

降糖肽 Aglycin 的高效表达及活性鉴定

黄敏华, 林静莲, 王蒙, 马毅, 王菊芳

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 基于自组装肽 ELK16 能在大肠杆菌细胞内自聚集的特性, 本研究将 Aglycin 通过一个内含肽 *Mxe* GyrA 与自组装肽连接, 构建能在体外自剪切的重组表达载体 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)并进行蛋白表达条件的优化, 得到目的蛋白聚集体, 随后对聚集体进行 DTT 切割条件的优化, 经过进一步纯化最终可得到纯度为 98.15%、产量为 5.53 mg/g 菌体湿重的 Aglycin 肽。采用基因工程手段重组表达 Aglycin 的产量比目前化学提取方法提高了近 100 倍。此外, 经体外实验证明, Aglycin 对 α -葡萄糖苷酶抑制的 IC_{50} (36.48 $\mu\text{mol/L}$) 比阿卡波糖 (991.33 $\mu\text{mol/L}$) 低, 说明 Aglycin 比阿卡波糖有更强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 这进一步证明 Aglycin 有开发为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的潜力。

关键词: 重组表达; 自组装肽; 大肠杆菌; α -葡萄糖苷酶抑制

文章编号: 1673-9078(2020)04-143-149

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.019

High-level Expression and Activity Determination of Hypoglycemic Peptide Aglycin

HUANG Min-hua, LIN Jing-lian, WANG Meng, MA Yi, WANG Ju-fang

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, based on the self-aggregation characteristics of the self-assembling ability of ELK16 in *Escherichia coli*, Aglycin was linked to the self-assembling peptide via an intein, *Mxe* GyrA, to construct a recombinant expression vector pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16 capable of self-cleavage *in vitro*. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and the protein expression conditions were optimized to obtain the target protein aggregates. Then, the DTT cleavage conditions were optimized for the aggregates. After further purification, Aglycin peptide with a purity of 98.15% and yield of 5.53 mg/g cell pellet wet weight was finally obtained. The yield of Aglycin peptide obtained by recombinant expression was almost 100 times higher than that of the currently used chemical extraction method. In addition, *in vitro* experiments have shown that the IC_{50} value (36.48 $\mu\text{mol/L}$) of Aglycin peptide for α -glucosidase inhibition was lower than that of acarbose (991.33 $\mu\text{mol/L}$), indicating that the inhibitory activity of Aglycin peptide against α -glucosidase was much stronger than that of acarbose. This further demonstrates the potential of Aglycin peptide as an α -glucosidase inhibitor.

Key words: recombinant expression; self-assembling peptide; *Escherichia coli*; α -glucosidase inhibition

引文格式:

黄敏华,林静莲,王蒙,等.降糖肽 Aglycin 的高效表达及活性鉴定[J].现代食品科技,2020,36(4):143-149

HUANG Min-hua, LIN Jing-lian, WANG Meng, et al. High-level expression and activity determination of hypoglycemic peptide Aglycin [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 143-149

迄今为止, 糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 已经成为威胁人类健康的隐性杀手之一, 据国际糖尿病联盟 (IDF) 公开发表的报告显示, 2017 年全球超过 4.25 亿人患上糖尿病, 其中我国患者数量占全球的 25% 以上, 高达 1.14 亿^[1]。糖尿病是由许多因素引起的代谢

收稿日期: 2019-05-13

基金项目: 科技部“863”科技计划项目 (2014AA021004)

作者简介: 黄敏华 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质工程

通讯作者: 王菊芳 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质工程与发

酵工程

障碍性疾病, 其中 II 型糖尿病患者高达 90% 以上^[2]。

II 型糖尿病的主要病征是高血糖, 而长期的高血糖症状会引发各种慢性并发症, 这是导致糖尿病患者死亡的主要因素, 每年至少需要 1000 亿美元来对糖尿病及其相关并发症进行治疗^[3]。在 II 型糖尿病患者中, 餐后血糖水平是血糖控制的重要指标^[4]。为减少餐后高血糖, 临床上通常会使用一些合成的 α -葡萄糖苷酶抑制剂 (如阿卡波糖和伏格列波糖等) 进行治疗, 以减缓碳水化合物的消化和延缓葡萄糖的吸收^[5]。但临床发现有些患者长期使用合成的 α -葡萄糖苷酶抑制剂会

引起一些不良副作用,包括胃肠胀气和腹部绞痛等^[6]。因此,开发一些抑制 α -葡萄糖苷酶活性的安全生物活性肽成为国内外研究的热点。

Aglycin是一种新型生物活性肽,由37个氨基酸残基组成,其含有三对分子内二硫键,目前仅可以从大豆或豌豆种子中进行提取分离制备,步骤繁琐,回收率低至1~5 mg/100 g干种子,同时比较难避免试剂残留^[7]。Aglycin又称为胰安肽,经初步的生理功能研究,Aglycin有一定调节糖代谢与保护胰腺 β 细胞的能力;此外,有研究者认为Aglycin具有干扰哺乳动物生理学的潜力,因此猜测它对血糖的调节可能还有其他机制^[8,9]。对其体外酶学实验进行研究,发现Aglycin不能被金黄色葡萄球菌V8蛋白酶、胃蛋白酶和胰蛋白酶水解,有望能开发为口服的降糖多肽药物^[10]。因此,开发一种高效生产高纯度Aglycin的简单方法并研究其对 α -葡萄糖苷酶抑制的降糖活性,具有重大的理论和现实意义。

研究表明,两亲性的自组装肽ELK16能够作为“下拉式”融合标签,有效地将蛋白质诱导成大肠杆菌中的细胞质活性聚集体^[11,12]。据研究,内含肽Mxe GyrA能在硫醇化合物的条件下实现N端切除,将目的蛋白通过内含肽Mxe GyrA与自组装肽连接,可以通过内含肽介导的切割将目的蛋白释放到可溶性部分中,进而实现目的蛋白的获得^[13,14]。

本研究首次通过基因工程手段在大肠杆菌BL21(DE3)中实现了Aglycin的重组表达,并且验证其具有一定的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,这为Aglycin开发为降糖多肽药物奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

分子克隆所用菌种为大肠杆菌 DH5 α , 重组蛋白表达菌株为大肠杆菌 BL21(DE3), 购自北京天根生化科技有限公司; 质粒 pET30a-Mxe-PT-ELK16 由林章凛教授馈赠, 为本实验室保藏。

1.1.2 试剂和培养基

2 \times PrimeSTAR HS (Premix) DNA 聚合酶、2 \times Power Taq PCR MasterMix DNA 聚合酶和 DL2000 DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司; Dpn I 限制性内切酶、蛋白质电泳 Marker 和 BCA 蛋白定量试剂盒购自美国赛默飞公司; 胰蛋白酶、酵母提取物购自英国 OXOID 公司; 超薄 DNA 产物纯化试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京天根生化科技公司; 卡那霉素 (Kan)、二硫苏糖醇 (DTT) 和抑肽酶购自上海生工生物工程有限公司; 阿卡波糖、 α -葡萄糖苷酶和 4-硝基苯基- α -D-葡萄糖苷 (PNPG) 购自美国 Sigma 公司; 超滤离心管购自美国 Millipore 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

LB 培养基: 1% (W/V) NaCl, 0.5% (W/V) 酵母提取物, 1% (W/V) 蛋白胨。

1.1.3 仪器设备

BPC-70F 生化培养箱, 上海一恒科技公司; IS-RDD3 恒温摇床, 美国精骐公司; 常温小型高速离心机, 美国 Thermo 公司; 5804R 台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 琼脂糖水平型电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; PCR 基因扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司; 全自动凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; PowerPac HC 蛋白质电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; NanoVue 超微量分光光度计, 美国 GE 公司; BLT 凝胶成像仪, 中国博鹭腾公司; Constant 高压细胞破碎仪, 英国 Constant Systems 公司; Scientz IID 超声波破碎仪, 宁波新芝公司; T6 新世纪可见分光光度计, 北京普析公司; M200 多功能酶标仪, 德国 TECAN 公司。

1.1.4 引物

本文所用引物如表 1 所示。

表 1 Aglycin 基因的扩增引物

Table 1 Amplification primers for Aglycin gene

引物名称	序列 (5'-3')
A-16-F	CTTTAAGAAGGAGATACATATGGCTTCTTGAACGGTGTGTTGCTCT
A-16-R	GGCGTCGCCGGTGATGCACATACGCATACAGACGGGTGACGGCAGTA

1.2 方法

1.2.1 基因合成和重组表达载体的构建

根据 Aglycin 的氨基酸序列 (ASCNGVCSPFEMPPCGSSACRCIPVGLVVG YCRH PSG)对密码子进行优化, 基因序列由华大基因合成。根据 Aglycin 和 pET30a-Mxe-PT-ELK16 的基因序列,

按照 RF(Restriction-free)克隆^[15]的原则设计引物(表 1)来扩增 Aglycin 目的基因。扩增完毕后, 采用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物扩增效率的检测并用 DNA 回收纯化试剂盒纯化回收 Aglycin 目的基因片段。随后以 pET30a-Mxe-PT-ELK16 质粒为模板, 以回收的 Aglycin 目的片段为大引物进行第二轮 PCR 线性扩增反应, 得到具有 Aglycin 基因的载体质粒。对

PCR 线性扩增后的产物进行 Dpn I 酶切处理(37 °C, 1 h), 以消化掉甲基化的母系载体 pET30a-Mxe-PT-ELK16, 然后进行大肠杆菌 DH5 α 菌株的转化实验^[16]。从转化后的 LB 平板(含 50 μ g/mL Kan)挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 对阳性转化子过夜培养并提质粒, 送至生工生物(上海)有限公司测序。构建成功的质粒命名为 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16。

1.2.2 重组蛋白的表达及条件优化

将构建成功的重组表达载体 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16 进行大肠杆菌 BL21(DE3)菌株的转化实验得到重组表达菌株, 接种至 6 mL 的 LB 液体培养基(含有 50 μ g/mL Kan)37 °C、220 r/min 过夜培养作为种子液。

Aglycin-Mxe-PT-ELK16 表达的温度优化: 将种子液按 1:100(V/V)的比例接种到 6 支装有 6 mL 新鲜 LB 液体培养基(含有 50 μ g/mL Kan)的试管中, 置于 37 °C、220 r/min 进行培养, 当 OD₆₀₀=0.6~0.8 时, 其中 3 支添加 1 mM IPTG 进行诱导, 另外 3 支不添加诱导剂 IPTG 作为对照, 两两配对分别于 16 °C、25 °C、37 °C 诱导表达 24 h、12 h、5 h。

Aglycin-Mxe-PT-ELK16 表达的诱导剂浓度优化: 将种子液按 1:100(V/V)的比例接种到 4 支装有 6 mL 新鲜 LB 液体培养基(含有 50 μ g/mL Kan)的试管中, 置于 37 °C、220 r/min 进行培养, 当 OD₆₀₀=0.6~0.8 时, 分别添加不同浓度的 IPTG 进行诱导, IPTG 浓度如下: 0、0.2、0.5、1 mM。将试管置于上述得到的最优温度的摇床中进行诱导表达。

诱导表达结束后, 测菌液 OD₆₀₀ 值, 并在 12000 r/min、1 min 的条件下进行离心收菌, 超声波破碎菌体, 吸取 80 μ L 制备破碎后的全液样品, 在 12000 r/min 离心 2 min 获得破碎后的上清和沉淀, 各吸取 80 μ L 制备破碎后的上清和沉淀样品。分别向上述样品中加入 5 \times SDS loading Buffer(20 μ L), 混匀完全后高温煮沸 10 min, 12000 r/min 离心 2 min 后进行 SDS-PAGE 检测(12%分离胶、5%浓缩胶)。

1.2.3 重组蛋白的 DTT 切割条件优化

将 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16-BL21(DE3)单克隆接种至 8 mL 的 LB 液体培养基(含有 50 μ g/mL Kan)中 37 °C、220 r/min 过夜培养作为种子液。将种子液按 1:100(V/V)的比例接种到 600 mL 新鲜 LB 液体培养基(含有 50 μ g/mL Kan)中, 置于 37 °C、220 r/min 进行培养, 当 OD₆₀₀=0.6~0.8 时, 根据 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白的最优表达条件添加最适浓度的 IPTG, 在最适温度下诱导培养一定时间。蛋白表达结束后, 9000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用

裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, pH 8.5)重悬, 高压破碎菌体后离心收集沉淀, 向沉淀加入洗涤缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 0.1%(V/V) Triton X-100, pH 8.5)进行洗涤, 得到沉淀样品。

DTT 切割时间的优化: 分别向沉淀样品添加相应体积(20 OD/mL)的含 40 mM DTT 的切割液(20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 40 mM DTT, pH 8.5), 悬浮均匀, 置于 4 °C 切割, 然后在切割 4、8、12、16 h 后取样, 制样并进行 SDS-PAGE 检测。

DTT 切割浓度的优化: 分别向沉淀样品添加含不同浓度 DTT(20、40、60、80 mM)的切割液, 悬浮均匀, 根据得到的最优切割时间放置于 4 °C 切割, 切割后分别制样, 进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 Aglycin 的 Tricine-SDS-PAGE 检测、纯化及浓缩定量

将 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白在最优的 DTT 切割条件进行切割反应后, 把切割后样品混悬均匀, 取 80 μ L 制样作为切割后全液样品。在 4 °C、14000 r/min 条件下离心 45 min 得到上清和沉淀, 各吸取 80 μ L 制备切割后的上清和沉淀样品。分别向上述样品中加入 5 \times SDS loading Buffer (20 μ L), 混匀完全后高温煮沸 10 min, 12000 r/min 离心 2 min 后进行 Tricine-SDS-PAGE 检测。

将 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白切割后释放到上清的 Aglycin 肽收集起来, 用截流量为 10 ku 的超滤管进行 4 °C 离心超滤纯化。将超滤管离心后的透过液(含 Aglycin 肽)收集, 取 80 μ L 样品制样进行 Tricine-SDS-PAGE 的检测。将用超滤管纯化得到的 Aglycin 肽浓缩后用 PBS 缓冲液完全透析, 并以抑肽酶作为标准品对其进行定量, 最后通过 Gel-Pro analyzer 软件进行灰度扫描分析计算 Aglycin 肽的浓度。

1.2.5 Aglycin 的 α -葡萄糖苷酶抑制活性检测

吸取 30 μ L 不同浓度的样品(阳性对照阿卡波糖、空白对照 PBS 缓冲液及 Aglycin 肽)于 96 孔板上(各设置 3 个平行)。向样品中各加入 30 μ L 0.1 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶(每个样品设置样品对照组, 用 0.1 mol/L PBS 缓冲液代替酶), 于 37 °C 共同孵育 10 min。然后向样品中各加入 30 μ L 预热过的 5 mmol/L PNPG 底物, 于 37 °C 恒温反应 20 min。反应结束后迅速加入 100 μ L 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液终止反应。终止反应后, 用酶标仪对反应液在 405 nm 波长下的吸收值 A 进行测定。

本实验共设置以下组别:

- a: 空白对照组(缓冲液+酶液+底物)
- b: 空白对照背景组(缓冲液+底物)
- c: 样品测定组(样品+酶液+底物)
- d: 样品背景组(样品+底物+缓冲液)

$$\text{酶活抑制率 (\%)} = \left[1 - \frac{A_c - A_d}{A_a - A_b} \right] \times 100\%$$

根据测量结果进行拟合曲线的制定并计算出 IC₅₀ 值(α-葡萄糖苷酶的抑制率达到 50%所需的待测样品浓度)^[17]。

1.2.6 数据统计分析

实验均设置 3 个平行组, 实验数据采用 GraphPad Prism 和 SPSS 软件进行统计分析, 结果以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 重组表达载体的构建

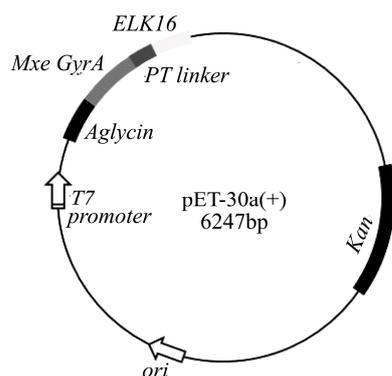


图1 重组表达载体的构建

Fig.1 Construction of recombinant expression vector

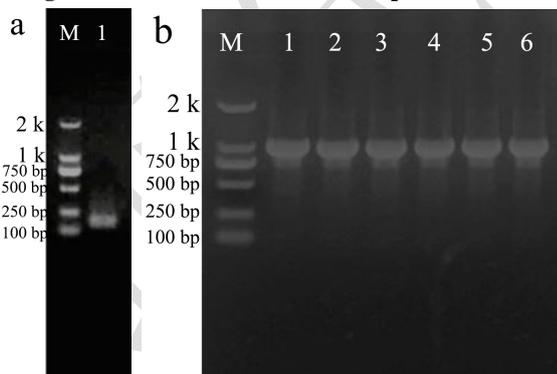


图2 目的基因 Aglycin 的扩增 (a) 和重组表达载体的菌落 PCR 验证 (b)

Fig.2 Amplification of the target gene Aglycin (a) and colony PCR identification results of the recombinant expression vector (b)

注: M: DNA 分子量标准; 泳道 1~6: 挑取的 6 个单克隆。根据方法 1.2.1 构建的 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-

ELK16 重组表达载体如图 1。采用 RF 克隆的方法, 第一轮通过 PCR 扩增得到 Aglycin 目的片段, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 PCR 扩增片段大小与理论值 165 bp 相符(图 2a)。第二轮 PCR 以 Aglycin 目的片段为大引物进行 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16 质粒的构建, 对过夜长出的单克隆进行菌落 PCR 的验证(图 2b), 结果显示扩增出来的 PCR 条带大小(约 980 bp)与理论一致。选取单克隆接种、提质粒进行测序, 测序结果显示重组质粒构建成功。随后将重组质粒 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16 转化大肠杆菌 BL21(DE3)得到重组表达菌株。

2.2 重组蛋白的表达条件优化

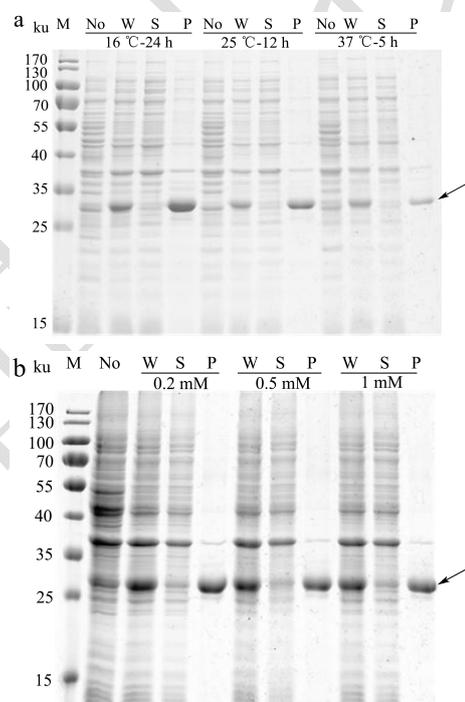


图3 重组蛋白 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 表达的温度优化 (a) 和 IPTG 诱导浓度优化 (b)

Fig.3 Temperature optimization (a) and IPTG concentration optimization (b) of the expression of Aglycin-Mxe-PT-ELK16

注: M: 蛋白分子量标准; No: 未诱导; W: 细胞裂解全液; S: 细胞裂解上清; P: 细胞裂解沉淀。

将 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16-BL21(DE3) 进行诱导表达, 如图 3a 所示, 菌体经诱导后都有明显的目的蛋白条带(29.4 ku), 说明 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白成功在大肠杆菌胞内表达。且在不同温度条件 (16 °C-24 h、25 °C-12 h、37 °C-5 h) 下, Aglycin-Mxe-PT-ELK16 重组蛋白绝大部分以沉淀形式(活性聚集体)进行表达(箭头所指)。对蛋白胶图进行灰度扫描, 评估蛋白表达量, 16 °C 表达 24 h 的条件下, Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白浓度最高。另外, 在较高表达温度下

Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白会形成真正的包涵体(数据未展示),从而失去生物活性,因此确定 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白的最优表达温度为 16 °C。继而优化诱导剂 IPTG 浓度(0.2 mM、0.5 mM、1 mM)(如图 3b),同样经蛋白灰度扫描,当 IPTG 浓度为 0.2 mM 时,Aglycin-Mxe-PT-ELK16 蛋白的表达量最大。

综上所述,最终确定重组蛋白 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 的最优表达条件为:0.2 mM IPTG,16 °C 诱导表达 24 h。

2.3 重组蛋白的 DTT 切割条件优化

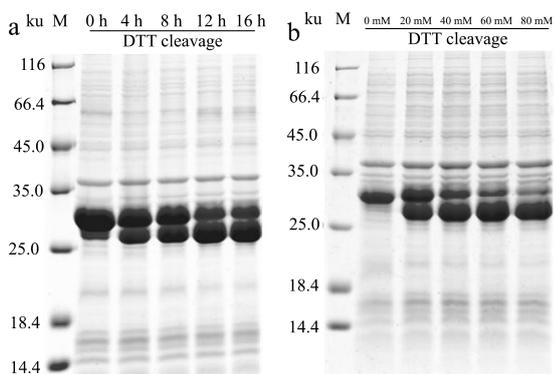


图4 重组蛋白 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 的 DTT 切割时间优化 (a) 和 DTT 切割浓度优化 (b)

Fig.4 DTT cleavage time optimization (a) and DTT cleavage concentration optimization (b) of Aglycin-Mxe-PT-ELK16

注: M: 蛋白分子量标准; DTT cleavage: DTT 切割后的样品。

为了进一步提高 Aglycin 肽的产量,我们对内含肽 Mxe GyrA 的切割条件进行了优化,为了保证蛋白及多肽的稳定性,均选择在 4 °C 低温条件下进行切割。首先,我们对 DTT 切割时间进行了优化,向重组蛋白 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 中加入 40 mM DTT 后,分别在切割 4、8、12、16 h 后取样,并进行 SDS-PAGE 电泳检测。确定了 DTT 的最优切割时间,我们还对 DTT 不同的切割浓度(20、40、60、80 mM)进行了优化。如图 4a 所示,当切割 4 h 后,约有 38.80% 的 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 聚集体发生切割;当切割反应进行 12 h,约有 68.25% 的重组蛋白发生切割,且随着切割时间的延长(16 h),蛋白切割效率保持不变。因此,DTT 切割的最优时间为 12 h。然后对 DTT 的添加浓度进行了优化,如图 4b 所示,当添加 40 mM 的 DTT 时,切割已经达到平衡(40 mM~80 mM: 56.20%~72.30%),且 40 mM DTT 已足够对内含肽 Mxe GyrA 产生切割反应,因此 DTT 切割的最优浓度为 40 mM。综上所述,重组蛋白 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 的最优切割条件为 40 mM DTT,4 °C 切割 12 h。

2.4 Aglycin 的 Tricine-SDS-PAGE 检测

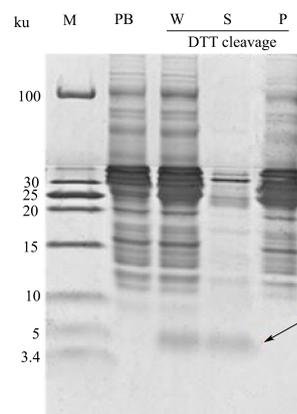


图5 Aglycin 肽的 Tricine-SDS-PAGE 检测

Fig.5 Tricine-SDS-PAGE analysis of the Aglycin peptide

注: M: 蛋白分子量标准; P_B: DTT 切割前的沉淀部分; W: 切割后全液; S: 切割后上清; P: 切割后沉淀; DTT cleavage: DTT 切割后的样品。

根据 DTT 切割的优化条件对 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 聚集体进行大量切割,经 4 °C、14000 r/min 条件下离心 45 min,得到上清和沉淀。根据 Tricine-SDS-PAGE 电泳的检测结果(如图 5)发现 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 聚集体切割后释放出的 Aglycin 肽存在于上清中(箭头所指),分子量约为 3.74 ku,这有利于 Aglycin 肽的下一步纯化。

2.5 Aglycin 的纯化及浓缩

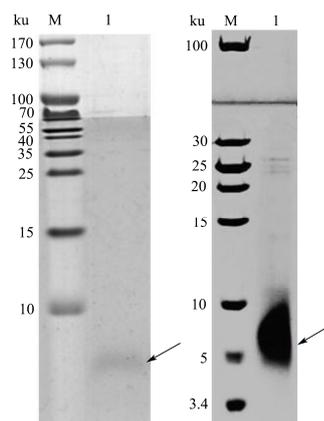


图6 Aglycin 肽的纯化和浓缩

Fig.6 Purification and concentration of Aglycin

注: M: 蛋白分子量标准。

将 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 聚集体切割后释放到上清的 Aglycin 肽收集起来,用截流量为 10 ku 的超滤管进行 4 °C 离心超滤纯化。理论上,Aglycin 肽的分子量只有 3.74 ku,因此 Aglycin 肽经超滤离心后应该存在于超滤管的透过液里,将超滤管离心后的透过液收集,进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳鉴定,发现通过对聚

集体 Aglycin-Mxe-PT-ELK16 的切割后上清进行超滤纯化,可以获得高纯度的 Aglycin 肽(如图 6 箭头所指),经 BandScan 软件分析纯度高达 98.15%。将收集到的高纯度 Aglycin 肽用 PBS 缓冲液完全透析,随后用截留量为 1 ku 的超滤管进行离心超滤浓缩,并以抑肽酶为标准品对浓缩透析后的 Aglycin 肽定量(数据未展示),最终得到浓度高达 45.00 μmol/L 的 Aglycin 肽,产量为 5.53 mg/g 菌体湿重,这比目前的化学提取法(1~5 mg/100 g 干种子)提高了近 100 倍。

2.6 Aglycin 的 α-葡萄糖苷酶抑制活性

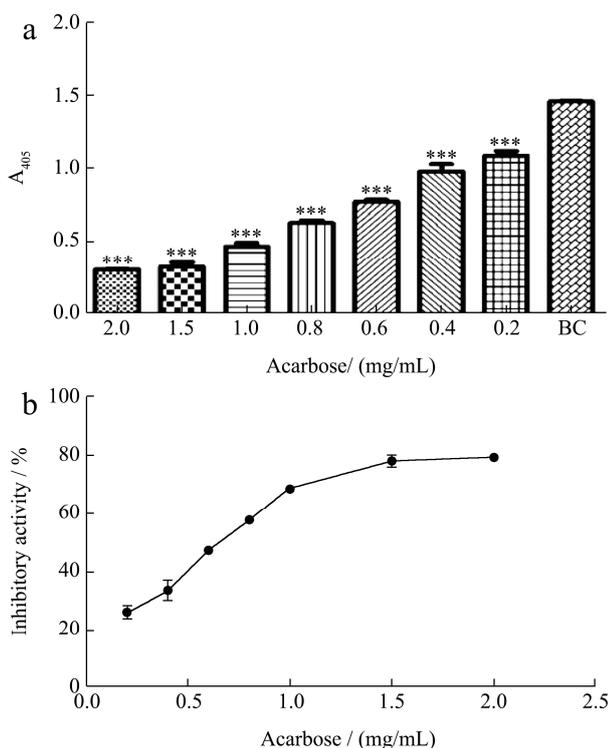


图 7 阿卡波糖的 α-葡萄糖苷酶抑制

Fig.7 α-glucosidase inhibitory activity of acarbose

注: a 为阿卡波糖浓度和吸光度 A₄₀₅ 的关系 (***: p<0.001); b 为阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制率。

将待测样品阿卡波糖稀释成各个所需浓度,以备进行 α-葡萄糖苷酶的抑制活性检测。如图 7 所示,阳性对照阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶有显著的抑制作用,说明本实验的试剂与方法适用于样品对 α-葡萄糖苷酶抑制的降糖功能测定。通过 SPSS 软件进行拟合,得到相关方程式为 $y = -21.95x^2 + 79.54x + 8.107$, 系数 $R^2 = 0.991$, 求得阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶抑制的 IC₅₀ 约为 0.64 mg/mL(991.33 μmol/L)。将待测样品 Aglycin 肽稀释成各个所需浓度,以备进行 α-葡萄糖苷酶的抑制活性检测。如图 8 所示,Aglycin 肽随着浓度的提高,其和 α-葡萄糖苷酶及底物 PNPG 反应后的 A₄₀₅ 逐步降低(产物 PNP 逐步减少),对 α-葡萄糖苷酶的抑制率逐

步提高,通过 SPSS 软件进行拟合,得到相关方程式为 $y = 0.008x^2 + 0.511x + 20.717$, 系数 $R^2 = 0.979$, 求得 Aglycin 肽对 α-葡萄糖苷酶抑制的 IC₅₀ 大约为 36.48 μmol/L。据报道,与从菲律宾楠叶中提取的 2 个山萘酚鼠李糖苷的苯丙酸酯对 α-葡萄糖苷酶抑制的 IC₅₀(6110 μmol/L 和 1100 μmol/L)相比^[18],Aglycin 对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性更强;此外 Aglycin 肽比亚麻降糖多肽(113.92 μmol/L)有更强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性^[19],这说明 Aglycin 肽对 α-葡萄糖苷酶活性有较强的抑制作用。另外,与阿卡波糖对 α-葡萄糖苷酶抑制的 IC₅₀(991.33 μmol/L)相比,Aglycin 比阿卡波糖的 IC₅₀ 低,说明 Aglycin 肽比阿卡波糖有更强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性,这进一步说明 Aglycin 肽有开发为 α-葡萄糖苷酶抑制剂的潜力,进而实现降糖的效果。

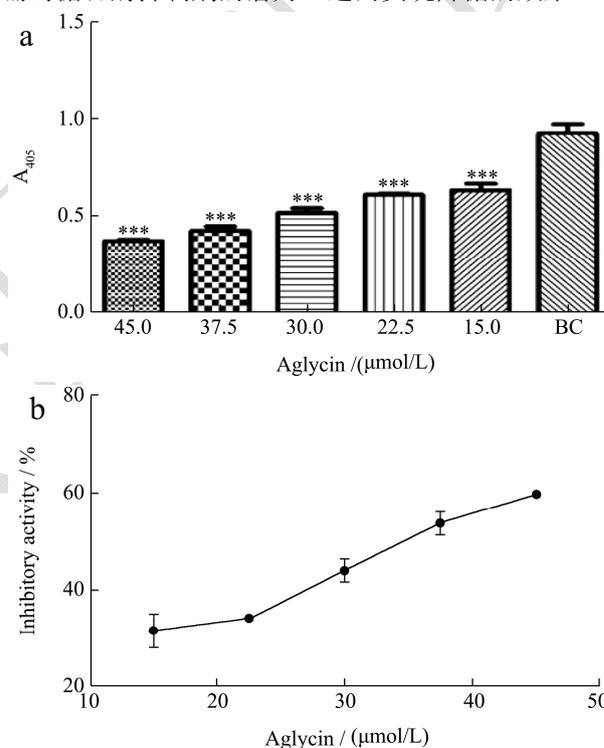


图 8 Aglycin 的 α-葡萄糖苷酶抑制

Fig.8 α-glucosidase inhibitory activity of Aglycin

注:a 为 Aglycin 浓度和吸光度 A₄₀₅ 的关系 (***: p<0.001); b 为 Aglycin 对 α-葡萄糖苷酶的抑制率。

3 结论

本文以活性肽 Aglycin 为研究目标,主要尝试 Aglycin 在大肠杆菌原核表达体系中的高效表达方式,并对其体外降糖活性的研究。基于自组装短肽 ELK16 的自聚集特性,通过 RF 克隆成功构建了重组表达载体 pET30a-Aglycin-Mxe-PT-ELK16,重组载体经过表达优化后,表达的重组蛋白均能以活性聚集体的形式存在于大肠杆菌胞内,细胞经过破碎后,无需金

属层析纯化、透析等后期复杂程序,只需简单离心即可获得具有生物活性的高纯度重组蛋白。通过对Aglycin-Mxe-PT-ELK16蛋白中内含肽Mxe GyrA在一定条件下的自剪切特性,大大减少目的多肽Aglycin的损失,经过简单的离心、超滤步骤便可高效获得高纯度(98.15%)的Aglycin,产量高达5.53 mg/g菌体湿重,这比目前的化学提取法(1~5 mg/100 g豆类干种子)提高了近100倍。值得注意的是,这是首次通过基因工程手段获得Aglycin肽。另外,经体外实验证明重组表达得到的Aglycin对 α -葡萄糖苷酶活性有一定的抑制作用,与阿卡波糖相比,Aglycin对 α -葡萄糖苷酶抑制的IC₅₀(36.48 μ mol/L)比阿卡波糖的IC₅₀(991.33 μ mol/L)低,说明Aglycin比阿卡波糖有更强的 α -葡萄糖苷酶抑制活性,这进一步说明Aglycin有开发为 α -葡萄糖苷酶抑制剂的潜力,为Aglycin开发为降糖多肽药物奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 母义明,贾伟平.中国糖尿病研究进展专辑简介[J].中国科学:生命科学,2018,48(8):807-809
MU Yi-ming, JIA Wei-ping. Introduction of China diabetes research progress album [J]. Chinese Science: Life Sciences, 2018, 48(8): 807-809
- [2] Xu Y, Wang L M, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-958
- [3] Jarald E, Joshi S B, Jain D C. Diabetes and herbal medicines [J]. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics, 2008, 7(1): 97-106
- [4] Chinenye S, Young E E. Isolated postprandial hyperglycemia in type 2 diabetic patients in a Nigerian tertiary health center [J]. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 2012, 16(4): 604-608
- [5] Min P J, Yoon B H, In J H, et al. Postprandial hypoglycemic effect of mulberry leaf in Goto-Kakizaki rats and counterpart control Wistar rats [J]. Nutrition Research and Practice, 2009, 3(4): 272-278
- [6] Lee J S, Han J S. Sargassum sagamianum extract alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice [J]. Preventive Nutrition & Food Science, 2018, 23(2): 122-126
- [7] 顿新鹏.新生物活性肽Aglycin的纯化鉴定及其对糖代谢的影响[D].武汉:华中科技大学,2007
DUN Xin-peng. Purification and identification of a new bioactive peptide Aglycin and its effect on glucose metabolism [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007
- [8] 鲁憬莉.抗T2DM新生物活性肽药理作用及机制研究[D].武汉:华中科技大学,2014
LU Jing-li. Pharmacological action and mechanism of anti-T2DM new bioactive peptide [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014
- [9] Dun X P, Wang J H, Chen L, et al. Activity of the plant peptide Aglycin in mammalian systems [J]. Febs Journal, 2007, 274(3): 751-759
- [10] Lu J L, Zeng Y, Hou W R, et al. The soybean peptide Aglycin regulates glucose homeostasis in type 2 diabetic mice via IR/IRS1 pathway [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(11): 1449-1457
- [11] Huang Z, Zhang C, Chen S, et al. Active inclusion bodies of acid phosphatase PhoC: Aggregation induced by GFP fusion and activities modulated by linker flexibility [J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12(1): 25
- [12] Xing L, Wu W, Zhou B, et al. Streamlined protein expression and purification using cleavable self-aggregating tags [J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 42
- [13] Starokadomskyy P L, Okunev O V, Irodov D M, et al. Utilization of protein splicing for purification of the human growth hormone [J]. Molecular Biology (Moscow), 2008, 42(6): 966-972
- [14] Zhao Q, Zhou B, Gao X, et al. A cleavable self-assembling tag strategy for preparing proteins and peptides with an authentic N-terminus [J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(6): 2829-2835
- [15] Ent F V D, Löwe J. RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids [J]. Journal of Biochemical & Biophysical Methods, 2006, 67(1): 67-74
- [16] Green MR, Sambrook J, Russell D W, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) [M]. Beijing: Science Press, 2013
- [17] 汪梅花.高产水溶性黄色素的红曲菌株选育及发酵调控与分离纯化[D].广州:华南理工大学,2017
WANG Mei-hua. Breeding, fermentation regulation, isolation and purification of red monascus strain with high yield of water-soluble yellow pigment [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017

(下转第 219 页)