

## 苦瓜籽 MAP30 酶活性试验研究

冷 波 吴 宇 谭诗珂

(成都产品质量检验研究院有限责任公司 四川 成都 610100)

**摘 要** 建立一种快速、高效检测 MAP30 酶活性的方法,并初步研究其部分生物活性。利用 MAP30 能以 PET28aDNA 为底物并脱去一些腺嘌呤碱基使超螺旋 DNA 解旋的特点,建立了测定 MAP30 酶活性的一种新方法,检测 MAP30 的酸碱和温度酶活性。MAP30 灵敏度 1  $\mu\text{g}$ , 酶催化反应的时间是 30 min。最适温度和 pH 值是 37  $^{\circ}\text{C}$  和 8.0。不同 pH 值环境对 MAP30 特性的影响是不同的,酸性越强或碱性越强对 MAP30 的影响越大。不同温度值环境对 MAP30 特性的影响是不同的,温度越高 MAP30 活性损失。因此,合适的酸碱和温度为广泛和深入地研究 MAP30 酶活性提供了有利的条件。

**关键词** MAP30; 不同保温时间; 超螺旋质粒 DNA; pH; 酶活性灵敏度; 温度

中图分类号 Q5 文献标志码 A 文章编号 1005-8915(2016)01-0052-03

苦瓜(*Momordica charntia*)是葫芦科苦瓜属的一年生蔓性草本植物,果实中的一些活性蛋白成分是通过专一修饰核糖体进而抑制蛋白质生物合成蛋白毒素的大亚基<sup>[1-2]</sup>。MAP30(*Momordica anti-HIV protein of 30 k*)是1990年Lee-Huang等<sup>[3]</sup>首次从苦瓜果实和种子中分离得到的单链核糖体失活蛋白<sup>[4]</sup>。MAP30具有与其他核糖体失活蛋白相似的生物活性,在体外具有N-糖苷酶活性,破坏DNA拓扑结构的活性,以及具有广谱抗肿瘤、抗病毒作用,可抑制肿瘤细胞的增殖,诱发肿瘤细胞凋亡,但对正常细胞无不良反应<sup>[5-8]</sup>。故MAP30是一种非常有效的抗病毒抗肿瘤植物成分。本文报道的工作,是以常见的质粒DNA为底物,根据核糖体失活蛋白(RIP)脱去一些腺嘌呤碱基后的超螺旋DNA能解旋为缺刻和线状DNA,降解为小片段的原理,建立了一种测定RIP酶活性的新方法<sup>[9]</sup>,有利于广泛和深入地开展对RIP的研究。

## 1 仪器与材料

MiniII型电泳仪(Bio-Rad公司);苦瓜籽(成都蜀信种业有限公司);UV-2102紫外分光光度计(UNICO公司);PET28aDNA、DL2000DNA Marker(Takara公司);柱式质粒DNA OUT(北京天恩泽基因科技有限公司);其余试剂为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 超螺旋DNA的提取

取含有质粒PET28aDNA转化的*Escherichia coli* BL21(DE3)至LB培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养12~16 h(转速200~300 r/min)达到指数生长期,质粒DNA通过柱式质粒

DNA OUT获得。

### 2.2 以质粒PET28a DNA为底物测定MAP30的酶活性

取质粒PET28a DNA(0.5  $\mu\text{g}$ )分别与5.0  $\mu\text{g}$ 的MAP30在10  $\mu\text{L}$ 缓冲液A(10 mmol/L Tris/HCl 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 50 mmol/L NaCl, pH 7.5), 37  $^{\circ}\text{C}$ 保温30 min后,加2  $\mu\text{L} \times 6$  of loading solution (30% Ficoll, 200 mmol/L EDTA, 0.25% Bromophenol blue 和 0.25% xylene cyanol FF)。1%琼脂糖凝胶电泳分析。

### 2.3 不同保温时间对MAP30作用于PET28a DNA的影响

取质粒PET28a DNA(5.0  $\mu\text{g}$ )溶于100  $\mu\text{L}$ 缓冲液A,加入50  $\mu\text{g}$  MAP30, 37  $^{\circ}\text{C}$ 保温,开始时立即取样10  $\mu\text{L}$ 记为0时样品,以后分别在保温5, 10, 15, 20, 25, 30 min时取样,取出的样品立即放入-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待分析。待取样过程全部结束后用1%琼脂糖凝胶电泳分析。

### 2.4 检测MAP30酶活性的灵敏度

取质粒PET28a DNA(0.5  $\mu\text{g}$ )与不同量的MAP30(0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0  $\mu\text{g}$ ) ,在10  $\mu\text{L}$ 缓冲液A中于37  $^{\circ}\text{C}$ 保温30 min后,用1%琼脂糖凝胶电泳分析。

### 2.5 不同的pH值对RIP作用于PET28a DNA的影响

取质粒PET28a DNA(0.5  $\mu\text{g}$ )与5  $\mu\text{g}$  MAP30分别在不同pH缓冲液[0.1 mol/L sodium citrate buffer (pH 5.3~6.0), 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.0~7.5), 0.1 mol/L Tris/HCl buffer (pH 7.0~9.0)] pH值9~11的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液中进行反应, 37  $^{\circ}\text{C}$ 保温30 min后, 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

### 2.6 不同的温度对MAP30作用于PET28a DNA的影响

取质粒PET28a DNA(5.0  $\mu\text{g}$ )溶于100  $\mu\text{L}$ 缓冲液A,

收稿日期: 2015-01-30

修回日期: 2015-12-10

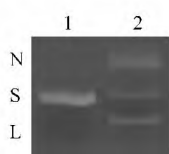
作者简介: 冷波(1985-), 四川大竹人, 硕士研究生, 主要研究方向: 化工。

与 5  $\mu\text{g}$  MAP30 分别在不同温度(25 30 35 37 40  $^{\circ}\text{C}$ ) 中进行反应,保温 30 min 后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 3 结果

#### 3.1 以质粒 PET28a DNA 为底物测定 MAP30 的酶活性

电泳结束后在凝胶成像仪上成像,并记录结果。结果见图 1, PET28a DNA 在与 MAP30 保温的作用下,脱去一些嘌呤碱基后转变为缺刻(N)和线状(L)的 DNA(图 1) 经凝胶电泳,脱腺嘌呤的 DNA 在脱腺嘌呤处断裂,被完全降解成小片段而逸出凝胶。在药物存在的条件下, PET28a DNA 被药物作用后出现两条条带,而未经药物作用的阴性对照则无新条带出现,说明 MAP30 可使共价闭合环状 DNA 的拓扑结构发生变化,具有 DNA 拓扑酶活性。

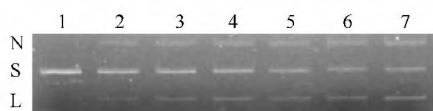


Lane 1: Plasmid PET28a DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was a control; Lane 2: Plasmid PET28a DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 5.0  $\mu\text{g}$  of MAP30 at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min; N: Nicked DNA; L: Linear DNA; S: Supercoiled DNA

Fig 1 The enzymatic activity of MAP30 on plasmid PET28a DNA

#### 3.2 不同保温时间对 MAP30 作用于 PET28a DNA 的影响

不同的保温时间, MAP30 降解质粒 PET28aDNA 的结果见图 2。随着 MAP30 降解质粒 DNA 时间的增加,超螺旋 DNA 的含量在逐渐减少,缺刻和线状结构 DNA 分子的量逐渐增加,30 min 后,可以清晰看到超螺旋、缺刻和线状的 DNA。测定活性时,故选取 30 min 为 MAP30 降解质粒 DNA 的时间。



Lane 1 ~ 7: Plasmid PET28a DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 5  $\mu\text{g}$  of MAP30 at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min respectively

Fig 2 Enzymatic activity of MAP30 on plasmid PET28a DNA with the change of time

#### 3.3 检测 MAP30 酶活性的灵敏度

用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后结果见图 3, MAP30 最低的检出量是 1  $\mu\text{g}$ (图 3)。从图 3 中的样品 2 ~ 8 可知,随着 MAP30 量的逐渐增加,质粒 DNA 的缺刻和线状形式的量也在相应地增加。当 MAP30 的加入量低于 1  $\mu\text{g}$  时,凝胶上出现的缺刻和线状 DNA 不易被观察到。应该指出,浓度高的 MAP30,能在多个位点脱去超螺旋 DNA 上的腺嘌呤碱基。由于超螺旋结构本身所产生的张力,使 DNA 链在部分脱去腺嘌呤碱基的位点处断裂,超螺旋 DNA 解旋为缺刻和线状

DNA<sup>[10-11]</sup> 在 1% 琼脂糖凝胶电泳下,脱腺嘌呤的 DNA 被完全降解成小片段而逸出凝胶。随着 MAP30 的降低,脱去 DNA 上的腺嘌呤碱基的位点亦相应减少,超螺旋 DNA 仅能解旋为缺刻和线状 DNA,脱腺嘌呤的 DNA 被完全降解成小片段的量较少,大部分的 DNA 仍然以缺刻和线状 DNA 的形式出现在凝胶上。



Lane 1: Plasmid PET28a DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was a control; Lane 2 ~ 8: Plasmid PET28a DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0  $\mu\text{g}$  of MAP30, respectively at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min

Fig 3 The sensitivity of enzymatic activity of MAP30 on plasmid PET28a DNA. The sensitivity of enzymatic activity of MAP30 on plasmid PET28a DNA was assayed as follows

#### 3.4 不同的 pH 值对 RIP 作用于 PET28 DNA 的影响

图 4 为试验用 MAP30 酶液在 pH 值 5.3 ~ 8.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 pH 值 9 ~ 11 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液条件下酶活测定结果。在 pH 值 5.3 ~ 8 时酶活随 pH 值的升高而升高, pH 值在 8 左右酶活达到最高,接着呈下降趋势。可知该 MAP30 的最适 pH 值为 8。考虑到 pH 8 虽然活性最大,同时失去活性的可能最大,我们用 pH 7.5 作为反应 pH 值。

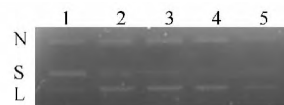


Lane 1 ~ 8: Plasmid PET28a DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 5  $\mu\text{g}$  of MAP30 at 37  $^{\circ}\text{C}$  for pH 5.3, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 for 30 min respectively

Fig 4 Enzymatic activity of MAP30 on plasmid PET28a DNA with the change of pH value

#### 3.5 不同的温度对 RIP 作用于 PET28 DNA 的影响

图 5 为试验用 MAP30 酶液在温度 25 ~ 40  $^{\circ}\text{C}$  缓冲液 A 条件下酶活测定结果。在温度 25 ~ 37  $^{\circ}\text{C}$  时酶活随温度的升高而升高,在 37  $^{\circ}\text{C}$  左右酶活达到最高,接着呈下降趋势。可知该 MAP30 的最适温度 37  $^{\circ}\text{C}$ 。



Lane 1 ~ 5: Plasmid PET28a DNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was incubated with 5  $\mu\text{g}$  of MAP30 at pH 7.5 at temperature 25, 30, 35, 37, 40  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min respectively

Fig 5 Enzymatic activity of MAP30 on plasmid PET28a DNA with the change of temperature

## 4 讨论

本文以常用质粒 DNA 为底物测定 RIP 酶( RNA N-糖苷酶) 活性的新方法研究 MAP30 最适 pH 值和最适温度, 与其它关于核糖体失活蛋白的报道相近似, 且耐热性能较好<sup>[12]</sup>。MAP30 的最适反应温度为 37℃。通过对 MAP30 pH 值的初测, 测得该酶的最大活性 pH 值为 8.0, 但考虑到实际应用, 我们将 pH 值定 7.5。该测定方法的建立, 使测定 RIP 酶活性的工作能够在普通的生化实验室里完成。对苦瓜籽中的核糖体失活蛋白( RIP) 抗病毒和抗肿瘤药效的研究有很好的促进作用。

## 参 考 文 献

- [1] 孙海燕, 胡家恕, 汪俏梅. 苦瓜的核糖体失活蛋白[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(3): 247-250.
- [2] 白竹梅, 沈富兵, 吴民沪, 等. 聚乙二醇修饰对苦瓜籽中 RIP 抗肿瘤活性及免疫学特性的影响[J]. 华西药学杂志, 2009, 24(6): 565-568.
- [3] Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, et al. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(19): 8818-8822.
- [4] 朱振洪, 杨威威, 葛立军, 等. MAP30 全长基因的克隆及在巴斯德毕赤酵母中的高效表达研究[J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(2): 110-116.
- [5] 鞠金秀, 陈瑞莞, 宋志宏. 苦瓜蛋白 MAP30 研究进展[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(11): 1340-1342.
- [6] Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins [J]. *J Biolog Chem*, 1987, 262(12): 5908-5912.
- [7] Endo Y, Tsurugi K. RNA N2glycosidase activity of ricin A2chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes [J]. *J Biolog Chem*, 1987, 262(17): 8128-8130.
- [8] Huang P L, Chen H C, Kung H F, et al. Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms [J]. *Biofactors*, 1992, 4(1): 37-41.
- [9] 王洪涛, 张绍铃, 刘望夷. 用质粒作底物测定核糖体失活蛋白酶活性的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(9): 991-995.
- [10] Ling J, Liu WY, Wang P T. Cleavage of supercoiled double-stranded DNA by several ribosome inactivating proteins *in vitro* [J]. *FEBS Lett*, 1994, 345(2-3): 143-146.
- [11] Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, et al. Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly (A) [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(3): 518-522.
- [12] 冯焱, 白永胜, 黄增辉. 木聚糖酶的热稳定性以及最适 pH 值、温度的研究[J]. 酶制剂, 2007, 28(18): 17-19.

## Study on the Enzymatic Activity of MAP30 of *Momordica Charantia*

LENG Bo, WU Yu, TAN Shi-ke

(The Limited Liability company of the Chengdu Institute of Product Quality Inspection, Chengdu 610100, China)

**Abstract** To establish a rapid and efficient method for preparation of MAP30 enzymatic activity and to study preliminarily its biological activity, principle of the method is based on that MAP30 can remove some adenine bases from double stranded supercoiled PET28a DNA molecules, subsequently the deadenylated DNA was cleaved into nicked and linear form. The deadenylated DNA was degraded into many small fragments and run out of the gel. The optimum techniques of acid-base and temperature stability were studied in order to further investigate enzyme characteristic and technique of resolution. The enzymatic activities of MAP30 were tested using this method. The limit of sensitivity is about 1 µg. The optimal pH and temperature of MAP30 was 8.0 and 37℃, respectively. Different pH and temperature value conditions influence the characteristics of the MAP30 and, the higher acidity or alkalinity and temperature of the chemical solution, the more enzymatic activities influence on the intensity of the MAP30. Therefore, acidity or alkalinity is one of the main factors influencing the enzymatic activity of MAP30. It should be emphasized that the merit of this method is to avoid the preparation of ribosome.

**Key words** MAP30, Temperature with the change of time, Double-stranded supercoiled DNA, pH value, The sensitivity of enzymatic activity, Temperature