivität bestimmt (vgl. Abb. 2).

Die in geeigneter Weise vereinigten Fraktionen wurden, wie schon beschrieben, dialysiert und auf 20 ml eingengt.

Für die papierelektrophoretische Charakterisierung wurden je 20 μl der Enzymlösungen A und B auf einen Papierstreifen 31 \times 4 cm (Schleicher & Schüll, 2043 a Mgl) aufgebracht. Als Puffer wurde wieder Glykokoll—NaOH-Puffer (pH = 10,5, $\mu = 0,06$) verwendet, Klemmenspannung 220 V. Nach einer Laufzeit von 14 Stdn. wurde das Papier in 1 cm breite Streifen geschnitten und diese in 1,5 ml des 0,05*m*-NaOH—Glykokoll-Puffers, der 0,001 Mol Na-(*p*-Nitrophenyl)-phosphat/l enthielt, 8 Stdn. bei 37°C inkubiert, und die Extinktion des gebildeten *p*-Nitrophenols bei 400 $\mu\mu$ gemessen (Abb. 3).

Je 3,0 ml der Lösungen A und B wurden bei 37°C im Vak. auf rd. 0,1 ml eingengt und mittels Stärkegelelektrophorese (0,03*m*-Boratpuffer, pH = 8,5;

⁴ *W. Graßmann* und *K. Hannig*, *Z. physiol. Chem.* **292**, 32 (1953).

3 V/cm) auf ihre Einheitlichkeit überprüft. Nach einer Laufzeit von 20 Stdn. wurde mit Amidoschwarz 10 B gefärbt.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde in allen Fällen nach der Methode von *Bessey, Lowry* und *Brock*⁵ bestimmt. Die erforderlichen Reagen-

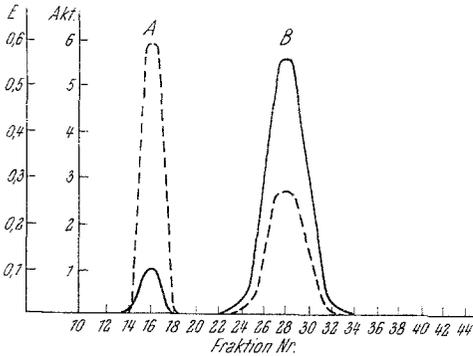


Abb. 1

Abb. 1. Elutionsdiagramm der Gelfiltration. Extinktion bei 280 mμ (—) und Aktivität der AP (---)

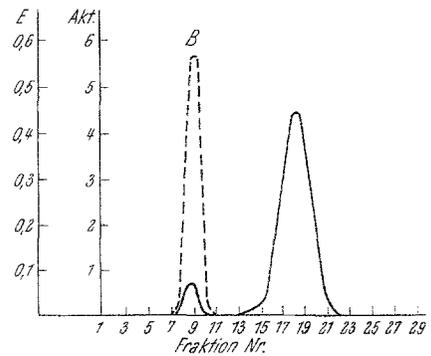


Abb. 2

Abb. 2. Aktivität der AP (---) und Extinktion bei 280 mμ nach präparativer Papierelektrophorese von B

tien wurden einer Biochemica Test-Combination der Fa. C. F. Boehringer & Soehne, Mannheim, entnommen.

Stickstoffbestimmungen wurden nach einer Mikromethode nach *Kjeldahl* durchgeführt.

Ergebnisse

Durch die Fällung mit den organischen Reagentien und die Änderung des pH-Wertes können die Isoenzyme der AP von den meisten in der Galle vorhandenen Proteinen abgetrennt werden. Eine Trennung der Isoenzyme erfolgt dann durch die Gelfiltration (Abb. 1), wobei sich die als erste eluierte Phosphatase (A) als stärkegelelektrophoretisch rein erweist. Durch präparative Papierelektrophorese kann auch das zweite Isoenzym (B) ohne größeren Aktivitätsverlust rein erhalten werden.

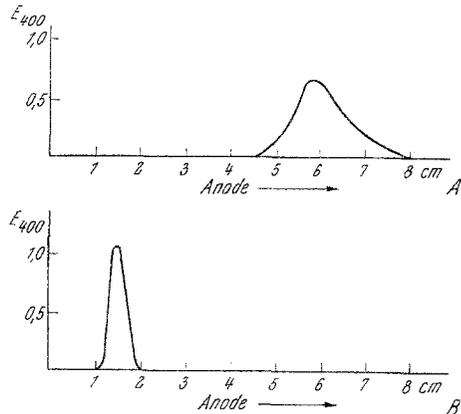


Abb. 3. Relative Verteilung der Aktivität der AP nach Papierelektrophorese

⁵ O. A. Bessey, H. O. Lowry und M. J. Brock, J. biol. Chem. 164, 321 (1946).

Die papierelektrophoretischen Untersuchungen zeigen, daß das Enzym A eine größere Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufweist als B (Abb. 3). Allerdings liegt A in einer sehr breiten Zone vor. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten, die mit der Elektrophorese in Stärkegel erhalten wurden. Nach dem Färben zeigt sich in beiden Fällen eine einzige, allerdings sehr schwach gefärbte Zone, die bei A wesentlich breiter als bei B ist.

Die Mikrostickstoffbestimmung ergab einen Wert von 0,90 mg N für A und 0,60 mg N für B. Da der Gesamtgehalt an Protein-Stickstoff in der verwendeten Rindergalle 3,0 g betrug, erfolgte somit eine Anreicherung von 1 : 3300 bzw. 1 : 5000.

Die spezif. Aktivität des Isoenzym A betrug 18 mMol-Einheiten/mg N, die des Isoenzym B 8 mMol-Einheiten/mg N. Vergleichende Messungen zeigten, daß bei allen angegebenen Reinigungsschritten kein größerer Aktivitätsverlust auftrat. Lediglich bei der präparativen Papierelektrophorese konnten wegen irreversibler Adsorption am Trägermaterial nur 80% der eingesetzten Aktivität wiedergewonnen werden.

Diskussion

In seiner ersten Arbeit hatte Estborn² auf das mögliche Vorhandensein eines dritten Isoenzym in der menschlichen Galle hingewiesen. Dies konnte im vorliegenden Fall für Rindergalle nicht bestätigt werden. Ob allerdings die beiden getrennten Isoenzyme wirklich schon in reiner Form vorliegen, könnte erst nach weiteren analytischen Untersuchungen (z. B. Ultrazentrifugierung) entschieden werden. Es muß zumindest damit gerechnet werden, daß eine Auftrennung des Enzyms A in weitere Isoenzyme möglich ist; ein Anzeichen dafür bietet die sowohl bei der Papier- als auch bei der Stärkegel-Elektrophorese auftretende breite Zone.

Ähnliche Resultate hatte auch Moss⁶ erhalten, der die Heterogenität der AP aus menschlichem Duodenum, und Dünndarm untersuchte. Auch hier zeigte sich bei Elektrophorese in Stärkegel, daß neben einer langsamer wandernden, sehr scharf begrenzten Zone noch eine oder zwei schneller wandernde diffuse Zonen auftraten. Eine weitere Auftrennung der entsprechenden Isoenzyme gelang in diesem Falle durch Chromatographie an DEAE-Cellulose.

Der C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Wien, habe ich für die Überlassung mehrerer Biochemica Test-Combinationen herzlich zu danken, sowie der Fa. Sanabo, Wien, für die freundliche Lieferung größerer Mengen Rindergalle.

⁶ D. W. Moss, Nature [London] **200**, 1206 (1963).