

毛细管胶束电动色谱法测定血管紧张素转化酶的活性

徐小华, 张蓉真, 盛思梅, 陈天豹, 李 珑, 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要 建立了应用毛细管胶束电动色谱(MECC)灵敏、快速的测定血管紧张素转化酶(ACE)活性的方法。通过对电压、上样时间、电极缓冲液体系等影响因素的优化,探讨了方法的可行性,确立了最佳测定条件(电压 8.1 kV;上样时间 1 s;电极缓冲液 20 mmol/L 硼酸盐缓冲液(pH 9.0,含 50 mmol/L SDS);检测波长 228 nm)。方法的最低 ACE 活性检测限为 5 pmol/min(以 2 倍的信噪比计)。

关键词 毛细管胶束电动色谱法 血管紧张素转化酶 活性

中图分类号 O657.8 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-8713(2001)01-0068-03

1 前言

血管紧张素转化酶(ACE)是一种二肽水解酶,能作用于血管紧张素 I(十肽)的 C-末端,形成具有强增压作用的血管紧张素 II(八肽)^[1]。近年来的研究发现,检测血清中的 ACE 水平有助于对一些炎症和心血管疾病的诊断,并且 ACE 的检测可用于 ACE 抑制药物的筛选^[1,2]。因而,ACE 活性的检测具有重要的临床和商业价值。目前,国内外 ACE 的检测方法有放射性同位素法^[3]、荧光比色法^[4]、紫外分光光度法^[5]等,这些方法的主要缺点是分析时间长,操作体系复杂。尽管高效液相色谱法^[6]的应用弥补了这些不足,但是在样品用量和检测精度方面还有待改进的地方。本文对用毛细管胶束电动色谱法(MECC)测定 ACE 活性的条件及可行性进行了探讨。

2 实验部分

2.1 材料

ACE(来源于兔子的肺)、三肽(Hip-His-Leu)和马尿酸(Hip)均购于 Sigma 公司。

2.2 仪器

P/ACE 5510 型毛细管电泳仪,毛细管:75 μm i. d. \times 27 cm(美国 Beckman 公司);电热恒温水浴锅(厦门电子仪器厂)。

2.3 方法

根据 Saito 等^[7]采用的以三肽为底物的酶反应条件,先将 5 μL 100 U/L 的 ACE 或样品加至 50 μL 反应液(pH 8.3,100 mmol/L 硼酸盐缓冲液,含有 500 mmol/L NaCl,6.5 mmol/L Hip-His-Leu)中,在

37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 min 后加入 95 μL 的 1 mol/L HCl 溶液终止反应。取上述终止反应后的反应液用于毛细管胶束电动色谱分析。实验采用压力进样,进样压力 3.45 kPa,上样时间 1 s,且在每次进样前用 0.1 mol/L NaOH、去离子水和电极缓冲液顺序冲洗各 1.5 min。

3 结果与讨论

3.1 毛细管电泳条件的确立

ACE 最适宜的酶反应体系为 pH 8.3 的硼酸盐缓冲液,依照毛细管电泳常用电极缓冲液条件,初步选用 50 mmol/L 的硼酸盐缓冲液(pH 8.3,含 50 mmol/L SDS),以便其他条件的选择。

3.1.1 电压的选择 升高分析电压,会使分离效率和分离度增加,分离时间缩短。但过高的电压会产生过量的焦耳热,这些热量不能及时散失,使径向温度梯度加大,反而使分离效率和分离度下降。因此需要选择一个最佳的分离电压。通过比较电压为 12.15 kV,10.8 kV,8.1 kV 和 5.4 kV 时的分离结果,认为当电压为 8.1 kV 时,分离效果最好。

3.1.2 上样时间的选择 由于毛细管柱容量较小,高浓度样品和大的进样体积造成的超载将使峰形变坏,分离效率降低^[8]。而且体系的最大分离效率受毛细管总体积与进样体积之比的限制,因此进样量也是影响分离效果的一个重要因素。在其他条件相同时(其中电压为 8.1 kV,采用压力上样),对比上样时间分别为 1 s,2 s,3 s,4 s 和 5 s 时样品(ACE 反应液)的分离效果,认为上样 1 s 时分离效果最佳。

3.1.3 电极缓冲体系的调整 电极缓冲液的 pH 不仅影响可解离分析物的有效电荷数,决定被分析

物在电场中的迁移速度,还可以影响电渗流的大小^[9]。因此通过调节电极缓冲液的 pH 值可以改变分析物的迁移行为和分离选择性。分别以 pH 值为 8.0 8.3 9.0 的硼酸盐缓冲液为电极缓冲液进行分离,最后确定电极缓冲体系的最佳 pH 值为 9.0。

电极缓冲液的浓度不仅决定溶液的导电性能,同时还影响毛细管壁和离子表面双电层的结构,所以可通过改变缓冲液的浓度来调节电泳淌度和电渗流,从而达到改善分离的目的。分别以 10 mmol/L, 20 mmol/L 和 50 mmol/L 浓度的硼酸盐缓冲液进行分离,比较可知 20 mmol/L 硼酸盐缓冲液的分离效果最佳(见图 1)。

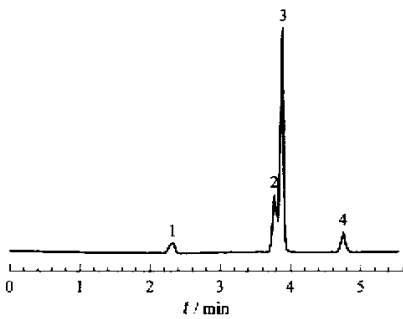


图 1 ACE 活性测定的毛细管电泳图
Fig.1 The electropherogram of ACE reaction mixture

Conditions :voltage 8.1 kV ; temperature 23 ℃ ; pressure injection 3.45 kPa·s ; buffer 20 mmol/L boric acid-borate buffer (pH 9.0) including 50 mmol/L SDS ; detection wavelength , 228 nm.

1.angiotensin-converting enzyme ; 2.dipeptide ; 3.Hip-His-Leu ; 4. hippuric acid.

3.2 ACE 活性测定方法及可行性评价

ACE 活性是以前在 37 ℃ 时 1 min 内催化三肽 (HHL) 生成 1 μmol 马尿酸(Hip)为 1 个活性单位 (U)来计量。因而样品中 ACE 活性大小需由其与 HHL 反应后生成 Hip 的量来确定。为确认 MECC 法测定 ACE 活性的可行性,首先须确定产物 Hip 浓度 (C_{Hip})与其对应的峰面积 (A)的相关性如何,再通过酶动力学常数 (K_m)来评价。

3.2.1 标准马尿酸浓度 (C_{Hip})与峰面积 (A)相关性的确定 在已确定的分离条件下分别以 0.01 mmol/L, 0.02 mmol/L, 0.03 mmol/L, 0.04 mmol/L, 0.08 mmol/L, 0.12 mmol/L 和 0.20 mmol/L 的 Hip 上样 1 s,得到马尿酸浓度 (C_{Hip} , mmol/L)与其对应峰面积 (A)的线性关系,相关系数 $r=0.999$ ($n=3$)。线性关系方程:

$$A = 3.681 \times C_{Hip} + 0.002 \quad (1)$$

3.2.2 ACE 活性的测定 先从 ACE 反应的谱图

得出 A 值,将其代入式 (1),计算 C_{Hip} 。再将 C_{Hip} 值代入根据 ACE 活性定义的方程式 (2),即算出 ACE 的活性 (U)。

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = 150 \times C_{Hip} / 30 = 5 \times 10^{-3} C_{Hip} \quad (2)$$

式 (2)中,150 为上样前样品总体积 (μL),30 为 ACE 反应时间 (min)。

3.2.3 ACE 的酶反应动力学常数 分别以 0.15 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.6 mmol/L, 1.2 mmol/L, 2.4 mmol/L, 4.8 mmol/L, 6.0 mmol/L, 7.2 mmol/L, 8.4 mmol/L 的不同底物浓度 (S) 进行反应,作出其对应的酶反应动力学曲线,如图 2 (该曲线符合 Michaelis 方程)。再通过坐标变换,我们可得到图 3 (该曲线符合 Lineweaver-Burk 方程)。从图 3 上,我们可得到 $K_m = 1.454$ mmol/L, $V_{max} = 5.069$ nmol/min。因而,来源于兔肺的 ACE 反应 Michaelis 方程为:

$$V (\text{nmol}/\text{min}) = 5.069 \times S / (1.454 + S) \quad (3)$$

式 (3)中, V 为酶反应速率, S 为底物浓度 (mmol/L)。本方法测得的 K_m 与已报道的兔肺的 ACE 的 K_m 相比,发现较 Cushmar^[10] 的 2.2 mmol/L 和 Das^[11] 的 2.3 mmol/L 要低,与 Fried-

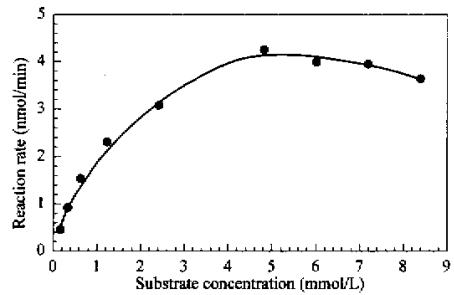


图 2 ACE 酶反应动力学曲线 (Michaelis 方程)

Fig.2 The enzyme kinetics curve of ACE (Michaelis equation)

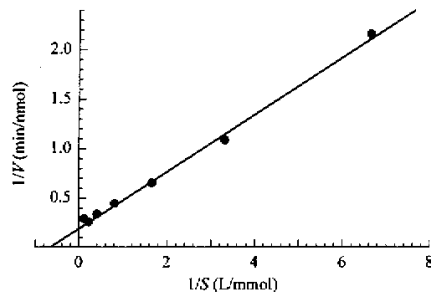


图 3 ACE 酶反应动力学曲线 (Lineweaver-Burk 方程)

Fig.3 The enzyme kinetics curve of ACE (Lineweaver-Burk equation)

S substrate concentration ; V reaction rate.

land^[12]的 1.2 mmol/L 较接近。这很可能是由于 Cushman 与 Das 用分光光度法测定时,使用溶剂抽提反应产物马尿酸不完全,而 Friedland 使用较灵敏的荧光检测。当然,使用不同的缓冲体系对 ACE 的活性测定也会有一定的影响^[10]。以同一 ACE 反应液连续进样 5 次,各组分的迁移时间和峰面积的相对标准偏差均小于 1%,且本方法的最低 ACE 活性检测限为 5 pmol/min(按 2 倍信噪比计)。

4 结论

毛细管胶束电动色谱测定 ACE 活性的方法与以往 ACE 活性测定方法相比,具有分离速度快(6 min)、分离效率高,重现性好,样品用量少(上样量为十几 nL),对于珍贵的样品分析有利等优点。

参考文献:

- [1] Qing Ch M, Suzanne O. *J Chromatogr A*, 1996, 743: 1105-1112
 [2] Lieberman J. *Am J Med*, 1975, 59: 367-372
 [3] Ryan J W, Chung A, Ammons C. *Biochem J*, 1977,

- 167 2 501-2 504
 [4] Friedland J, Silverstein E. *Am J Clin Pathol*, 1976, 66: 2 416-2 424
 [5] Neels H M, Scharpe S L, Van Sande M E, et al. *Clin Chem*, 1982, 28(6): 1 352-1 355
 [6] Liu S T, Chen G R, Shi B H, et al. In: Whitaker J R, Norman F H, Charles F S, et al eds. *Food for health in the pacific rim*. Connecticut: Food & Nutrition Press, 1997. 363-370
 [7] Saito Y, Nakamura K, Kawato A, et al. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1992, 66(7): 1 081-1 087
 [8] Otsuka K, Terabe S. *Methods Mol Biol*, 1996, 52: 125-155
 [9] Lauer H H, McManigill D. *J Capillary Electrophor*, 1996, 3(4): 191-198
 [10] Cushman D W, Cheung H S. *Biochem Pharmacol*, 1971, 20: 1 637-1 648
 [11] Das M, Soffer R L. *J Biol Chem*, 1975, 250(17): 6 762-6 768
 [12] Friedland J, Silverstein E. *Int J Biochem*, 1983, 15(11): 1 337-1 343

Determination of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

XU Xiao-hua, ZHANG Rong-zhen, SHENG Si-mei, CHEN Tian-bao,
 LI Long, RAO Ping-fan

(*Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China*)

Abstract: A sensitive and rapid method was developed for angiotensin-converting enzyme (ACE) activity determination by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). MECC was carried out to separate and quantify the products of the enzymatic reaction using Hip-Leu-His as the substrate in 20 mmol/L boric acid-borate buffer (pH 9.0) including 50 mmol/L SDS as the run buffer at an applied voltage of 8.1 kV. The electrophoresis was monitored at 228 nm, and completed in 6 minutes. The detection limits of ACE activity was 5 pmol/min (signal to noise ratio was 2).

Key words: micellar electrokinetic capillary chromatography; angiotensin-converting enzyme; activity