

# 兔肺血管紧张素转换酶的分离提取及特性研究

杨严俊 李进伟

(江南大学食品学院,无锡 214036)

**摘 要** 采用 DEAE-Sepharose FF 离子交换色谱分离方法从兔肺中分离提取血管紧张素转换酶(ACE)。采用马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)作为底物测得其酶活力为 1.95 U/mg,最适温度和 pH 值分别为 37℃和 8.3。经与商品兔肺 ACE 进行对照实验表明,分离得到的兔肺 ACE 与商品兔肺 ACE 的性质完全相同。

**关键词** 兔肺,血管紧张素转换酶,分离

血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, EC3.4.15.1)简称为 ACE,是由单一肽链组成的糖蛋白,它是通过水解作用把血管紧张肽 I 转化成血管紧张肽 II,与此同时,ACE 还可钝化血管。舒缓激肽,这 2 种作用均可导致血管收缩,从而引起高血压。因此 ACE 被认为是引起高血压的一个重要因素<sup>[1]</sup>。由于兔肺 ACE 各方面的特性与人 ACE 最为相近,所以目前主要是采用兔肺 ACE 来代替人的 ACE,用于功能性因子——降血压肽的分析检测<sup>[2~4]</sup>。国内目前还没有生产兔肺 ACE 的厂家,而国际市场的兔肺 ACE 的价格极为昂贵(每 0.1 单位 29.8 美元)。笔者尝试采用 DEAE-Sepharose FF 新型离子交换树脂,从兔肺中分离提取 ACE 酶,为进一步研究和开发降血压肽奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜兔肺取自农贸市场;马尿酸组氨酰亮氨酸、DEAE-Sepharose FF 和商品兔肺 ACE 分别购于日本多肽公司、Pharmacia 公司和 Sigma 公司;脱氧胆酸钠(进口分装)从中国医药上海化学试剂公司购买;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 主要仪器

SCR20BC 高速冷冻离心机,日本 HITACHI 公司;752 紫外分光光度计,上海分析仪器厂;SBS-100 数控自动部分收集器,上海沪西分析仪器厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 兔肺 ACE 粗酶的分离提取

体重 3~4 kg 的兔子处死后立即取出肺,剔除结缔组织,切成小块,并用 4℃生理盐水反复冲洗干净。在 2 倍体积的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.3)中匀浆,匀浆液差速离心后得到 3 个组份:P1 为 700 × g 离心 20 min 的沉淀,S 为 700 × g 离心后的上清液,在 37 000 × g 的条件下再离心 1 h 的上清液,P2 为 37 000 × g 离心 1 h 的沉淀。取沉淀 P2 溶于 20 倍的上述缓冲液中,再加入脱氧胆酸钠并均质 3 min,放置过夜后,在 37 000 × g 的条件下再离心 1 h,所得上清液用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH8.3)透析,经过滤后即为兔肺 ACE 的粗酶液。

#### 1.3.2 兔肺 ACE 酶的色谱分离

DEAE-Sepharose FF 预处理后装柱(1.6 × 20 cm),0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH8.3)平衡 6 h(流速为 1 mL/min),然后将粗酶液上柱,用 150 mL 的上述缓冲液洗脱,再用含 0~0.18 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液进行梯度洗脱,收集洗脱组份

并浓缩。以上各步均在  $0 \sim 8^{\circ}\text{C}$  的条件下进行。

### 1.3.3 酶活检测方法

酶活检测采用 Cushman 的测定方法<sup>[5]</sup>, 在 2 mL 的 eppendorf 管中进行, 每次测试的总体积为 0.2 mL: 含 pH8.3 的 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液, 0.3 mol/L NaCl, 0.005 mol/L HHL。37℃ 恒温水浴 5 min, 加入适量 ACE 酶液反应 30 min 后, 最后用 0.2 mL 1 mol/L 的 HCl 终止反应。然后加入 1.2 mL 乙酸乙酯(  $-20^{\circ}\text{C}$  )振荡混合, 3 500 r/min 离心 5 min, 取出 0.8 mL 酯层转入试管中, 在  $80 \sim 90^{\circ}\text{C}$  的烘箱中烘干( 约 1 h ), 再用 0.8 mL 去离子水溶解, 最后在 228 nm 测定吸光值; 空白对照管除在反应前先加入 0.2 mL 的 1 mol/L HCl 终止反应外, 其余操作与反应管相同。酶活力定义 37℃ 的条件下, 催化形成 1  $\mu\text{mol}$  马尿酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 兔肺 ACE 的初步分离

经差速离心分离后, P1、P2、S 各组份的蛋白质和兔肺 ACE 的含量见表 1。组份 P1 和 S 中兔肺 ACE 的比活很低, 分别只有 0.053 和 0.030 U/mg。而组份 P2 的比活较高, 是 S 的 4 倍左右。故作为进一步分离纯化的材料。

表 1 冷冻离心后 P1、P2 和 S 中的兔肺 ACE 和蛋白质含量

各部分	蛋白质含量 /mg	酶活力 /U	比活 /U·mg <sup>-1</sup>
P1	1 134	60	0.053
P2	726	90	0.124
S	1 625	49	0.030

### 2.2 脱氧胆酸钠对兔肺 ACE 活力的影响

表 3 各分离步骤中兔肺 ACE 的活性比较

分离步骤	蛋白质含量/mg	总酶活/U	比活/U·mg <sup>-1</sup>	回收率/%	纯化倍数
49 000 × g 离心	726	90	0.124	100	1
脱氧胆酸钠增溶	179	56	0.312	62	2.5
DEAE-Sepharose FF	16.4	32	1.95	35.5	15.7

兔肺 ACE 是一种主要存在于兔肺泡膜上的膜蛋白。由于脱氧胆酸钠对膜蛋白具有增溶作用, 因此可用于兔肺 ACE 的提取。但脱氧胆酸钠与蛋白质的不同比例对兔肺 ACE 的比活有很大的影响( 见表 2 ), 实验发现蛋白质与脱氧胆酸钠的质量比为 3:1 时, 增溶效果最佳。

表 2 脱氧胆酸钠与蛋白质的不同比例对提取兔肺 ACE 的影响

m( 蛋白质 ): m( 脱氧胆酸钠 )	比活/U·mg <sup>-1</sup>
5:1	0.218
4:1	0.255
3:1	0.312
2:1	0.267

### 2.3 柱色谱纯化

兔肺 ACE 的进一步纯化采用 Pharmacia 公司新开发的离子交换树脂 DEAE-Sepharose FF。它具有交换容量大、机械强度高、耐压、易保存及在 pH 和离子强度变化较大时体积变化较小的特点, 特别适合于分子量较大的蛋白质的分离。兔肺 ACE 粗酶液( 总酶活为 90 U )上 DEAE-Sepharose FF 柱, 先用起始缓冲液除去不能被 DEAE-Sepharose FF 吸附的杂蛋白, 待洗脱曲线平直后采用梯度洗脱, 得到 2 个组份峰( 见图 1 )。经酶活测定表明, 第 1 个峰具有 ACE 酶的活性, 其洗脱强度在 0.04 ~ 0.1 mol/L NaCl 范围之内。该组份中总酶活为 32 U, 比活为 1.95 U/mg。活性收率为 35.5%, 纯化倍数则高达 15.7 倍( 见表 3 )。

### 2.4 pH 对兔肺 ACE 活力及稳定性的影响

以 HHL 为底物, 在 37℃ 测定不同 pH 时兔肺 ACE 的活力, 可知兔肺 ACE 在 pH 为 8.3 时的反应速度最大, 而在 pH 7 ~ 9 之间的稳定性都较高( 见图 2 和图 3 ), 与 Sigma 公司的兔肺 ACE 酶的特性完全相同。

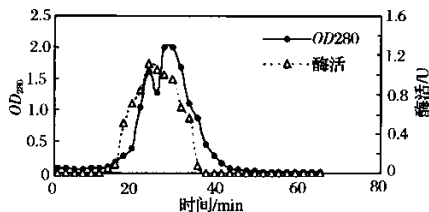


图 1 DEAE-Sepharose FF 洗脱曲线  
(每管为 2.5 mL)

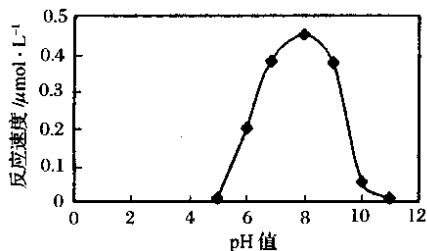


图 2 pH 对反应速度的影响

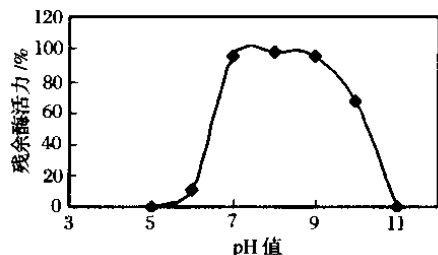


图 3 pH 对酶活的影响

## 2.5 温度对兔肺 ACE 活力及稳定性的影响

兔肺 ACE 与底物 HHL 在不同温度下的酶活测定表明,ACE 酶活随反应温度升高而上升,至 37℃ 时达到最大,超过 37℃ 时,酶活开始下降。将 ACE 和上述缓冲液在不同温度下保温 60 min 后,测定残余酶活力,结果表明兔肺 ACE 对温度较敏感,在 25℃ 以下稳定,37℃ 时残余酶活力可达 80% 左右,55℃ 则完全丧失酶活力(见图 4 和图 5)。

## 2.6 兔肺 ACE 的性能评价

为了进一步测试分离得到的兔肺 ACE 是否与商品兔肺 ACE 的性能相同,实验采用作者从菠菜叶蛋白中分离得到的一个具有降血压功能的活性多肽——MRWRD(Met-Arg-Trp-Arg-Asp)进行验证。MRWRD 经 ACE 水解后,其水解产物(主要为 MRW 和 RW)的  $IC_{50}$  值反而高于水解前。自制兔肺

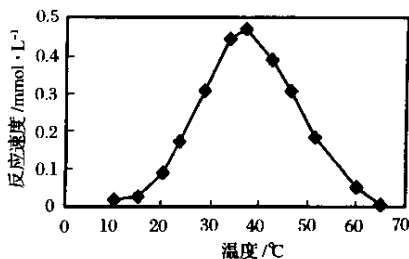


图 4 温度对反应速度的影响

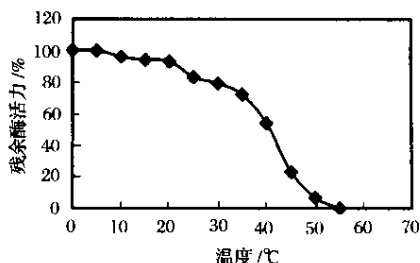


图 5 温度对酶活的影响

ACE 与商品兔肺 ACE 于 37℃ 分别保温培养后,其  $IC_{50}$  值的结果如表 4 所示。

表 4 自制兔肺 ACE 与商品兔肺 ACE 性能比较

种 类	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	培养前	培养后
自制兔肺 ACE	1.8	0.65
商品兔肺 ACE	2.0	0.71

从表 4 可看到,2 种 ACE 的水解结果基本相同,说明与商品兔肺 ACE 相比较,自制兔肺 ACE 中没有其他可能会影响多肽活性测定的杂质,其水解物的高压液相色谱也证实两者的主要水解产物相同,主要是 MRW 和 RW。这个结果与以前的实验结果完全相符<sup>[6]</sup>。由此可见分离得到的兔肺 ACE 的质量与商品兔肺 ACE 相同,完全可替代后者用于降血压的研究。

## 3 结 论

兔肺 ACE 经 DEAE-Sepharose FF 分离,其比活达到 1.95 U/mg,已接近 Sigma 公司商品兔肺 ACE 的活性。并且性能也完全相同,因此可直接用于筛选检测功能性因子——降血压肽。另外本实验方法具有简便、快速、重复性好等特点。

## 参 考 文 献

- 1 Ondetti M A , Rubin B , Cushman D W. Science , 1977 , 196 :441 ~ 444
- 2 Maruyama S , Nakagomi K , Tomizuka N et al. A-gri Biol Chem , 1985 , 49 :1405 ~ 1409
- 3 Yokoyama K , Chiba H , Yoshikawa M. Biosci Biotechnol Biochem , 1992 , 56 :1541 ~ 1545
- 4 Cushman D W , Cheung H S. Biochemical Pharmacology , 1971 , 20 :1637 ~ 1648
- 5 Suetuna K. The Clinical Report , 1991 , 25 :2245 ~ 2251
- 6 Yang Y , Yoshikawa M. 日本农芸化学会年会 , 2002.4

## Isolation and Properties of Angiotensin Converting Enzyme from Rabbit Lung

Yang Yanjing Li Jinwei

( School of Food Science and Technology , Southern Yangtze University , Wuxi , 214036 )

**ABSTRACT** Angiotensin converting enzyme was isolated from rabbit lung by DEAE - Sepharose FF. The activity of isolated ACE , which was measured by substrate Hippuryl-His-Leu ( HHL ) , is 1.95 U/mg. The optimum temperature and pH is 37℃ and 8.3 , respectively. The property of isolated ACE of rabbit lung is exactly same as the commercial ACE of rabbit lung

**Key words** rabbit lung , angiotensin converting enzyme , isolation

2004年征订

### 轻 工 机 械

国内总发行 浙江省报刊发行局( 邮发代号 32-39 )

国外总发行 中国国际图书贸易总公司( 发行代号 Q4555 )

欢迎订阅 ● 欢迎刊登广告 ● 欢迎赐稿

全国中文核心期刊

中国轻工业机械协会

中国轻工业总公司 主 办

轻工业杭州机电设计研究院

全面介绍国内外轻工机械( 造纸、塑料、食品、日化等 ) 包装机械和轻工模具在设计、研究、生产、管理、配件服务等方面的新成果、新设备、新技术、新方法等。

● 季刊 大 16 开 每册定价 8.00 元 全年 32.00 元。

● 邮局订阅( 刊号 32-39 ) 也可直接向本编辑部邮购( 另加邮费 1 元/本 )。

● 编辑部地址 杭州体育场路 71 号 邮编 310004

● 开户银行 杭州工商银行建国北路分理处

● 户名 : 轻工机械编辑部 帐号 : 1202022209014455185

● 刊号 : CN33-1180/TH ISSN 1005-2895

● 电话 ( 0571 ) 85186130

http ://QGJX.chinajournal.net.cn

E-mail : qgjxzz@mail.hz.zj.cn 或 qgjx@chinajournal.net.cn

本刊已加入《中国学术期刊( 光盘版 )》和“中国期刊网”、“万方数据资源系统”、“中文科技期刊数据库”