出酶法提取的最佳条件：以酶料比 40∶1 加入槐米干粉中，在 pH 7.0、温度 20 ℃下，酶解处理 1 h 后，总黄酮提取率可达 11.4%，比常规提取率增加了 28.7%。使用微生物粗酶辅助法是中药材提取的新方法，值得进一步探讨和进行工艺优化。

参考文献：

[1] Schulz B, Boyle C, Draeger S, *et al*. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites [J]. *Mycol Res*, 2002, 106: 996-1004.

[2] 史 央，戴传超，陆 玲，等. 大戟科 4 种药用植物内生真菌 3 种胞外酶活性的比较[J]. 植物资源与环境学报，2002，11：17-20.

[3] Wang J W, Wu J H, Huang W Y, *et al*. Laccase production by *Monotospora* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* [J]. *Biores Technol*, 2006, 97: 786-789.

[4] 王宜磊. 高酶活菌株的筛选及漆酶特性[J]. 微生物学杂志，2004，24：11-13.

[5] 朱明旗，曹支敏，李振歧. 栓菌属高产漆酶菌株的筛选及其发酵产酶条件研究初报[J]. 中国农学通报，2006，22：119-121.

[6] 王宜磊，朱 陶. 漆酶高产菌株的筛选及产酶条件研究[J]. 生态学杂志，2002，21：27-29.

[7] 廖华卫，李瑞珍，黄敏仪. 槐花米中药用有效成分芦丁提取方法研究[J]. 现代食品与药品杂志，2006，16：73-75.

[8] 王佳玲，余惠生，付时雨，等. 白腐菌漆酶的研究进展[J]. 微生物学通报，1998，25：233-236.

[9] 蔡伟建，李 峰，李济吾. 镰刀菌（*Fusarium* sp.）HJ01 对中性艳蓝 GL 的脱色降解特性研究[J]. 环境科学学报，2007，27：213-220.

[10] Wang J W, Zhang Z, Tan R X. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23: 857-860.

[11] 陈学伟，马书林. 酶法提取黄芪多糖的研究[J]. 上海中医药杂志，2005，39：56-58.

[12] 王 邕，黎海彬，白先放，等. 酶解-溶剂法提取罗汉果中黄酮类物质的研究[J]. 食品科技，2006，31：125-127.

苦瓜籽 MAP30 的聚乙二醇化学修饰条件优化及纯化研究

张永明，刘盛邦，黄 凯，聂 宇，孟延发*

（四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室，四川 成都 610064）

摘 要：目的 探讨聚乙二醇修饰苦瓜籽核糖体失活蛋白（MAP30）的反应条件以及修饰产物的纯化方法。**方法** 在不同条件下，将聚乙二醇活性酯（mPEG）$_2$-NHS 与 MAP30 反应，用 SDS-PAGE 分析不同反应条件对产物成分的影响；采用 Sephacryl S-300 HR 分子筛柱色谱法对修饰产物进行分离纯化，TNBS 法测定目标产物 PEG-MAP30 的氨基修饰度。**结果** 聚乙二醇修饰 MAP30 的最优反应条件为 4 ℃，pH 8.5 硼酸硼砂缓冲液，MAP30 质量浓度 1 mg/mL，MAP30 与（mPEG）$_2$-NHS 质量比 1∶10 为最佳修饰条件，5 min 内反应完全；反应产物进一步纯化，经 SDS-PAGE 检测目标产物 PEG-MAP30 中不含未修饰的 MAP30；TNBS 法测定 MAP30 的氨基修饰度为 44.9%。**结论** 初步确定了聚乙二醇修饰 MAP30 的反应条件和修饰产物的纯化方法。

关键词： 苦瓜籽；核糖体失活蛋白（MAP30）；聚乙二醇；化学修饰

中图分类号： R284.2；R286.02 **文献标识码：** A **文章编号：** 0253-2670(2008)11-1640-04

Modification conditions optimization and purification of PEGylated MAP30 from *Semen Momordicae Charantiae*

ZHANG Yong-ming, LIU Sheng-bang, HUANG Kai, NIE Yu, MENG Yan-fa

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Objective To explore conditions for the modification of MAP30 from *Semen Momordica Charantiae* with polyethylene glycol (PEG) and the method for the purification of PEG-MAP30. **Methods** To analyze the influence of various conditions on the components of PEG-MAP30 by SDS-PAGE, purify PEG-MAP30 by Sephacryl S-300 HR molecular sieve column chromatography, and detect the modification rate of amino by TNBS under the optimal reaction condition with the reaction of (mPEG)$_2$-NHS and MAP30. **Results** Temperature 4℃, boric acid-borax buffer with pH 8.5, concentration of MAP30 1 mg/mL, the mass ratio of MAP30 to (mPEG)$_2$-NHS (1∶10), and, 5 min for reaction time were selected as the optimal reaction condition. Molecular sieve column showed a good purification effect. The

收稿日期：2008-04-07

基金项目：国家自然科学基金资助项目（C01020404）

作者简介：张永明（1982－），男，河南新乡人，硕士研究生，2005 年毕业于河南师范大学生命科学学院，研究方向为蛋白质工程与酶工程。E-mail：dongxie110@tom.com

*通讯作者 孟延发 E-mail：yfmeng@163.net

万方数据

modification rate of amino was 44.9% tested by TNBS under the optimal reaction condition. **Conclusion** The factors influencing the modification of MAP30 with PEG are determined, and a purification method for PEG-MAP30 is developed.

Key words: *Semen Momordicae Charantiae*; momordica anti-HIV protein of 30 kDa (MAP30); polyethylene glycol (PEG); chemical modification

MAP30 (maomordica anti-HIV protein of 30 kDa) 是从苦瓜籽中提取的一种相对分子质量为 3.0×10^4 的蛋白质，具有 *N*-糖苷键活性，破坏 DNA 拓扑结构以及抑制 HIV-1 整合酶的活性[1]。MAP30 可以特异性地抑制肿瘤细胞和受病毒感染的细胞，诱发其凋亡，对正常细胞却没有不良反应[1,2]。但是作为一类外源蛋白，MAP30 注射时容易引起体内的免疫反应，体内半衰期较短，限制了它在临床上的应用。聚乙二醇 (PEG) 是一种两亲性聚合物，是一种具有较好生物相容性的高分子化合物，对人体无毒性。PEG 本身无免疫原性和蛋白酶识别位点，其修饰蛋白质会因掩盖某些抗原决定位点而降低 PEG 化蛋白药物的免疫原性[3]，也可能封闭蛋白酶作用位点而保护蛋白质不被降解[4]。相对分子质量的增大会降低肾小球的清除速率，增加药物在体内循环半衰期，从而提高药物的生物利用度[5,6]。目前 PEG 修饰的腺苷脱胺酶和天冬酰胺酶已获批准上市[7]。本研究采用 $(mPEG)_2$-NHS (*N*-hydroxysuccinimide-PEG_2) 修饰 MAP30，进行 PEG 修饰条件筛选、修饰产物分离纯化及部分性质研究，为 MAP30-PEG 研制开发提供一定的依据。

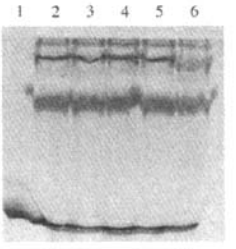
1 材料

Mini Ⅰ型电泳仪 (Bio-Rad)；MAP30 参照文献报道制得[1]；$(mPEG)_2$-NHS (Mr 20 000)，Shearwater 公司产品；Sephacryl S-300 HR，Pharmacia 公司产品；MW Calibration Kit (Hou-Bio)；其余试剂均为国产或进口分析纯。

2 方法与结果

2.1 修饰条件的优化

2.1.1 修饰反应进程分析：温度 4 ℃条件下，MAP30 终质量浓度采用 1 mg/mL，MAP30 与 PEG 活性酯按质量比 1∶10 进行反应，即 1 mL 反应体系中加入 10 mg PEG 活性酯进行反应。修饰反应进行 10 s、5、10、15、20、30 min 后分别取样 40 μL 加入到装有 40 μL 1 mol/L Gly 的 EP 管中中止反应。分别取样进行 SDS-PAGE。结果显示 5、10、15、20、30 min 所取样品的组成无明显差别，表明至少在 5 min 内已反应完全，见图 1。



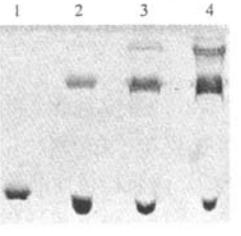
1～6-反应时间为 10 s、5、10、15、20、30 min

1－6-reation time: 10s, 5, 10, 15, 20, and 30 min

图 1 不同反应时间 PEG 修饰 MAP30 的反应进程分析

Fig. 1 SDS-PAGE of MAP30 reaction by PEG modification at various reaction times

2.1.2 MAP30 与 PEG 活性酯比例对修饰反应的影响：温度 4 ℃条件下，MAP30 终质量浓度采用 1 mg/mL，分别按 MAP30 与 PEG 活性酯的质量比 1∶2、1∶5、1∶10 进行修饰反应，即 3 个 1 mL 反应体系中分别加入 2、5、10 mg PEG 活性酯，反应 30 min，取样进行 SDS-PAGE。结果显示，随着 PEG 活性酯与 MAP30 质量比的增加，MAP30 带所占比例逐渐下降，PEG-MAP30 带比例逐渐上升，并且出现更高修饰度的条带，见图 2。



1-MAP30 2～4-MAP30 与 $(mPEG)_2$-NHS 的质量比为 1∶2、1∶5、1∶10

1-MAP30 2－4-mass ratios of MAP30 to $(mPEG)_2$-NHS 1∶2, 1∶5, and 1∶10

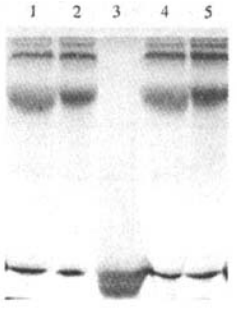
图 2 MAP30 与 $mPEG_2$-NHS 质量比对修饰反应的影响

Fig. 2 SDS-PAGE of modification reaction at various mass ratios of MAP30 to $(mPEG)_2$-NHS.

2.1.3 MAP30 蛋白质量浓度以及缓冲液对修饰反应的影响：温度 4 ℃条件下，MAP30 终质量浓度采用 1、2 mg/mL，缓冲体系为 pH 8.5 50 mmol/L 磷

万方数据

酸盐和硼酸硼砂缓冲液，按质量比 1∶10 加入 PEG 活性酯，即 1 mL 蛋白质量浓度为 1 mg/mL 的反应体系中，加入 10 mg PEG 活性酯；1 mL 蛋白质量浓度为 2 mg/mL 的反应体系中，加入 20 mg PEG 活性酯，反应 30 min。取样进行 SDS-PAGE。结果显示，在两种缓冲液中，蛋白质量浓度 1 mg/mL 的修饰效果皆比 2 mg/mL 略好，同时磷酸盐缓冲液比硼酸硼砂的修饰效果略差，见图 3。



1，2-磷酸盐缓冲液 3-MAP30
4，5-硼砂硼酸缓冲液
1，2-phosphate buffer 3-MAP30
4，5-boric acid-borax buffer

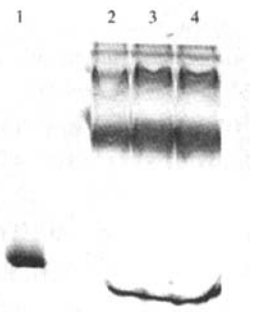
图 3 不同 MAP30 质量浓度及缓冲液对修饰反应的影响

Fig. 3 SDS-PAGE of modification reaction at different MAP30 concentration and buffers

2.1.4 温度对修饰反应的影响：MAP30 分别置于 4、12、25 ℃预冷或恒温 10 min，按质量比 1∶10 加入 PEG 活性酯，即 1 mL 反应体系中加入 10 mg PEG 活性酯，反应 30 min。取样进行 SDS-PAGE。经 SDS-PAGE 分析，在 3 种温度（4、12、25 ℃）下修饰反应产物相对比无明显差别，表明温度对修饰反应影响不大，见图 4。

2.2 PEG-MAP30 的分离纯化：采用 Sephacryl S-300 HR 分子筛柱色谱，以 pH 7.0，含 0.15 mol/L NaCl 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液为流动相，收集各洗脱峰。MAP30 通过自由氨基与 PEG 以稳定的酰胺键共价结合成 PEG 化 MAP30，即 MAP30-PEG，同时 $(mPEG)_2$-NHS 上的官能团 N-羟基琥珀酰亚铵（*N*-hydroxysuccinimide，NHS）脱落。经 Sephacryl S-300 HR 分子筛柱色谱纯化，得到 3 个洗脱峰，SDS-PAGE 分析显示保留时间最短的为 MAP30-PEG，其次为未反应的 MAP30，最后是修饰反应的另一个产物 NHS。见图 5。

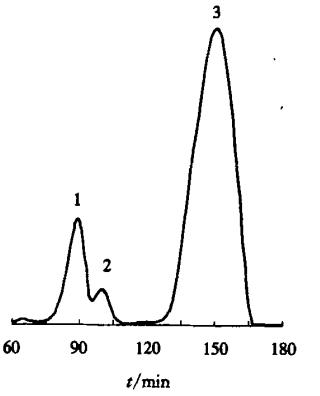
2.3 蛋白凝胶电泳（SDS-PAGE 法）：以 10%或 12%分离胶和 4%浓缩胶进行 SDS-PAGE 测定，考



1-MAP30
2～4-反应温度 4、12、25 ℃
1-MAP30
2－4- reaction temperatures 4，12，and 25 ℃

图 4 不同反应温度对修饰反应的影响

Fig. 4 SDS-PAGE of modification reaction at different temperatures



1-PEG-MAP30 2-MAP30 3-NHS

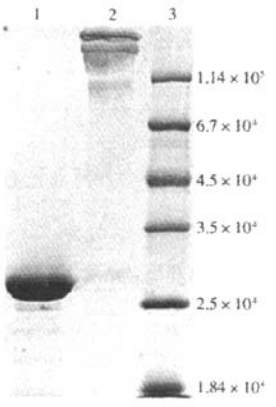
图 5 Sephacryl S-300 HR 分子筛色谱分离纯化 MAP30-PEG

Fig. 5 Purification of MAP30-PEG by Sephacryl S-300 HR molecular sieve chromatography.

马斯亮蓝 R-250 染色后，脱色液脱色至背景近无色。经过分子筛色谱分离后，由于 MAP30-PEG 与 MAP30 的洗脱峰未完全分开，为了保证 PEG-MAP30 的质量分数，弃去了 PEG-MAP30 洗脱峰后面的一小部分，见图 6。

2.4 MAP30 氨基修饰度的测定：蛋白的测定采用 BCA 法[8]。采用 TNBS 法测定 MAP30 氨基修饰度。用紫外（UV）吸收法调节 MAP30 和 MAP30-PEG 到相同蛋白质量浓度，分别取 200 μL 加入 5 μL 0.001 g/mL TNBS 溶液，避光反应 1 h 后测定 420 nm 处吸光度值，以 0.1 mol/L pH 8.5 的硼酸缓冲液为对照，测定 420 nm 吸光度值，计算 MAP30 的修饰度[修饰度 $=(A_{MAP30}-A_{MAP30\text{-}PEG})/A_{MAP30}$]。计算得氨基修饰度为 44.9%，说明 MAP30 分子中 44.9%

万方数据



1-MAP30 2-MAP30-PEG 3-Marker

图 6 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤色谱分离纯化 MAP30-PEG

Fig. 6 Purification of PEG-MAP30 by Sephacryl S-300 HR gel filtration chromatography

的氨基结合了 PEG。每个 MAP30 分子中含有 15 个赖氨酸残基，由此可推断出每个 MAP30 分子上平均结合了约 7 个 PEG。

2.5 体外抑制肿瘤细胞生长活性测定：正常人胚肺细胞和人白血病细胞 K562、人肝癌细胞、3T3、小鼠黑色素瘤 B16 分别在含 10% 小牛血清的 Nissui-1640 培养基（pH 7.0～7.2）和 Nissui-MEM 培养基（pH 7.0～7.2）中，于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长期细胞，用培养液调整细胞浓度至 5×10^4/mL，用此细胞液将样品 MAP30 和 MAP30-PEG 稀释至不同质量浓度。每孔 150 μL，3 个复孔。阴性对照加放线菌酮（终质量浓度 0.05 μL/mL），阳性对照孔中加入细胞液。培养 48、72、96 h 后加入 MTT（25 μL/孔），继续培养 4 h，倾去上清液，加入二甲基亚砜（150 μL/孔），用酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度值。在本实验条件下，经纯化的 MAP30 和 MAP30-PEG 对供试的几种肿瘤细胞株均表现出不同程度的抑制生长作用，与熊术道等报道结果相似[9]。其中 MAP30-PEG 的活性回收率较高，详细数据及结果将连同专利另发表。

3 结论

影响 $(mPEG)_2$-NHS 修饰 MAP30 反应的因素为 MAP30 与 PEG 活性酯的比例，MAP30 蛋白质量浓度和温度不是主要因素。因此，修饰反应的条件设计为蛋白质量浓度 1 mg/mL，4 ℃，pH 8.5 硼酸缓冲液反应体系，MAP30 与 PEG 活性酯质量比为 1∶10，反应 5 min 即可。

由于蛋白质在 PEG 修饰前后的等电点和分子大小发生改变，修饰反应混合物的分离纯化可选择离子交换或分子筛色谱。本研究中使用的 PEG 活性酯相对分子质量相对较大，MAP30 修饰前后的相对分子质量相差较大，使用 Sephacryl S-300 HR 分子筛色谱能较好地分离 MAP30-PEG，并且能彻底地去除相对分子质量较小的反应副产物 NHS 和交换缓冲体系。故本研究采用分子筛柱纯化修饰反应混合物。

分离得到的样品 MAP30-PEG 对肿瘤细胞有选择性的毒性作用，对正常二倍体细胞毒性极小，为其在临床方面的应用提供了一定的依据。

参考文献：

[1] Lee H S, Huang P L, Nara P L, *et al*. MAP30: a new inhibitor of HIV infection and replication [J]. *FEBS Lett*, 1990, 272(1,2): 12.

[2] Huang P L, Sun Y, Chen H C, *et al*. Proteolytic fragments of anti-HIV and anti-tumor proteins MAP30 and GAP31 are biologically active [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262 (3): 615-623.

[3] Katre N V. Immunogenicity of recombinant IL-2 modified by covalent attachment of polyethylene glycol [J]. *J Immunol*, 1990, 44: 209-213.

[4] Monfardini C, Schiavon O, Caliceti P, *et al*. A branched monomethoxypoly (ethylene glycol) for protein modification [J]. *Bioconjug Chem*, 1995, 6: 62-69.

[5] Freey R E. Chemical modification of proteins: comments and perspectives [J]. *Int Pept Protein Res*, 1987, 29: 145-158.

[6] Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly (ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice [J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83: 601-606.

[7] Veronese F M, Harris J M. Introduction and overview of peptide and protein pegylation [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 453.

[8] Kozlowski A, Harris J M. Some recent developments in the chemical modification of proteins with a note on applications to biopharmaceuticals [J]. *J Controlled Release*, 2001, 72: 217-225.

[9] 熊术道，尹丽慧，李景蓉，等. 苦瓜籽 RIP 的分离纯化及其对 K562 细胞作用的研究 [J]. 中华中医药学刊，2007，25(1)：81-84.

万方数据