

α -葡萄糖苷酶抑制剂高通量筛选模型的建立及其应用

孟鹏¹, 齐西珍¹, 郑芳¹, 任丽梅¹, 白芳^{1*}, 白钢^{1,2}

(南开大学,¹药学院,²生命科学学院,天津 300071)

摘要:【目的】针对人 α -麦芽糖苷酶这个糖代谢途径中重要的靶蛋白,建立 α -糖苷酶抑制剂高通量筛选模型。【方法】采用毕赤酵母表达系统克隆和表达人 α -麦芽糖苷酶。利用酶的催化特性建立 α -糖苷酶抑制剂筛选模型。应用该模型对放线菌代谢产物库进行高通量筛选。通过构建16S rRNA系统发育树分析阳性菌株的分类地位。【结果】首次成功克隆、表达了具催化活性的人 α -麦芽糖苷酶N端结构域。针对人 α -麦芽糖苷酶N端催化结构域,建立 α -糖苷酶抑制剂的筛选模型。对包含近2000株放线菌代谢产物的天然产物库进行高通量筛选,最终得到20株 α -麦芽糖苷酶抑制剂生产菌株。其中19株放线菌为链霉菌属,且在分类学上具有丰富的多样性。【结论】本研究建立的 α -糖苷酶抑制剂高通量筛选模型具有很强的实用价值,可用于新型糖苷酶抑制剂类降糖药物的开发。

关键词: α -糖苷酶抑制剂; 毕赤酵母表达系统; α -麦芽糖苷酶; 放线菌; 高通量药筛

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-1080

α -葡萄糖苷酶抑制剂是目前临床治疗2型糖尿病的一线口服降糖药物,它通过可逆性地抑制肠道内的 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶(如 α -麦芽糖酶、 α -蔗糖酶等),延缓多糖(如淀粉、寡糖等)分解为单糖的过程,从而减慢葡萄糖的吸收速度,降低餐后血糖^[1-2]。目前用于临床糖尿病治疗的 α -糖苷酶抑制剂代表性药物主要有阿卡波糖(Acarbose)、伏格列波糖(Voglibose)、米格列醇(Miglitol)^[3-5]等。其中,阿卡波糖对淀粉酶的抑制作用最强,对双糖酶(麦芽糖酶和蔗糖酶)的抑制作用差。而伏格列波糖和米格列醇则恰好相反,由于防止了淀粉在肠道内大量堆积、发酵而引起的消化不良,后两者的肠胀气副作用比前者轻一些^[6]。因此开发具有自主知识产权的,生物活性更强的新型双糖酶抑制剂将具有非常广阔的应用前景。

放线菌是土壤中种类和数量庞大的一个微生物类群,具有强大的生物合成能力,一直以来都是人们

筛选新型天然化合物的资源宝库。阿卡波糖就发现于游动放线菌(*Actinoplanes* sp. SE50)的发酵液中^[7]。本实验室利用稀释分离法从京、津、黑、辽、鲁、皖、闽、桂、滇等地区的400多份土壤样品中共分离到5000余株放线菌,并建立了包含近2000株放线菌代谢产物的天然产物库。

人 α -麦芽糖苷酶(α -maltase glucoamylase, MGAM, EC 3.2.1.20/EC 3.2.1.3)能够水解麦芽糖中的 α (1-4)糖苷键生成葡萄糖,也具有淀粉末端水解能力,即水解直链糊精末端的 α (1-4)糖苷键^[8-9]。MGAM由两个催化结构域构成:N端结构域和C端结构域,这两个独立的结构域都具有对麦芽糖的水解能力,均属于糖基水解酶家族31(glycosyl-hydrolase family 31, GH31)^[10-11]。

本文从糖的消化、吸收、代谢途径入手,针对人 α -麦芽糖苷酶这个重要靶蛋白,建立 α -葡萄糖苷酶抑制剂的筛选模型,对包含近2000株放线菌代谢产

基金项目:国家“863计划”(2006AA020502)

*通信作者。Tel/Fax: +86-22-23508371; E-mail: baifang1122@nankai.edu.cn

作者简介:孟鹏(1982-),男,山东人,硕士研究生,研究方向为天然药化。E-mail: mengpeng1234@mail.nankai.edu.cn

收稿日期:2010-03-27;修回日期:2010-05-12

物的天然产物库进行高通量筛选,最终得到 20 株 α -麦芽糖苷酶抑制剂生产菌株,并通过 16S rRNA 系统发育分析阐明了这 20 株菌的多样性。为开发具有自主知识产权的天然降糖新药奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:含有人 α -麦芽糖苷酶基因质粒购自 GeneCopoeia。表达载体 pPIC9k、*E. coli* DH5 α 和毕赤酵母 GS115 菌株均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:质粒小提试剂盒购自北京天根生物公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准均购自大连宝生物公司(TaKaRa)。所用培养基及抗生素均购自北京鼎国生物制品公司。16S rRNA 序列测定工作由上海生工公司完成。米格列醇片(Miglitol, 奥恬苹)为四川维奥制药有限公司产品。葡萄糖体外诊断试剂盒(GOD. PAP 法)为北京中生生物工程公司产品。BCA 蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝科技公司。

1.2 MGAM 高效表达酵母菌株的构建

以克隆有人 α -麦芽糖苷酶 cDNA (GenBank 注册号:NM004668)的质粒为模版,以 MGAMnt1: 5' AAGGAAAAACCTAGGTCTGCTGAATGTCCAGTGG 3', MGAMnt2: 5' AAGGAAAAACCTAGGCCTTATCTTTATGCTCCATTCC 3' 为引物(下划线处为 *Avr* II 酶切位点),PCR 扩增出 2.6 kb 的 MGAM N 端催化结构域的基因片段。通过 *Avr* II 酶切位点将 MGAM 基因片段插入 pPIC9K 的多克隆位点,转入大肠杆菌 DH5 α , 在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性克隆子,构建成毕赤酵母表达载体 pPIC9K-MGAM。将该质粒转化入毕赤酵母 GS115 中,筛选得到 α -麦芽糖苷酶稳定表达菌株 GS115/MGAM,具体筛选方法详见毕赤酵母多拷贝表达载体试剂盒(Invitrogen)说明书。

1.3 MGAM 的诱导表达及分离纯化

将 MGAM 表达菌株 GS115/MGAM 单克隆接种到 BMGY 的培养基中,培养 48 h 后转入 BMMY 培养基中进行诱导表达,每 12 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%,28 $^{\circ}$ C,250 r/min 摇瓶诱导培养 4 天后收集发酵液。2 L 发酵液经离心去除酵母菌体,上清液通过截流分子量为 10 kDa 的中空纤维素膜超滤浓缩至 400 mL,得到人 α -麦芽糖苷酶粗酶液,SDS-PAGE 电泳检测,蛋白质含量测定方法详见 BCA 法蛋白定

量试剂盒说明书。

1.4 MGAM 酶活力测定

取 300 μ L 麦芽糖(0.1%),加入 150 μ L 适当稀释的 MGAM 酶溶液,混匀后,37 $^{\circ}$ C 保温 30 min,于沸水中保温 5 min 终止反应,取 10 μ L 反应液加入 150 μ L 葡萄糖工作液,37 $^{\circ}$ C 保温 15 min,测定 490 nm 处的吸光度,反应液中葡萄糖含量越高,显色反应越强,则 OD_{490} 数值越小,根据葡萄糖标准曲线计算生成葡萄糖的量。在 37 $^{\circ}$ C, pH6.9 条件下,每分钟催化形成 1 μ mol D-葡萄糖所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.5 对 MGAM 抑制效果的分析

以 200 μ L 0.1% 麦芽糖为底物,加入 100 μ L 系列稀释的 α -糖苷酶抑制剂溶液,随后加入 100 μ L MGAM(0.5 U/ μ L)启动反应,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后沸水浴 5 min 终止反应,取 50 μ L 反应液用葡萄糖氧化酶法测定 490 nm 光吸收值,具体操作方法详见葡萄糖体外诊断试剂盒使用说明书。以抑制剂浓度为横坐标, α -麦芽糖酶的相对活力为纵坐标作图,绘制剂量依赖的抑制曲线,并通过 GraphPad Prism 5.0 软件计算出半数抑制浓度(IC50)。

1.6 16S rRNA 系统发育学分析

采用 Clustal X 和 Mega4.1 软件进行多重序列比对分析,以 Neighbour-joining (NJ)法构建系统发育树^[12]。分支聚类的稳定性用 bootstrap 方法取样分析 1000 次,进行统计检验。

2 结果

2.1 毕赤酵母表达体系中人 α -麦芽糖苷酶的克隆及表达

将人 α -麦芽糖苷酶 N 端结构域(含 874 个氨基酸)的 cDNA 序列克隆到 pPIC9K 中,得到表达质粒 pPIC9K-MGAM,该质粒经限制性内切酶 *Sac* I 线性化后转化入毕赤酵母 GS115 菌株中,携带有 *AOX1-MGAM* 转录单元的线性质粒以多拷贝形式整合到酵母基因组中,经筛选获得 MGAM 表达菌株 GS115/MGAM,在 0.5% 甲醇诱导下 MGAM 被毕赤酵母高效分泌表达。发酵液经离心除菌体、中空纤维素膜浓缩后得到人 α -麦芽糖苷酶酶液,经 SDS-PAGE 检测(图 1),含量约为 4.2 g/L,酶活力为 103.1 U/mL。

2.2 人 α -麦芽糖苷酶抑制剂高通量筛选模型的建立

2.2.1 放线菌代谢产物库的建立:放线菌发酵液经

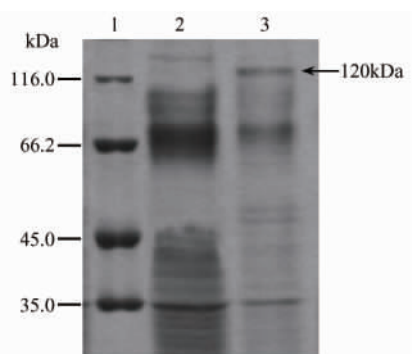


图1 MGAM 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 SDS-PAGE of MGAM. 1. Marker. 2. Fermentation supernatant of GS115/pPIC9K. 3. Fermentation supernatant of GS115/pPIC9K-MGAM, black arrow indicates the MGAM.

冷冻干燥后,溶于 DMSO,发酵产物浓度为 50 g/L,保存于 96 孔板中,200 μ L/孔。其中,每块 96 孔板保存 90 个样品(即 90 株放线菌的发酵产物),剩余 6 孔作为阴阳性对照。本研究共使用 22 块板,包含 1980 株放线菌的发酵产物。

2.2.2 高通量筛选体系的建立:由于高通量筛选过程需在微孔板中进行,因此需要缩小反应体系,同时,因仪器的限制,无法实现酶解反应在其最适反应温度下进行,因此采取适当增加酶量和延长反应时间的办法来保证酶的水解效果。为此,本研究在 1.2.4 反应体系的基础上进行调整,最终将高通量筛选体系确定为:于 96 孔板中,每孔 100 μ L 麦芽糖溶液(1%),10 μ L 放线菌发酵产物(50 g/L),20 μ L MGAM 酶液(2 U/ μ L),室温反应 2 h,以 10 μ L 0.5 mol/L 的盐酸终止反应,取 40 μ L 上述反应液

转移至另一新的 96 孔板,加入 150 μ L 葡萄糖工作液,室温反应 15 min,测定每孔 490 nm 处吸光度。应用上述体系测定上市药物米格列醇对 MGAM 的抑制曲线,结果如图 2 所示,米格列醇对 MGAM 具有剂量依赖性的抑制作用,吸光值均在线性范围内,说明该反应体系可以用于考察放线菌发酵液样品对 α -麦芽糖苷酶的抑制效果。

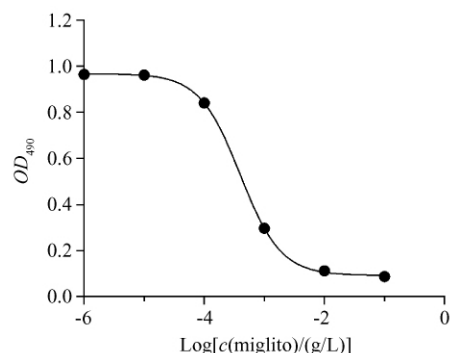


图2 米格列醇对 MGAM 的剂量依赖抑制曲线

Fig. 2 Dose-dependent inhibitory curves of miglitol.

2.3 人 α -麦芽糖苷酶抑制剂生产菌的高通量筛选

利用 Tecan Freedom EVO 200 型高通量药物筛选工作站对 1980 种放线菌发酵产物进行 α -糖苷酶抑制剂的高通量筛选。结果如图 3 所示,大部分放线菌发酵产物对人 α -麦芽糖苷酶的活力没有影响,只有一部分放线菌的发酵产物对 MGAM 有比较明显的抑制作用。以 OD_{490} 为 1.0 时的酶活为 100% 计,取信噪比 > 2.5 ,即抑制效果在 40% 以下 ($OD_{490} < 0.4$) 的菌株视为 α -麦芽糖苷酶抑制剂产生菌,共有 23 株。

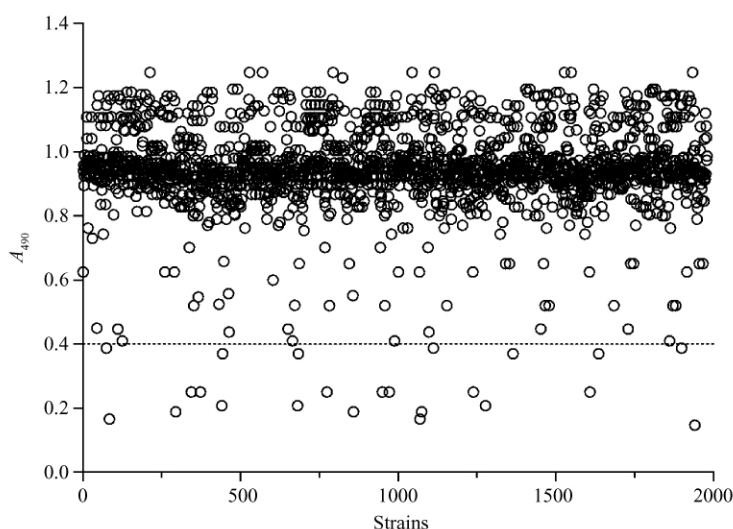


图3 放线菌发酵液对 MGAM 的抑制效果

Fig. 3 Inhibition of MGAM by actinomycetes' culture.

由于高通量药筛结果存在一定的假阳性,因此,按 1.2.4 所述方法对这 23 株菌的发酵产物进行了复筛。最终确定了 20 株 α -麦芽糖苷酶抑制剂产生菌株(表 1),与已上市的 α -糖苷酶抑制剂米格列醇相比,有 14 株菌发酵产物的 MGAM 抑制活性较强,其发酵产物经系列稀释后能够绘制出完整的反 S 形

抑制曲线,并计算出 IC₅₀ 值(图 4,表 1),以米格列醇的 IC₅₀ 定义为 1,计算 14 株菌的比 IC₅₀(表 1),可发现其中菌株 PW609, PW638 和 PZB126 发酵产物的抑制活性均强于同剂量的米格列醇,分别是米格列醇的 4.27、1.59 和 2.47 倍。

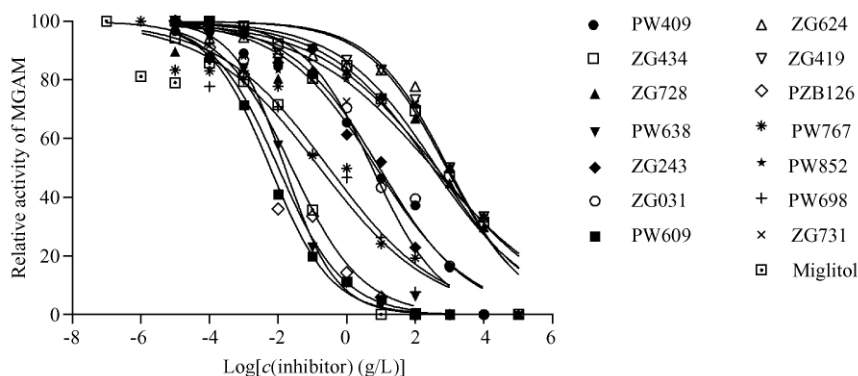


图 4 放线菌发酵产物对 MGAM 的剂量依赖抑制曲线

Fig.4 Dose-dependent inhibitory curves of the products from actinomycetes.

表 1 α -糖苷酶抑制剂产生菌列表

Table 1 α -Glucosidase inhibitor producing strains list

Strains	IC ₅₀ ^a (g/L)	Inhibition potency (IC ₅₀ _{miglitol} /IC ₅₀ _{strain})	Nearest known species, Similarity/%	GenBank Accession No.
PW003	NA	-	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 3392, 99.2	GQ985446
PW409	7.306	0.0035	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 15419, 99.7	FJ820337
PW852	416.4	0.000061	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 13072, 99.5	FJ820336
PW609	0.005926	4.27	<i>Streptomyces</i> sp. 216701, 99.5	GQ985448
PW638	0.01594	1.59	<i>Streptomyces</i> sp. 2H31-7, 99.4	GQ985447
PW698	0.1639	0.15	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 15899, 99.8	GQ985449
PW767	0.3023	0.084	<i>Streptomyces</i> sp. L133, 99.9	GQ985450
ZG031	9.001	0.0028	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 12178, 99.2	GQ985451
ZG084	NA	-	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 12772, 93	GQ985452
ZG731	332.2	0.000076	<i>Streptomyces</i> sp. 14318, 99.9	GQ985455
ZG243	5.609	0.0045	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL B-16357, 99.3	GQ985453
ZG419	NA	-	<i>Streptomyces</i> sp. MH105, 99.8	GU991347
ZG434	427.6	0.000059	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 15899, 100	GU991348
ZG574	NA	-	<i>Streptomyces</i> sp. 752, 99.3	GQ214029
ZG624	912.8	0.000028	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 13373, 99.7	GU991349
ZG636	NA	-	<i>Streptomyces</i> sp. HBUM174520, 99.6	GU991350
ZG642	NA	-	<i>Streptomyces</i> sp. A528Ydz-FQ, 99.9	GU991351
ZG728	319.5	0.000079	<i>Streptomyces</i> sp. 1A01504, 99.5	GQ985454
ZG737	811	0.000031	<i>Streptomyces</i> sp. EA1145, 99.4	GQ214028
PZB126	0.01024	2.47	<i>Streptomyces</i> sp. 216802, 99.3	GU991338
Miglitol	0.0253	1		

^a: NA indicates not available, as the inhibitor content or inhibitory activity is low, therefore IC₅₀ value can not be determined.

2.4 α -糖苷酶抑制剂产生菌的 16S rRNA 系统发育分析

对 20 株 α -糖苷酶抑制剂生产菌的 16S rRNA 进行核酸序列测定,首先将所得序列在 GenBank 中进行比对,发现除 ZG084 号菌株外,其余 19 株菌的 16S rRNA 序列均与链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 的

16S rRNA 具有 >99% 的 DNA 序列相似性(表 1),说明这 19 株放线菌均属于链霉菌属。然后将 20 株菌的 16S rRNA 序列提交给 Genbank 数据库,并获得核酸序列注册号(表 1)。最后将 20 株菌的 16S rRNA 与 6 株链霉菌属常见种,即 *Streptomyces tendae*, *Streptomyces macrosporeus*, *Streptomyces*

tumenensis, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces myxogenes*, *Streptomyces lavendulae* 的 16S rRNA 序列进行比对, 共同构建系统发育树。如图 5 所示, 20

株 α -糖苷酶抑制剂产生菌在进化树上的遗传距离相距较远, 说明活性菌株具有较丰富的菌种多样性。

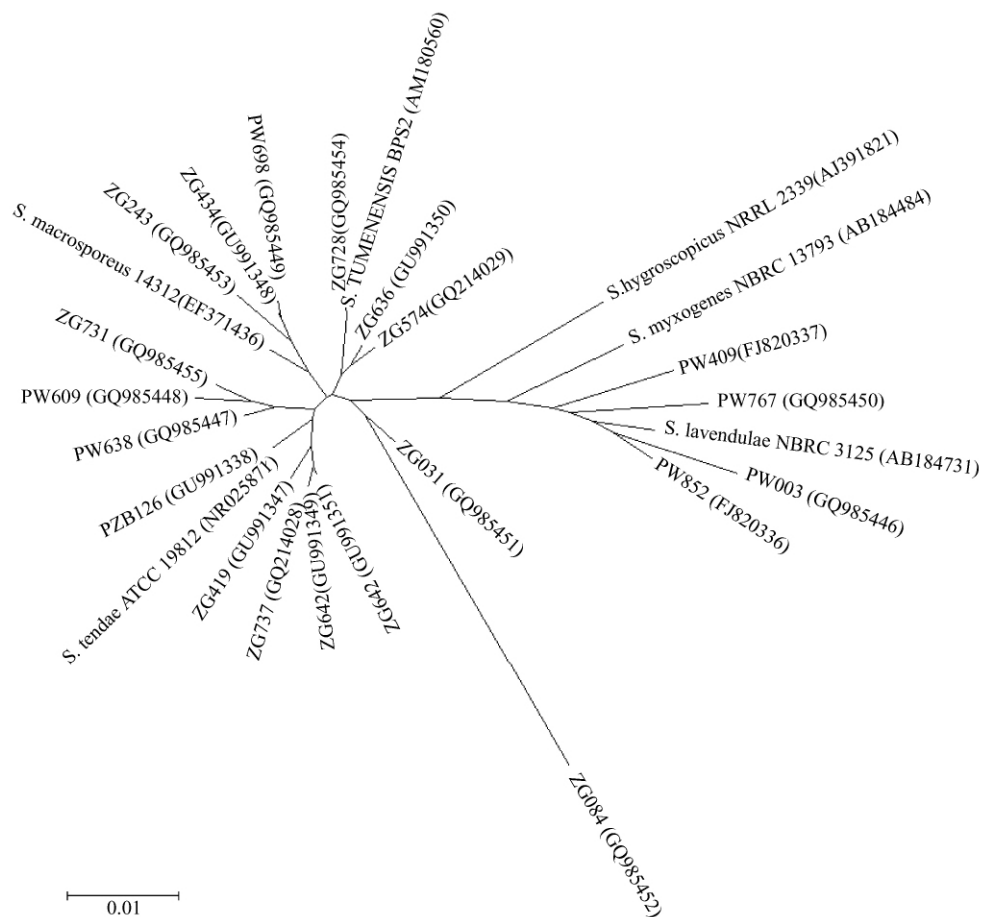


图 5 α -糖苷酶抑制剂生产菌株的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 5 Molecular phylogenetic consensus of α -Glucosidase inhibitor producing strains based on 16S rRNA gene.

3 讨论

由于高通量筛选在创新先导物的发现过程中具有高效、快速、微量等特点, 因此被国际大多数医药研究机构广泛采用, 在创新药物的研究和开发中发挥了重要作用^[13]。本研究建立的高通量筛选模型, 是以消化道中糖类分解酶 α -麦芽糖苷酶作为靶分子, 筛选相应的天然抑制剂。该系统 4 h 内可以检测约 500 个样品, 因此非常快速、高效。以往的 α -糖苷酶抑制剂筛选体系都是使用动物 (如猪或大鼠) 来源的小肠酶^[14], 即包含淀粉酶和各种糖苷酶的混合物, 这样筛出的抑制剂其作用靶点不明确, 不利于其抑制机理的阐明。而且对于新药开发而言, 采用人源蛋白作为靶标进行活性化合物的筛选则更为安全、有效。

Nichols 和 Rossi 等人曾利用 COS-1 细胞和果蝇

S2 细胞成功表达了具有催化活性的人 α -麦芽糖苷酶的 N 端催化结构域^[15-16], 但是 COS-1 细胞表达水平低且目标蛋白会锚定在细胞膜上, 给分离纯化带来很大的困难, 目前表达 MGAM 最常用的是果蝇 S2 细胞表达系统, 然而 S2 细胞表达系统也存在诸如细胞培养困难, 表达量低等缺点。作为真核生物的毕赤酵母不仅具有高等真核表达系统的诸多优点, 如蛋白加工、折叠、翻译后修饰等, 而且操作与 *E. coli* 同样简单。它比哺乳动物细胞培养等其它真核表达系统更快捷、简单、廉价, 且表达水平更高^[17]。本文首次利用毕赤酵母表达系统成功地克隆表达了人 α -麦芽糖苷酶的 N 端催化结构域, 表达产物具有较高的酶活力, 由于毕赤酵母/pPIC9K 表达系统是分泌型表达, 发酵液经过简单纯化后即可于药物筛选, 操作便捷、成本低廉, 适合大规模应用。

利用 MGAM 抑制剂筛选模型对近 2000 株土壤

放线菌发酵产物进行高通量筛选,最终得到 20 株 α -麦芽糖苷酶抑制剂产生菌,经过 16S rRNA 分析,发现其中的 19 株放线菌属于链霉菌属,将活性菌株与链霉菌属的 6 个常见种共同构建系统发育树,在 6 个常见种中,*S. hygrosopicus*, *S. myxogenes*, *S. lavendulae* 分别是已报道的糖苷酶抑制剂 Valienamine、Oligostatins 和 Nojirimycin 的产生菌,其中,井冈霉素(valienamine) 是环醇类糖苷酶抑制剂, oligostatins 为假性寡糖类糖苷酶抑制剂,而野尻霉素(nojirimycin) 属于类吡喃糖类的糖苷酶抑制剂^[18]。应用 MGAM 抑制剂筛选模型筛选得到的 20 株活性菌株在系统发育树上表现出较丰富的菌种多样性,暗示着这 20 株菌的发酵产物中可能包含多种类型的 α -糖苷酶抑制剂。

从复筛结果可以看出,虽然 20 株候选菌株在高通量筛选体系中对 MGAM 的抑制效果均在 40% 以下,但在复筛中表现出的抑制效果却有很大差异。这是由于高通量筛选时所使用的反应体系较微量,且反应时间长,不同样品反映在 OD 值上的差距不易拉开,而当反应体系放大,且处在酶的最适反应条件下(反应时间缩短),这种差异就比较明显了。在抑制活性较高的 14 株菌中,菌株 PW609, PW638 和 PZB126 发酵产物的抑制活性均强于同剂量的米格列醇。因此,可将链霉菌 PW609, PW638 和 PZB126 作为重点菌株进行新型 α -糖苷酶抑制剂天然药物的开发。

参考文献

- [1] Kim YM, Wang MH, Rhee HI. A novel α -Glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Rs*, 2004 (339): 715-717.
- [2] Puls W. Pharmacology of glucosidase inhibitors. In *Handbook of Experimental Pharmacology: Oral Antidiabetics*, 1996(119): 497-525.
- [3] Balfour JA, McTavish D. Acarbose: an update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus. *Drugs*, 1993, 46(6): 1025.
- [4] 王家驰. 新一代 α -葡萄糖苷酶抑制剂—伏格列波糖(倍欣). *中国糖尿病杂志 (Chinese Journal of Diabetes)*, 1999, 7(2): 126-127.
- [5] 钟倩. 米格列醇首次上市用于 II 型糖尿病. *国外医药-合成药、生化药、制剂分册 (World Pharmacy)*, 1998, 19(6): 369-370.
- [6] 王卫东, 徐! , 徐维平. α -糖苷酶抑制剂和二甲双胍联用对 2 型糖尿病患者治疗效果的 Meta-分析. *中国临床保健杂志 (Chinese Journal of Clinical Healthcare)*, 2008, 11(6): 572-573.
- [7] Sumitani JI, Tsujimoto Y, Kawaguchi T, Arai M. Cloning and secretive expression of the gene encoding the proteinaceous α -amylase inhibitor paim from *Streptomyces corchorusii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 90(2): 214-216.
- [8] Robayo-Torres CC, Quezada-Calvillo R and Nichols BL. Disaccharide digestion: clinical and molecular aspects. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006, 4: 276-287.
- [9] Heymann H and Günther S. Calculation of subsite affinities of human small intestinal glucoamylase - maltase. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1994, 375: 451-455.
- [10] Ernst HA, Leggio LL, Willemoës M, Leonard G, Blum P, Larsen S. Structure of the *Sulfolobus solfataricus* alpha-glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 358: 1106-1124.
- [11] Nichols BL, Avery S, Sen P, Swallow DM, Hahn D, Sterchi E. The maltase - glucoamylase gene: common ancestry to sucrase - isomaltase with complementary starch digestion activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 1432-1437.
- [12] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 姜成林. 放线菌系统学:原理、方法及实践. 第一版. 北京:科学出版社,2007.
- [13] Du G H. Application of high throughput screening in drug development. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2001, 121(4): 289-293.
- [14] 耿鹏. 天蓝黄链霉菌及其产生的新型 α -淀粉酶抑制剂研究. 南开大学学位论文, 2008.
- [15] Buford L. Nichols, Stephen Avery, Partha Sen, Dallas M. Swallow. The maltase-glucoamylase gene: Common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(3):1432 - 1437.
- [16] Elena J. Rossi, Lyann Sim, David R. Rose. Inhibition of recombinant human maltase glucoamylase by salacinol and derivatives. *Federation of European Biochemical Societies*, 2006, 273: 2673 - 2683
- [17] 路蓉. 巴斯德毕赤酵母表达系统及其分泌型蛋白表达的研究进展. *临床和实验医学杂志 (Journal of Clinical and Experimental Medicine)*. 2004, 3(1): 43-47.
- [18] 欧阳曙. 微生物来源的淀粉酶和糖苷酶抑制剂研究进展. *国外医药抗生物分册 (World Notes on Antibiotics)*, 1993, 14(1): 44-54.

Establishment and application of a high-throughput model for screening α -glucosidase inhibitors

Peng Meng¹, Xizhen Qi¹, Fang Zheng¹, Limei Ren¹, Fang Bai^{1*}, Gang Bai^{1,2}

(¹ College of Pharmacy, ² College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: [**Objective**] Targeted at the important enzyme in human glucose metabolic pathway, the purpose of this paper is to establish α -glucosidase inhibitors high throughput screening model. [**Methods**] *Pichia pastoris* expression system was used to clone and express the human α -maltase glucosidase. Using the catalytic properties of enzyme to establish α -glucosidase inhibitor screening model. This model was applied in screening of actinomycete metabolites library. The taxonomic status of positive strains were analyzed by constructing 16S rRNA phylogenetic tree. [**Results**] The N-terminal catalytic domain of human α -maltase glucosidase was successfully cloned and expressed for the first time. The high-throughput screening model of α -glucosidase inhibitors was established. A natural product library containing metabolites from nearly 2000 actinomycetes was screened, 20 α -maltase glucosidase inhibitor producing strains were obtained finally, of which, 19 strains initially identified as *Streptomyces*, and showed taxonomically rich diversity. [**Conclusion**] The α -glucosidase inhibitor high-throughput screening model has high practical value, this work laid the foundation for developing new hypoglycemic drugs.

Keywords: α -glucosidase inhibitor; *Pichia pastoris* expression system; α -maltase glucoamylase; actinomycetes; high-throughput screening

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA020502)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-23508371; E-mail: baifang1122@nankai.edu.cn

Received: 27 March 2010/Revised: 12 May 2010

《微生物学报》投稿方式

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

- (1) 远程投稿:请先登陆本刊网站 <http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。
- (2) 收稿回执:编辑部看到远程投稿后,当日或者次日给作者发“收稿回执”,通知作者投稿成功。
- (3) 编辑部内审:编辑看到远程投稿后,还要对稿件进行内审。内审会有2个结果,直退或受理,请接到“受理通知”的作者再补交其它材料(纸样介绍信和稿件、受理费)。
- (4) 邮寄纸样:为了保护知识产权,务必请作者提供“研究内容所属单位”出具的介绍信(请到本刊网页的“下载专区”中下载“介绍信”模板);为了核实文中的图、表等内容,还需要提供一份纸质稿件。
- (5) 受理费:100元审稿费。按照“稿件受理通知”中提供的详细地址办理,务必通过邮局汇款,切忌夹在纸样材料中随信邮寄!【为了便于查找,请在汇款单上注明“稿件编号”。】