استخراج و بهینه‌سازی تخلیص چند مرحله‌ای آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین I(ACE) از ریه خرگوش

سیدمحمد شفیعی I

***دکتر مهیندخت کیهانی** II

دکتر محمد شعبانی III

دکتر اسماعیل کوچکی شلمانی III

مهرانگیز کاویانی IV

چکیده

آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین I(ACE) یک پپتیدیل دی پپتید هیدرولاز است که ۲ اسید آمینه انتهای کربوکسیلی(His-Leu) را از آنژیوتانسین I که یک دکاپپتید است جدا کرده و آنژیوتانسین II(یک اکتاپپتید) را تولید می‌نماید. به علت اهمیت ACE و مهارکننده‌های آن در بیماری‌زایی و درمان بیماری‌های قلبی عروقی مانند فشار خون بالا و نارسایی قلبی، تخلیص و سنجش آن علاوه بر ارزش علمی دارای اهمیت بالینی و تجاری می‌باشد. با توجه به این مطلب، در مطالعه حاضر ACE از بافت ریه خرگوش به عنوان منبع غنی از ACE در ۳ مرحله خالص گردید. برای استخراج ACE، پس از عمل هموژن کردن، از دترژنت غیریونی Nonidet-P٤٠ استفاده شد سپس محلول استخراج شده از دترژنت، تحت عمل رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم با غلظت‌های اشباعی ۵۰٪ و ۷۰٪ قرار گرفت. در مرحله بعد محلول رویی به دست آمده توسط تبادل یونی با Q-Sepharose HP کروماتوگرافی شد سپس نمونه‌های دارای حداکثر فعالیت مخصوص آنزیم، توسط Sepharryl HR S۲۰۰ تحت کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون قرار گرفتند. پس از این مرحله خالص بودن آنزیم با SDS-PAGE و PAGE تایید شد و وزن مولکولی آن ۱۷۵ کیلودالتون تعیین گردید. فعالیت مخصوص نهایی به دست آمده برای ACE، ۳۹/۱ واحد در میلی‌گرم بود که به دنبال ٦٥١ برابر خالص‌کردن حاصل شده بود و بازده نهایی فرآیند تخلیص، ۵/۲٪ مشاهده شد. پس از تخلیص آنزیم، Km(michaelis constant) آن برای سوبسترای HHL(هیپوریل ـ هیستیدیل ـ لوسین)، ۲/۱۷ میلی‌مول محاسبه شد. مهار کننده رقابتی کاپتوپریل توانست در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۰۰۱ میلی مولار تقریباً ACE را به طور کامل مهار کند. PH اپتیمم برای ACE ۸/۳ محاسبه گردید. همچنین بررسی اثر تغییرات دمایی، کاهش شدید در فعالیت آنزیم را در دمای بالاتر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داد. کاهش مراحل تخلیص و مدت زمان لازم برای آن و نیز بازده مناسب به دست آمده، نتیجه استفاده از رزین‌های با قدرت تفکیک بهتر و به کار گیری سیستم FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) بود که در نهایت موجب بهبود و کاهش زمان فرآیند تخلیص چند مرحله‌ای ACE گردید.

کلیدواژه‌ها: ۱ – آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۲ – تخلیص چند مرحله‌ای ۳ – کروماتوگرافی ۴ – ریه

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان نامه سیدمحمد شفیعی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی به راهنمایی دکتر مهیندخت کیهانی و دکتر اسماعیل کوچکی شلمانی و مشاوره دکتر محمد شعبانی و مهرانگیز کاویانی، سال ۱۳۸۱.

I) کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران.

II) دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران.(*مولف مسئول)

III) استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران.

IV) کارشناس ارشد شیمی آلی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران.

مقدمه

آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسیون I(۱، ۱۵، ٤، ۳:EC) Angiotensin-converting Enzyme(ACE)، یک پروتئین با جرم مولکولی بالا حدود ۱۵۰،۰۰۰ دالتون، گلیکوزیله و انتگرال است که در سطح مجرایی غشای سلولی قرار گرفته است. ACE یک دی‌پپتیدیل کربوکسی پپتیداز بوده که عمل تبدیل یک دکاپپتید به نام آنژیوتانسین I(ANG I) را به یک اکتاپپتید به نام آنژیوتانسین II(ANG II) که نقشی اساسی در هموستاز قلبی ـ عروقی ایفا می‌کند، بر عهده دارد.

ACE عمل هیدرولیز برادی کینین که یک واسطه التهابی و پپتید گشاد کننده عروق و ناتریورتیک (natriuretic) و محرک قوی ساخته شدن نیتریک اکسید و پروستاگلاندین گشاد کننده عروق است را نیز کاتالیز می‌کند.[۲و ۳] هم‌چنین ACE می‌تواند پپتیدهایی مانند ماده P(Substance)، انکفالین و اندورفین را غیرفعال نماید. مهارکننده‌های مستقیم جای‌گاه فعال ACE، در درمان فشار خون سیستمیک و سکته قلبی احتقانی موثر هستند.[۱و ۲]

افزایش سرمی ACE در بیماری‌های گرانولوماتوز اولیه گزارش شده که سارکوییدوز مهم‌ترین آن‌ها است. ACE سرمی در گرانولوماتوزهای ریوی غیرسارکوییدی مانند سیلیکوزیس و آسبستوزیس، بیماری گوشه(Gusher's disease) و جذام نیز افزایش می‌یابد.[۳] هم‌چنین افزایش این آنزیم در دیابت ملیتوس گزارش شده است.[٤]

مقادیر سرمی این آنزیم در ناهنجاری‌های عمل‌کردی اندوتلیوم کاهش می‌یابد که در شیمی درمانی یا پرتودرمانی و بیماران مبتلا به سرطان دیده می‌شود.[۳] از آن‌جا که ACE از نظر زیست پزشکی و آسیب‌شناختی و نیز تحقیقات آنزیم‌شناسی دارای اهمیت قابل توجهی می‌باشد، تخلیص این آنزیم در مقیاس تولیدی و کاربردی با روش انجام شده در این پژوهش و به کار گرفتن آن در تهیه کیت‌های تشخیصی دقیق به روش ایمونواسی جهت اندازه‌گیری ACE در بیماری‌هایی که با آن در ارتباط هستند و مطالعه اثر داروهای جدید در مهار آن و بررسی‌های مولکولی مانند کریستالوگرافی و مطالعه دقیق‌تر ساختار مولکولی ACE با ارزش خواهد بود.

روش بررسی

این مطالعه که از نوع توسعه‌ای(Developmental study) بود، جهت افزایش کیفیت و سرعت تخلیص آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین صورت گرفت. نمونه مورد استفاده در این پژوهش ریه خرگوش بود. در ابتدا ۷ عدد خرگوش نر سالم، بدون هیچ گونه تیمار دارویی جهت این کار انتخاب شدند سپس ریه‌های جدا شده که در کل دارای وزنی معادل ٦۵/۹ گرم بودند خیلی سریع در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند.

در مرحله بعد بافت ریه منجمد که در یخ قرار داشت به قطعات کوچک‌تر تقسیم گردید. روش عمل بدین ترتیب بود که قطعات بافت ریه در ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر هموژناسیون (Tris-HCl ۲۰ میلی‌مول، pH=۷/۸ حاوی استات منیزیم ۵ میلی‌مول و کلرید پتاسیم ۳۰ میلی‌مول و سوکروز ۰/۲۵ مول) ریخته شد سپس توسط دستگاه هموژنایزر به مدت ۱/۵ دقیقه تحت عمل هموژناسیون قرار گرفت.

هموژنات بافتی پس از صاف شدن به مدت ۲ ساعت در سانتریفوژ یخچال‌دار در ٦۰۰۰g سانتریفوژ گردید و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب باقی مانده در ۱۵۰ میلی‌لیتر بافر پایه(Tris-HCl، ۱۰ میلی‌مول، pH=۷/۸) مخلوط شد و ۰/۷۵ میلی‌لیتر(۰/۵٪V/V) دترژنت Nonidet-P٤۰ به آن اضافه گردید سپس مخلوط ذکر شده به مدت ۳ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد توسط مگنت و استیرر هم زده شد.

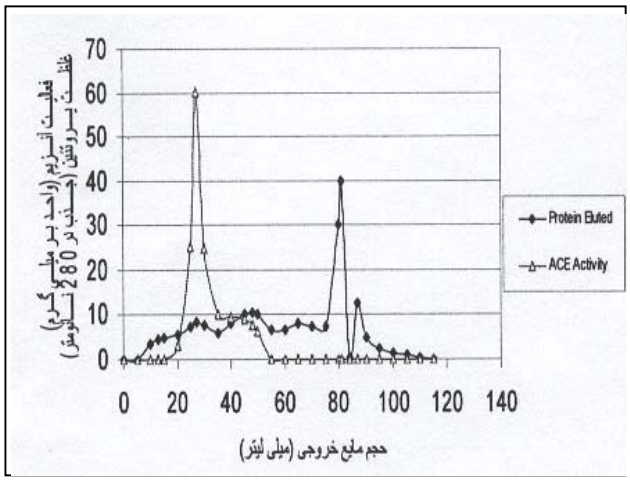
محلول به دست آمده دوباره در ٦۰۰۰g سانتریفوژ گردید و محلول رویی استخراج شده از دترژنت (دترژنت به کار رفته، ACE را از غشای سلول جدا کرده و به صورت محلول درمی‌آورد) توسط سولفات

آمونیوم رسوب داده شد. بدین منظور محلول به غلظت اشباعی ۵۰٪ از سولفات آمونیوم رسانده شد. پس از این مرحله، هموژنات در ۶۰۰۰g به مدت ۳۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی با دقت و بدون مخلوط شدن با رسوب جدا شد. مایع رویی سپس به ۷۰٪ درجه اشباع با سولفات آمونیوم رسانده شد و مراحل فوق برای این مرحله نیز صورت گرفت.

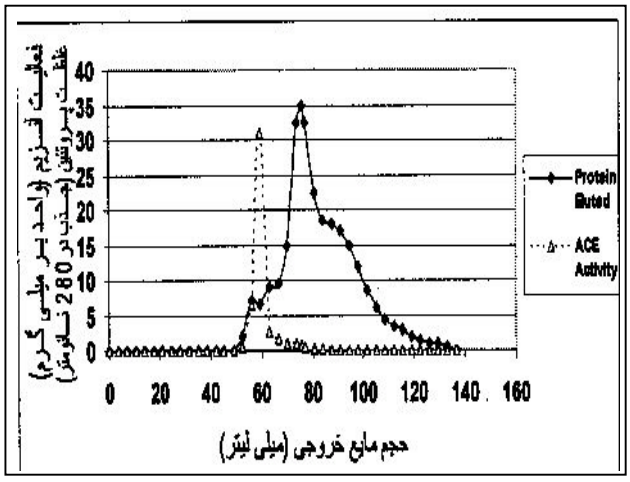
پس از عمل دیالیز جهت جدا کردن سولفات آمونیوم، نمونه مورد نظر با جریان برابر با ۱ میلی‌لیتر در دقیقه توسط پمپ روی ستون XK۲۶/۱۰ حاوی Q- سفارز برده شد. در مرحله بعد از یک سیستم ایجاد کننده شیب غلظت نمکی(Gradient Mixer) استفاده گردید. گرادیان میکسر در سمت خروجی حاوی بافر پایه، فاقد NaCl و در سمت دیگر حاوی بافر ذکر شده همراه با NaCl(۱M) بود. محتوای گرادیان میکسر با جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه توسط پمپ روی ستون برده شد که حاصل این شست‌وشو ۶ پیک بود.

تمام پیک‌های جمع‌آوری شده تحت عمل سنجش ACE به روش کوشمن و چونگ[۵] قرار گرفتند. فعالیت مخصوص (Specific Activity) آنزیم با اندازه‌گیری فعالیت آن و نیز اندازه‌گیری غلظت پروتئین برحسب میلی گرم برای هر پیک به دست آمد. اندازه‌گیری غلظت پروتئین با روش برادفورد(Bradford) صورت گرفت[۶] و فراکشنی که دارای بیش‌ترین مقدار فعالیت مخصوص ACE بود تعیین گردید(نمودار شماره ۱).

جهت غلیظ کردن نمونه به دست آمده از دستگاه Freeze Drier استفاده شد. نمونه توسط پمپ با جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه روی ستون ژل فیلتراسیون XK۱۶/۶۰ حاوی سفاکریل HR S-۲۰۰ فرستاده شده و پس از ثبت توسط رکوردر دستگاه، ٤ پیک حاصل شده در چندین فراکشن جمع‌آوری گردید سپس برای تمام فراکشن‌ها روش سنجش کوشمن و چونگ[۵] انجام شد و نمونه دارای حداکثر فعالیت مخصوص آنزیم تعیین گردید(نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱- کروماتوگرافی با Q-سفارز



نمودار شماره ۲- کروماتوگرافی با سفاکریل S-۲۰۰

اساس سنجش ACE با روش کوشمن و چونگ واکنش هیدرولیز سوبسترای سنتتیک هیپوریل ـ هیستیدیل ـ لوسین توسط ACE به اسید هیپوریک و هیستیدیل ـ لوسین و سپس اسپکتروفتومتری ماورای بنفش اسیدهیپوریک در ۲۲۸ نانومتر است و میزان اسیدهیپوریک تولید شده معیاری از فعالیت آنزیم می‌باشد.[۵]

سنجش فعالیت ACE برای هموژنات اولیه و سپس تمام مراحل تخلیص از جمله تمام فراکشن‌های به دست آمده به روش کروماتوگرافی ستونی انجام شد. برای انجام شدن الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید جهت تعیین میزان خالص بودن و وزن مولکولی ACE، از ۲ روش الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید استفاده گردید که عبارت بودند از:

الف) PAGE با سیستم بافری ناپیوسته تریس ـ گلایسین با ژل ۷/۵٪ ب)SDS-PAGE با ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰٪. بررسی Vmax و Km آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین خالص با استفاده از سوبسترای سنتتیک HHL انجام شد. روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری Vmax و Km تهیه رقت‌های متفاوت از HHL و اندازه‌گیری فعالیت ACE در این رقت‌ها و رسم منحنی لاین ویور ـ برک بود. جهت بررسی اثر مهارکنندگی کاپتوپریل رقت‌های ۰/۱ میلی‌مول، ۰/۰۱ میلی‌مول و ۱ میکرومول کاپتوپریل در نمونه آنزیمی خالص شده تهیه گردید سپس برای تمام نمونه‌ها، آزمون سنجش کوشمن و چونگ با غلظت ثابت HHL(۵ میلی‌مول) و یکسان بودن سایر شرایط صورت گرفت.

نتایج

در این مطالعه، تخلیص آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین I(ACE) به طور کلی در ۳ مرحله انجام شد و در نهایت آنزیم خالص شده که دارای فعالیت مخصوص و مناسب بود و نیز باند واحد در SDS-PAGE و PAGE مشاهده شد. مراحل تخلیص آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین I از مرحله عصاره خام سلولی تا مرحله ژل فیلتراسیون با Sephacryl S-HR۲۰۰ همراه با میزان پروتئین تام، فعالیت مخصوص آنزیم، مرتبه خالص سازی و بازده عمل در جدول شماره ۱ آورده شده است. نتایج PAGE و SDS-PAGE: در نمودار شماره ۳-الف نشان داده شده است. خط ۱ نمونه مربوط به عصاره خام بافت ریه، خط ۲ مربوط به نمونه

جدول شماره ۱- شمای مراحل تخلیص ACE

مرحله	غلظت پروتئین (میلی‌گرم در لیتر)	فعالیت ویژه (واحد بر میلی‌گرم)	مرتبه خالص‌سازی	بازده تخلیص(درصد)
هموژنات اولیه	۳۵/۹۲	۰/۰۶	۱	۱۰۰
استخراج شده از دترژنت	۲۲/۷۵	۰/۱۰	۱/۷	۸۰
رسوب‌دهی با سولفات آمونیم	٦/٤٧	۰/۳۸	٦/۵	٦٤
کروماتوگرافی با Q سفارز	۰/۹	۸	۱۳۳	۲۱
کروماتوگرافی با سفاکریل S-۲۰۰	۰/٤٦	۳۹/۱	٦۵۱	۵/۲

در کنار مجموعه نمونه‌های حاوی کاپتوپریل، ۱ نمونه بدون مهار کننده نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد سپس میزان فعالیت آنزیم برای تمام نمونه‌های حاوی کاپتوپریل و نمونه فاقد کاپتوپریل محاسبه و مقایسه گردید.

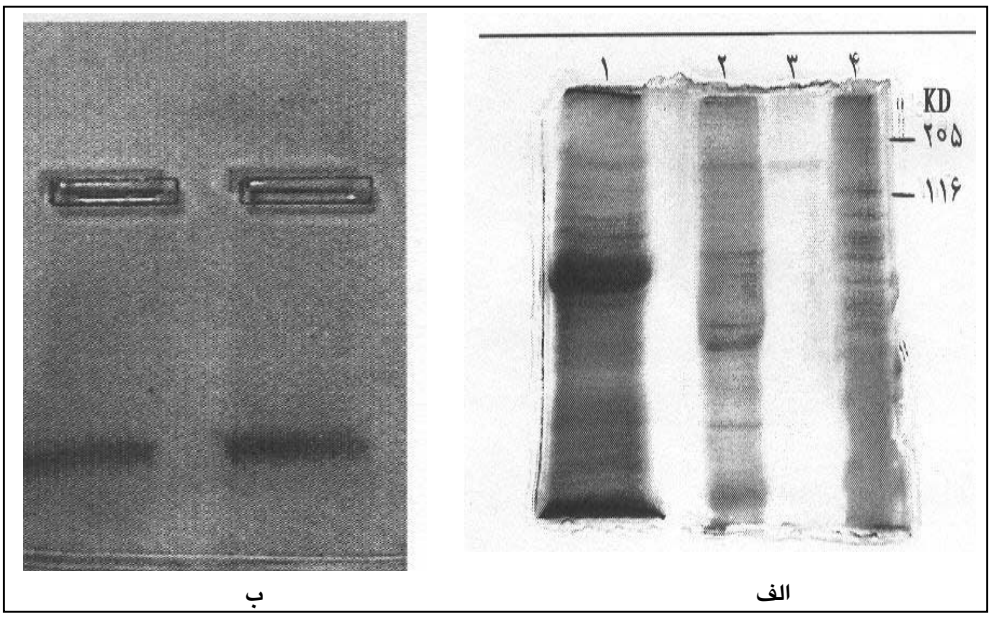
در بررسی اثر حرارت بر فعالیت ACE از ACE خالص شده در مرحله نهایی استفاده شد و فرآیند انکوباسیون در دماهای ۱۰، ۳۷، ۵۵و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه روی نمونه‌های جداگانه از ACE صورت گرفت و میزان فعالیت ACE در هر دما تعیین گردید. برای بررسی اثر تغییرات pH بر فعالیت ACE از بافر فسفات پتاسیم (K۲HPO٤/KH۲PO٤) به میزان ۱۰۰ میلی‌مول در pH ٦، ٦/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹و ۱۰ استفاده شد و میزان فعالیت ACE در هر یک از درجه‌های pH ذکر شده محاسبه گردید.

کروماتوگرافی تبادل یونی با Q-Sepharose HP، خط ۳ نمونه مربوط به مرحله نهایی تخلیص و خط ٤ مربوط به شاخص‌های وزن مولکولی است. خط ۳ تنها یک باند پروتئینی را نشان می‌دهد که بین شاخص‌های با وزن مولکولی ۲۰۵ و ۱۱٦ کیلودالتون قرار گرفته و مربوط به ACE می‌باشد و نشان دهنده تخلیص این آنزیم توسط فرآیند چند مرحله‌ای است. جهت تعیین وزن مولکولی باند پروتئینی خالص مشاهده شده در خط ۳، نمودار استاندارد از طریق محاسبه لگاریتم وزن مولکولی شاخص‌های پروتئینی با توجه به Rf به دست آمده در حرکت الکتروفورزی آن‌ها رسم گردید سپس وزن مولکولی ACE با توجه به این نمودار، ۱۷۵ کیلودالتون محاسبه شد. نمونه نهایی ACE خالص شده توسط PAGE(بدون دناتوره شدن) تحت عمل

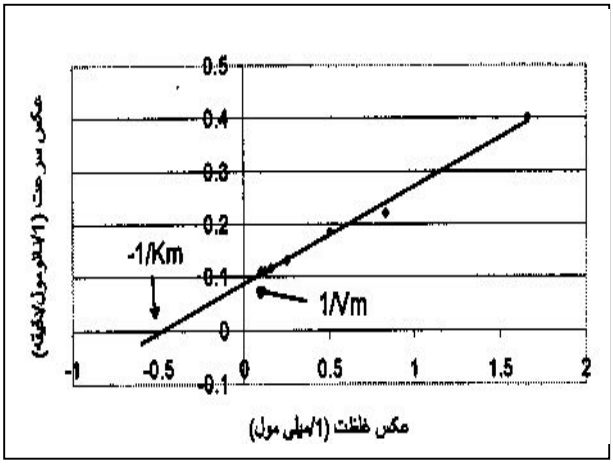
الکتروفورز قرار گرفت و همان طور که در نمودار ۳-ب مشاهده می‌شود، ۲ نمونه مربوط به دفعات متفاوت تخلیص، تنها یک باند پروتئینی را نشان دادند که نشان دهنده خالص بودن ACE در حالت طبیعی و غیردناتوره بود.

با توجه به نمودار شماره ٤، $\frac{1}{Vmax}$ و $-\frac{1}{Km}$ جهت بررسی کینتیک آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین به دست آمد سپس میزان Vmax برابر ۱۱/٤۸۱ نانومول در دقیقه و Km آنزیم برابر ۲/۱۷ میلی‌مول برای سوبسترای HHL محاسبه گردید.

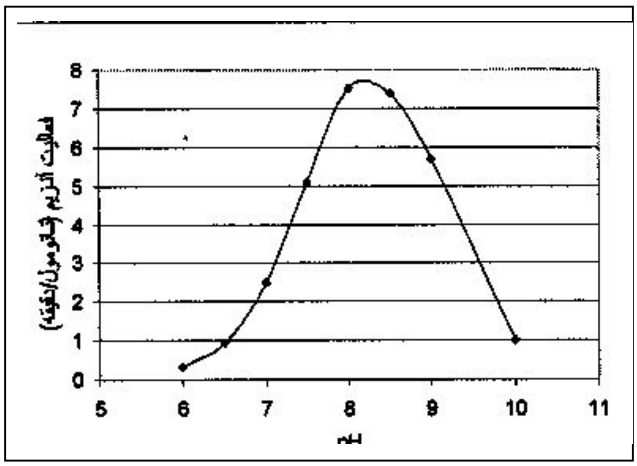
در رابطه با اثر مهار کننده رقابتی، نتایج نشان داد که کاپتوپریل در غلظت‌های ۰۱/۰۰۱، ۰/۰ و ۰/۱ به ترتیب به میزان ۹۸، ۹۸/۸ و ۹۹٪ سبب مهار ACE می‌گردد. در رابطه با اثر pH و تعیین pH اپتیمم همان طور که در نمودار شماره ٥ دیده می‌شود، ACE در محدوده pH ۸/٥-۸ حداکثر فعالیت را داشت. بررسی اثر تغییرات دما نشان داد (نمودار شماره ٦) که با افزایش دما به بیش از ۳۷ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت ACE به طور چشمگیری کاهش می‌یابد.



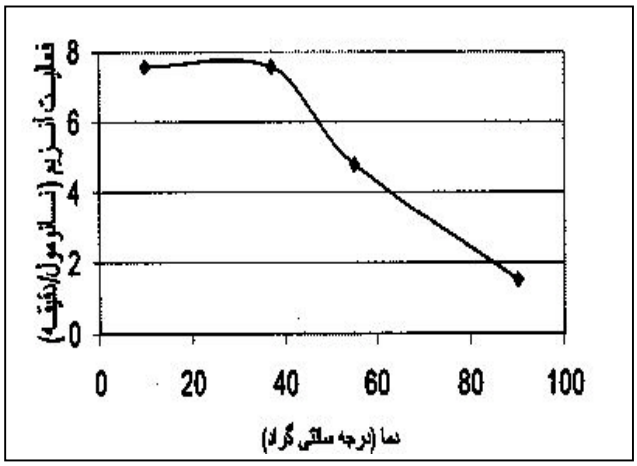
نمودار شماره ۳-الف: شمای الکتروفورز SDS-PAGE، **ب:** شمای الکتروفورز PAGE



نمودار شماره ۴- نمودار لاینویور ـ برک



نمودار شماره ۵- اثر تغییرات pH بر فعالیت ACE



نمودار شماره ۶- اثر تغییرات دما بر فعالیت ACE

بحث

در این پژوهش جهت تخلیص ACE در مراحل کروماتوگرافی از روش پیش رفته و سریع FPLC استفاده شد و این آنزیم طی ۳ مرحله اصلی که شامل رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی تبادل یونی با Q-Sepharose HP و ژل فیلتراسیون با Sephacryl S HR-۲۰۰ بود، خالص گردید. در مرحله استخراج از اثر دترژنت غیریونی Nonidet P۴۰ برای به حالت محلول در آوردن ACE و جدایی آن از غشا استفاده شد. از آن جا که این دترژنت قابلیت دیالیز شدن دارد در فرآیند سنجش و اندازه‌گیری فعالیت ACE و نیز کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون تداخلی ایجاد نمی‌کند.[۷]

در بعضی موارد از تریتون X-۱۰۰ به عنوان دترژنت استفاده می‌شد.[۸] این دترژنت قابل دیالیز شدن نیست و می‌تواند در سنجش و تعیین مقدار آنزیم و محاسبه بازده فرآیندهای تخلیص مشکل ایجاد کند. در بعضی موارد نیز از هضم تریپسینی برای جداسازی ACE از غشا استفاده گردید که در این حالت آنزیم فاقد توالی بخش غشایی می‌باشد.[۹] در کروماتوگرافی تبادل یونی از رزین Q-Sepharose HP که یک مبادله کننده قوی آنیونی است و کارایی بالایی نیز دارد استفاده شد.

بخش کاتیونی و مبادله کننده این رزین(Q) به پایه سفارز HP متصل شده است که نسبت به سفارز FF و سلولز، تفکیک(Resolution) بهتری ایجاد می‌کند.[۱۰] با توجه به فعالیت مخصوص به دست آمده برای ACE، این آنزیم در این مرحله نسبت به مرحله قبل(رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم) بیش از ۲۰ برابر خالص‌تر گردید بنابراین در بین مراحل تخلیص، کروماتوگرافی تبادل یونی بیش‌ترین اثر را داشته است. هم‌چنین ظرفیت یونی بالای این رزین اجازه بارگذاری حجم زیادی از نمونه را روی ستون می‌داد.[۱۱] در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون از رزین HR-۲۰۰ Sephacryl S جهت ژل فیلتراسیون استفاده شد که تفکیک (resolution) بالاتر و بهتری نسبت به رزین‌های ژل فیلتراسیون از جنس سفادکس و قابلیت استفاده جهت خالص کردن در مقیاس آزمایشگاهی و تولیدی را داشت.[۱۲]

با وجود آن که انجام شدن کریستالوگرافی به روش پراکندگی اشعه X جهت شناخت دقیق ساختار ACE ضروری می‌باشد، به علت مشکل بودن تخلیص این آنزیم و تهیه مقادیر لازم، این عمل هنوز امکان‌پذیر نشده است. اگر چه کریستالوگرافی ایزوزیم بیضه‌ای ACE که به طریق نوترکیب تهیه می‌شود اخیراً انجام شده است[۱۲و ۱۳] و شیوه اتصال لیزیتوپریل(یکی از مهارکننده‌های ACE) به آن ارائه گردیده[۱۴] و نیز ۲ نوع هموگ ACE در دروزوفیلا (Drosophila) کریستالوگرافی شده است(تا ۴۲٪ تشابه توالی با ACE بیضه‌ای دارند)،[۱۵] هنوز ساختار ACE از منابع انسانی از طریق کریستالوگرافی با اشعه X تعیین نگردیده است.

در این تحقیق ACE در مقایسه با گزارش‌های مشابه قبلی، با فعالیت مخصوص نهایی مناسب و قابل قبولی (۳۹/۱units/mg) خالص شد.[۱۶] اگر چه بازده عمل (۵/۲٪) نسبت به روش‌های کروماتوگرافی میل ترکیبی پایین‌تر بود، این روش‌ها جهت تخلیص ACE در مقادیر زیاد و بررسی‌های انجام شده به دنبال آن فاقد ارزش می‌باشد.[۱۶]

ذکر این نکته لازم است که روش انجام شده در این تحقیق در مقیاس آزمایشگاهی بود اما با توجه به خصوصیات ذکر شده در کارآیی رزین‌های مورد استفاده و ارجحیت روش

چنـد مرحلـه‌ای بر کروماتوگرافی میل ترکیبی، انجـام شـدن آن در مقیـاس تولیـدی جهـت مطالعـات بعـدی پیشـنهاد می‌گردد.

منابع

1- Brew K. Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. TRENDS Pharmacol Sci 2003 Aug; 24(8): 391-4.

2- Oparil S, Meng QC, Sun SD, Chen YF, Dell'Italia LJ. Cardiovascular diseases In: Birmingham E, Editor. Vascular endothelium: Responses to Injury. 1st ed. Newyork: Plenum press; 1996. P. 205.

3- Baudin B. New aspect on angiotens in converting enzyme: from gene to disease. Clin Chem Lab Med 2002; 40(30): 256-65.

4- Nicola W, Sidhom G, El Kyyat Z, Ibrahim S, Salah A, El Sayed A. Plasma angiotensin II, renin activity and serum angiotensin converting enzyme activity in non-insulin dependent diabetes mellitus patients with diabetic nephropaty. Endocr J 2001 Feb; 48(1): 25-31.

5- Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol 1971 Jul; 20(7): 1637-48.

6- Harris ELV, Angel S. Protein purification methods. 1st ed. oxford: Oxford university press, 1990. P. 14-5.

7- Bull HG, Thornberry NA, Cordes EH. Purification of angiotensin converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography. J Biol Chem 1985 Mar 10; 260(5): 2963-72.

8- Erickson RH, Suzuki Y, Sedlmayer A, Song IS, Kim YS. Rat intestinal angiotensin converting enzyme: Purification, properties, expression, function. Am J Physiol 1992 Oct; 263(4 Pt 1): G466-73.

9- Friedland J, Silverstein E, Drooker M, Setton C. Human lung angiotensin converting enzyme. Purification and antibody preparation. J Clin Invest 1981 Apr; 67(4): 1151-60.

10- Harris ELV, Angel S. Protein purification methods. 1st ed. oxford: Oxford University Press; 1990. P. 204-8.

11- Harris ELV, Angel S. Protein purification methods. 1st ed. oxford: Oxford University Press; 1990. P. 295-8.

12- Natesh R, Schwager SLU, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the human angiotensin converting enzyme lisinopril complex. Nature 2003; 421: 551-4.

13- Gordon K, Redelinghuys P, Schwager SL, Ehlers MR, Pagageorgiou AC, Natesh R, et al. Deglycosylation processing and crystallization of human testis angiotensin converting enzyme. Biochem J 2003, 15; 371(Pt 2): 437-42.

14- Brew K. Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. Trends Pharmacol Sci 2003; 24(8): 391-4.

15- Kim HM, Shin DR, Yoo OJ, Lee H, Lee JO. Crystal structure of drosophila angiotensin I-converting enzyme bound to captopril and lisinopril. FEBS Lett 2003; 13; 538(1-3): 65-70.

16- Meng QC, Oparil S. Purification and assay methods for angiotensin converting enzyme (Review). J Chromatogr A 1996; 743: 105-22.

Extraction and Development of Multi-Step Purification of Angiotensin-I Converting Enzyme(ACE) from Rabbit Lung

S.M. Shafiee, MSc [I] ****M. Keyhani, Ph.D.*** [II] ***M. Shabani, Ph.D.*** [III]
I. Koochaki Shalmani, Ph.D. [III] ***M. Kaviani, MSc*** [IV]

Abstract

Angiotensin-converting enzyme(ACE)(EC: 3.4.15.1) is a peptidyl dipeptide hydrolase that removes the carboxyl terminal (His-Leu) from angiotensin I to produce the octapeptide angiotensin II. Due to the importance of ACE and its active site-directed inhibitors in the pathogenesis and treatment of cardiovascular disorders such as hypertension and heart failure, ACE purification and assay are of clinical and commercial as well as scientific interest. In the present study it was attempted to purify ACE faster and simpler. Purification procedure was finally performed in three steps. After homogenization and centrifugation, ACE was solubilized from pellet using Nonidet-P40, a non-ionic detergent. The supernatant solution brought to 50% and 70% saturation concentration of ammonium sulfate. After ammonium sulfate precipitation, the supernatant solution was used to purify ACE by Q-Sepharose HP as a strong anion exchanger and then by Sephacryl HR S200(gel filtration). After these steps, ACE purification was confirmed by PAGE and SDS-PAGE. The molecular weight found for ACE was 175 KD. Final specific activity was 39.1 units/mg which was achieved through 651 fold purification and the activity recovered was 5.2%. After purification, Km of ACE for Hippuryl-Histidyl-Leucine, a synthetic substrate, was 2.17 mM. Concentrations between 0.001-0.1mM of Captopril, a competitive inhibitor, inhibited ACE almost completely. Optimal pH determined for ACE activity was 8.3. Incubation temperature above 37^{oc} decreased ACE activity remarkably. ACE purification in three steps(previously often in 5 steps), a decrease in purification steps, procedure time and expenditure and also acceptable activity and yield, were all due to using resins with high resolution and also FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) system which, finally, facilitated the chromatographic procedures.

Key Words: 1) Angiotensin Converting Enzyme 2) Multi-Step Purification 3) Chromatography 4) Lung

---

The present article is a summary of the thesis by S.M. Shafiee for MSc degree in Biochemistry under supervision of M. Keyhani, Ph.D. and I. Koochaki Shalmani, Ph.D. and consultation with M. Shabani, Ph.D. and M. Kaviani, MSc, (2002).

***I*)** *MSc in Biochemistry. School of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

***II*)** *Associate Professor of Clinical Biochemistry. School of Paramedicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*

***III*)** *Assistant Professor of Biochemistry. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

***IV*)** *MSc in Organic Chemistry. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*