

The Establishment and Primary Application of High Sensitive Interleukin-6 Radioimmunoassay. YAN Guang-Tao, HAO Xiur-Hua, WANG Lu-Huan (Research Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China).

Abstract The high effective antibody of interleukin-6 was obtained by immunizing rabbits and guinea pigs with recombinant IL-6 many times. The IL-6 was labeled by ^{125}I with chloramines-T methods and purified by the Sephadex-G25 chromatograph column. The reaction between antigen and antibody was carried out by one step balance method and incubated in 4°C for 24 hours, then separated bond and free antigen by PR reagent. The detection range of this method was about $0.1\sim 3.2\ \mu\text{g/L}$, the lowest detection level was $0.1\ \mu\text{g/L}$, error within batches

and between batches was less than 6.4% and 10% respectively. The serum IL-6 concentration in normal male was $(0.270\pm 0.13)\ \mu\text{g/L}$ ($n=115$), and in female was $(0.260\pm 0.10)\ \mu\text{g/L}$ ($n=101$), there was no difference in male and female group. Otherwise, the level of IL-6 in serum of rabbits was significantly higher than that of self-control at 24 hours after hemorrhagic shock and reperfusion. IL-6 in lymph fluid of rat after hemorrhagic shock was significantly elevated, then it was descended by the treatment of anisodamine ($1\ \text{mg/kg}$). The liberation of IL-6 also was promoted and obviously higher than that of the control when fibre cells around tooth were cultured with endotoxin ($10\ \text{mg/L}$) at different time *in vitro*.

Key words interleukin-6, radioimmunoassay, endotoxin, hemorrhagic shock

亲和层析法分离纯化猪肺血管紧张素转换酶*

刘宏 陈兰英¹⁾

(中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037)
(中国协和医科大学阜外心血管病医院)

摘要 亲和胶合成实验以双环氧化合物 1, 4-丁二醇-2-缩水甘油醚 (1, 4-butanediol diglycidyl ether) 为活化体及连接臂, 在硼氢化钠 (NaBH_4) 存在的碱性条件下, 将载体 Sepharose CL4B 与雷诺普利 (lisinopril) 共价连接在一起, 成功合成亲和层析胶, 并利用亲和层析胶对猪肺血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 进行分离提纯. 猪肺组织匀浆经 $1.6\sim 2.6\ \text{mol/L}$ 硫酸铵分级沉淀、透析平衡、亲和柱分离等步骤, 从 $200\ \text{g}$ 猪肺中提纯得到 $0.79\ \text{mg}$ ACE 蛋白, 酶活力回收 11.9%, 比活力 $38.8\ \text{U/mg}$. 与层析前的酶液比较, 亲和层析一步提纯可达 264 倍; 与肺匀浆液比较提纯达 808 倍. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳可见, 提纯的猪肺 ACE 为一条带, 分子质量约为 $180\ \text{ku}$.

关键词 亲和层析胶制备, 分离纯化, 血管紧张素转换酶

学科分类号 Q503

血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 是与细胞膜结合的含锌蛋白酶, 可水解血管紧张素 I (angiotensin I, Ang I) 羧基端二肽, 得到八肽的升压活性物质——血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II), 还可以作用有降压活性的物质——缓激肽 (bradykinin, BK), 切去其羧基端二肽使之失活, ACE 的这些性质使其参与了体内血压调节^[1]. 目前各种 ACE 抑制剂 (ACE inhibitor, ACEI) 类药物在临床治疗中所取得的成

功进一步说明 ACE 在血压调节和高血压发生中起重要作用^[2], 对 ACE 的生化性质、生理功能及其 ACEI 的研究一直是心血管疾病研究中的一个重要方向, 而制备高纯度的 ACE 是开展研究工作的第一步. 本实验室早期采用传统分离提纯方法在国内

* 国家新药研究基金资助项目 (96-901-05-85).

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 68314466-8068, E-mail: lychen@mail.sparkice.com.cn

收稿日期: 1999-09-05, 修回日期: 2000-03-01

最先从猪肺组织中提纯出 ACE, 但纯化过程费时, 随后又成功地改用国外赠送的亲胶进行提纯, 但亲胶的使用量受限, 为此, 我们进行了 ACE 亲胶的设计合成。

ACE 是一种膜结合的大分子, 由于空间位阻效应, 亲胶纯化效果与连接载体和配体的连接臂长度有关。在 Pantoliano 等^[3]的研究中发现 6-[N-(ρ -aminobenzoyl) amino] caproic acid 作为连接臂,

活化连接后臂长 2.8 nm 时胶亲和吸附效果最好, 根据本实验室所能获得原料试剂的可能性, 重新设计了实验方案, 选择了与 6-[N-(ρ -aminobenzoyl) amino] caproic acid 碳链结构和长度相似的 1, 4-丁二醇-2-缩水甘油醚为活化连接臂, 以水溶性的 ACE 竞争性抑制剂-雷诺普利 (lisinopril) 为配体, Sepharose CL-4B 为固相载体, 试验亲胶合成、制备的方法。具体原理如图 1 所示。

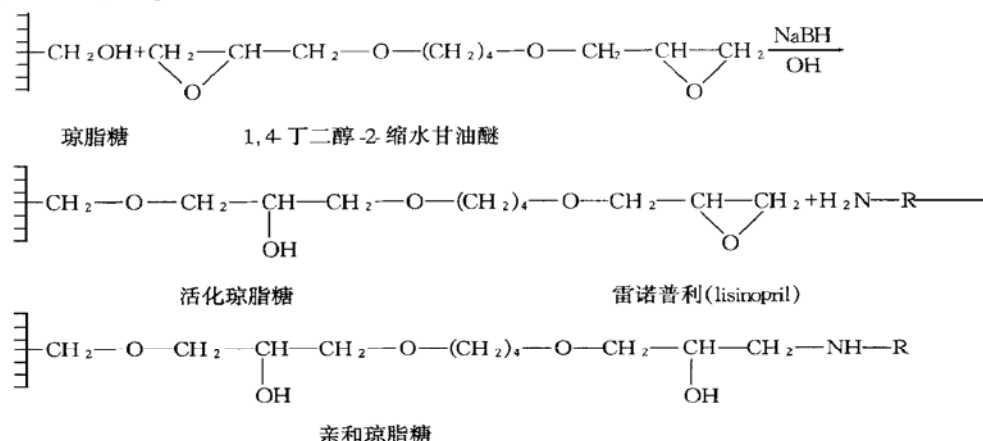


图 1 亲和胶合成原理

1 材料与方法

1.1 试剂器材

Sepharose CL-4B、蛋白质分子质量标准为 Pharmacia 产品。Tris 为 E. Merck 产品。马尿酸组氨酸 (hippuryl-L-histidyl-L-leucine, HHL)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、1, 4-丁二醇-2-缩水甘油醚 (1, 4-butanediol diglycidyl ether)、硼氢化钠 (NaBH) 为 Sigma 产品。雷诺普利 (lisinopril) 为英国捷利康公司产品。电泳分析试剂与器材为 Bio-Rad 系列配套产品。其余试剂均为国产分析纯。酶活力检测仪器为 PE λ 14 紫外分光光度计 (PE 公司生产, USA)。

1.2 实验过程

1.2.1 亲和胶制备

a. 环氧活化琼脂糖: Sepharose CL-4B 用蒸馏水清洗数次, 砂心漏斗抽干水份, 按照 1 g 琼脂糖凝胶加入 1, 4-丁二醇-2-缩水甘油醚 1 ml, 0.6 mol/L NaOH 1 ml, NaBH 2 mg 的比例将上述试剂混于一封口锥形瓶中, 25℃ 旋转混合反应 8 h。1 000 ml 蒸馏水充分洗涤终止反应, 砂心漏斗滤去多余水份, 此为活化环氧琼脂糖。

b. 配体接合反应: 以每 1g 抽干活化琼脂糖凝

胶加 2 ml 25 mmol/L lisinopril (0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液, pH 10.83, 配制) 的比例进行配体接合反应, 45℃, 120 r/min 轻摇 12 h, 0.1 mol/L 碳酸钠缓冲液 (pH 10.83) 冲洗凝胶终止反应。

c. 封闭剩余环氧基团: 1 mol/L 的甘氨酸溶液, pH 10.0, 37℃ 过夜, 封闭未反应的环氧基团。然后用下列溶液依次清洗合成的亲和胶: 去离子水; 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液, pH 3.8; 0.5 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 硼酸钠缓冲液, pH 8.7; 去离子水。清洗后装柱, 以 15 倍床体积的 0.3% Triton X-100, 0.3 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris 缓冲液, pH 7.5, 平衡亲和柱, 4℃ 保存备用。

1.2.2 ACE 分离提纯

200 g 新鲜猪肺用预冷生理盐水清洗, 剪成小块, 加入 600 ml 蒸馏水, 断续打碎 10×20 s, 加入 15 ml 的 10% Triton X-100, 慢速搅拌 30 min, 四层纱布过滤, 滤液离心 (6 000 g × 20 min, 4℃), 保留上清液。硫酸铵分级沉淀, 收集 1.6~2.6 mol/L 间的硫酸铵沉淀, 溶解于 0.3 mol/L NaCl, 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液中 (pH 7.5)。置于含 0.3% Triton X-100, 0.3 mol/L NaCl, 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液, pH 7.5, 进行充分透析,

离心 ($50\,000\,g \times 60\,\text{min}$) 去除悬浮物后即制备好的上柱前样品。

样品以 $20\,\text{ml/h}$ 流速上样亲和柱 ($1.0\,\text{cm} \times 8\,\text{cm}$)，依次用 $40\,\text{ml}\,0.3\,\text{mol/L}\,\text{NaCl}$ 、 $0.3\%\,\text{Triton X-100}$ 、 $20\,\text{mmol/L}\,\text{Tris}$ 缓冲液， $\text{pH}\,7.5$ 和不含 Triton 的上述缓冲液洗柱，至指示器基线平稳后，用 $50\,\text{mmol/L}$ 硼酸钠缓冲液， $\text{pH}\,9.5$ ，洗脱收集蛋白质峰，最后用 $0.2\,\text{mol/L}\,\text{NaOH}$ 洗柱并收集蛋白质，检测各收集管酶活力。

提纯完毕，亲和胶柱用 $100\,\text{ml}\,0.2\,\text{mol/L}\,\text{NaOH}$ 、 $50\,\text{mmol/L}$ 的硼酸钠溶液清洗， $0.3\%\,\text{Triton X-100}$ 、 $20\,\text{mmol/L}\,\text{Tris}$ 缓冲液， $\text{pH}\,7.5$ ，充分平衡后 4°C 保存下次使用。

1.2.3 ACE 活力测定：乙酸乙酯提取比色法^[4]，酶反应体系为： $125\,\mu\text{l}$ 反应终体积中含有 $5.0\,\text{mmol/L}$ 三肽底物 (HHL)， $0.6\,\text{mol/L}\,\text{NaCl}$ ， $90\,\text{mmol/L}$ 硼酸缓冲液， $\text{pH}\,8.0$ 。平行对照管除在反应前先加入 $125\,\mu\text{l}\,1\,\text{mol/L}\,\text{HCl}$ 以终止反应外，其余成分同反应管。反应由加入酶液启动， 37°C 反应 $30\,\text{min}$ 后，反应管加入 $125\,\mu\text{l}\,1\,\text{mol/L}\,\text{HCl}$ 终止反应。再分别加入 $750\,\mu\text{l}$ 乙酸乙酯抽提 $5\,\text{min}$ ，离心 ($1\,000\,\text{r/min}$ ， $1.5\,\text{min}$) 取上清 $500\,\mu\text{l}$ 加热蒸干后，加入 $1.5\,\text{ml}\,1\,\text{mol/L}\,\text{NaCl}$ 于 $228\,\text{nm}$ 检测光吸收值，计算酶活力。一个酶单位 (U) 定义为在本实验条件下，每分钟催化三肽底物 (HHL) 生成 $1\,\mu\text{mol}$ 产物时所需的酶量。酶活力以 mU/ml (或 U/ml) 表示。

1.2.4 蛋白质浓度测定：按 Lowry^[5] 法，以 BSA 作标准。

1.2.5 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳：采用 Leammli 电泳系统^[6]进行电泳。

2 结果与讨论

2.1 ACE 亲和胶的合成

实验先期合成 $5\,\text{ml}$ 亲和层析胶，在猪肺 ACE 分离纯化过程中检测其吸附柱效可达 $1.3\,\text{g/L}$ 。利用亲和胶反复进行 ACE 提纯，发现胶稳定性较好，在仔细处理和 4°C 保存条件下，6 个月内多次使用未见柱效发生明显退化。本实验的设计合成方法与国外相关文献中采用的方法比较^[7]，省去了环氧氯丙烷、乙腈对 Sepharose 琼脂糖凝胶侧链基团的活化步骤和 N-羟基琥珀酰亚胺对连接臂的活化步骤，节省时间和经费，便于合成操作进行。

2.2 猪肺 ACE 的分离纯化

亲和层析胶的合成效果可以通过对猪肺组织中 ACE 的分离提纯结果中看出，图 2 和表 1 分别为利用 ACE 亲和层析胶分离纯化 ACE 时的层析图和各主要分离步骤的提纯效果。

样品过柱后，用 $50\,\text{mmol/L}$ 硼酸钠洗脱液， $\text{pH}\,9.5$ ，洗出的蛋白质峰 (约 $100\,\text{mg/L}$) 酶活力很高，在此洗脱条件下未见其他蛋白质峰出现。换成 $0.2\,\text{mol/L}\,\text{NaOH}$ 溶液洗柱后又出现一较大的蛋白质峰，但 ACE 酶活力极低，说明在第一步洗脱时，与亲和胶结合的 ACE 已经大部被洗脱下来。

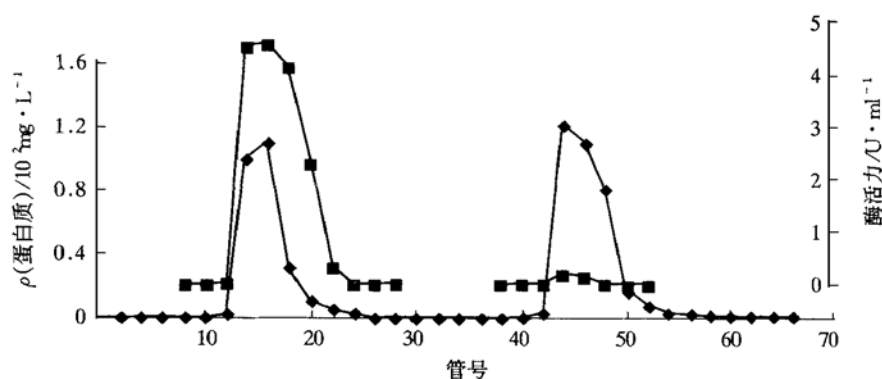


图 2 猪肺 ACE 的亲和层析

◆—◆: 蛋白质浓度; ■—■: 酶活力。

表 1 猪肺 ACE 的提纯

实验步骤	总蛋白质/ mg	总活力/ U	比活力/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	提纯倍数	活力回收率/%
粗提液	5340	257.9	0.048	1	100
$1.6 \sim 2.6\,\text{mol/L}\,(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	864	127.0	0.147	3.06	49.2
亲和层析	0.79	30.7	38.81	808	11.9

从表 1 中看出 200 g 猪肺组织经硫酸铵分级沉淀、透析除盐、缓冲液平衡、亲和柱分离等步骤, 分离纯化出 0.79 mg ACE 蛋白, 酶活力回收 11.9%, 比活力 38.8 U/mg. 与亲和层析前的上样酶液比较, 亲和层析一步可提纯达 264 倍, 与肺匀浆液比较最后的提纯倍数达 808.

对提纯的 ACE 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 可见经亲和层析法分离提纯, 一步就达到单一条带的电泳纯 (图 3), 经与蛋白质分子质量标准对照后计算其分子质量约为 180 ku.

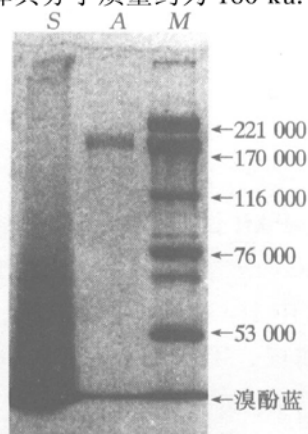


图 3 ACE 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定
S: 粗提液; A: 纯化 ACE; M: 蛋白质分子质量标准.

以上实验结果证明本实验通过以 1, 4-丁二醇-2-缩水甘油醚为连接臂, 将固相载体与配体连接在一起, 合成 ACE 亲和层析胶的方法是成功的. 在用其进行猪肺组织 ACE 的分离过程中达到令人满意的提纯效果. 以猪肺为原料提纯 ACE, 材料来源广泛、价格便宜, 但 ACE 含量低, 经典方法提纯不仅步骤多, 产量低, 纯度有时还难以达到理想要求. 应用亲和胶则简化步骤, 节约时间及成本. 与早期应用的 ACE 提纯方法^[8]和本室实验室前期应用的分离方法^[4]相比较, 省去 DEAE-阴离子交换层析、CM-羟甲基纤维素阳离子交换层析和 Sephadex G-100 层析等分离步骤, 酶的比活力和提纯倍数均较以前方法提高了一倍. 此方法的成功为今后大量快速制备 ACE 提供了条件, 为进行 ACE 深入研究奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Ferrario C M, Flack J M. Pathologic consequences of increased angiotensin II activity. *Cardiovasc Drugs Therapy*, 1996, **10** (5): 511~ 518
- 2 Zannad F. The emerging role ACE inhibitors in the treatment of cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990, **15** (S2): S1~ S3

- 3 Pantoliano M W, Holmquist B, Riordan J F. Affinity chromatographic purification of ACE. *Biochemistry*, 1984, **23** (5): 1037~ 1042
- 4 陈兰英, 田 敏, 谢贵富. 猪肺血管紧张素转换酶的提纯. *生物化学杂志*, 1988, **4** (4): 345~ 351
Chen L Y, Tian M, Xie G F. *J Biochem*, 1988, **4** (4): 345~ 351
- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193** (1): 265~ 275
- 6 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680 ~ 685
- 7 Bull H G, Thornberry N A, Cordes E H. Purification of angiotensin-converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography. *J Biol Chem*, 1985, **260** (5): 2963 ~ 2972
- 8 Rohrbach M S, Williams E B, Rolstad R A. Purification and substrate specificity of bovine angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem*, 1981, **256** (1): 225~ 230

Preparation and Application of Affinity Agarose in Hog Lung Angiotensin-converting Enzyme Purification Process. LIU Hong, CHEN Lan-Ying (Cardiovascular Institute, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100037, China).

Abstract A method for preparing biospecific affinity chromatography agarose for angiotensin-converting enzyme is reported. Bisoxiranes, 1, 4-butanediol diglycidyl ether, has been used for introducing reactive oxirane groups into Sepharose CL-4B, and coupling to ACE selective inhibitor——lisinopril in anion conditions including NaBH as deoxidizer. 0.79 mg ACE protein was purified from 200 g hog lung homogenate by 1.6 ~ 2.6 mol/L ammonium sulfate fractionation, dialysis, buffer balance and affinity chromatography. The recovery of ACE activity was 11.9% with specific activity of 38.8 U/mg protein and the enzyme was purified 808 fold in comparison with the homogenate supernatant of hog lungs, specially, only one step of affinity chromatography, the enzyme was purified 264 fold. Purified ACE showed a single band after migrated identically in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and given an apparent molecular mass about 180 ku.

Key words affinity agarose preparation, purification, angiotensin-converting enzyme