

文章编号: 1007-7847(1999)04-0321-05

影响血清中 GPI-PLD 活性检测的因素

龚 隽, 余明琨

(中国科学技术大学 研究生院生物学部, 中国北京 100039)

摘要: 采用在碱性条件下正 醇抽提的人胎盘膜上的碱性磷酸酶(ALP)作底物, 检测血清中糖基磷脂酰肌醇- 特异性的磷脂酶 D (GPI-PLD) 的活性水平. 这种 ALP 含疏水的 GPI 锚定膜结构(anchor), 与血清保温后能被其中的 GPI-PLD 降解成亲水的不含 GPI-锚定的 ALP. 采用 Triton X-114 二相分离法和梯度凝胶电泳法来分离含 GPI 的 ALP 和不含 GPI 的 ALP, 计算出转化率(%), 用来表示 GPI-PLD 酶活性. 对这两种方法进行比较后, 表明在一般实验室条件下, 二相分离法更为简便, 并对其影响因素进行了全面探讨.

关键词: 寡聚糖基磷脂酰肌醇专 一性的磷脂酶 D(GPI-PLD); 碱性磷酸酶(ALP); Triton X-114 分相法; 梯度凝胶电泳法

中图分类号: Q556; R34 文献标识码: A

Factors Affecting the Glycosylphosphatidylinositol-specific Phospholipase D Activity in Serum

GONG Jun, YU Ming-kun

(Department of Biology, Graduate School of Chinese University of Science and Technology, Beijing 100039, China)

Abstract: A reproducible substrate for the assay of phosphatidylinositol-specific phospholipase D (GPI-PLD) was prepared by extracting alkaline phosphatase (ALP) from human placental tissue with n-butanol under alkaline conditions. The ALP thus retained its hydrophobic glycan phosphatidylinositol (GPI) anchor. Incubation with serum ALP was hydrolyzed the GPI linkage by GPI-PLD action, producing a hydrophilic isoform. The degree of conversion of the two isoforms can be taken as a criterion for measuring GPI-PLD activity of the serum sample. The results of two methods - Triton X-114 phase partitioning system and gradient-gel electrophoresis were compared, giving corresponding and reproducible GPI-PLD activity in serum. However, the phase partitioning method is preferred for

* 收稿日期: 1999-06-28; 修回日期: 1999-09-01

基金项目: 中国科学技术大学研究生院院长基金

作者简介: 龚隽(1969-), 女, 四川人, 中国科学技术大学研究生院讲师, 硕士, 从事磷脂酶 D 的生化性质研究. Tel: 010-68226079, Fax: 010-68272833, E-mail: gongjun@cc5.gsbustc.ac.cn; 余明琨(1940-), 女(回族), 四川人, 中国科学技术大学研究生院副教授, 从事生物化学酶学研究.

routine analysis. Factors affecting the estimation are thoroughly discussed and the assay is reliable and sufficiently precise.

Key words: GPI-PLD; ALP; Triton X-114 phase partitioning; gradient-gel electrophoresis

80年代中期,糖基化磷脂酰肌醇(Glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定(Anchor)结构的膜蛋白已成为近年来生物膜研究中的热点. 目前已知大量的不同种类和来源的蛋白质分子是以这种特殊的形式锚定于细胞表面,包括补体衰败因子(DAF)、神经细胞粘附因子(N-CAM)、乙酰胆碱酯酶(AchE)以及碱性磷酸酶(ALP)等. 研究发现, GPI-锚定结构在真核生物体中具有重要的生物膜功能. 随着 GPI-锚定蛋白的发现,在哺乳动物及人的血清中鉴定出了一种广泛存在的高活性的 GPI 特异性磷脂酶 D(GPI-PLD)^[1,2]. 在体外条件下有去污剂存在时该酶能降解 GPI-锚定膜蛋白及蛋白多糖. 应用含疏水的 GPI-锚定膜蛋白或酶作底物,测定经 GPI-PLD 作用后疏水性底物到亲水性底物的转化率,可以用来表示 GPI-PLD 的酶活水平. 目前国际上所用的测活方法均基于此原理^[3-6],但不同的方法所得结果的可比性差,同样的方法重复性和稳定性也不理想,从而影响了对该酶活性水平的病理意义的深入研究. 本文对影响测定血清 GPI-PLD 活性的因素进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Triton X-114, 顺丁烯二酸, 对硝基苯磷酸酯(p-NPP), 乙基酚聚乙二醇醚(NP-40), 脱氧胆酸(DOC), 磷酸钠 α -萘酯, 丙烯酰胺, N, N'-亚甲双丙烯酰胺, 过硫酸铵, 乙二醇双乙胺醚-N, N'-四乙酸(EGTA) 是 Sigma 公司的产品; 速染兰 BB 盐购自 Schmid Gmgh+ CO; N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED) 购自 Koch-Light Laboratories Ltd.; 其它试剂均为国产分析纯试剂.

1.1.2 血液标本及胎盘 正常人血清取自中国人民解放军 307 医院血库及 402 医院生化室; 制备 ALP 的胎盘来自 402 医院正常分娩的健康产妇; 大鼠血清取自军事医学科学院动物场提供的健康成熟的雌性大白鼠(350 g).

1.2 方法

1.2.1 底物的制备 采用碱性条件(pH 8.0)正丁醇抽提^[7], 从匀浆的新鲜人胎盘细胞粗膜中得到疏水性的含 GPI-锚定 ALP.

1.2.2 Triton X-114 分相法 按文献[8]操作: 取以缓冲液 C(0.15 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L MgCl₂, 0.01 mmol/L Zn(Ac)₂, 10 mmol/L Tris-顺丁烯二酸, pH 7.0)稀释的血清 25 μ L, 加入 25 μ L 含有一定浓度的 NP-40(用缓冲液 C 配制)的 ALP 于 37 $^{\circ}$ C 保温 20 min, 然后加入 450 μ L 用缓冲液 C 配制的 0.5% Triton X-114 在 0 $^{\circ}$ C 终止反应. 混匀, 取出 100 μ L 用于测定具疏水基团和切去了疏水基团的 ALP 总活力(记为 At). 剩余部分于 37 $^{\circ}$ C 保温 3 min 后 12 000 r/min 离心分相, 疏水性 ALP 随 Triton X-114 凝聚于管底, 而水相在其上. 取水相(上相)100 μ L, 测定切去了疏水基团的 ALP 的活力(记为 A_s). 用缓冲液 C 代替血清样品在同样条件下操作作为对照. 将样品的 A_s/At 值减去对照值, 所得的百分率则是 GPI-锚定疏水基的降解率, 以此表示 GPI-PLD 的活性水平. 本文中每个样

品的测定值均为 3 个平行实验的均值。

1. 2. 3 梯度凝胶电泳 按文献[9]进行。取 40 μ L 样品, 分别含未加入血清未保温的 ALP、加入一定量血清并于 37 $^{\circ}$ C 保温 20 min 的 ALP 以及未加入血清于 37 $^{\circ}$ C 保温 20 min 的 ALP, 用 0. 25 mol/L Tris-硼酸盐缓冲液 C (pH 9. 0) 终止反应。再加入 1/4 V (40% 的蔗糖 + 0. 02% 溴酚蓝), 分别进行质量浓度为 25 ~ 250 g/L 的聚丙烯酰胺的梯度电泳(200 V 约 3 h, 0. 09 mol/L Tris, 0. 08 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 8. 4)。然后取胶, 在染色液(50 mg 磷酸钠 α -萘酯, 70 mg 速染兰 BB 盐溶于 100 mL Tris/硼酸盐液, pH 8. 4) 中染色 1 h, 离子水冲洗, 将胶复印, 用光密度计扫描测定。

1. 2. 4 ALP 的活性测定 以 100 mL 25 mol/L 的 P-NPP 作底物, 在 pH 10. 5 的 1 mol/L 二乙醇胺(DEA) 中于 37 $^{\circ}$ C 反应, 用 1 mol/L 的 NaOH 终止反应, 在 405 nm 测定对硝基酚的生成量, 计算活性。

2 结果和讨论

2. 1 GPI-PLD 的两种测定方法

采用含 GPI-锚定的碱性磷酸酶(GPI-ALP) 作底物, 分别用梯度凝胶电泳法和 Triton X-114 二相分离法测定了 10 例健康人血清 GPI-PLD 活性。用从疏水性底物到亲水性的转化率来表示 GPI-PLD 的活性。统计测定结果, 前者的 $\bar{x} \pm s$ (均数 \pm 标准差) 为 $33. 1 \pm 4. 6$, 后者为 $37. 5 \pm 10. 6$ 。对这两组数据进行 t 检验, 结果 $S\bar{a} = 5. 78$, $t = 0. 76 (< t_{0. 05} = 2. 26)$ (图 1)。用两种方法测定同一人的不同血清量降解 ALP 的活性图谱, $\bar{x} \pm s$ 分别为 $23. 83 \pm 10. 7$, $33. 8 \pm 12. 2$, $S\bar{a} = 6. 88$, $t = 1. 45 (< t_{0. 05} = 2. 26)$ (图 2)。以上结果说明, 依赖于分子大小的梯度胶电泳分离法与依赖于疏水性质的分相分离法的测定结果之间无显著差异, 是

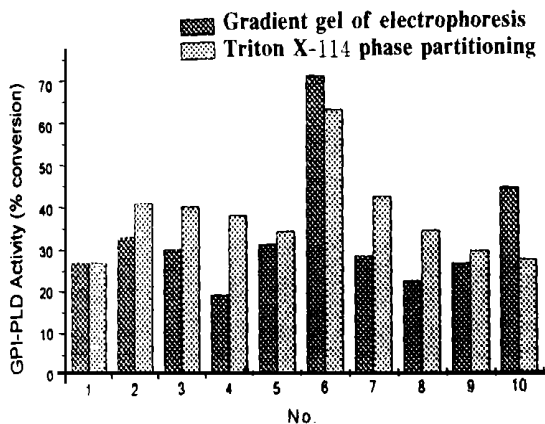


图 1 梯度凝胶电泳与 Triton X-114 二相分离法测定 10 例健康人血清酶活图谱

Fig. 1 The comparison of two methods of measuring the serum GPI-PLD activity in 10 healthy subjects

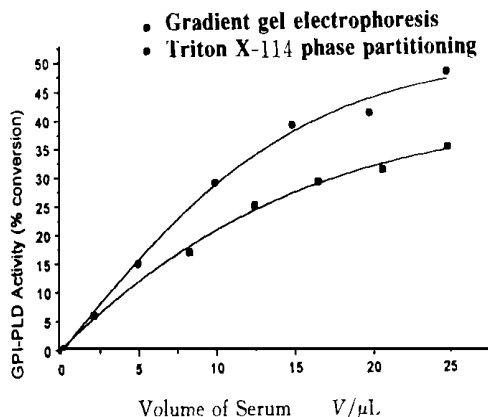


图 2 梯度凝胶电泳与 Triton X-114 二相分离法测定不同剂量的血清降解一定量 ALP 的活性图谱

Fig. 2 Effect of one serum sample with different volumes on the conversion of ALP observed by gradient gel electrophoresis and Triton X-114 phase partitioning system

一致的. 我们认为在一般实验室条件下, 采用二相法, 其消耗的试剂比较便宜, 且仅需常规仪器, 易于在国内推广.

2.2 影响二相分离法的因素

2.2.1 胎盘 ALP 提取的纯度 采用碱性条件正丁醇抽提可使绝大部分杂蛋白被清除^[10], 梯度胶电泳显示, 制备的 ALP 中不含锚定膜蛋白的比例也低于 5%, 从而 GPI-PLD 的活性不会受到其它杂质的干扰. 浓的 ALP 酶液 4℃ 保存, 其活性及疏水的 GPI-锚定膜蛋白可稳定存放 30 d 以上.

2.2.2 酶与底物反应的时间曲线 我们分别用人及大白鼠血清作酶与底物反应的保温时间曲线 (图 3). 当血清在 37℃ 保温时, ALP 的锚定膜蛋白降解率在 0~25 min 范围内与时间呈线形关系.

2.2.3 血清剂量与酶活性的关系 由图 4 可见, 无论是人还是大白鼠, 锚定膜蛋白的降解率均随着血清量增加而增加. 血清量在 35 μL 以下时, 曲线基本呈线形关系.

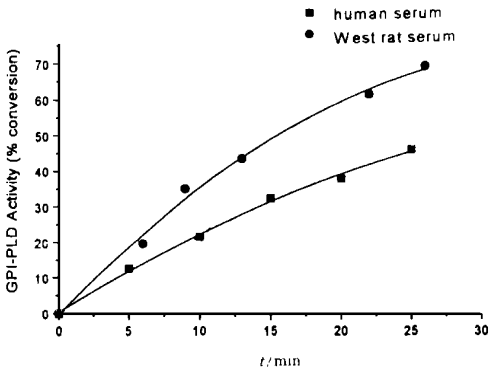


图 3 不同的温育时间对人和大鼠血清酶活的影响

Fig. 3 Conversion of the hydrophobic ALP to the hydrophilic isoform following incubation with human serum and West rat serum at 37℃ for different periods of time

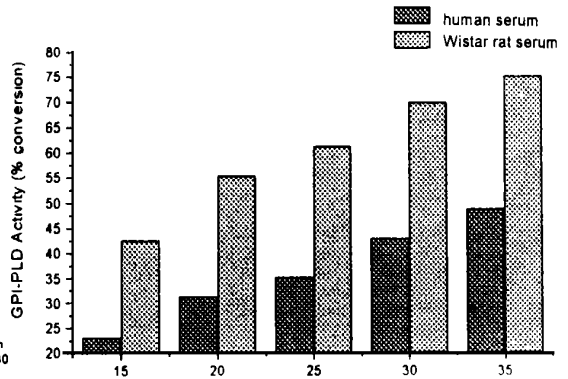


图 4 不同剂量的人和大鼠血清降解 ALP 的活性比较

Fig. 4 Effect of human and Wistar rat sera (200× and 100×) with different volumes on the conversion of the hydrophobic ALP to the hydrophilic isoform following incubation at 37℃ for 20 min

2.2.4 去污剂浓度 由于底物的疏水性质, 去污剂的存在对酶活性的测定是至关重要的. 我们分别用了不同的非离子型去污剂 (Triton X-100, NP-40) 和两性去污剂 (SB-14), 测定了不同去污剂浓度对酶活力的影响, 发现这几种去污剂对活性的影响具有相同规律. 我们用 0%~0.92% 终浓度的 NP-40 (ALP 与血清混合后) 测定发现: NP-40 浓度为零时, GPI-PLD 几乎无活性; NP-40 为 0.02% 时活性为 67%. 随着 NP-40 浓度的增高, 活性达最高值. 当 NP-40 浓度继续增高, 则活性受抑制 (图 5). 因此选择不同的去污剂浓度是造成测定结果差别的主要原因. 我们通过稀释底物时选择一定的 NP-40 浓度 (0.08%), 使 GPI-PLD 活性检测的重复性好, 而不会在含较多其它成分 (如脂蛋白) 时出现极低的活性.

2.2.5 分相系统中的去污剂浓度 用于测活的分相系统是一种非离子型去污剂 Triton X-114 的缓冲液系统, 故 Triton X-114 的浓度是否会象 NP-40 一样或同 NP-40 一起影响 GPI-PLD 活性的测定是一个值得考虑的因素. 我们的实验发现, 0.5%~1.0% 的 Triton

X-114 均可用于分相而不影响测活, 并且也很适宜. 因为浓度太稀会使分相不完全, 太浓又不便于分相. 我们一般采用 0.5% 的 Triton X-114 就能够完全分相. 另外, 我们分别对不加 NP-40 和加入 2% NP-40 的 ALP 进行了分相处理, 两组结果几乎没有差别. 说明在一个系统中这两种去污剂是互不干扰的, 不会影响活力测定的准确性.

2.2.6 反应温度 据文献报道^[6], 酶与底物若在 0 下进行保温反应, 92% 的底物仍保持含锚定膜蛋白的状态; 在 37 时, 锚定膜蛋白

降解率达 62%. 故可以用冰水来终止反应, 并且底物短时间保存在 4 也是适宜的.

2.2.7 血清的保存 不同的存储时间和温度对血清中 GPI-PLD 活性有影响. -20 保存的血清即使在两周后仍然保持活性, 而室温下和 4 下短期的保存(24 ~ 48 h)并不影响酶活, 但长时间保存后酶活性明显下降.

目前 GPI-PLD 的检测方法不断发展, 但依据的原理都是利用水解时底物和产物之间物理性质的差异. 在现有的报道中, 由于测定条件尚不统一, 影响到测定值的可比性, 也影响到对 GPI-PLD 功能的研究. 我们通过对影响血清 GPI-PLD 活性检测的因素进行分析, 旨在寻求一个稳定、可靠、简便的测活系统, 从而能对 GPI-PLD 进行全面、深入的研究, 并期望应用于临床.

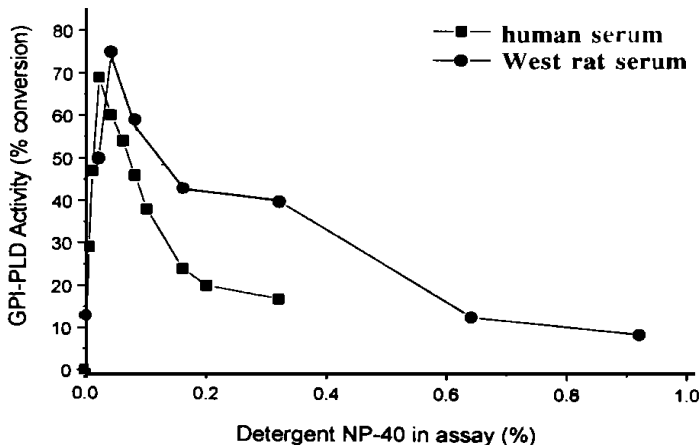


图 5 不同浓度的 NP-40 对人大鼠血清 GPI-PLD 活性的影响

Fig 5 GPI-PLD activity as a function of NP-40 in the assay. The substrate, ALP, in a buffer with 2% NP-40, was diluted by 1:12.5 in a solution containing increasing amounts of NP-40 following incubation with human serum (200x) and West rat serum (100x)

参考文献:

[1] DAVITZ A, HERELD D, SHAK S, et al. A glycan phosphatidylinositol-specific phospholipase D in human serum [J]. Science, 1987, 238: 81-84.

[2] LOW M G, PRASAD A R S. A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 980-984.

[3] LOW M G, HUANG K S. Factors affecting the ability of GPI-specific PLD to degrade the membrane anchors of cell surface proteins [J]. Biochem J, 1991, 279: 483-493.

[4] HUANG K S, LI S, LOW M G. Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D [J]. Methods in Enzymology, 1991, 197: 567-574.

(下转第 331 页)

Biochem, 1971, 20: 89-102.

- [7] UTANS U, ARCECI R J, YAMASHITA Y, *et al.* Cloning and characterization of inflammatory factor-I: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection[J]. J Clin Invest, 1995, 95(6): 2954-2962.
- [8] HEIZMANN C W, HUNZIKER W. Intracellular calcium-binding proteins, more sites than insights [J]. Trends in Biochem Sci, 1991, 16(3): 98-103.
- [9] GOEDDEL D V, Gene Expression Technology[M]. San Diego: Academic Press Limited, 1991.
- [10] SHAW G, KAMEM R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation[J]. Cell, 1986, 46: 659.
- [11] FROMHERZ S, SZENT-GYORGYI A D. Role of essential light chain EF hand domain in calcium binding and regulation of scallop myosin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(17): 7652-7656.

(上接第 325 页)

- [5] RAYMOND F D, MOSS D W, FISHER D. Phase partitioning detects differences between phospholipase-released form of alkaline phosphatase—a GPI-linked protein [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1156: 117-122.
- [6] RAYMOND F D, FORTUNATO G, MOSS D W. A method for the assay of phosphatidylinositol-specific phospholipase D activity in serum [J]. Clinica Chimica Acta, 1993, 215: 139-152.
- [7] MALIK A S, LOW M G. Conversion of human placental alkaline phosphatase from a high Mr form to a low Mr form during butanol extraction [J]. Biochem J, 1986, 240: 519-527.
- [8] 余明琨, 龚隼, 高玲, 等. 人血清中糖基磷脂酰肌醇-特异性的磷脂酶 D 活性的测定 [J]. 基础医学与临床, 1996, 16(6): 458-462.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第 2 版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 106-111.
- [10] 唐建华, Stevens V L. 人胎盘碱性磷酸酶的纯化及其抗血清的制备 [J]. 生命科学研究, 1998, 2(2): 98-102.