

# 聚乙二醇定点修饰 $\beta$ -乳球蛋白谷氨酰胺残基 条件优化及其对蛋白抗原性的影响

Modification condition optimization of site specific PEGylation at  $\beta$ -lactoglobulin glutamine residues and its effect on antigenicity

罗舜菁 甘克明 陆旭丽 成娜娜 刘成梅

LUO Shun-jing GAN Ke-ming LU Xu-li CHENG Na-na LIU Cheng-mei

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University,  
Nanchang, Jiangxi 330047, China)

**摘要:**采用谷氨酰胺转氨酶(TG 酶)催化聚乙二醇(PEG)定点修饰技术对  $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -LG)的谷氨酰胺残基进行修饰,探究其对蛋白抗原性的影响。通过 SDS-PAGE 结合凝胶过滤色谱对修饰产物的修饰率进行分析,通过优化得最佳修饰条件为 pH 7.0,温度 25  $^{\circ}$ C, $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比 1 : 15,TG 酶与  $\beta$ -LG 质量比 3 : 1,缓冲液中乙醇添加量 25%(体积分数),该条件下修饰率为 60.17%。采用阳离子交换色谱对修饰产物进行分离纯化,SDS-PAGE 分析显示,纯化得到的修饰产物表观分子量在 28 kDa 左右,为 PEG 单修饰产物。反相高效液相色谱分析结果表明,修饰产物均一,无其它位置异构体存在。间接竞争 ELISA 测定结果表明,经 PEG 修饰后  $\beta$ -LG 的抗原性显著降低,降低率为 59.04%。

**关键词:**  $\beta$ -乳球蛋白;聚乙二醇;抗原性;条件优化;谷氨酰胺

**Abstract:** Site specific polyethylene glycol modification (PEGylation) catalyzed by transglutaminase (TGase) was applied to modify  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG) at glutamine residues and its effect on the antigenicity of  $\beta$ -LG was explored. The modification rate of the modified product was analyzed by SDS-PAGE combined with gel filtration chromatography. According to single factor experiment, the optimal modification conditions were obtained as follows: reaction pH was 7.0, reaction temperature was 25  $^{\circ}$ C, molar ratio of  $\beta$ -LG to PEG was 1 : 15, mass ratio of TGase to  $\beta$ -LG

was 3 : 1, the amount of ethanol added in buffer was 25% (v/v). Under the optimal modification conditions, the modification rate of PEGylated product was 60.17%. The PEGylated product was purified by cationic exchange chromatography, the SDS-PAGE analysis result showed that the PEGylated product had an apparent molecular mass of about 28 kDa, which was mono-PEGylated product. The result of reversed phase high performance liquid chromatography showed that the obtained PEGylated product was homogeneous and without other isomers existed. The indirect competitive ELISA result showed that the antigenicity of  $\beta$ -LG was significantly reduced after PEGylation, and the antigenicity reduction rate was 59.04%.

**Keywords:**  $\beta$ -lactoglobulin; polyethylene glycol; antigenicity; condition optimization; glutamine

$\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -lactoglobulin, $\beta$ -LG)是乳清蛋白的主要成分,在乳清蛋白中的含量约为 43.6~50.0%<sup>[1]</sup>。天然的  $\beta$ -LG 也是牛乳中最主要的过敏原之一<sup>[2]</sup>,对牛乳过敏的患者中约 82%的人会对  $\beta$ -LG 产生过敏反应<sup>[3-4]</sup>。消除或降低牛乳致敏性的最有效方法是将过敏原物质从牛乳中分离,将牛乳中  $\beta$ -LG 去除后可以模拟人乳,可用于婴幼儿配方奶粉的生产<sup>[5]</sup>。 $\beta$ -LG 具有较高的营养价值及多种功能特性,如溶解性、起泡性和凝胶性等,因而在食品加工中具有较大的应用价值<sup>[6]</sup>,而其强致敏性使其应用范围受到了极大限制<sup>[2]</sup>。针对从牛乳中分离出的  $\beta$ -LG,为降低其致敏性,进行了大量的研究,其中,化学修饰技术如糖基化<sup>[7]</sup>、聚乙二醇修饰<sup>[8]</sup>等是目前研究的热点。

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰多用于药物蛋白的修饰,以改善蛋白的生物化学特性、降低抗原性

**基金项目:**国家自然科学基金(编号:31560435);南昌大学研究生创新专项资金资助项目(编号:cx2016229)

**作者简介:**罗舜菁,女,南昌大学教授,硕士。

**通信作者:**刘成梅(1963—),男,南昌大学教授,博士。

E-mail: liuchengmei@ncu.edu.cn

**收稿日期:**2019-03-13

等<sup>[9]</sup>。分子量在 1 000 Da 以上的 PEG 无毒,且已被美国食品药品监督管理局批准用于食品、药品和化妆品中<sup>[8,10]</sup>。目前,应用 PEG 随机修饰来降低 $\beta$ -LG 抗原性的研究<sup>[11-12]</sup>已有少量报道。然而,PEG 随机修饰通常会得到多种 PEG 修饰产物的混合物,难以分离纯化和表征其性质<sup>[13]</sup>。此外,PEG 随机修饰的修饰位点难以确定,使 $\beta$ -LG 的修饰位点与抗原性间关系的研究存在较大困难。在随机修饰条件下,蛋白结构也会发生较大改变<sup>[8]</sup>。综上所述,应用 PEG 随机修饰难以对 $\beta$ -LG 的抗原性变化机理进行深入探究,因而也难以对其抗原性进行有效调控。酶催化 PEG 定点修饰技术可在谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TG 酶)的催化下,对蛋白质谷氨酰胺残基(Gln)进行定点修饰<sup>[14]</sup>,得到的修饰产物均一<sup>[15]</sup>,且修饰条件温和,因而对蛋白构象的影响较小。

本研究拟在 TG 酶催化下用 5 kDa mPEG-NH<sub>2</sub> 定点修饰 $\beta$ -LG 的 Gln 残基,通过 SDS-PAGE 结合凝胶过滤色谱对修饰条件进行优化。经阳离子交换色谱对修饰产物进行分离纯化,用 SDS-PAGE 和反相高效液相色谱(RP-HPLC)对修饰产物进行鉴定,通过间接竞争 ELISA 法对修饰前后的蛋白进行抗原性分析,以期开发有效降低 $\beta$ -LG 抗原性的方法,为进一步研究其抗原性变化机理提供指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

牛乳 $\beta$ -乳球蛋白、猪明胶:美国 Sigma 公司;

单甲氧基聚乙二醇胺(mPEG-NH<sub>2</sub>):5 kDa,北京键凯科技股份有限公司;

谷氨酰胺转氨酶(TG 酶):200 U/g,上海源叶生物科技有限公司;

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(Glycine)、4 $\times$ 上样缓冲液(含 $\beta$ -巯基乙醇)、考马斯亮蓝 R250:北京索莱宝科技有限公司;

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、醋酸钠、氯化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、柠檬酸、邻苯二胺、无水乙醇、冰醋酸、甲醇:分析纯,天津市大茂化学试剂厂;

三氟乙酸、乙腈:色谱纯,天津市大茂化学试剂厂;

吐温-20、30%过氧化氢、浓硫酸:分析纯,西陇科学股份有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

垂直电泳仪:Mini-PROTEIN Tetra 型,美国伯乐公司;

中高压层析系统:NGC Quest 10 Plus 型,美国伯乐公司;

酶标仪:HF2000 型,北京华安麦科生物技术有限公司;

电子分析天平:ME104 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

pH 计:Five Easy Plus 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

高速冷冻离心机:Heraeus Multifuge X1R 型,美国 Thermo 公司;

数显恒温水浴锅:HH-2 型,江苏金坛市荣华仪器制造有限公司;

超纯水系统:Simplicity UV 型,美国 Millipore 公司;

高效液相色谱仪:Agilent 1100 型,美国安捷伦科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 mPEG-NH<sub>2</sub> 定点修饰 $\beta$ -LG 谷氨酰胺残基 根据 Mero 等<sup>[9]</sup>的方法,修改如下:将 $\beta$ -LG 溶解在一定 pH 值且含有一定量乙醇的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中,使其浓度为 1.0 mg/mL。依次按一定量 $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比及 TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比(E/S)加入 5 kDa 的 mPEG-NH<sub>2</sub> 和 TG 酶,搅拌均匀后,在一定温度下反应 12 h,用冰醋酸调 pH 至 4.5 终止反应。

#### 1.2.2 单因素试验

(1) TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比:按 1.2.1 方法, $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比 1:10,缓冲液中乙醇添加量 25%(体积分数),反应 pH 7.0,反应温度 25 $^{\circ}$ C,考察 TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比(5:1,3:1,1:1,1:3)对修饰率的影响。

(2) 反应 pH:按 1.2.1 方法,TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比 1:1, $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比 1:10,缓冲液中乙醇添加量 25%(体积分数),反应温度 25 $^{\circ}$ C,考察反应 pH(5.0,6.0,7.0,8.0)对修饰率的影响。

(3) $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比:按 1.2.1 方法,TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比 1:1,反应 pH 7.0,缓冲液中乙醇添加量 25%(体积分数),反应温度 25 $^{\circ}$ C,考察 $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比(1:5,1:10,1:15,1:20)对修饰率的影响。

(4) 缓冲液中乙醇添加量:按 1.2.1 方法,TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比 1:1, $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比 1:10,反应 pH 7.0,反应温度 25 $^{\circ}$ C,考察缓冲液中乙醇添加量(0%,15%,25%,35%)(体积分数)对修饰率的影响。

(5) 反应温度:按 1.2.1 方法,TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比 1:1, $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比 1:10,反应 pH 7.0,缓冲液中乙醇添加量 25%(体积分数),考察反应温度(4,25,37 $^{\circ}$ C)对修饰率的影响。

1.2.3 SDS-PAGE 分析 参考 Laemmli<sup>[16]</sup>的方法,用 5%的浓缩胶和 12%的分离胶进行电泳。

1.2.4 凝胶过滤色谱分析 参考薛晓莹<sup>[17]</sup>的方法,不同反应条件下 $\beta$ -LG 的 PEG 修饰产物的修饰率经 Superdex

200 凝胶色谱柱进行测定。按式(1)计算。

$$R = \frac{A_1}{A} \times 100, \quad (1)$$

式中:

$R$ ——修饰产物的修饰率, %;

$A_1$ —— $\beta$ -LG 的 PEG 修饰产物的峰面积,  $\text{cm}^2$ ;

$A$ ——总蛋白峰面积,  $\text{cm}^2$ 。

1.2.5  $\beta$ -LG 的 PEG 修饰产物的纯化 参考 Yu 等<sup>[18]</sup>的方法并稍作改动,用 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱对修饰产物进行分离纯化。用 pH 4.0, 0.04 mol/L 醋酸钠初始缓冲液(洗脱液 A)和含 1.0 mol/L NaCl 的 0.04 mol/L, pH 4.0 醋酸钠缓冲液(洗脱液 B),以流速 2 mL/min 进行梯度洗脱,洗脱梯度为 0%~100%洗脱液 B。在 280 nm 下测定各洗脱液的吸光值。收集各洗脱峰,经 SDS-PAGE 分析确定各洗脱峰的成分。然后收集 PEG 修饰产物的洗脱峰,用截留分子量 10 kDa 的 Amicon Ultra-15 超滤离心管于 4 °C 下以 4 990 r/min 离心 20 min,浓缩得到样品。

1.2.6 反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析 参考李慧等<sup>[19]</sup>和玉莹等<sup>[20]</sup>的方法,用 Waters SunFire C18 色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm)对  $\beta$ -LG 及其修饰产物进行分析。

1.2.7 抗原性分析 参考蔡小飞等<sup>[1]</sup>和 Kleber 等<sup>[21]</sup>的方法,采用间接竞争 ELISA 法测定 PEG 修饰前后  $\beta$ -LG 的抗原性。抗原性降低率按式(2)计算<sup>[1]</sup>。

$$P = \frac{A_i - A_1}{A_0 - A_1} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$P$ ——抗原性降低率, %;

$A_i$ ——待测样品在 490 nm 处测得的吸光度;

$A_1$ —— $\beta$ -LG 在 490 nm 处测得的吸光度;

$A_0$ ——空白对照组在 490 nm 处测得的吸光度。

### 1.3 数据处理

采用 Excel 2007 进行数据整理,用 Origin 8.0 软件作图。所有数据为 3 次重复试验的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

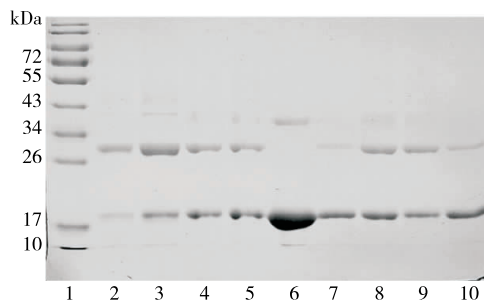
2.1.1 TG 酶与  $\beta$ -LG 质量比( $E/S$ )及反应 pH 值对修饰率的影响 由图 1(a)中泳道 2~5 可知,4 种  $E/S$  下的反应液在电泳图中均只含有 2 个条带,分别在 18, 28 kDa 附近, $\beta$ -LG 标准品的条带在 18 kDa 附近。因此,推测 28 kDa 附近条带为其 PEG 修饰产物。比较 28 kDa 附近条带可知,随着  $E/S$  的增大,PEG 修饰产物的量逐渐增加。修饰率测定结果如图 1(b)所示,随着  $E/S$  的增大,其修饰率逐渐增大,在  $E/S$  为 3 : 1 时达到最大。由于  $E/S$  增大时反应液中 TG 酶浓度增大,使酶与底物的接

触面积增大,从而使修饰率增大;当  $E/S$  为 3 : 1 时,酶浓度接近饱和,继续增大  $E/S$  其修饰率不再明显增加。

由图 1(a)中泳道 7~10 可知,随着 pH 值的增大,PEG 修饰产物的量呈先增大后减小的趋势,且在 pH 6.0, 7.0 时均较大。修饰率测定结果与电泳结果一致,如图 1(c) 所示,在 pH 7.0 时其修饰率最大,可能与 TG 酶的最适 pH 有关,在 pH 6.0~7.0 范围内其反应活性最强。

综上所述,5 kDa mPEG-NH<sub>2</sub> 定点修饰  $\beta$ -LG 的最佳 TG 酶与  $\beta$ -LG 质量比为 3 : 1,最佳反应 pH 为 7.0。

2.1.2  $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比及乙醇添加量对修饰率的影响 由图 2(a)、(b)可知,随着 PEG 添加量的增加,其修



1. 蛋白 Marker 2~5. 分别表示  $E/S$  为 5 : 1, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3 时的反应液 6.  $\beta$ -LG 7~10. 分别表示 pH 为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 时的反应液

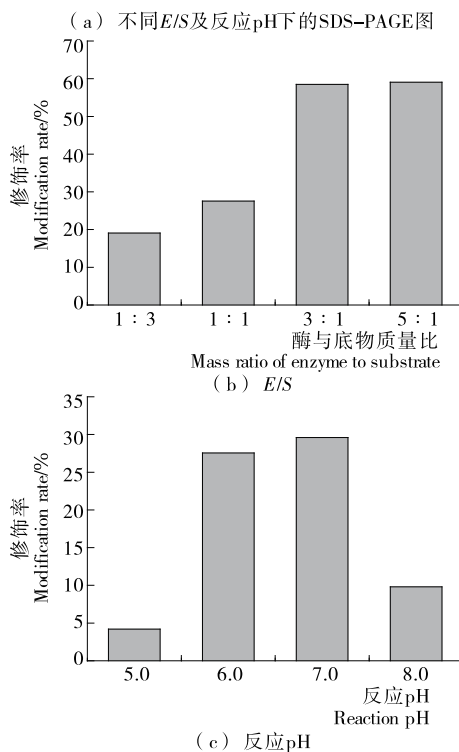
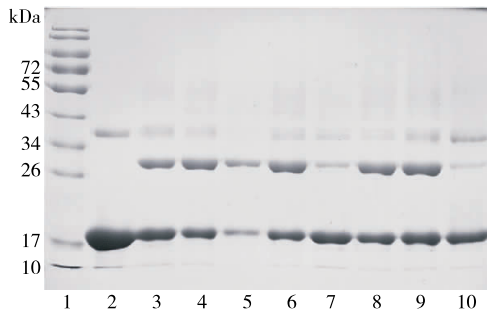


图 1  $E/S$  及反应 pH 值对修饰率的影响  
Figure 1 Effects of  $E/S$  and reaction pH on modification rate

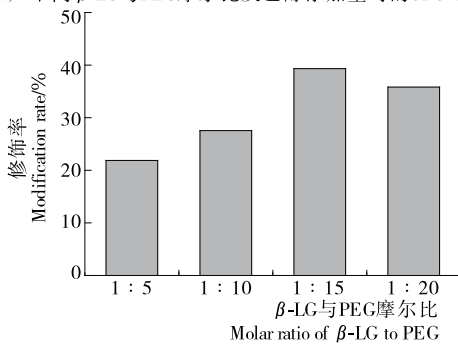
修饰率先增大后减小的趋势,在 $\beta$ -LG与PEG摩尔比为1:15时最大。由于PEG添加量的增加使 $\beta$ -LG与PEG的接触面积增大,有利于修饰反应的进行;而当添加量过高时,反应液中过多的PEG会阻碍 $\beta$ -LG与TG酶的结合,从而使修饰率降低。

由图2(a)、(c)可知,随着乙醇添加量的增加,其修饰率呈先增大后减小的趋势,在乙醇添加量为25%时最大;而当乙醇添加量为35%时几乎无PEG修饰产物生成,生成大量沉淀,说明当乙醇添加量为35%时,缓冲液中乙醇浓度过高,使蛋白聚集沉淀,从而阻碍了反应的进行。

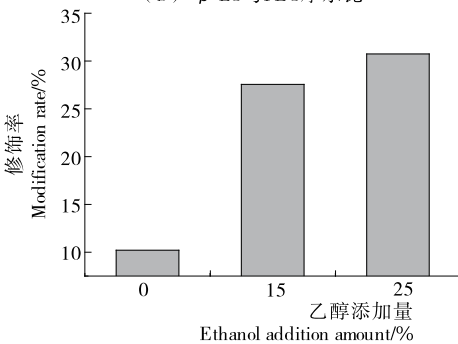


1. 蛋白 Marker 2.  $\beta$ -LG 3~6. 分别表示 $\beta$ -LG与PEG摩尔比为1:5,1:10,1:15,1:20时的反应液 7~10. 分别表示乙醇添加量(体积分数)为0%,15%,25%,35%时的反应液

(a) 不同 $\beta$ -LG与PEG摩尔比及乙醇添加量时的SDS-PAGE图



(b)  $\beta$ -LG与PEG摩尔比



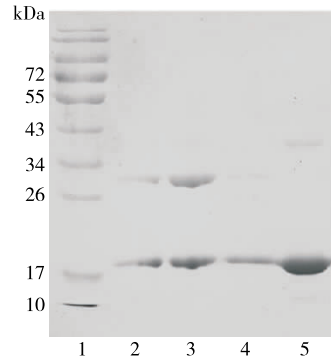
(c) 乙醇添加量

图2  $\beta$ -LG与PEG摩尔比及乙醇添加量对修饰率的影响

Figure 2 Effects of molar ratio of  $\beta$ -LG to PEG and ethanol addition amount on modification rate

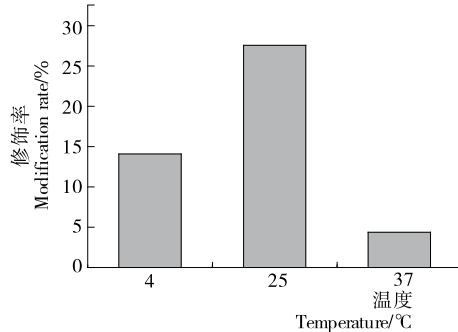
综上所述,5 kDa mPEG-NH<sub>2</sub>定点修饰 $\beta$ -LG的最佳 $\beta$ -LG与PEG摩尔比为1:15,最佳乙醇添加量为25%(体积分数)。

2.1.3 反应温度对修饰率的影响 由图3(a)、(b)可知,反应温度对修饰反应的影响较大,在3个温度下PEG修饰产物的修饰率分别为14.08%,27.56%,4.36%,在25℃时其修饰率最高。因此,确定其最佳反应温度为25℃。



1. 蛋白 Marker 2~4. 分别为4,25,37℃时的反应液 5.  $\beta$ -LG

(a) 不同反应温度下的SDS-PAGE图



(b) 反应温度

图3 反应温度对修饰率的影响

Figure 3 Effect of reaction temperature on modification rate

综上所述,PEG定点修饰 $\beta$ -LG的最优条件为反应pH 7.0,反应温度25℃, $\beta$ -LG与PEG摩尔比1:15,TG酶与 $\beta$ -LG质量比3:1,缓冲液中乙醇添加量25%(体积分数),该修饰条件下其PEG修饰产物的修饰率为60.17%。

## 2.2 $\beta$ -LG的PEG修饰产物的纯化

如图4所示,经0.0~1.0 mol/L NaCl盐离子梯度洗脱后,反应混合液主要出现两个洗脱峰F1和F2。PEG与蛋白结合后会屏蔽蛋白表面的电荷,从而使蛋白与层析介质的结合强度减弱,因此PEG修饰产物会先于未修饰的蛋白而被洗脱下来<sup>[22]</sup>。据此推测,洗脱峰F1,F2分别为 $\beta$ -LG的PEG修饰产物和未修饰的 $\beta$ -LG。

分别收集两个洗脱峰经SDS-PAGE分析,由图5可知,洗脱峰F1在28 kDa左右有1个明显的条带,而洗脱

峰 F2 在 18 kDa 左右有 1 个明显的条带,表明 F1、F2 两个洗脱峰分别对应  $\beta$ -LG 的 PEG 修饰产物和未修饰的  $\beta$ -LG,与上述推测结果一致。此外,有研究<sup>[23]</sup>表明,在溶液中,PEG 分子的每个乙氧基单元会与 2~3 个水分子结合,使 PEG 修饰产物的水化半径明显增大,因而 PEG 修饰产物的表观分子量通常是未修饰蛋白的分子量与 2~3 倍的 PEG 实际分子量之和。在图 5 中, $\beta$ -LG 的分子量在 18 kDa 左右,而其 PEG 修饰产物的分子量在 28 kDa 左右,刚好约为 1 个  $\beta$ -LG 分子的分子量与 2 倍 PEG 分子量之和。据此推测,所得的产物为 PEG 单修饰产物,即 1 个 PEG 分子与 1 个  $\beta$ -LG 分子结合。

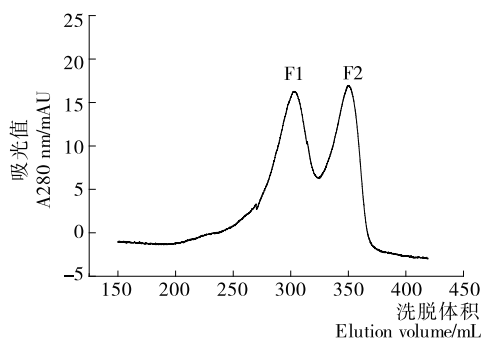
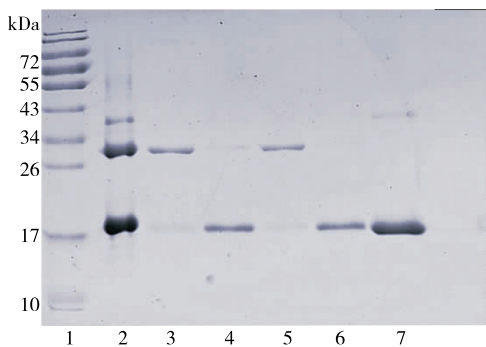


图 4  $\beta$ -LG 的 PEG 修饰混合物的阳离子交换色谱图  
Figure 4 Cationic exchange chromatogram of PEGylation mixtures of  $\beta$ -LG



1. 蛋白 Marker 2. 修饰混合物 3 与 5. 洗脱峰 F1 4 与 6. 洗脱峰 F2 7.  $\beta$ -LG

图 5 阳离子交换色谱纯化得到的各洗脱峰 SDS-PAGE 图

Figure 5 SDS-PAGE analysis of elution peaks obtained by purification

### 2.3 反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分析

如图 6 所示,经乙腈和水梯度洗脱后, $\beta$ -LG 分别在 31.3、32.7 min 出现两个洗脱峰。牛乳中  $\beta$ -LG 主要存在 A、B 两种遗传变异体,有研究<sup>[20、24]</sup>表明,通过 RP-HPLC 可将两种变异体分离开。因此,图 6 中  $\beta$ -LG 的两个洗脱峰可能分别为其 A、B 两种遗传变异体。经阳离子交换色谱纯化得到的 PEG 修饰产物,其色谱峰无明显变化,除

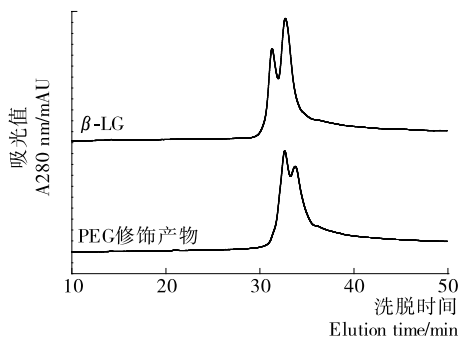
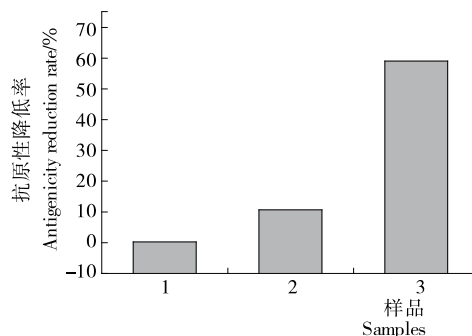


图 6  $\beta$ -LG 及其 PEG 修饰产物的反相高效液相色谱图  
Figure 6 RP-HPLC profiles of native  $\beta$ -LG and PEGylated  $\beta$ -LG

两种遗传变异体的洗脱峰外,无其他洗脱峰出现,表明在该修饰条件下 PEG 修饰位点固定,得到的修饰产物均一,无其他位置异构体生成。

### 2.4 PEG 修饰前后 $\beta$ -LG 的抗原性变化

如图 7 所示,经 PEG 定点修饰后  $\beta$ -LG 的抗原性显著降低,其降低率约为 59.04%。由于在 PEG 修饰过程中添加了 25% 乙醇,为了探究 25% 乙醇是否会对  $\beta$ -LG 的抗原性产生影响,以经 25% 乙醇处理过的  $\beta$ -LG 为另一对照组对其抗原性进行测定,结果表明 25% 乙醇对  $\beta$ -LG 的抗原性影响不大,其抗原性降低率仅为 10.67%。上述试验结果表明,酶催化 PEG 定点修饰导致  $\beta$ -LG 抗原性降低,其主要原因是连接在蛋白上的 PEG 链发挥了某种作用,而修饰条件对其抗原性影响不大。Mu 等<sup>[25]</sup>研究表明,连接在蛋白上的 PEG 链能在蛋白表面形成一层独特的水化层,因而造成对蛋白的空间屏蔽作用。有研究<sup>[26-27]</sup>表明, $\beta$ -LG 的抗原性与线性表位和构象表位有关。肽段 AA41~60, AA102~124, AA149~162 是  $\beta$ -LG 的主要抗原表位,分别能被 92%, 97%, 89% 的人血清识别<sup>[28]</sup>。因此,连接在  $\beta$ -LG 分子上的大分子 PEG 链覆盖



1.  $\beta$ -LG 2. 经 25% 乙醇处理过的  $\beta$ -LG 3. PEG 修饰产物  
图 7  $\beta$ -LG 的 Gln 残基的 PEG 定点修饰对其抗原性的影响

Figure 7 Effect of site specific PEGylation at  $\beta$ -lactoglobulin glutamine residues on antigenicity

在蛋白表面,可能会掩盖表面的一些线性表位和构象表位,阻碍其与特异性抗体的结合,因而使 $\beta$ -LG的抗原性显著降低。

### 3 结论

本研究运用酶催化 PEG 定点修饰技术对 $\beta$ -LG 的 Gln 残基进行定点修饰,通过 SDS-PAGE 结合凝胶过滤色谱分析确定最佳修饰条件为反应 pH 7.0,反应温度 25 °C, $\beta$ -LG 与 PEG 摩尔比 1:15, TG 酶与 $\beta$ -LG 质量比 3:1,缓冲液中乙醇添加量 25%(体积分数),在该修饰条件下其 PEG 修饰产物的修饰率为 60.17%。最佳修饰条件下的修饰混合物经阳离子交换色谱纯化后,得到了均一的 PEG 单修饰产物。经 PEG 修饰后 $\beta$ -LG 的抗原性显著降低,降低率可达 59.04%。本试验仅对酶催化 PEG 定点修饰前后 $\beta$ -LG 的抗原性变化情况进行了初步探究,后续可通过蛋白结构分析及 PEG 修饰位点分析等手段对其抗原性变化机理进行深入研究,为实现 $\beta$ -LG 抗原性的有效调控打下基础。此外,酶催化 PEG 定点修饰对 $\beta$ -LG 的功能特性如乳化性、起泡性、凝胶性等的影响也有待研究。

#### 参考文献

- [1] 蔡小飞, 钟俊桢, 刘成梅, 等. 聚乙二醇修饰对牛乳 $\beta$ -乳球蛋白抗原性的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 234-237.
- [2] CHEN Yuan, TU Zong-cai, WANG Hui, et al. Glycation of beta-lactoglobulin under dynamic high pressure microfluidization treatment: Effects on IgE-binding capacity and conformation[J]. Food Research International, 2016, 89(1): 882-888.
- [3] RODOLPHE F, KARINE A P, HERV B, et al. IgE-mediated rat mast cell triggering with tryptic and synthetic peptides of bovine beta-lactoglobulin[J]. International Archives of Allergy & Immunology, 2005, 138(4): 291-297.
- [4] 涂宗财, 田明, 王辉, 等. 高压脉冲电场结合糖基化对 $\beta$ -乳球蛋白抗原性与结构的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 211-216.
- [5] 李慧, 刘小翠. 牛乳乳清蛋白过敏性研究进展[J]. 山西农业科学, 2011, 39(12): 1 328-1 331.
- [6] CHEN Ying-jia, CHEN Xiao-xia, ZHOU Peng, et al. Improving the thermostability of  $\beta$ -lactoglobulin via glycation: The effect of sugar structures[J]. Food Research International, 2015, 69(1): 106-113.
- [7] ZHONG Jun-zhen, TU Yue, LIU Wei, et al. Comparative study on the effects of nystose and fructofuranosyl nystose in the glycation reaction on the antigenicity and conformation of beta-lactoglobulin[J]. Food Chemistry, 2015, 188(6): 58-63.
- [8] ZHONG Jun-zhen, CAI Xiao-fei, LIU Cheng-mei, et al. Purification and conformational changes of bovine PEGylated  $\beta$ -lactoglobulin related to antigenicity[J]. Food Chemistry, 2016, 199(3): 87-92.
- [9] MERO A, SCHIAVON M, VERONESE F M, et al. A new method to increase selectivity of transglutaminase mediated PEGylation of salmon calcitonin and human growth hormone[J]. Journal of Controlled Release, 2011, 154(1): 27-34.
- [10] LIU Wei, LIU Jun-ping, ZOU Li-qiang, et al. Stability and conformational change of methoxypolyethylene glycol modification for native and unfolded trypsin [J]. Food Chemistry, 2014, 146(1): 278-283.
- [11] NIJS M, AZARKAN M, SMOLDERS N, et al. Preliminary characterization of bovine beta-lactoglobulin after its conjugation to polyethylene glycol[J]. Biotechnology & Bioengineering, 1997, 54(1): 40-49.
- [12] WR BLEWSKA B, JEDRYCHOWSKI L. Effect of conjugation of cow milk whey protein with polyethylene glycol on changes in their immunoreactive and allergic properties[J]. Food and Agricultural Immunology, 2002, 14(2): 155-162.
- [13] KHAMENEH B, SABERI M R, HASSANZADEH-KHAYYAT M, et al. Evaluation of physicochemical and stability properties of human growth hormone upon enzymatic PEGylation [J]. Journal of Applied Biomedicine, 2016, 14(4): 257-264.
- [14] SPOLAORE B, RABONI S, SATWEKAR A A, et al. Site-specific transglutaminase-mediated conjugation of interferon alpha-2b at glutamine or lysine residues[J]. Bioconjugate Chemistry, 2016, 27(11): 2 695-2 706.
- [15] FONTANA A, SPOLAORE B, MERO A, et al. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, 60(1): 13-28.
- [16] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5 259): 680-685.
- [17] 薛晓莹. 葡激酶的聚乙二醇定点修饰产物制备及药理学性质研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2015: 51-52.
- [18] YU Peng-zhan, ZHENG Chun-yang, CHEN Jing, et al. Investigation on PEGylation strategy of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, 15(16): 5 396-5 405.
- [19] 李慧, 陈敏, 李赫, 等. 反相高效液相色谱法测定乳清蛋白中的 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白[J]. 色谱, 2007, 25(1): 116-117.
- [20] 王莹, 屈玉霄, 刘春红, 等. 高效液相色谱法测定 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(2): 57-60.
- [21] KLEBER N, KRAUSE I, ILLGNER S, et al. The antigenic response of beta-lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation[J]. European Food Research & Technology, 2004, 219(2): 105-110.

(下转第 164 页)

22:1(mL/g)、乙醇浓度 60%,在此条件下陕北小粒黑豆皮原花青素平均提取得率为 5.380%。黑豆皮原花青素的抗氧化性试验研究表明原花青素对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子均具有一定的清除效果,该抗氧化能力与原花青素浓度有一定的关系,其  $IC_{50}$  值分别为 0.075,0.590,0.220 mg/mL。通过本试验说明陕北小粒黑豆皮原花青素含量可观且具有较好的抗氧化活性,后续可对黑豆皮中原花青素的抗氧化有效成分作进一步研究。

### 参考文献

[1] 余修亮,朱志平,李佳桥,等. 莲子壳原花青素超声提取工艺优化及其抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 99-109.

[2] 刘新,余小平,游江舟,等. 荔枝皮中原花青素提取工艺优化及其黄酮-3-醇 HPLC 分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 154-158.

[3] 韦琴. 板栗壳中原花青素含量检测方法的比较研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 77-81.

[4] 丁晓旭,尹洋,崔相国,等. 原花青素对喉癌 TU686 细胞增殖、凋亡的影响[J]. 解剖科学进展, 2018, 24(6): 584-587.

[5] ZHOU Qian, HAN Xue, LI Rong-bin, et al. Anti-atherosclerosis of oligomeric proanthocyanidins from *Rhodiola rosea* on rat model via hypolipemic, antioxidant, anti-inflammatory activities together with regulation of endothelial function[J]. *Phytomedicine*, 2018, 51(11): 171-180.

[6] 李海超,吕鹏,陈飞儿,等. 原花青素的抗肿瘤机制研究现状[J]. 吉林医药学院学报, 2017, 38(1): 64-66.

[7] 秦琦,张英蕾,张守文. 黑豆的营养保健价值及研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2015, 25(7): 145-150.

[8] 王巧环,江均平,傅慧敏,等. 绿豆、红小豆和黑豆种皮 18 种元素分析[J]. 食品科学, 2015, 36(20): 126-129.

[9] 沈蒙,康子悦,葛云飞,等. 酶法改性提取黑豆皮可溶性膳食纤维及性质的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30

(6): 1 046-1 053, 1 084.

[10] 蒋新龙,蒋益花. 黑豆皮花色苷酯化修饰及其降解与抗氧化特性[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(9): 34-41.

[11] 张翠,张丽娟,刘占云,等. 比色法测定不同产地黑豆皮中总黄酮的含量[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 309-311, 316.

[12] 沈蒙,曹龙奎. 提取黑豆皮中可溶性膳食纤维的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2017, 27(9): 82-87.

[13] 朱学伸,赵文,林淑鑫,等. 黑豆种皮中原花青素的提取和纯化研究[J]. 现代食品科技, 2018, 34(1): 154-160.

[14] 李勇,李代魁,李忠平,等. 黑豆皮中原花青素含量测定及抗氧化活性研究[J]. 农产品加工, 2019(3): 60-63.

[15] 张喜峰,程广,何倩,等. 双水相萃取分离葡萄籽中原花青素[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 168-173.

[16] 张喜峰,陈雨迪,崔晶,等. 锁阳原花青素提取方法及抗氧化和抗糖基化研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(12): 2 039-2 048.

[17] 李春阳,许时婴,王璋. 香草醛—盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 157-161.

[18] 文魁山. 葡萄籽原花青素高聚体的解聚方法与条件优化的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 19-23.

[19] 高晶晶,慕苗. 陕北小粒黑豆中黄酮的提取工艺研究[J]. 河南科学, 2018, 36(9): 1 367-1 371.

[20] ZHENG Lin, LIN Lian-zhu, SU Guo-wan, et al. Pitfalls of using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides[J]. *Food Research International*, 2015, 76(6): 359-365.

[21] 付晶晶,肖海芳,宋元达. 金银花等 6 种植物提取物总黄酮含量与抗氧化性相关性研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 159-163.

[22] 符群,吴桐,王梦丽. 负压超声法提取刺玫果黄酮及其抗氧化性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 1-10.

(上接第 17 页)

[22] SEELY J E, RICHEY C W. Use of ion-exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography in the preparation and recovery of polyethylene glycol-linked proteins[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 908(1): 235-241.

[23] SCARAMUZZA S, TONON G, OLIANAS A, et al. A new site-specific monoPEGylated filgrastim derivative prepared by enzymatic conjugation: Production and physicochemical characterization[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 164(3): 355-363.

[24] EL-ZAHAR K, SITOHY M, DALGALARRONDO M, et al. Purification and physicochemical characterization of ovine beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin [J]. *Die*

*Nahrung*, 2004, 48(3): 177-183.

[25] MU Qi-meng, HU Tao, YU Jing-kai. Molecular insight into the steric shielding effect of PEG on the conjugated staphylokinase: Biochemical characterization and molecular dynamics simulation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): 1-10.

[26] BALL G, SHELTON M J, WALSH B J, et al. A major continuous allergenic epitope of bovine beta-lactoglobulin recognized by human IgE binding[J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 1994, 24(8): 758-764.

[27] CLEMENT G, BOQUET D, FROBERT Y, et al. Epitopic characterization of native bovine  $\beta$ -lactoglobulin [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 266(1): 67-78.

[28] WAL J M. Structure and function of milk allergens[J]. *Allergy*, 2001, 56(67): 35-38.