

猪肺血管紧张素转化酶的提取纯化及其性质研究

吴琼英, 马海乐, 崔恒林, 吴守一
(江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013)

摘 要: 新鲜猪肺均浆离心后, 经 35%~55% 饱和度的硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-100 凝胶柱层析、DEAE Sephadex A-50 阴离子交换后, 得到经 SDS-PAGE 显示为一条带的 ACE 纯品。200g 猪肺可制备出 ACE 347.09U, 比活力 29.029U/mg, 活力回收 12.53%。用双倒数作图法得出 ACE 的酶反应动力学常数 K_m 为 3.168mmol/L, V_{max} 为 6.165nmol/min。两个月的保藏后, 试验证明所提酶活力保持稳定。

关键词: 猪肺; 血管紧张素转化酶; 凝胶过滤; 阴离子交换

Study on Extraction and Characteristics of Angiotensin Converting Enzyme-ACE of Fresh Hog Lung

WU Qiong-ying, MA Hai-le, CUI Heng-lin, WU Shou-yi
(College of Biology and Environment Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The fresh hog lung was homogenated and centrifugated with 35%~55% saturation ammonium sulfate fraction. Then by using of Sephadex G-100 gel filtration and DEAE Sephadex A-50 anion exchange chromatogram column, pure ACE (Angiotensin I-Converting Enzyme) showed as a single band by SDS-PAGE test and gave an apparent molecular weight about 185kD. The result was 347.09U ACE was obtained from 200g hog lung tissue with specific activity 29.029U/mg and activity recovery 12.53%. Using Lineweaver-Burk method, the Michaelis-constant of hog lung ACE was 3.168mmol/L and V_{max} 6.165nmol/min. After two months conserving, the test proved that the activity of the ACE was kept steady.

Key words: hog lung; angiotensin converting enzyme; gel filtration; anion exchange

中图分类号 Q814.1

文献标识码 B

文章编号 1002-6630(2004)09-0071-04

血管紧张素转化酶(Angiotensin I-converting enzyme, ACE)主要参与肾素-血管紧张素-醛固酮系统的调节。ACE催化血管紧张素 I (angiotensin I) 转变为具强效升高血压作用的物质—血管紧张素 II (angiotensin II), 同时, ACE 将具降压作用的物质—舒缓激肽(bradykinin)降解, 使之失去降压作用^[1,2]。ACE 的这些性质在参与血压调节方面发挥重要作用。目前用于降压的药物, 原理上主要是抑制 ACE 的活性。面对高血压人群的不断增长, 越来越多的工作者致力于血管紧张素转化酶抑制剂(Angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)的开发研究, 而在此过程中实现抑制剂降压效果体外检测的重要途径就是测试其对 ACE 活性的抑制作用。因此, 对 ACE 的需求量也越来越大, 而从国外定购 ACE 价格十分昂贵。本文在总结前人工作的基础上,

希望寻找出一种更有效的制备 ACE 方法, 以满足降压药物—ACE 抑制剂开发研究工作的需要。

1 材料、试剂与设备

1.1 材料

猪肺(采自刚宰的猪); 透析袋(截留分子量 14000 ± 2000); Sephadex G-100, 进口分装; DEAE Sephadex A-50, 进口分装。

1.2 试剂

马尿酸-组氨酸-亮氨酸(N-Hippuryl-His-Leu tetrahydrate, 简称 HHL, Fluka 销售)、硼酸、硼砂、氯化钠、硫酸铵、丙稀酰胺、甲叉双丙稀酰胺、SDS、N,N,N',N'-四甲基乙二胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝 G₂₅₀、牛血清白蛋白、碳酸钠、硫酸铜、酒石酸钾钠、钨

收稿日期: 2003-10-08

作者简介: 吴琼英(1975-), 女, 博士研究生, 研究方向为生物资源有效成分的分离与提纯。

酸钠、钼酸钠、硫酸锂、中分子量标准蛋白(Pharmacia公司)。

1.3 设备

高效毛细管电泳(Backman公司)、高速冷冻离心机(Backman公司)、真空冷冻干燥设备(Backman公司)、柱层析系统(系统构成包括: 400mm × 17mm 层析柱、HD-9704 紫外检测仪、BSZ-100 自动部分收集器、小型台式记录仪、DHL-A 电脑恒流泵)、生化培养箱、微量进样器、DYY-III 28A 型垂直平板电泳槽、TH- 梯度混合器、721- 型分光光度计。

2 试验方法

2.1 ACE 活力测定

三肽 HHL 在 ACE 的催化下快速地分解产生马尿酸(Hippuric Acid)和二肽(His-Leu)。通常通过测定马尿酸的生成量来评价 ACE 的酶活力^[3,4]。

将 5μl 稀释 50 倍后的 ACE 酶液(本试验提取)加入已在 37℃ 保温 5min 的 60μl 反应底物(该底物含 6.5mmol/L 的 HHL, 0.3mol/L NaCl, pH8.3、0.1mol/L 硼酸缓冲液)中启动反应体系, 37℃ 恒温反应 30min 后, 加入 85μl 1mol/L 的 HCl 终止反应, 将反应后的混合液作为样品直接用高效毛细管电泳测定马尿酸的含量。根据马尿酸的生成速度计算酶活力。

1 个酶活力单位(U)定义为: 在本试验条件下, 每分钟催化 HHL 生成 1μmol/L 马尿酸时所需的酶量(U/10ml); 比活力定义为: 每毫克蛋白质所具有的酶活力(U/mg 蛋白质)。

2.2 蛋白质含量的测定

采用微量凯氏定氮法、Folin 试剂法定量测定样品中的蛋白质含量。柱层析时蛋白质含量的测定采用紫外分光光度计法。

2.3 酶纯度及分子量测定

酶纯度及分子量测定用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行^[5]。

2.4 酶反应动力学常数(K_m)的测定

采用双倒数作图法测定 K_m 值^[6]。

3 试验操作及结果

3.1 制备猪肺粗提物

新鲜猪肺购回后置冰箱冷藏室约 10h, 使组织充分冷却, 同时将配好的足量 pH8.3、0.1mol/L 硼酸缓冲液冷却至 4℃。然后, 将猪肺清洗, 去除大的血管、脂肪, 切为小块, 得 200g 猪肺组织。放入组织捣碎机, 加入预冷的缓冲液 1000ml, 间歇均浆 2min, 将浆液置冰箱冷藏 5h 以使浸提物充分溶解。在 4℃、10000r/min 离心 20min, 得 630ml 上清液, 测得 ACE 活力为 43.970U/10ml, 蛋白质含量为 494.045mg/10ml。

3.2 硫酸铵分级沉淀

冰浴条件下向上清液中缓慢加入 35% 饱和度的硫酸铵, 边加边缓慢搅拌, 防止大量泡沫产生使蛋白质变性。冰箱中静置 5h 左右, 4℃、10000r/min 离心 20min, 取上清液; 再加入 55% 饱和度的硫酸铵, 静置 12h 左右, 4℃、7000r/min 离心 10min, 收集沉淀, 用适量预冷的 pH8.3、0.1mol/L 硼酸缓冲液(含 0.3mol/L NaCl)溶解。装入截留分子量为 14000 ± 2000 的透析袋, 用同样的缓冲液在 4℃ 透析, 间隔更换透析液, 以 10% 的 BaCl₂ 为检测液, 直至透析液中无 SO₄²⁻ 存在。共得酶液 150ml, 酶活力为 47.744U/10ml, 蛋白质含量为 146.8mg/10ml。

3.3 Sephadex G-100 凝胶过滤

先用预冷过的 pH8.3、0.1mol/L 硼酸缓冲液(含 0.3mol/L NaCl)平衡 Sephadex G-100 凝胶柱, 再加经硫酸铵沉淀所得酶液 2ml, 待酶液进入凝胶界面以下, 用置于冰浴中的同种缓冲液进行洗脱, 洗脱流速 0.5ml/min, 以 280nm 波长紫外检测, 部分收集, 每管收集 4ml, 检测 ACE 活性及蛋白质浓度, 试验结果如图 1。

由图 1 可见, 经 Sephadex G-100 层析后, ACE 酶快速而集中地被洗脱出来, 从而除去了分子量小于 150000(G-100 的分离范围为 4000~150000)的绝大部分杂质,

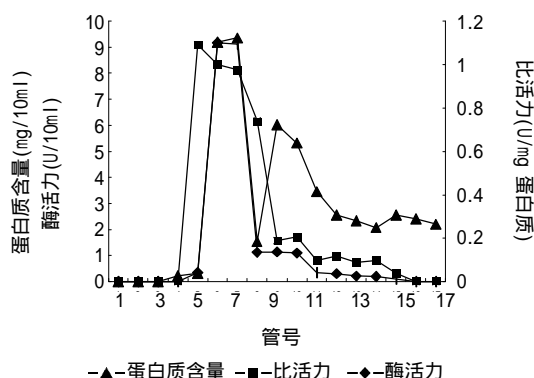


图1 Sephadex G-100凝胶柱纯化ACE

Fig.1 Sephadex G-100 gel filtration

质, 使 ACE 酶高度集中。重复进样, 收集比活力较高的 5~7 管, 得总体积。所得样品冷冻干燥, 再用 pH8.3、0.1mol/L 硼酸缓冲液溶解, 用于后面的离子交换。凝胶过滤的效果见表 1。

3.4 DEAE Sephadex A-50 阴离子交换

DEAE Sephadex A-50 充分膨胀后装柱, 将经 Sephadex G-100 凝胶过滤所得的样品上样, 用含 0.6mol/L NaCl 和不含 NaCl 的 pH8.3、0.1mol/L 的硼酸缓冲液进行梯度洗脱, 洗脱液流速 0.5ml/min, 每管收集 2ml, 对各管进行酶活力和蛋白质含量测定。测定结果如图 2。

由图 2 可知, 在所选定的操作条件下, DEAE Sephadex A-50 阴离子交换对经 Sephadex G-100 层析后的

表1 猪肺ACE的纯化表
Table1 Purification procedure of hog lung ACE

纯化步骤	酶活力(U/10ml)	比活力(U/mg蛋白质)	总体积(ml)	总活力(U)	纯化倍数	活力回收(%)
粗提	43.970	0.089	630	2770.11	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 盐析	47.744	0.299	150	716.16	3.360	25.86
Sephadex G-100 凝胶层析	9.177	0.999	600	550.62	11.22	19.88
离子交换	4.664	29.029	744	347.09	326.17	12.53

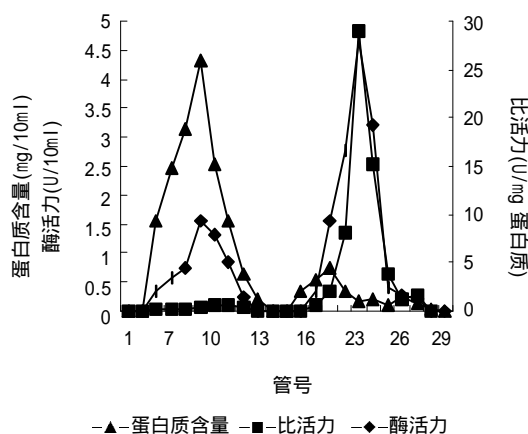


图2 阴离子交换色谱

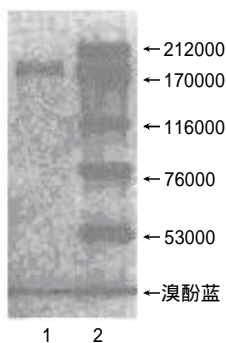
Fig.2 Anion exchange chromatogram

酶液能起到良好的分离效果。重复进样, 收集比活力最高的第24管, 得总体积, 冷冻干燥得ACE成品。离子交换的结果见表1。

3.5 ACE的纯度及分子量测定

采用连续系统, 做SDS-PAGE(凝胶浓度T=6%, 交联度C=3%, 溴酚蓝为示踪染料, 12.5%三氟乙酸配制的0.1%考马斯亮蓝G₂₅₀为染色剂, 7%乙酸溶液为脱色剂)。SDS-PAGE显示纯化的ACE为一条带(图3), 可见经本实验所纯化的ACE酶达到了电泳纯, ACE酶分子量约为185kD, 与孙凤祥、刘宏等报道的接近^[7,8]。

3.6 测定ACE的酶反应动力学常数



1. 纯化的ACE 2. 标准蛋白质

图3 SDS-PAGE测定纯化后的ACE

Fig.3 SDS-PAGE mensurate purified ACE

分别以0.22、0.43、0.87、1.52、2.16、3.25、4.33、5.42、6.50mmol/L的HHL浓度(S)与提纯后的猪肺ACE酶进行反应。结果酶反应动力学曲线如图4, 以1/V对1/S作双倒数图, 得图5。从图5可算出 $K_m=3.168\text{mmol/L}$ 、 $V_{max}=6.165\text{nmol/min}$ 。

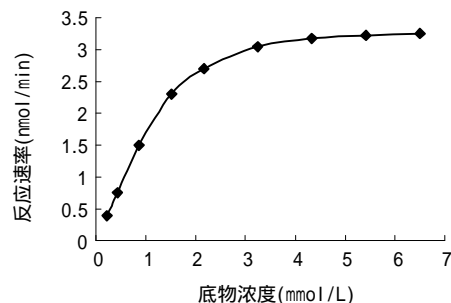


图4 ACE酶反应动力学曲线(Michaelis方程)

Fig.4 The enzyme kinetics curve of ACE (Michaelis equation)

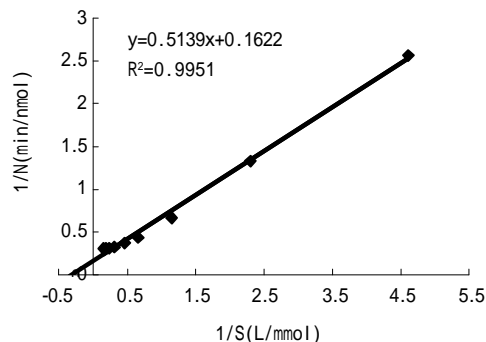


图5 ACE酶反应动力学曲线(Lineweaver-Burk方程)

Fig.5 The enzyme kinetics curve of ACE (Lineweaver-Burk equation)

3.7 ACE的保藏试验

将纯化的ACE酶液置4℃保藏两个月后, 以HHL为底物按前法测定酶活力, 测得酶活力为4.479U/10ml, 与提取时的酶活力4.664U/10ml相比, 酶活力下降不明显。

4 结论

4.1 从表1可以看出: 200g猪肺经以上各步提纯后可制备出ACE 347.09U, 比活力29.029U/mg, 纯化倍数达326.17倍, 活力回收12.53%。与前人研究的结果相比,

菊花脑茎叶抗病原菌活性及其有效成分研究

纪莉莲, 张强华

(淮阴工学院生物工程系, 江苏 淮安 223001)

摘 要: 首次以菊花脑提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌等 6 种常见的病原细菌及黑曲霉、啤酒酵母等 4 种病原真菌进行了拮抗试验, 结果表明菊花脑提取物 A、B 和 C 具有较强的拮抗病原菌的活性, 且抗菌活性有明显的量效关系, 其对各种供试病原细菌的最低抑菌浓度为 0.3%~0.5% (g/ml), 对供试病原真菌的 MIC 值从 0.3%~1.0% 不等。菊花脑提取物 A (挥发油) 显示了广谱的抗菌范围, 其对供试细菌和供试真菌的抑菌效力相当, 但菊花脑提取物 B 和 C (非挥发性成分) 对供试细菌的拮抗作用 (MIC 值为 0.3%~0.5%) 远大于对供试真菌 (MIC 值为 0.7%~1.0%) 的作用。菊花脑中起抗菌作用的主要成分是挥发油、总黄酮、苦味素、野菊花内酯等活性成分。
关键词: 菊花脑; 提取物; 抗菌活性; 病原菌; 最低抗菌浓度

Studies on the Anti-pathogenic Activities and Effective Components of the Leaves and Stalks from *Chrysanthemum nankingense* Hand. Mazz

Ji Li-lian, ZHANG Qiang-hua

(Department of Bioengineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China)

Abstract: The anti-pathogenic activities of *Chrysanthemum nankingense* Hand. Mazz were evaluated against 6 pathogenic bacteria and 4 pathogenic fungi. Results indicated that the 3 extracts (A, B and C) of *Chrysanthemum nankingense* Hand. Mazz showed strong inhibitory effects on these pathogens in a concentration-dependent manner. The extract A (volatile fraction) was

收稿日期: 2003-09-30

作者简介: 纪莉莲 (1965-), 女, 副教授, 博士, 主要从事微生物及生化药学研究。

大大提高了纯化的效率和产率^[7~9]。

4.2 SDS-PAGE 测定纯化后的猪肺 ACE 酶分子量约为 185 kD。

4.3 双倒数作图法得出所提纯的猪肺 ACE 的酶反应动力学常数 K_m 为 3.168 mmol/L、 V_{max} 为 6.165 nmol/min。

4.4 保藏试验证明本研所得 ACE 酶活力稳定, 可满足研究工作的需要。

参考文献:

- [1] Naoyuki Yamamoto, Atsuko Akino, Toshiaki Takano. Anti-hypertensive Effects of Different Kinds of Fermented Milk in Spontaneously Hypertensive Rats[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 58(4): 776-778.
- [2] Yasunori Nakamura, Osamu Masuda, Toshiaki Takano. Decrease of Tissue Angiotensin I-Converting Enzyme Activity upon Feeding Sour Milk in Spontaneously Hypertensive

Rats[J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(3): 488-489.

- [3] Bin-Wha Chang, Richie L C Chen, I-Jen Huang, et al. Assays for Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity[J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 291, 84-88.
- [4] Zak K Shihabi. Analysis of Angiotensin Converting Enzyme by Capillary Electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 853(1999): 185-188.
- [5] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用 (第二版) [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2001. 287-326.
- [6] 沈同, 王镜岩. 生物化学 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 241-265.
- [7] 孙凤祥, 曲梅花, 高佩林, 等. 猪肺血管紧张素转换酶的制备[J]. *中国生化药物杂志*, 2002, 23(3): 122-123.
- [8] 刘宏, 陈兰英. 血管紧张素转换酶纯化与性质研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(6): 788-792.
- [9] 刘宏, 陈兰英. 亲和层析法分离纯化猪肺血管紧张素转换酶[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(5): 544-54.