

## 人胰腺 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂高通量筛选模型的建立及其应用

齐西珍<sup>1</sup>, 任丽梅<sup>1</sup>, 郑芳<sup>1</sup>, 张奇<sup>1</sup>, 白芳<sup>1\*</sup>, 白钢<sup>1,2</sup>

南开大学,<sup>1</sup> 药学院,<sup>2</sup> 生命科学学院, 天津 300071

**摘要** 【目的】针对人胰腺  $\alpha$ -淀粉酶这个糖代谢途径中重要的靶蛋白, 建立  $\alpha$ -淀粉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胰腺  $\alpha$ -淀粉酶; 利用酶的催化特性建立  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂筛选模型; 应用该模型对放线菌发酵液冻干物进行高通量筛选; 通过构建 16S rRNA 系统发育树分析阳性菌株的分类地位。【结果】成功克隆、表达了具催化活性的人胰腺  $\alpha$ -淀粉酶; 建立了  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂的筛选模型; 对近 2000 株放线菌的发酵液冻干物进行高通量筛选, 最终得到 14 株  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂产生菌株, 且在分类学上具有丰富的菌种多样性。【结论】本研究建立的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂高通量筛选模型具有很强的实用价值, 可用于新型淀粉酶抑制剂类降糖药物的开发。

**关键词:**  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂, 毕赤酵母表达系统, 人胰腺  $\alpha$ -淀粉酶, 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 (2011) 08-1106-07

人类胰腺  $\alpha$ -淀粉酶 (human pancreatic  $\alpha$ -amylase, HPA) 是人消化系统中的关键酶, 它参与膳食中淀粉水解成葡萄糖的第一步, 小肠中 HPA 的活性与餐后血糖水平密切相关, 抑制 HPA 的活性有利于糖尿病和肥胖症的治疗和防治<sup>[1]</sup>。目前,  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂类降糖药物阿卡波糖 (拜唐苹<sup>TM</sup>) 已广泛应用于临床上对 2 型糖尿病的治疗, 然而, 由于对非消化性  $\alpha$ -糖苷酶 (nondigestive  $\alpha$ -glycosidases) 产生的非特异性抑制导致了其副作用的产生, 当这类药物 (如阿卡波糖) 或其代谢产物被全身性吸收后, 便会使副作用加剧<sup>[2-3]</sup>。理想的 HPA 抑制剂类药物应该选择性的在肠道内发生药效, 尽量降低全身性作用。因此, 发现新型的、HPA 特异性强的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂是此类降糖药物研发的方向<sup>[4-5]</sup>。

天然产物是酶抑制剂的宝贵来源,  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂阿卡波糖最初就是从游动放线菌的发酵液中分离出来的<sup>[6]</sup>。选择从微生物发酵产物中筛选活性分子的优势在于, 发酵产物中包含数不尽的微生物初级和次级代谢产物, 而它们中的多数都是全新的化合物, 这就大大增加了新型生物活性分子发现的机会<sup>[7]</sup>。

高通量药物筛选是 20 世纪 80 年代中期产生的为寻找先导物, 针对大量样品进行药理活性评价分析的一种技术手段, 是以药物发现的基本规律为基础, 应用药理学、生物化学、分子生物学及细胞生物学、计算机科学、药物化学、组合化学等多个学科知识的一种药物筛选体系<sup>[8]</sup>。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

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21002052); 天津市应用基础及前沿技术 Research Plan 项目 (10JCYBJC14300); 中央高校基本科研业务费专项资金 (65011161)

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

作者简介: 齐西珍 (1985 -), 女, 山东人, 硕士研究生, 微生物发酵及产物分离。E-mail: qixizhen@163.com

收稿日期: 2011-01-19; 修回日期: 2011-03-12

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<sup>[9]</sup>。

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,收集了其中2000株放线菌的发酵液冻干物<sup>[10]</sup>。本文针对HPA这个糖代谢中的关键酶,构建了 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂药物的高通量筛选模型,并利用该模型对上述放线菌发酵产物进行了广泛筛选,获得了数株HPA抑制剂产生菌,为发现新型的 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂先导物奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株:**含有人胰腺 $\alpha$ -淀粉酶cDNA(GenBank注册号:NM020978)的质粒pEX-C0614-HPA购自GeneCopoeia;表达载体pPIC9k、*E. coli* DH5 $\alpha$ 和毕赤酵母GS115菌株均为本实验室保存。

**1.1.2 培养基和试剂:**LB培养基(10%胰蛋白胨、5%酵母提取物、10%氯化钠,pH7.4);BMGY培养基(2%胰蛋白胨、1%酵母粉、1.34%YNB、 $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素、0.1 mol/L pH6.0磷酸缓冲液、1%甘油);BMMY培养基(2%胰蛋白胨、1%酵母粉、1.34%YNB、 $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素、0.1 mol/L pH6.0磷酸缓冲液、0.5%甲醇);卢戈氏碘液(5%碘、10%碘化钾)。

**1.1.3 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、 $T_4$  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、抗生素及常用生化试剂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;阿卡波糖片(Acarbose,拜唐苹)为德国拜耳制药有限公司产品;BCA蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝科技公司。

### 1.2 HPA 高效表达酵母菌株的构建

以克隆人胰腺 $\alpha$ -淀粉酶基因的质粒pEX-C0614-HPA为模版,以AMY-1:5'-AAGGAAAAAA-CCTAGGATGAAGTTCTTTCTGTTGC-3'和AMY-2:5'-AAGGAAAAAA-CCTAGGCTATAATTTAGATTCAG-CATGAATTG-3'为引物(下划线处为*Avr* II酶切位点),PCR扩增出1.6 kb的HPA全长基因片段。通

过*Avr* II酶切位点将HPA基因片段插入pPIC9K的多克隆位点,转入大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,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-HPA。将该质粒转化入毕赤酵母GS115中,筛选得到人胰腺 $\alpha$ -淀粉酶稳定表达菌株GS115/HPA,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 HPA 的诱导表达及分离纯化

将HPA表达菌株单克隆接种到BMGY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℃,250 r/min摇瓶诱导培养4 d后收集发酵液。发酵液经离心去除酵母菌体,中空纤维素膜超滤浓缩,乙醇沉淀,最后参照Rydberg的方法<sup>[11]</sup>,通过糖原特异性吸附得到HPA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 HPA 酶活力测定

以200  $\mu$ L 0.1%可溶性淀粉为底物,加入20  $\mu$ L HPA启动反应,0.5 mol/L盐酸终止反应,还原糖的测定以麦芽糖为标准,样品加30  $\mu$ L 1% 3,5-二硝基水杨酸后沸水浴5 min,适当稀释后测490 nm光吸收值,根据麦芽糖标准曲线计算生成麦芽糖的量。在40℃,pH6.5条件下,每分钟催化淀粉释放1.0 mg麦芽糖所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

### 1.5 HPA 酶学性质的测定

HPA的最适反应温度:不同温度下保温10 min后测定HPA的酶活力,以酶活力最大时的活性为100%换算不同温度下酶的相对活性。

HPA的最适反应pH值:测定不同pH的缓冲液中酶活力的大小,以酶活性最高时的活性为100%换算不同pH下酶的相对活性。

### 1.6 对 HPA 抑制效果的分析

以400  $\mu$ L 0.1%淀粉溶液为底物,加入50  $\mu$ L系列稀释的 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂溶液,随后加入50  $\mu$ L HPA(0.5 U/ $\mu$ L)启动反应,37℃孵育30 min后沸水浴5 min终止反应,在上述反应体系中加入50  $\mu$ L卢戈氏碘液,于630 nm测定光吸收值。应用GraphPad Prism 5.0软件,以抑制剂浓度为横坐标,HPA的相对活力为纵坐标作图,绘制剂量依赖的抑制曲线,并计算半数抑制浓度(IC50)。

### 1.7 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<sup>[11]</sup>。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胰腺 $\alpha$ -淀粉酶的克隆及表达

将人胰腺  $\alpha$ -淀粉酶基因(HPA)克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中,得到表达质粒 pPIC9K-HPA。将重组质粒 pPIC9K-HPA 线性化后,转化毕赤酵母 GS115,携带有 AOX1-HPA 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 HPA 表达菌株 GS115/HPA。GS115/HPA 经甲醇诱导可高效表达人胰腺  $\alpha$ -淀粉酶(图 1),发酵液中每 mg 蛋白的 HPA 酶活力可达 136 U。

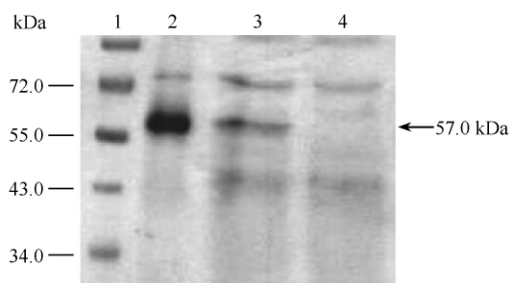


图 1 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of HPA. 1. Protein maker; 2. Glycogen specificity precipitation of HPA, black arrow indicate the HPA; 3. Fermentation supernatant of GS115/HPA; 4. Fermentation supernatant of GS115 contained empty vector pPIC9K.

### 2.2 HPA 的酶学性质

HPA 具有一定的温度耐受性,当温度在 25℃ - 55℃ 时均能保持良好的酶活性(图 2-A),最适反应温度为 40℃。HPA 的最适 pH 为 6.5,其在 pH 为 6 - 7 时活性都很高,并且在该酶等电点时 (pH = 6.77) 酶活性稍有下降(图 2-B)。

### 2.3 人胰腺 $\alpha$ -淀粉酶抑制剂高通量筛选模型的建立

**2.3.1 放线菌发酵液冻干物的制备:**放线菌发酵液经冷冻干燥后,溶于 DMSO,发酵液冻干物浓度为 50 mg/mL,保存于 96 孔板中 200  $\mu$ 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 96 孔板,共包含 1980 株放线菌的发酵液冻干物。

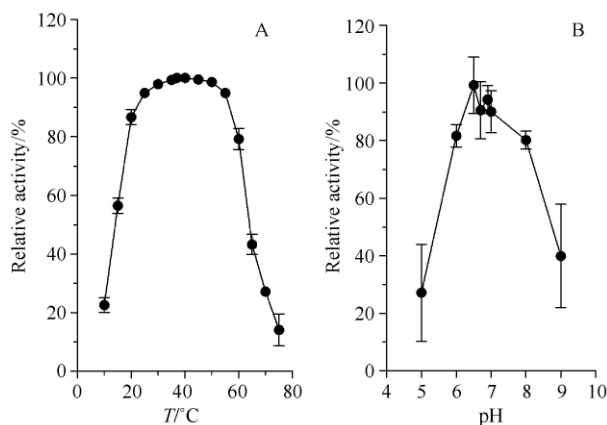


图 2 HPA 的酶学性质

Fig. 2 Enzymatic properties of the HPA. A: The effects of temperature on the enzyme activity, B: The effects of pH on the enzyme activity.

**2.3.2 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,本研究在方法 1.6 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  $\mu$ L 淀粉溶液(1%),10  $\mu$ L 放线菌发酵液冻干物(50 mg/mL),10  $\mu$ L HPA 酶液(5 U/ $\mu$ L),室温反应 1 h,以 10  $\mu$ L 0.5 mol/L 的盐酸终止反应,加入 50  $\mu$ L 卢戈氏碘液,取上述反应液 100  $\mu$ L 转移至另一新的 96 孔板,测定每孔 630 nm 处吸光度。应用上述体系测定上市药物阿卡波糖对 HPA 的抑制曲线,结果如图 3 所示,阿卡波糖对 HPA 表现出剂量依赖性的抑制作用,吸光值均在线性范围内。

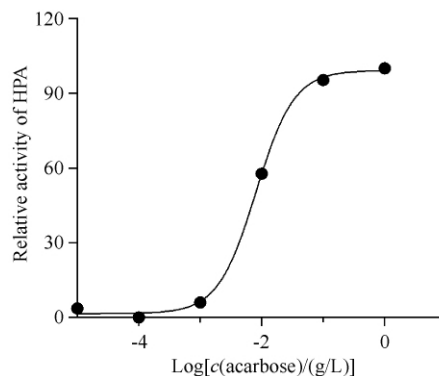


图 3 阿卡波糖对 HPA 的剂量依赖抑制曲线

Fig. 3 Dose-dependent inhibitory curves of acarbose.

2.4 人胰腺α-淀粉酶抑制剂产生菌的高通量筛选

利用 Tecan Freedom EVO 200 型高通量药物筛选工作站( Tecan ,瑞士) 对 1980 株放线菌发酵产物进行α-淀粉酶抑制剂的高通量筛选。结果如图 4 所示 ,约 0.96% 的放线菌发酵产物对 HPA 有较明显的抑制作用。以  $OD_{630}$  为 0.5 时的酶活定义为 100% ,取信噪比 > 3 ,即  $OD_{630} > 1.5$  的菌株视为α-淀粉酶抑制剂产生菌 ,共 19 株。

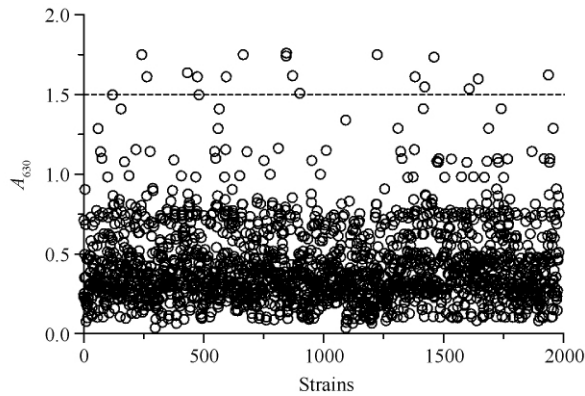


图 4 放线菌发酵液对 HPA 的抑制效果  
Fig. 4 Inhibition of HPA by actinomycetes' culture.

依照 1.6 所述方法对高通量筛选获得的 19 株菌进行复筛 ,最终确定了 14 株α-淀粉酶抑制剂产生菌株 ,其发酵液冻干物经系列稀释后能够绘制出完整的 S 形抑制曲线 ,并计算出 IC<sub>50</sub> 值( 图 5 ,表 1) 。将阿卡波糖对 HPA 的抑制活性定义为 100% ,计算 14 株菌发酵产物的比 IC<sub>50</sub>( 表 1) ,发现其中菌株 PW444 ,ZG656 和 PW283 发酵产物的抑制活性较高 ,分别为 32.68%、20.47% 和 17.93% 。

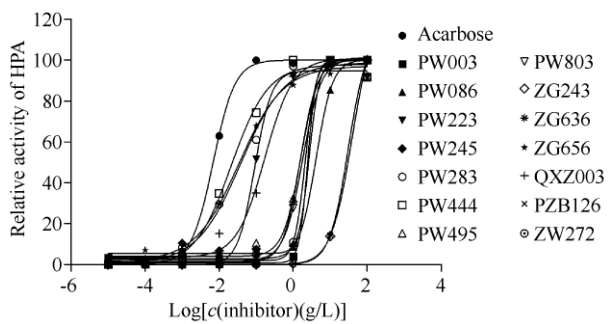


图 5 放线菌发酵产物对 HPA 的剂量依赖抑制曲线  
Fig. 5 Dose-dependent inhibitory curves of the products from actinomycetes.

表 1 α-淀粉酶抑制剂产生菌列表  
Table 1 α-Amylase inhibitor producing strains list

Strains	IC <sub>50</sub> /( mg/mL)	Inhibition potency ( IC <sub>50</sub> <sub>acarbose</sub> /IC <sub>50</sub> <sub>strain</sub> × 100% )	Nearest known species , Similarity ( % )	GenBank accession No.
PW003	2.472	0.28	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 3392 , 99.2	GQ985446
PW086	4.145	0.17	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 15899 , 99.7	HQ684738
PW223	0.09145	7.63	<i>Streptomyces</i> sp. HBUM175093 , 99.9	HQ684739
PW245	2.724	0.26	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 12547 , 99.4	HQ684740
PW283	0.03893	17.93	<i>Streptomyces</i> sp. SDS , 99.6	HQ684741
PW444	0.02136	32.68	<i>Streptomyces</i> sp. USF-6280 , 99.9	HQ684742
PW495	1.62	0.43	<i>Streptomyces</i> sp. 0712K10-2 , 100	HM222677
PW803	1.805	0.39	<i>Streptomyces</i> sp. 11025 , 99.4	HQ684743
ZG243	39.81	0.02	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL B-16357 , 99.3	GQ985453
ZG636	31.05	0.02	<i>Streptomyces</i> sp. HBUM174520 , 99.6	GU991350
ZG656	0.0341	20.47	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 15399 , 99.9	EU201137
PZB126	1.545	0.45	<i>Streptomyces</i> sp. 216802 , 99.3	GU991338
QXZ003	0.1719	4.06	<i>Streptomyces</i> sp. NBRC 12547 , 99.4	HQ684744
ZW272	2.133	0.33	<i>Streptomyces</i> sp. MJM12153 , 98.9	HQ684745
Acarbose	0.00698	100		

2.5 人胰腺α-淀粉酶抑制剂产生菌的 16S rRNA 系统发育分析

首先对 14 株α-淀粉酶抑制剂产生菌的 16S rRNA 进行核酸序列测定 ,将所得序列在 Genbank 中进行比对 ,发现它们均与链霉菌属( *Streptomyces*

sp.) 的 16S rRNA 具有 >99% 的 DNA 序列相似性 ( 表 1) ,说明这 14 株放线菌均属于链霉菌属。然后将 14 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 14 株菌的 16S rRNA 与 5 株链霉菌属常见种 ,即

*Streptomyces tendae*, *Streptomyces macrosporeus*,  
*Streptomyces tumenensis*, *Streptomyces hygrosopicus*,  
*Streptomyces lavendulae* 的 16S rRNA 序列进行比

对,共同构建系统发育树。如图 6 所示,14 株  $\alpha$ -淀粉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。

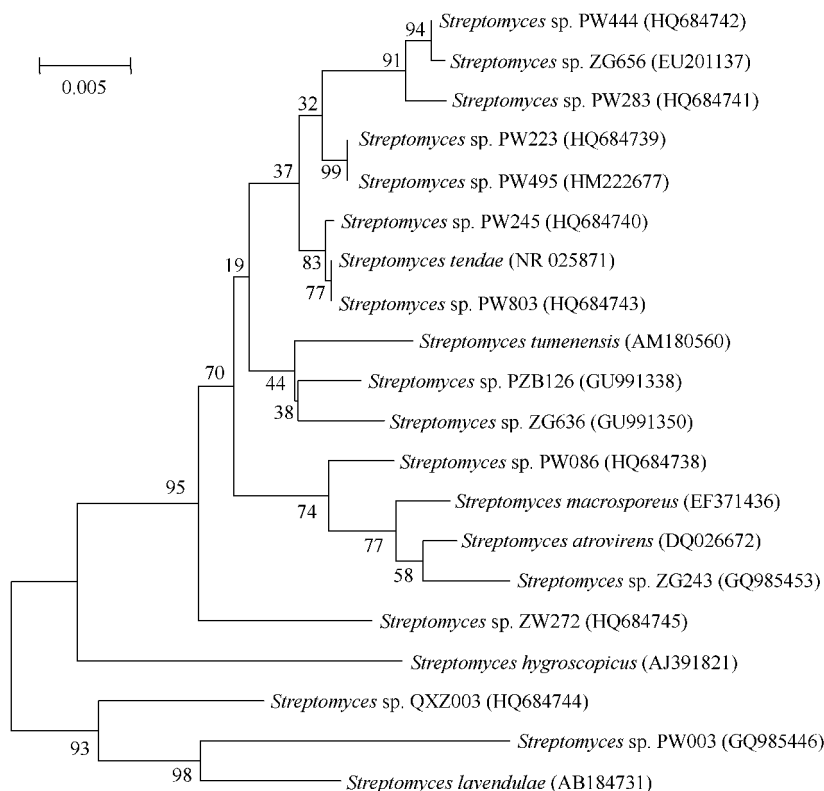


图 6  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂产生菌株的 16S rRNA 系统发育树

Fig. 6 Molecular phylogenetic consensus of  $\alpha$ -Amylase inhibitor producing strains based on 16S rRNA gene. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.5% sequence divergence.

### 3 讨论

本文利用毕赤酵母表达体系成功地克隆、表达了人体糖代谢途径中的关键酶 HPA,该酶的最适反应温度为 40℃,最适 pH 为 6.5,符合人胰腺  $\alpha$ -淀粉酶特性<sup>[12]</sup>。利用 HPA 水解淀粉引起碘反应消失这一特性,设计并建立了 HPA 抑制剂高通量筛选模型,该系统 4 小时内可以检测约 500 个样品,因此非常快速、高效。

以往的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂筛选体系多是使用动物(如猪或大鼠)来源的小肠酶<sup>[10]</sup>,是包含淀粉酶和各种糖苷酶的混合物,其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。Tarling 等<sup>[4]</sup>人曾报道过应用 HPA 筛选抑制剂,其测定原理是以 2-氯-对硝基苯麦芽三糖苷(CNP-G3)为底物,HPA 水解 CNP-G3 可释放色团 2-氯-4-硝基苯酚(CNP),CNP 在 405 nm 波长处有光吸收,通过测定 CNP 的释放量来评估 HPA 抑制剂的活性<sup>[12]</sup>,CNP-G3 法应用于高通量筛选的缺点是底物成本高。

通过 HPA 抑制剂高通量筛选得到的 19 株候选菌株,在复筛中表现出的抑制效果有较大差异,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,这种差异就得以显现。经过 16S rRNA 序列分析,发现 14 株  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂产生菌均属于链霉菌属,将活性菌株与链霉菌属的 5

个常见种共同构建系统发育树,其中 *S. hygroscopicus* 和 *S. lavendulae* 分别是已报道的糖苷酶抑制剂井冈霉素(valienamine)和野尻霉素(nojirimycin)的产生菌<sup>[13]</sup>。应用 HPA 抑制剂筛选模型筛选得到的 14 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 14 株菌的发酵产物中可能包含多种类型的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂。其中,菌株 PW444, ZG656 和 PW283 发酵产物的抑制活性最强,因此,可将它们作为重点菌株进行新型  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂天然药物的开发。

## 参考文献

- [1] Rydberg EH, Sidhu G, Vo HC, Hewitt J, Cote HC, Wang Y, Numao S, MacGillivray RT, Overall CM, Brayer GD and Withers SG. Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha-amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Science*, 1999, 8: 635-643.
- [2] Li C, Begum A, Numao S, Park KH, Withers SG, Brayer GD. Acarbose rearrangement mechanism implied by the kinetic and structural analysis of human pancreatic alpha-amylase in complex with analogues and their elongated counterparts. *Biochemistry*, 2005, 44 (9): 3347-3357.
- [3] Scheen AJ. Is there a role for alpha-glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus? *Drugs*, 2003, 63: 933-951.
- [4] Tarling CA, Woods K, Zhang R, Brastianos HC, Brayer GD, Withers SG. The search for novel human pancreatic  $\alpha$ -amylase inhibitors: high-throughput screening of terrestrial and marine natural product extracts. *ChemBioChem*, 2008, 9: 433-438.
- [5] Yokose K, Ogawa K, Sano T, Watanabe K, Maruyama HB, Suhara Y. New alpha-amylase inhibitor, trestatins. I. Isolation, characterization and biological activities of trestatins A, B and C. *Journal of Antibiotics*, 1983, 36: 1157-1165.
- [6] Schmidt DD, Frommer W, Muller L, Truscheit E. Glucosidase inhibitors from Bacilli. *Naturwissenschaften*, 1979, 66: 584-585.
- [7] Bnouham M, Ziyyat A, Maekhfi H, Tahri A, Legssyer A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity—A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes & Metabolism*, 2006, 14: 1-25.
- [8] Han B, Chen W, Yang C M. Application of high throughput screening in traditional Chinese medicine development. *Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine* (江西中医学院学报), 2005, 17 (5): 36-38.
- [9] Zhang L, Du G H. High content drug screening and its application. *Acta Pharmaceutica Sinica* (药理学报), 2005, 40(6): 486-490.
- [10] 耿鹏. 天蓝黄链霉菌及其产生的新型  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂研究. 南开大学学位论文, 2008.
- [11] 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. 北京: 科学出版社, 2007.
- [12] 吕邦泰, 杨昌国, 许叶. 用 2-氯-4-硝基苯- $\alpha$ -半乳糖麦芽糖苷作底物测定总淀粉酶和胰腺淀粉酶. 现代实用医学, 2001, 13(1): 23-26.
- [13] 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.

# High-throughput screening of human pancreatic $\alpha$ -amylase inhibitors

Xizhen Qi<sup>1</sup>, Limei Ren<sup>1</sup>, Fang Zheng<sup>1</sup>, Qi Zhang<sup>1</sup>, Fang Bai<sup>1\*</sup>, Gang Bai<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> College of Pharmacy, <sup>2</sup> College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

**Abstract** [Objective] Targeting the important enzyme in human glucose metabolic pathway, we established a high throughput screening model for human pancreatic  $\alpha$ -amylase inhibitors. [Methods] *Pichia pastoris* expression system was used to clone and express the human pancreatic  $\alpha$ -amylase; we established the  $\alpha$ -amylase inhibitor screening model using the catalytic properties of enzyme; this model was applied in screening of actinomycete metabolites; the taxonomic status of positive strains were analyzed by constructing 16S rRNA phylogenetic tree. [Results] We cloned and expressed the intact gene of human pancreatic  $\alpha$ -amylase successfully; the high-throughput screening model of  $\alpha$ -amylase inhibitors was established; nearly 2000 actinomycete metabolites were screened, 14  $\alpha$ -amylase inhibitor producing strains were obtained finally, and showed taxonomically rich diversity. [Conclusion] The  $\alpha$ -amylase inhibitor high-throughput screening model had high practical value for developing new hypoglycemic drugs.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase inhibitor, *Pichia pastoris* expression system, human pancreatic  $\alpha$ -amylase, actinomycetes, high-throughput screening

( 本文责编: 王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China ( 21002052 ), by the Tianjin Municipal Science and Technology Commission of China ( 10JCYBJC14300 ) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities ( 65011161 )

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

Received: 19 January 2011 /Revised: 12 March 2011

## 梅特勒-托利多参加 2011 世界制药机械、包装设备与材料中国展

由中国医药保健品进出口商会主办的 2011 世界制药机械、包装设备与材料中国展(P-MEC China 2011) 携手 2011 世界生化、分析仪器与实验室设备中国展以及世界制药原料中国展(CPhI China) 于 2011 年 6 月 21-23 日在上海浦东新国际博览中心顺利召开。

梅特勒-托利多始终密切关注着制药行业的发展和动向,在此次会上重点展出了实验室研发和分析检测仪器、在线检测仪器、包装检测仪器和工业称重设备,这些仪器设备都将在很大程度上帮助到制药行业用户加快研发进程,提升生产效率和产品质量。

配合今年中国新版 GMP 的正式实施,梅特勒-托利多全方位的制药行业解决方案,帮助制药行业用户轻松满足 GMP 要求。梅特勒-托利多作为专业的仪器设备解决方案供应商,和广大制药行业用户一样,花了大量的时间和精力来学习和研究新版 GMP,同时引入在其他发达国家制药行业长期积累下来的经验和资源,专门针对现今中国制药行业的需求,提供符合 GMP 要求的管理解决方案,帮助制药行业用户解决在药物发现、研发、生产、质量控制以及物流等方面的困惑,帮助用户轻松避免风险、符合法规、确保质量和控制成本。

此外,梅特勒-托利多的高级技术应用顾问刘慧敏博士在现场就 RTCal/iC Safety 实时在线反应量热技术以及 ReactIR 流通池在连续工艺技术中的应用发表了演讲。同时,梅特勒-托利多(美国)的自动化学咨询顾问王建博士发表了用工艺过程分析技术来提高工艺效率和产品质量的演讲。梅特勒-托利多的特邀讲师上海医药工业研究院药物晶体工程研究室主任任国宾博士与上海亿法医药科技 CEO 顾虹博士也发表了相关演讲。现场与会气氛热烈,讲师和参会人员就制药行业的工艺研发和安全、化工生产热危害的研究等问题进行了充分探讨。

梅特勒-托利多是全球领先的精密仪器和服务供应商,也是全球最大的实验室、工业和食品零售业称重设备的制造商和销售商。

更多关于梅特勒-托利多公司的信息请登录: [www.mt.com](http://www.mt.com)