

蝎毒活性肽 BmK AngM1 的定点突变及其抗炎活性研究

梁 兰, 王庆华, 胡宗风, 朱 平, 侯 琦, 杨金玲*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室& 国家卫生计生委天然药物生物合成重点实验室, 北京 100050)

摘要: 蝎毒活性肽 BmK AngM1 具有良好的镇痛活性, 但目前对其抗炎活性的研究尚未有报道。本研究利用 *Escherichia coli* BL21 trxB (DE3) 对 BmK AngM1 进行了重组表达, 利用 IMPACT™-TWIN 系统建立了重组 BmK AngM1 (rBmK AngM1) 的纯化方法, 并对 rBmK AngM1 进行了抗炎活性检测。为了进一步提高其抗炎活性, 本研究对 BmK AngM1 功能结构域中可能的活性位点 (Y5、Y42 和 R58) 进行了定点突变。结果表明, rBmK AngM1 及其突变体均具有显著的抗炎活性, 其中单突变体 R58N 及双突变体 Y5F/R58N、Y42F/R58N 与野生型蛋白相比, 抗炎活性均有明显提高。由此推测, 58 位残基在 BmK AngM1 的抗炎活性中起重要作用。本研究为通过蛋白质工程设计改造 BmK AngM1 以提高其药理活性奠定了基础。

关键词: 蝎毒; 几丁质; 定点突变; 抗炎活性

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-1007-05

Studies on site-directed mutagenesis of BmK AngM1 from scorpion venom and its anti-inflammatory activity

LIANG Lan, WANG Qing-hua, HU Zong-feng, ZHU Ping, HOU Qi, YANG Jin-ling*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines and Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products of National Health and Family Planning Commission, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Scorpion toxin BmK AngM1 has been reported to have a strong analgesic effect. However, its anti-inflammatory activity was unknown. In this study, the recombinant BmK AngM1 (rBmK AngM1) was expressed in *Escherichia coli* BL21 trxB (DE3). The purified rBmK AngM1 was obtained efficiently through the IMPACT™-TWIN system. The anti-inflammatory activity of the recombinant protein was investigated. In order to improve the anti-inflammatory activity of rBmK AngM1, the potential active sites (Y5, Y42, R58) were substituted with different amino acids. The results showed that rBmK AngM1 and its mutants all have significant anti-inflammatory activity. The activities were significantly increased in the single mutant R58N and mutants Y5F/R58N, Y42F/R58N over the wild type protein. The data suggest that position 58 in BmK AngM1 plays a functional role in the anti-inflammatory activity. This study lays a foundation for the protein engineering design of BmK AngM1 to improve its pharmacological activity.

Key words: scorpion toxin; chitin; site-directed mutagenesis; anti-inflammatory activity

收稿日期: 2017-03-15; 修回日期: 2017-04-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873384); 北京市自然科学基金资助项目 (7082064); 中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目 (2006QZH06).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165199, Fax: 86-10-63017757, E-mail: yangjl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0222

全蝎作为传统中药已有 2 000 多年的应用历史, 全蝎的主要有效成分为蝎尾毒腺分泌的蝎毒素。药理学研究表明, 蝎毒素具有镇痛、抗炎、抗肿瘤、抗血栓及免疫调节等多种功效^[1-5], 作为一种新型的多肽类药物, 其具有良好的研究潜力和应用前景。然而, 蝎毒素含有多种复杂的活性成分, 为了更深入地探索其药理作用, 需进一步对全蝎的有效成分进行提取分离或重组表达, 以获得成分单一的目的蛋白。

近年来, 随着蝎毒提取技术的发展, 国内外研究人员已从蝎毒中分离出数十种蝎毒素单体^[6]。其中, 蝎毒活性肽 BmK AngM1 是从东亚钳蝎 (*Buthus martensii* Karsch) 中分离得到的一种新的长链蝎毒素^[7]。目前, 对该肽的研究内容主要包括分离纯化、分子克隆、原核和真核表达及其镇痛药理活性评价等^[8,9], 对其抗炎活性研究尚未有报道。有鉴于此, 本研究对 BmK AngM1 进行了抗炎活性评价。

蛋白质剪接 (protein splicing) 是一种由蛋白质内含肽 (intein) 介导, 在蛋白质水平上的翻译后加工过程。此过程从翻译后的蛋白质前体中切除蛋白质内含肽, 同时两侧的蛋白质外显肽 (exon) 连接成新的具有生物活性的成熟蛋白质。天然的外显肽常常可以替换成外源蛋白质而不影响内含肽的剪切活性^[10]。这一点是以内含肽作为融合蛋白进行蛋白质纯化的理论基础。IMPACTTM-TWIN 系统正是利用了内含肽的自剪切实现了对蛋白质的纯化。本文利用这一系统建立了 rBmK AngM1 的纯化方法, 获得了与天然蛋白序列一致的重组蛋白, 进行了抗炎活性检测。

本研究通过软件分析, 将 BmK AngM1 三维结构与其他 α 型蝎毒素进行比对, 发现其含有两个主要的功能域: 由 N 末端和 C 末端的残基共同形成的 NC 结构域及残基 (¹⁴YECGI¹⁸) 与 (³⁸WGGKY⁴²) 共同形成的核心结构域^[11]。本研究根据初步的活性位点预测, 利用定点突变的方法, 获得了 6 个相关的突变体蛋白, 探索了 BmK AngM1 中 3 个可能的活性位点与其抗炎活性之间的关系。

材料与方法

菌株和质粒 宿主菌 *Escherichia coli* BL21 trxB (DE3); 质粒 pMD18-BmK AngM1; 表达载体 pTWIN1 (本实验室保存)。

试剂 *Sap* I、*Bam*HI 限制性内切酶、Dpn I、T4 DNA 连接酶和 Q5 高保真 DNA 聚合酶 (NEB 公司);

几丁质树脂 (GE Healthcare); Hepes (拜尔迪生物技术有限公司); IPTG 和氨苄青霉素 (美国 INALCO 公司); 普通 Taq 聚合酶、DNA Marker、PCR 产物纯化试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司); 质粒提取试剂盒 (天根生化科技有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。

仪器 3K18 型低温高速离心机 (Sigma 公司); 超声波破碎仪 (Sonic 公司); Mini 2D 型电泳仪 (Bio-Rad 公司); PCR 仪 (Eppendorf 公司)。

BmK AngM1 基因的克隆 根据目的基因的碱基序列, 利用 Primer Premier 5 软件设计引物, 在 5' 端加上 *Sap* I 酶切位点, 在 3' 端加上 *Bam*HI 酶切位点。以质粒 pMD18-BmK AngM1 为模板, 以 A 和 B 为引物, 扩增得到基因 *BmK AngM1*。PCR 反应程序: 98 °C 30 s, (98 °C 10 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min) × 30 循环, 72 °C 10 min。具体引物序列见表 1。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并用凝胶回收试剂盒对目的基因进行回收。

Table 1 Primer sequences

Primer	Sequence (5'→3')
A	CGCCTCTTCGAACGTTAGAGATGCTTACATTGC
B	CGCGGATCCCTTAGCGCCGCTTACTGACAC
Y5F-F	AGAGATGCTTTCATTGCTAA
Y5F-R	CAATGAAGCATCTCTAACGA
Y42F-F	GAGGTAAGTTTGGTAACGCC
Y42F-R	TTACCAAACTTACCTCCCCATT
R58N-F	CCAATTAACGTCCAGGAAAAGT
R58N-R	TGGGACGTTAATTGGAACAGAA

表达质粒构建 将 PCR 扩增得到的基因片段 *BmK AngM1* 和质粒载体 pTWIN1 用 *Sap* I 和 *Bam*HI 双酶切处理。回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶将 *BmK AngM1* 片段与 pTWIN1 进行连接, 得到的野生型重组表达质粒命名为 pTWIN1-BmK AngM1。以质粒 pTWIN1-BmK AngM1 为模板, 根据目的突变体序列设计引物 (表 1), 通过 Q5 高保真 DNA 聚合酶进行全质粒扩增。PCR 反应程序: 98 °C 30 s, (98 °C 10 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min) × 30 循环, 72 °C 10 min。PCR 反应结束后, 取 1 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 验证片段大小正确后, 向装有 PCR 产物的离心管中加入 2 μ L Dpn I, 37 °C 水浴 2 h 以消化模板, 随后将离心管内溶液加到 Trans1-T1 感受态细胞中进行转化, 将转化子进行 PCR 扩增鉴定后, 进一步测序确认。从测序正确的菌株中提取质粒。

重组菌的构建与筛选 将表达质粒转化 *E. coli*

BL21 trxB (DE3) 感受态细胞, 在含 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 平板上进行培养, 37°C 过夜。从抗性平板上挑取转化子, 以各自引物进行 PCR 扩增验证。PCR 条件: 94°C 10 min, (94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 4 min) \times 30 循环, 72°C 10 min。

重组菌的诱导表达 挑取重组菌单菌落, 接种于 10 mL 含 Amp 的 LB 培养基中, 37°C 、 $200 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养过夜, 然后按 1:100 体积转入 150 mL 含 Amp 的 LB 培养基 37°C 扩大培养, 当 OD 值达到 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度 $0.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 16°C 、 $150 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 诱导表达 18 h, $8000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集菌体。超声波破碎仪破碎, $9000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 收集上清液, 取 $20 \mu\text{L}$ 进行 SDS-PAGE 电泳, 银染。

rBmK AngM1 蛋白的纯化 取 2 mL 几丁质 (Chitin) 树脂装柱, 用 10 个柱体积的缓冲液 Buffer I ($20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, pH 8.5) 进行柱平衡, 将 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后的上清液缓慢加入 Chitin 柱, 流速为 $1 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 再用至少 20 倍柱体积的缓冲液 Buffer I 洗柱。取 $100 \mu\text{L}$ Chitin 柱填料用缓冲液 Buffer I 吹洗两次, 离心, 去上清, 加 $40 \mu\text{L}$ 1% SDS 吹洗, 离心, 取上清检测蛋白是否挂柱。用 15 mL Buffer II ($20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, pH 7.0) 诱导内含肽的自剪切, 4°C 静置 2 天。2 天后, 用 Buffer II 洗脱并收集目的蛋白。取 $100 \mu\text{L}$ Chitin 柱填料用缓冲液 Buffer II 吹洗两次, 离心, 去上清, 加 $40 \mu\text{L}$ 1% SDS 吹洗, 离心, 取上清检测蛋白与内含肽是否已完全裂解。用 10 倍柱体积的 1% SDS 漂洗 Chitin 柱, 将其在该溶液中浸泡 30 min, 再用 $0.5 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 漂洗, 经过处理的 Chitin 柱可再次用来纯化蛋白。

rBmK AngM1 及其突变体的抗炎活性检测 昆明种小鼠, 雄性, $18\sim 22 \text{g}$, 按体重随机分为空白对照组 (假手术组)、野生型组和突变体组, 每组各 10 只。空白组动物按体重静脉注射 0.9% 氯化钠溶液 $1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 野生型组和突变体组分别皮下注射 $1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 样品。10 min 后, 小鼠左耳涂 2% 巴豆油液 $50 \mu\text{L}$ 。4 h 后处死, 剪下双耳, 用直径为 8 mm 的不锈钢镊子冲下左右耳片, 分别称重, 以左右耳片重量之差作为肿胀度, 计算对炎症的抑制率。样品组抑制率 (%) = (空白组平均肿胀度 - 样品组平均肿胀度) / 空白组平均肿胀度 $\times 100\%$ 。

结果

1 重组表达质粒的构建

以质粒 pMD18-BmK AngM1 为模板, 以表 1

中的 A 和 B 为引物, 通过 PCR 扩增得到基因 *BmK AngM1*。将 *BmK AngM1* 片段用 *Sap* I 和 *Bam*HI 双酶切, 切胶回收目的片段, 将其连接到相应内切酶处理过的表达载体 pTWIN1, 得到重组表达质粒 pTWIN1-BmK AngM1, 测序证明读码框架准确。

以质粒 pTWIN1-BmK AngM1 为模板, 以表 1 中的相应引物进行全质粒扩增, 获得突变体 Y5F、Y42F、R58N、Y5F/Y42F、Y5F/R58N 及 Y42F/R58N 的基因 (图 1)。以突变体质粒为模板, 通过各自引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示, 基因大小均与理论值相符 (图 2)。对突变体质粒进行测序, 结果也与预期设计相符, 证明突变位点和读码框架准确。

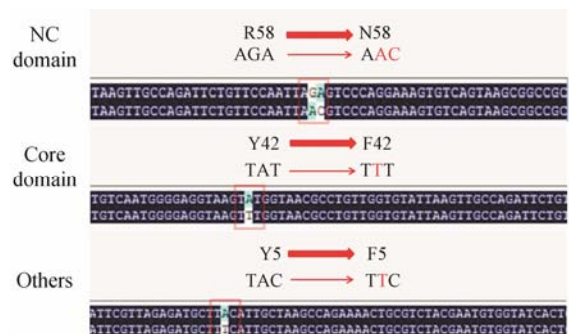


Figure 1 Gene sequences of mutants

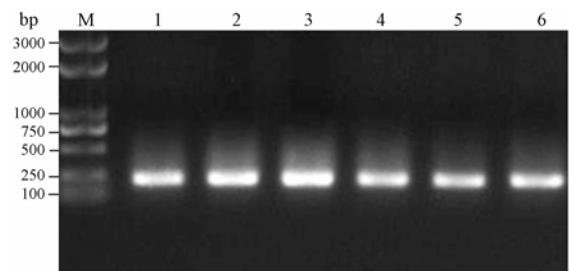


Figure 2 The amplification of mutated *BmK AngM1* genes by PCR. M: Marker; 1-6: Mutants of Y5F, Y42F, R58N, Y5F/Y42F, Y5F/R58N, Y42F/R58N

2 重组蛋白的表达与纯化

将带有 *BmK AngM1* 基因的 pTWIN1 质粒转入 *E. coli* BL21 trxB (DE3), 在含有 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp 的 LB 培养基中进行培养, 通过 $0.5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达, 从图 3a 可看出, 发酵液上清在 $35\sim 45 \text{kDa}$ 之间出现一条特异的蛋白条带, 而转入空载体 pTWIN1 的对照转化子在相应位置没有出现条带, 证明 BmK AngM1 蛋白获得了表达。

取上样后 Chitin 柱填料经处理后检测表明, 融合蛋白 (CBD-intein-rBmK AngM1) 与 Chitin 柱结合 (图 3b-泳道 3); 经 Buffer II 诱导内含肽自剪切

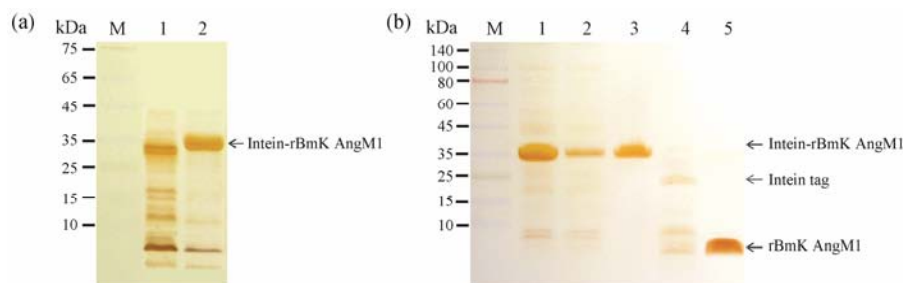


Figure 3 (a) The analysis of intein-rBmK AngM1 expression by Tricine-SDS-PAGE. M: Marker; 1: pTWIN1/trxB; 2: pTWIN1/Intein-rBmK AngM1/trxB. (b) The purification of rBmK AngM1 by IMPACT-TWIN system. M: Marker; 1: Cell lysate; 2: Chitin column flow-through; 3: Chitin column before washing (CBD-intein-rBmK AngM1); 4: Chitin column after washing (CBD-intein); 5: Chitin column eluent after washing with elution buffer

后的 Chitin 柱填料经处理后检测表明, rBmK AngM1 与内含肽裂解 (图 3b-泳道 4), rBmK AngM1 被洗脱下来 (图 3b-泳道 5)。

3 rBmK AngM1 及其突变体的抗炎活性检测

通过巴豆油诱导小鼠耳炎模型证明, 以 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量皮下注射给药, rBmK AngM1 与突变体蛋白均有显著抑制活性 (表 2)。其中单突变体 Y5F 和 Y42F 与 rBmK AngM1 相比, 无显著差异; 单突变体 R58N 及双突变体 Y5F/R58N、Y42F/R58N 与 rBmK AngM1 相比, 其活性均有显著提高。

Table 2 Anti-inflammatory effects of rBmK AngM1 and its mutants on mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs normal saline

Group	Ear swelling/mg Mean \pm Std	Inhibition efficiency/%	Relative activity/%
Normal saline	20.6 \pm 5.5	–	–
rBmK AngM1	10.1 \pm 6.7**	51.0	100
Y5F	12.8 \pm 6.7*	38.1	74.7
Y42F	9.2 \pm 3.9***	55.6	109.0
R58N	5.8 \pm 2.5***	71.8	140.8
Y5F/Y42F	7.7 \pm 3.6***	62.6	122.7
Y5F/R58N	5.2 \pm 3.0***	74.9	146.9
Y42F/R58N	4.6 \pm 2.2***	77.5	152.0

讨论

通过不同的表达系统表达目的蛋白时, 需要根据目的蛋白的特性来选择最适载体及宿主, 这对于蛋白表达和纯化至关重要。IMPACTTM-TWIN 系统是一种新型的蛋白融合表达及纯化系统, 该系统最大的优点是表达的融合蛋白无需蛋白酶裂解即可实现目的蛋白与融合标签的精确切割, 不但可以有效降低成本, 提高效率, 还减少了蛋白酶与目的蛋白的分离纯化步骤^[12]。本文利用 pTWIN1 载体构建重组载体以表达目的蛋白。将载体 pTWIN1 中含有的内含

肽-几丁质结合蛋白基因与 *BmK AngM1* 基因进行融合, 经诱导表达出从 N 端到 C 端为几丁质结合蛋白-内含肽-rBmK AngM1 的融合蛋白, 有利于表达可溶性目的蛋白, 并通过几丁质亲和和色谱一步纯化得到目的蛋白, 减少目的蛋白在纯化过程中的损失。此外, 宿主的选择对重组蛋白的结构和功能也有重要影响。大肠杆菌表达系统能够在较短时间内获得表达产物, 且成本相对较低, 但其表达的重组蛋白常以包涵体形式存在^[13]。大肠杆菌胞质中有一套硫氧还蛋白 (thioredoxin) 系统可以破坏二硫键的形成, 从而维持胞内还原态, 这主要是硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TrxB) 的作用, 因此其缺乏催化二硫键形成的能力^[14]。*E. coli* BL21 trxB (DE3) 是一种硫氧还蛋白还原酶缺陷菌株, 有利于胞质中蛋白二硫键的形成, 为具有二硫键的外源蛋白在大肠杆菌中正确折叠提供了有效的环境^[15]。Cao 等^[16]利用 pET32a 载体构建了重组表达载体, 并在 *E. coli* BL21 trxB (DE3) 宿主菌中进行表达, 发现在 BL21 trxB (DE3) 中能够有效表达出具有活性的 BmK AngM1。因此, 本文通过 IMPACTTM-TWIN 系统, 在宿主菌 *E. coli* BL21 trxB (DE3) 中对 BmK AngM1 进行了重组表达, 并建立了 rBmK AngM1 的纯化方法, 成功表达并纯化得到了有活性的 rBmK AngM1。

通过对 BmK AngM1 的三维结构进行分析, 发现其有四对二硫键、一个 NC 结构域及一个核心结构域^[11]。据文献报道, 当蝎毒活性肽 BmK AGP-SYPU1 的 5 位和核心结构域中的 42 位酪氨酸突变成苯丙氨酸时, 其活性明显提高^[17]。通过对其结构进行分析, 推断可能原因为突变的 Phe5 和 Phe42 不能与 Lys41 和 Pro60 形成氢键, 使得核心结构域的柔性更高, 从而使这些突变体具有更高的活性。但本文实验结果表明, 当 5 位和 42 位的酪氨酸突变成苯丙氨酸时, BmK

AngM1 的抗炎活性无显著变化。将 NC 结构域中的 58 位精氨酸突变成天冬酰胺时, 其抗炎活性显著提高, 其可能原因为精氨酸的多个带电基团和脂肪链部分影响了 BmK AngM1 的抗炎活性, 天冬酰胺的侧链使得 BmK AngM1 的结构更加稳定。由此可见, 58 位残基在 BmK AngM1 的抗炎活性中起关键作用, 该位点可能是其发挥抗炎作用的活性位点。

References

- [1] Wang CY, Tan ZY, Chen B, et al. Antihyperalgesia effect of BmK IT2, a depressant insect-selective scorpion toxin in rat by peripheral administration [J]. *Brain Res Bull*, 2000, 53: 335–338.
- [2] Ye HY, Li WD, Lin ZB. The anti-inflammatory effect of scorpion venom [J]. *J Gannan Med Univ (赣南医学院学报)*, 2001, 21: 248–251.
- [3] Shao JH, Cui Y, Zhao MY, et al. Purification, characterization, and bioactivity of a new analgesic-antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch [J]. *Peptides*, 2014, 53: 89–96.
- [4] Wang J, Qian W, Zhu Q, et al. Martentoxin, a large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel inhibitor, attenuated TNF- α -induced nitric oxide release by human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Biomed Res*, 2013, 27: 386–393.
- [5] Santhosh KN, Pavana D, Thippeswamy NB. Impact of scorpion venom as an acute stressor on the neuroendocrine-immunological network [J]. *Toxicon*, 2016, 122: 113–118.
- [6] Liu KN, Nie XB, Liu J. Extraction technology of scorpion venom and its application prospect [J]. *J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol (河北中医药学报)*, 2016, 31: 55–58.
- [7] Cao ZY, Mi ZM, Cheng GF, et al. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensii* Karch [J]. *J Peptide Res*, 2004, 64: 33–41.
- [8] Yang JL, He HX, Zhu HX, et al. Optimization on the production of analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch in *Pichia pastoris* [J]. *Acta Pharm Sin (药理学学报)*, 2009, 44: 91–94.
- [9] Cao Z, Wang W, Xiao X, et al. High-level expression and purification of an analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch [J]. *Protein Peptide Lett*, 2007, 14: 247–251.
- [10] Eryilmaz E, Shah NH, Muir TW, et al. Structural and dynamical features of inteins and implications on protein splicing [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 14506–14511.
- [11] Cui Y, Song YB, Ma L, et al. Site-directed mutagenesis of the toxin from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch (BmKAS): insight into sites related to analgesic activity [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33: 1633–1639.
- [12] Wang H, Meng X, Xu J, et al. Production, purification, and characterization of the cecropin from *Plutella xylostella*, pxCECA1, using an intein-induced self-cleavable system in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 94: 1031–1039.
- [13] Sulitan A, Ji SJ, Zhu YX. Prokaryotic expression and transgenic analysis of a scorpion toxin AaHIT1 gene [J]. *Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报)*, 2003, 19: 182–185.
- [14] Derman AI, Prinz WA, Belin D, et al. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. *Science*, 1993, 262: 1744–1748.
- [15] Lei RY, Qiao YH, Yan JD, et al. Soluble expression of recombinant human BMP6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay *in vitro* [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2008, 24: 452–459.
- [16] Cao ZY. Studies on *Buthusmartensii* Toxins: Purification, Identification, Characterization and Gene Expression (东亚钳蝎蝎毒多肽的分离纯化、结构鉴定、活性测定及基因表达研究) [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 2004.
- [17] Deng L, Zhang HX, Wang Y, et al. Site-directed mutagenesis of BmK AGP-SYPU1: the role of two conserved Tyr (Tyr5 and Tyr42) in analgesic activity [J]. *Protein J*, 2014, 33: 157–164.