

聚丙烯酸分离纯化苦瓜种仁碱性蛋白的方法及影响因素

The Method and Influencing Factors of Alkalescency Protein Purification from Bitter Melon (*Momordica charantia*) Seeds by Polyacrylicacid Precipitation

张海花^{1,2} 汪俏梅² 胡家恕² 童富淡^{1,2*}

ZHANG Hai-Hua^{1,2} ,WANG Qiao-Mei² ,HU Jia-Shu² and TONG Fu-Dan^{1,2*}

1 浙江理工大学生命科学学院 杭州 310018

2 浙江大学 杭州 310029

1 College of Life Sciences , Zhejiang Sci-Tech University , Hangzhou 310018 , China

2 Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China

摘 要 以苦瓜籽为材料,研究了聚丙烯酸分离纯化苦瓜种仁碱性蛋白的方法及影响因素。等电点沉淀试验表明,柠檬酸、盐酸分别调节苦瓜种仁粗提液 pH 至 6.0、4.0 时,各有 14.62% 和 32.49% 的苦瓜种仁蛋白被沉淀。醋酸的等电点沉淀作用呈现阶段性特点, pH 6.0 和 4.0 时分别有 26.17% 和 38.72% 的苦瓜种仁蛋白被沉淀。醋酸、盐酸和柠檬酸处理的 1mL 苦瓜种仁粗提液(pH 4.0), 1% PAA 选择性沉淀碱性蛋白(等电点 pI 为 8.65 ~ 9.30)的最佳用量分别为 100 μ L、120 μ L 和 100 μ L。醋酸调节苦瓜种仁粗提液 pH 分别至 5.0、4.0 和 3.0, 等电点沉淀后的上清液用 PAA 沉淀碱性蛋白, 当 PAA (1%) 用量为 160 μ L/mL 提取液时, pH 5.0 和 3.0 样液分别有 33.77% 和 43.56% 蛋白质被沉淀, 当 PAA 用量为 120 μ L/mL 提取液时, pH 4.0 样液中 30.83% 蛋白质被沉淀。PAA-蛋白质复合物溶解于碱性溶液(pH > 9.0), 当溶液 NaCl 浓度为 3.0% 时, 溶液蛋白质浓度最高。PAA 选择性沉淀的苦瓜种仁碱性蛋白经 Sephadex G-75 柱层析分离, 分别在 175min 和 300min 出现主峰 I 和 II。SDS-PAGE 和 IEF 分析表明主峰 I 的分子量约为 30kD, pI 值约为 9.5, 主峰 II 的分子量约为 10kD, pI 值约为 9.3。

关键词 聚丙烯酸, 碱性蛋白, SDS-PAGE, IEF, 苦瓜

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)04-0735-06

Abstract In this study, polyacrylicacid precipitation alkalescence protein from *Momordica charantia* L. seeds was studied, and the effect of conditions on experiment was also evaluated. Isoelectric precipitation is achieved by adjusting the pH of a protein solution and is based on that a protein's solubility is at minimum at its pI. The sample was titrated to pH 6.0 with citric acid, and 14.62% proteins were precipitated. With hydrochloric acid to pH 4.0, 32.49% proteins were precipitated. With the acetic acid to pH 6.0 and pH 4.0, 26.17% and 38.72% proteins were precipitated, respectively. In the 1 mL Bitter melon seeds extraction(pH 4.0) adjusted by acetic acid, hydrochloric acid and citric acid, the optimum dosage of PAA(1%) precipitating alkalescency protein(pI 8.65 ~ 9.30) was 100 μ L, 120 μ L and 100 μ L respectively. The respective extraction (1mL) was titrated to pH 5.0, pH 4.0, and pH 3.0 by acetic acid. After isoelectric precipitation, the PAA precipitation protein was performed. When concentration of PAA (1%) was 160 μ L/mL, the protein decreased in the supernatant was 33.77% at pH 5.0, and

Received : December 19 , 2006 ; Accepted : February 2 , 2007.

This work was supported by the grant from the Department of Science and Technology of Zhejiang Province(No. 2004C32014).

* Corresponding author : Tel : 86-571-86843193 , Fax : 86-571-86843303 , E-mail : fdtong@zstu.edu.cn

浙江省科学技术厅资助项目(No. 2004C32014)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

43.56% at pH 3.0. When concentration of PAA (1%) was 120 $\mu\text{L/mL}$, the protein decreased in the supernatant was 30.83% at pH 4.0. PAA-Protein complex could redissolve in alkaline conditions (pH > 9.0) and the protein most easily redissolved when the NaCl was 3.0%. The bitter melon seeds extraction after PAA purification flowed through the Sephadex G-75 columns. The peaks I and II were obtained after 175min and 300min, respectively. SDS-PAGE and IEF analysis showed that the molecule weight from peaks I was 30kD with pI 9.5, peaks II 10kD with pI 9.3.

Key words polyacrylic acid, alkaline protein, SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), IEF (isoelectric focusing), *Momordica charantia* L.

在生物工程领域,特别是在食品、医药等生物工程中常常涉及到大规模的蛋白质分离提纯过程^[1]。降低分离成本和提高回收率是蛋白质分离工程的主要目标。从大规模的低浓度溶液中纯化回收蛋白,其关键的步骤之一是蛋白质沉淀^[2]。聚合高分子电解质含有大量的阳离子或阴离子,通过静电作用结合带相反离子的蛋白质,形成聚合高分子电解质-蛋白质复合物沉淀^[2]。聚合高分子电解质沉淀技术具有聚合高分子电解质用量少(0.05%~0.1%, W/V)、选择性强的特点,沉淀后蛋白质保持生物活性,能被重新溶于水,并可形成高浓度的蛋白质溶液。溶液中的聚合高分子电解质可以和金属离子生成沉淀除去。

聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)是带阴离子的聚合高分子电解质,曾用于分离溶菌酶^[4,5]。苦瓜种仁中含有 α -苦瓜素(α -momorcharin, α -MMC)、 β -苦瓜素(β -momorcharin, β -MMC)、苦瓜激素、苦瓜抑制剂以及核糖体失活蛋白和苦瓜免疫缺陷病毒I型抑制剂等多种碱性蛋白,具有降血糖、抗肿瘤、免疫调节和抗菌等多种生物活性^[6-10]。苦瓜种仁碱性蛋白的传统分离纯化方法是离子色谱、凝胶色谱、亲和色谱及其组合,这些方法大多都根据电荷效应和分子大小来分离纯化,分离时间长,最终收率也不理想^[11-16]。

本试验以丙酮去除苦瓜种仁脂类物质,首次研究了苦瓜种仁脱脂蛋白溶液在不同酸介质和不同pH条件下的等电点沉淀曲线,同时研究了聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)对苦瓜种仁碱性蛋白的选择性沉淀作用,以及pH、PAA用量、NaCl等因素的影响,为建立苦瓜种仁碱性蛋白分离纯化的新方法提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 苦瓜种仁 浙江大学蔬菜研究所提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA), 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,

BCA) 聚丙烯酸(Polyacrylic Acid, PAA), SDS标准分子量蛋白和IEF标准蛋白均购自Sigma公司; Sephadex G-75购自Pharmacia公司; Multiskan Mk3酶标仪购自Thermo Labsystems Co., Ltd.; LKB多相电泳系统为LKB产品。

1.2 方法

1.2.1 苦瓜种仁粗提液的制备 取26g苦瓜种仁加入50mL丙酮磨碎,过滤,并用150mL丙酮洗涤,室温干燥得15g苦瓜种仁丙酮粉,溶于260mL重蒸水,17000r/min 4℃离心30min,上清液即为苦瓜种仁脱脂粗提液,4℃保存。

1.2.2 苦瓜种仁蛋白的等电点沉淀 各取20mL粗提液分别放入3支洁净的离心管中,其pH都为6.86。分别用盐酸、醋酸和柠檬酸调pH值至5.9、4.8、3.8和3.0,每次调pH后于8000r/min 4℃离心5min,上清液转移至另一洁净的离心管中,记录体积,并留0.5mL检测蛋白含量、分子量和等电点。

1.2.3 酸介质对PAA沉淀作用的影响 各取15mL粗提液分别放入3支洁净的离心管中,分别用醋酸、盐酸和柠檬酸调pH值至4.0,8000r/min 4℃离心5min,取各种酸处理的上清液1mL分别放入5个1.5mL eppendorf管,每个离心管中分别加入1% PAA 80 μL 、100 μL 、120 μL 、140 μL 、160 μL ,混匀并置室温静止15min,3000r/min离心5min,取上清检测蛋白等电点和分子量。

1.2.4 PAA浓度和pH值对PAA沉淀作用的影响 各取15mL粗提液分别放入3支洁净的离心管中,用醋酸调pH值分别至5.0、4.0和3.0,8000r/min 4℃离心5min,取每个pH值的上清液1mL分别放入5个1.5mL eppendorf管,每个离心管中分别加入1% PAA 80 μL 、100 μL 、120 μL 、140 μL 、160 μL ,混匀并置室温静止15min,3000r/min离心5min,取上清检测蛋白含量。

1.2.5 NaCl对PAA-蛋白质复合物溶解性的影响 取100mL粗提液,以醋酸调节pH值至4.0,8000r/min 4℃离心5min,上清液转移至另一洁净的离心

管 加入 10% PAA 1.4mL 室温静置 15min 3000r/min 离心 5min ,收集沉淀溶于 60mL 水中 ,Na₂CO₃ (1mol/L)调节 pH 值至 9.7。各取 10mL 分别放入 6 个离心管中 ,依次加入 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5g NaCl ,再加入 300μL CaCl₂ 溶液(20%) ,HCl 调 pH 值至 5.0 3000r/min 4℃离心 3min ,检测上清液的蛋白质浓度。

1.2.6 苦瓜种仁蛋白质的分离纯化 :取 20mL 粗提液 用醋酸调 pH 值至 4.0 ,8000r/min 4℃离心 5min ,上清液转移至另一洁净的离心管 ,加入 10% PAA 280μL ,混匀 ,室温静置 10min ,3000r/min ,4℃离心 5min ,收集沉淀溶于 12mL 重蒸水中 ,以 Na₂CO₃ 溶液 (1mol/L)调节 pH 值至 9.7 ,加入 0.6g NaCl (终浓度为 3%) ,再加入 400μL CaCl₂ 溶液(20%) ,HCl 调 pH 值至 5.0 3000r/min 4℃离心 3 min ,上清液即为碱性蛋白溶液。

经 PAA 沉淀的碱性蛋白溶液上 Sephadex G-75 ,用 5mmol/L PBS(pH 7.0 ,含 0.4% NaCl)缓冲液洗脱 ,流速是 18mL/h ,分别收集各个洗脱峰 ,检测各洗脱峰蛋白的分子量和等电点。

1.2.7 蛋白质含量、分子量和等电点的检测 :参照 Smith 的方法^[17] ,用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid ,BCA)法检测样品蛋白质浓度 ,2mg/mL 的结晶牛血清白蛋白为标准液 ;SDS-PAGE 检测分子量 ,等电聚焦 (isoelectrofocusing ,IEF)电泳检测等电点 pH(pI 值)^[18]。

2 结果与分析

2.1 苦瓜种仁蛋白的等电点沉淀曲线

经丙酮处理的苦瓜种仁粗提液蛋白浓度为 6.72mg/mL ,pH 为 6.86。以柠檬酸(citric acid)调节苦瓜种仁粗提液的酸碱度 ,在 pH7.0 ~ 6.0 之间的等电点沉淀作用明显 ,其中 pH6.0 时 14.62% 的苦瓜种仁蛋白被沉淀 ;在 pH6.0 ~ 3.0 之间几乎没有沉淀作用。以盐酸(hydrochloric acid)调节粗提液酸碱度 ,在 pH7.0 ~ 4.0 之间的等电点沉淀作用明显 ,其中 pH4.0 时 32.49% 的苦瓜种仁蛋白被沉淀 ;在 pH4.0 ~ 3.0 之间的等电点沉淀作用减弱。醋酸(acetic acid)等电点沉淀作用呈现阶段性特点 ,在 pH7.0 ~ 6.0 和 pH5.0 ~ 4.0 之间的等电点沉淀作用明显 ,而 pH6.0 ~ 5.0 和 pH 4.0 ~ 3.0 之间几乎没有沉淀作用 ,其中 pH6.0 和 4.0 时分别有 26.17% 和 38.72% 的苦瓜种仁蛋白被沉淀(图 1)。等电点沉淀试验结果表明盐酸和醋酸的等电点沉淀作用的效果优于柠

檬酸。

等电聚焦电泳结果显示 ,分别以盐酸、醋酸和柠檬酸为酸介质的等电点沉淀上清液中 ,酸性、中性蛋白的种类和含量随溶液 pH 值的降低显著下降 ,等电点 pI 值大于 8.65 的碱性蛋白的种类和含量与粗提液相似 ,而等电点 pI 值为 8.65 的碱性蛋白含量随溶液 pH 值的降低而减少 ,这种减少作用以柠檬酸处理样品最明显(图 2) ,说明以盐酸、醋酸和柠檬酸为酸介质的等电点沉淀过程中 ,上清液中的酸性、中性蛋白形成沉淀 ,离心分离的上清液以碱性蛋白为主。等电聚焦电泳结果表明在 pH 7.0 ~ 3.0 范围内 ,盐酸、醋酸等电点沉淀能有效除去苦瓜种仁粗提液中的酸性和中性蛋白 ,保留碱性蛋白。

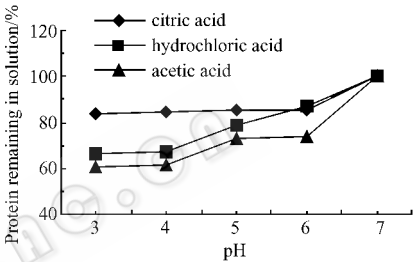


图 1 柠檬酸、盐酸和醋酸对苦瓜种仁蛋白的等电点沉淀作用

Fig. 1 Isoelectric precipitation profiles of native protein from *Momordica charantia*(bitter melon seeds)

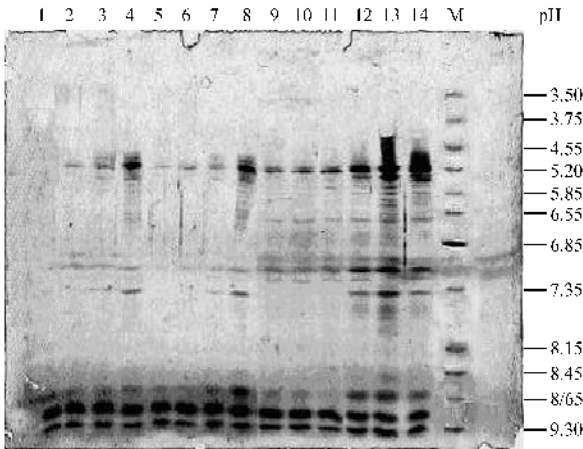


图 2 等电点沉淀后上清液蛋白质的 IEF 图谱

Fig. 2 IEF profiles of protein in the upper solution after isoelectric precipitation

1, 2, 3 and 4 : pH3.0 , 4.0 , 5.0 and 6.0 being titrated by hydrochloric acid ; 5、6、7 and 8 : pH3.0 , 4.0 , 5.0 and 6.0 being titrated by Acetic Acid ; 9 , 10 , 11 and 12 : pH5.0 , 4.0 , 3.0 and 6.0 being titrated by citric acid ; 13 , 14 : crude extract ; M : IEF protein Maker .

2.2 醋酸、盐酸和柠檬酸对苦瓜种仁碱性蛋白沉淀的影响

醋酸处理的苦瓜种仁粗提液(1mL)经 80μL
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

100 μ L、120 μ L、140 μ L、160 μ L 的 1% PAA 沉淀后, 100 μ L PAA(1%) 沉淀后的上清液 IEF 电泳结果未显示等电点 pH 为 8.65~9.3 碱性蛋白; 盐酸处理的苦瓜种仁粗提液(1mL)经 80 μ L、100 μ L、120 μ L、140 μ L、160 μ L 的 1% PAA 沉淀后, 120 μ L PAA(1%) 沉淀后的上清液 IEF 电泳结果未显示等电点 pH 为 8.65~9.3 碱性蛋白; 柠檬酸处理的苦瓜种仁粗提液(1mL)经 80 μ L、100 μ L、120 μ L、140 μ L、160 μ L 的 1%

PAA 沉淀后, 100 μ L PAA(1%) 沉淀后的上清液 IEF 电泳结果未显示等电点 pH 为 8.65~9.3 碱性蛋白(图 3A)。SDS-PAGE 显示 PAA 沉淀的碱性蛋白分子量为 35.0kD~14.4kD, 上清液中的碱性蛋白含量随着 PAA 用量增加而下降, 表明 PAA 能选择性沉淀苦瓜种仁碱性蛋白, 同时表明 PAA 对醋酸处理的苦瓜种仁粗提液碱性蛋白的沉淀效率高于盐酸和柠檬酸处理的苦瓜种仁粗提液的碱性蛋白(图 3)。

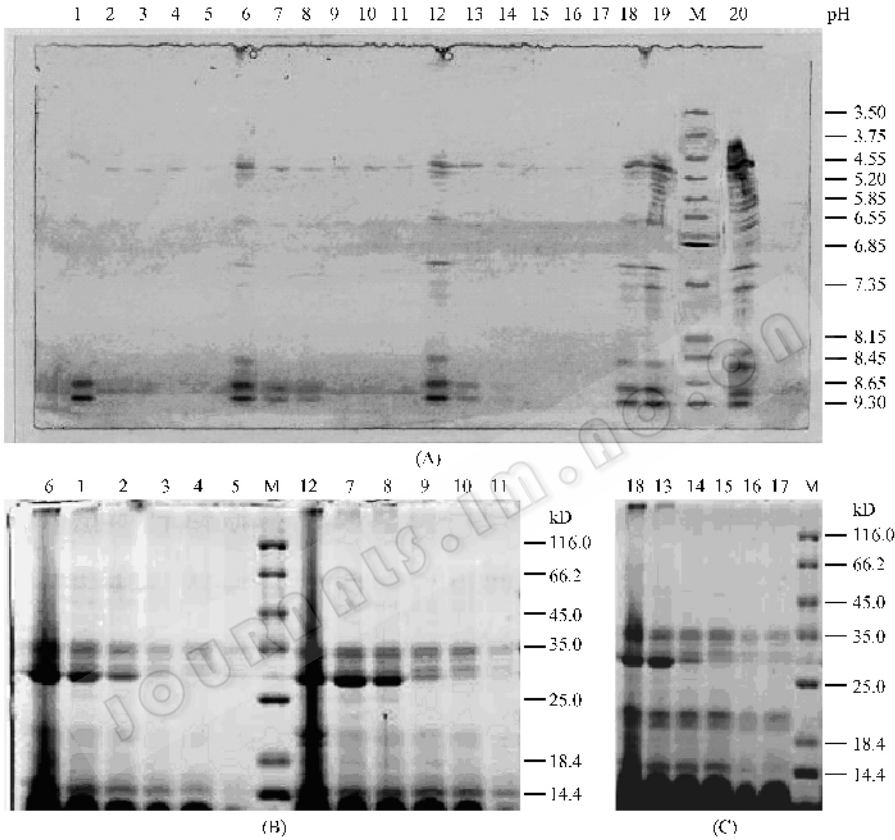


图 3 粗提液经醋酸、盐酸和柠檬酸处理(pH 4.0),不同浓度 PAA 沉淀后上清液蛋白质的 IEF 图谱(A); 粗提液经醋酸和盐酸处理(pH 4.0),不同浓度 PAA 沉淀后上清液蛋白质的 SDS-PAGE 图谱(B); 粗提液经柠檬酸处理(pH 4.0),不同浓度 PAA 沉淀后上清液蛋白质的 SDS-PAGE 图谱(C)

Fig. 3 IEF profile of protein in the upper solution from different concentration PAA precipitation after the crude extract was titrated to pH4.0 by Acetic Acid, hydrochloric acid and citric acid respectively(A); SDS-PAGE profile of protein in the upper solution from different concentration PAA precipitation after the crude extract was titrated to pH4.0 by Acetic Acid and hydrochloric acid(B); SDS-PAGE profile after the crude extract was titrated to pH4.0 by citric acid(C)

Lane 1, 2, 3, 4 and 5 are from the upper solution after titration with Acetic Acid and precipitation by PAA at 80 μ L, 100 μ L, 120 μ L, 140 μ L and 160 μ L respectively; likely, Lane 7, 8, 9, 10, 11 from hydrochloric acid titration and precipitation by PAA; Lane 13, 14, 15, 16 and 17 from citric acid titration and precipitation by PAA. Lane 12 from from hydrochloric acid titration; Lane 18: citric acid titration; Lane 19 and 20: crude extract; M: protein marker.

2.3 PAA 浓度和 pH 值对 PAA 沉淀作用的影响

苦瓜种仁粗提液用醋酸分别调节 pH 至 5.0、4.0 和 3.0, 等电点沉淀后的上清液用不同浓度 PAA 沉淀碱性蛋白后, 用 BCA 法检测上清液蛋白质浓度。结果显示 pH 3.0 和 5.0 样液的上清液蛋白质含量随 PAA 量的增加而降低, 当 PAA 用量为 160 μ L/mL 提取液时, 分别有 33.77% 和 43.56% 蛋白质

被 PAA 沉淀。当 PAA 用量为 0~120 μ L/mL 提取液时, pH 4.0 样液的上清液蛋白质含量随 PAA 用量增加而降低, 在 PAA 用量为 120 μ L/mL 提取液时达到最低, 30.83% 蛋白质被 PAA 沉淀; 当 PAA 用量为 120~160 μ L/mL 提取液时, 上清液蛋白质含量随着 PAA 用量的进一步增加而升高(图 4)。

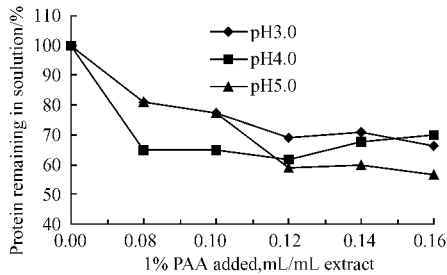


图 4 不同 pH 条件下 PAA 用量对 RIP 沉淀作用的影响
Fig. 4 Protein solubility profile after addition of PAA in pH 3.0 ,4.0 or 5.0

2.4 NaCl 对 PAA-碱性蛋白质复合物溶解性的影响

PAA-蛋白质复合物溶解于碱性溶液(1mol/L Na₂CO₃ 调节 pH 值至 9.7)溶解性与 NaCl 的浓度有关,当溶液 NaCl 浓度为 3.0%时,溶液的碱性蛋白质浓度最高(图 5)。

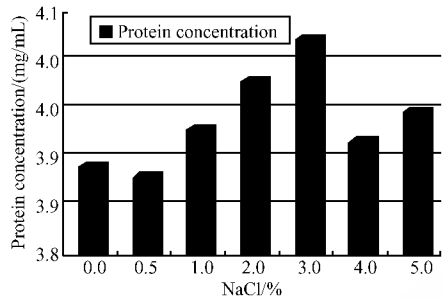


图 5 NaCl 浓度对 PAA-蛋白质复合物溶解性的影响
Fig. 5 Solubilization of PAA-basic protein complexes in NaCl solutions

2.5 PAA 分离纯化苦瓜种仁碱性蛋白

用 PAA 沉淀的苦瓜种仁碱性蛋白经 Sephadex G-75 柱层析分离,分别在 175 min 和 300min 形成出现 2 个主峰 I 和 II(图 6)。SDS-PAGE 和 IEF 分析表明主峰 I 的分子量约为 30kD ,pI 值约为 9.5 ,主峰 II 的分子量约为 10kD ,pI 值约为 9.3 ;主峰 I 和 II 蛋白的 SDS-PAGE 图谱呈现单一条带,其纯度已达电泳纯(图 7)。

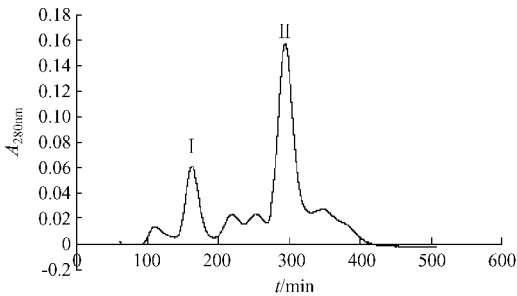


图 6 PAA 沉淀的苦瓜种仁碱性蛋白的 Sephadex G-75 柱层析图谱
Fig. 6 The alkaline protein by gel-filtration chromatography on a Sephadex G-75 column

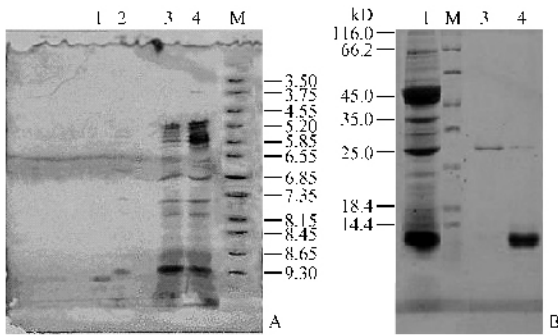


图 7 Sephadex G-75 柱层析分离产物的 IEF 图谱(A); SDS-PAGE 图谱(B)
Fig. 7 The IEF profiles (A) and the SDS-PAGE profiles(B) of the alkaline protein by gel-filtration chromatography on a Sephadex G-75 column.
A. 1 : peak I of gel-filtration chromatography ; 2 : peak II of gel-filtration chromatography ; 3 and 4 : crude extract ; M : IEF protein marker. B. 1 : crude extract ; 3 : peak I ; 4 : Peak II ; M : protein marker.

3 讨论

在苦瓜种仁蛋白的等电点沉淀过程中,醋酸和盐酸的沉淀效果优于柠檬酸,原因可能与其结构有关。柠檬酸分子大于醋酸和盐酸分子,位阻作用较大,不易接近蛋白质分子中和其表面电荷。盐酸是一种强酸,对蛋白质有较强变性作用,醋酸是一种弱酸,性质温和,对蛋白质活性的影响较小,苦瓜种仁蛋白的等电点沉淀应优先选用醋酸。

PAA 选择性沉淀苦瓜种仁碱性蛋白受酸介质、PAA 浓度和 pH 值等多种因素影响。醋酸处理的苦瓜种仁碱性蛋白比盐酸和柠檬酸处理的苦瓜种仁碱性蛋白更容易被 PAA 沉淀,PAA 选择性沉淀苦瓜种仁碱性蛋白最适 pH 值为 4.0 ,1% PAA 的最佳用量是 120μL/mL 提取液。PAA 分离溶菌酶的最佳用量是 1.5mg 高分子电解质/mg 溶菌酶^[5],PAA 的过量导致生成的沉淀重新溶解,对于不同的目的蛋白,PAA 的用量有一定的范围。PAA 对碱性蛋白的选择性沉淀还与其分子量相关,相同条件下大分子量的聚合高分子电解质对蛋白质的沉淀效率更高^[4]。

PAA-苦瓜种仁碱性蛋白复合物溶于碱性溶液,盐浓度影响溶解度。溶液 NaCl 浓度为 3.0% 时,PAA-苦瓜种仁碱性蛋白复合物的溶解度最高,溶液 NaCl 浓度为 3.0% 时,PAA-溶菌酶复合物的溶解度最高^[4]。

PAA 选择性吸附的苦瓜种仁碱性蛋白,经 Sephadex G-75 柱层析分离得到两个主峰,分子量分别约为 30kD 和 10kD ,pI 值分别约为 9.5 和 9.3 ,这

两种蛋白可能是苦瓜种仁核糖体失活蛋白和小分子毒蛋白,但需经动物实验或蛋白质质谱分析验证。另外,徐立宏^[19]和 ChenmingZhang^[5]采用了聚丙烯酸沉淀法分别从废弃蛋壳和烟草中提取溶菌酶,表明 PAA 能选择性吸附不同分子量和不同来源的碱性蛋白,是碱性蛋白分离纯化有效方法之一。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Chen W, Berg JC. The effect of polyelectrolyte dosage on floc formation in protein precipitation by polyelectrolytes. *Chemical Engineering Science*, 1993, **48**: 1775 – 1784.
- [2] Glatz CE. Precipitation. In: Asenjo, JA., Ed.. *Downstream Processing Biotechnology*. New York, 1990.
- [3] Niederauer MQ, Glatz CE. Selective precipitation. *Adv Biochem Engr/Biotechnol*, 1992, **47**: 159 – 188.
- [4] Sternberg M, Hershberger D. Separation of protein with polyacrylic acids. *Biochim Biophys Acta*, 1974, **342**: 195 – 206.
- [5] Chenming Z, Raymond L, Jackie C, et al. Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1069**: 107 – 112.
- [6] Lee-Huang S, Huang PL, Nara PL, et al. MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. *FEBS Lett*, 1990, **272**: 12 – 18.
- [7] Chan WY, Ng TB, Rong SH, et al. Antiproliferative and teratogenic activities of the bishemisuccinates of α -hydroxycholesterol and β -hydroxycholesterol. *General Pharmacology: The Vascular System Ge Pharmacol*, 1994, **25**(4): 767 – 772.
- [8] Muñoz R, Arias Y, Ferreras J M, et al. Sensitivity of cancer cell lines to the novel non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein Nigrinb. *Cancer Lett*, 2001, **167**: 163 – 169.
- [9] Au TK, Collins RA, Lam TL, et al. The plant ribosome inactivating proteins uflin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Letters*, 2000, **471**: 169 – 172.
- [10] Paul MFT, Ng TB, Fong WP, et al. New ribosome-inactivating proteins from seeds and fruits of the bitter gourd *Momordica charantia*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, **31**(9): 895.
- [11] Fong WP, Poon YT, Wong TM, et al. A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins α - and β -momorcharins from *momordica charantia* seeds, n-terminal sequence comparison and establishment of their n-glycosidase activity. *Life Sciences*, 1996, **59**(11): 901 – 909.
- [12] Valbonesi P, Barbieri L, Bolognesi A, et al. Preparation of highly purified momordin II without ribonuclease activity. *Life Sciences*, 1999, **65**(14): 1485 – 1491.
- [13] Meng YR(孟延发), Du YF(杜毅峰), Zhang XM(张雪梅). Characteristics and biological properties of ribosome inhibiting protein (RIP) from *Momordica charantia* (bitter melon seeds). *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 1999, **15**(6): 920 – 923.
- [14] Fu MH(傅明辉), Tian J(田洁). Isolation, purification and anti-oxidation of ribosome-inactivated proteins from seeds of *Momordica charantia* L. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*(中国生化药物杂志), 2002, **23**(3): 134 – 136.
- [15] Wang Jianhua, Nie Huiling, Tam Siuchung, et al. Anti-HIV-1 property of trichosanthin correlates with its ribosome inactivating activity. *FEBS Letters*, 2002, **531**(2): 295 – 298.
- [16] Wang BX(王宾香), Shi XZ(时祥柱), Guo CT(郭春腾), et al. Isolation and purification of ribosome-inactivating proteins from bitter melon seeds by ion exchange chromatographic columns in series. *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), 2004, **22**(5): 543 – 546.
- [17] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, **150**: 76 – 85.
- [18] Guo RJ(郭尧君). *Experimental Technology of Protein Electrophoresis*(蛋白质电泳技术). Beijing: Science Press(科学出版社), 2005.
- [19] Xu LH(徐立宏), Liu SB(柳树彬). Research on the extraction of Lysozyme from eggshell. *Guangdong Chemical Industry*(广东化工), 2004, **31**(4): 25 – 27.