

基于UPLC-Q-Exactive-MS的菲牛蛭酶解物肽段鉴定与分子特性表征

李 尹¹, 郭秀欢¹, 雷 艳¹, 侯觉文¹, 谢海林², 袁瑞娟^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 广西复鑫益生物科技有限公司, 广西 贵港 537300

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive-MS)技术对菲牛蛭酶解物中肽段进行鉴定与表征。方法 采用胰蛋白酶对菲牛蛭进行酶解, 利用UPLC-Q-Exactive-MS技术结合Maxquant软件对菲牛蛭酶解物进行分析并对其肽段进行序列鉴定, 同时采用生物信息学平台对这些肽段进行生物活性与不良反应预测以及相对分子质量、等电点(pI)、净电荷、亲水性氨基酸比例、不稳定性指数等基本分子特性的预测。结果 利用UPLC-Q-Exactive-MS技术联合Maxquant软件在菲牛蛭酶解物中共鉴定出32条肽段, 其中肽段AGFAGDDAPR的各项肽段分子特性符合目前已知抗血栓肽的共性特征, 鉴定分数为103.83, 可信度高; 活性概率为0.56, 相对分子质量976.01, 肽链长度为10; 平均亲水性为0.5, 亲水性氨基酸残基比例为30%, 水溶性良好; pI值为4.21, 净电荷为-1; 不稳定性指数为20.72, 在水中稳定性强; 具有抗血栓活性的可能性较大。同时6条肽段SSGETSSIIR、AGFAGDDAPR、SSGETSSIIR、DSYVGDEAQSKR、GARRER、SIEDQVKR被预测具有抗血管生成活性且无溶血现象, 但仍需进一步的合成与活性验证。结论 以菲牛蛭为例, 提供了一种快速从酶解物中鉴定动物药肽段序列的方法, 以期对动物药的肽类成分的研究提供思路。

关键词: 菲牛蛭; 酶解物; 肽段鉴定; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive-MS); Maxquant软件; 抗血栓; 血管生成

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)01-0048-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.01.006

Peptide identification and molecular characterization of enzymatic hydrolysates from *Poecilobdella manillensis* based on UPLC-Q-Exactive-MS

LI Yin¹, GUO Xiuhuan¹, LEI Yan¹, HOU Juewen¹, XIE Hailin², YUAN Ruijuan¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. GuangXi Fu Xin Yi Biological Technology Co.Ltd., Guigang 537300, China

Abstract: Objective In view of the difficulties in the separation and identification of protein and peptides of *Poecilobdella manillensis* leading to the ambiguity of peptides components of it, a method for the identification and characterization of polypeptides in enzymatic hydrolysate of *Poecilobdella manillensis* was developed. **Methods** *Poecilobdella manillensis* was hydrolyzed by trypsin, and the polypeptides were identified by UPLC-Q-Exactive-MS technology and Maxquant software from the hydrolysate. Meanwhile, some bioinformatics platforms were used to predict the biological activity and side effects of these peptides, as well as molecular weight, isoelectric point, net charge, proportion of hydrophilic amino acids, instability index and other basic molecular properties. **Results** A total of 32 peptides were identified by UPLC-Q-Exactive-MS technology combined with Maxquant software. Among them, the molecular properties of AGFAGDDAPR accorded with the common characteristics of antithrombotic peptides which were known to researchers. The identification score was 103.83, with high reliability. The activity probability was 0.56, the molecular weight was 976.01, and the peptide chain length was 10. The average hydrophilicity was 0.5, hydrophilic amino acid residue proportion was 30%, good water solubility; The isoelectric point was 4.21 and the net charge was -1. Instability index was 20.72, strong stability in water, so it would be possible to have antithrombotic activity. Six peptides (SSGETSSIIR, AGFAGDDAPR, SSGETSSIIR, DSYVGDEAQSKR, GARRER, and SIEDQVKR) were predicted to have

收稿日期: 2021-06-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82173955);北京市自然科学基金资助项目(7172130)

第一作者: 李 尹(1997—),女,在读硕士生,主要从事动物药肽类成分研究。E-mail:1962403243@qq.com

*通信作者: 袁瑞娟,副教授,硕士生导师,主要从事中药分析及中药质量控制研究。E-mail: rjyuan@126.com

antiangiogenic activity and no hemolysis, but further synthesis and activity verification experiments were needed. **Conclusion** This study takes *Poecilobdella manillensis* as an example to provide a method for rapid identification of the peptide sequence in enzymatic hydrolysates of animal drugs and provide ideas for the study of peptide components of animal drugs.

Key words: *Poecilobdella manillensis*; enzymatic hydrolysate; peptide identification; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive-MS); Maxquant; antithrombotic; angiogenesis

水蛭是一味常用的活血化瘀类动物药,根据食性不同,可分为吸血水蛭和非吸血水蛭2大类。菲牛蛭是一种典型的吸血水蛭,具有优异的抗凝、溶栓、抗血管生成等生物活性,被收载于广西、云南等地方标准中。目前,从菲牛蛭唾液中分离出的菲牛蛭素,是凝血酶的强抑制剂,此外,还含有其他未知的生物活性成分,活性物质基础尚需深入研究^[1-6]。菲牛蛭在临床使用中常以冻干粉的形式口服给药,其中蛋白类活性成分需要在胃肠道中被消化降解后才能发挥药效。有研究表明,菲牛蛭酶解物具有更好的生物活性,且胰蛋白酶是其关键水解酶^[7-11]。菲牛蛭经胰蛋白酶酶解的肽段可能是发挥药效的重要物质基础。但由于菲牛蛭活性物质基础复杂,经过酶解后产生的肽段更加复杂,使得其活性物质基础研究难上加难。

近年来,通过色谱分离、质谱分析与物种蛋白数据库匹配检索等步骤快速分析混合物中蛋白质和肽的组成,使得动物药中活性组分的研究从单一组分的研究转变为多组分的同步研究,也极大提高了发现新蛋白质和肽的效率^[12-14]。同时利用各种生物信息学平台可以对肽段的等电点(pI)等基本分子特性进行预测。四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive-MS)是近几年推出的新型四极杆和轨道阱杂交高分辨质谱仪,可实现高可靠性的定性和定量分析,应用于肽段解析也能完成精准的分析与鉴定^[15-17]。因此本研究结合酶解技术、UPLC-Q-Exactive-MS技术与Maxquant软件快速鉴定菲牛蛭酶解物中存在的肽段成分,对其基本分子特性进行预测,为菲牛蛭的活性肽类成分研究奠定基础,同时探索从酶解物中快速鉴定蛋白肽类的方法。

1 材料

1.1 仪器

UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS仪,Ultimate 3000超高效液相色谱系统(赛默飞世尔科技公司,美国);高速粉碎机(北京同创嘉德科技有限公司);DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(北京世纪予

华仪器有限公司);ES-120型电子分析天平(长沙湘平科技发展有限公司);LGJ型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);METTLER TOLEDO实验室pH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Sorvall ST 8R高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司,美国)。

1.2 药材及主要试剂

菲牛蛭,活体,由广西复鑫益集团有限公司提供,由北京中医药大学中药鉴定系白贞芳副教授鉴定为医蛭科牛蛭属菲牛蛭*Poecilobdella manillensis* Lesson;质谱级乙腈和质谱级甲酸均购自赛默飞世尔科技(美国)有限公司;色谱用水为屈臣氏水; NH_4HCO_3 购自上海源叶生物科技有限公司;胰蛋白酶1:250(美国Amresco公司)。

2 方法

2.1 菲牛蛭酶解液供试品的制备

菲牛蛭活体置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻24 h处死,取出后将其冷冻干燥,得菲牛蛭冻干品。菲牛蛭冻干品经粉碎机粉碎,过5号筛,得菲牛蛭冻干粉;置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱密封保存备用。称量菲牛蛭冻干粉0.4 g,1% NH_4HCO_3 (pH 8.0左右)溶液溶解后,置100 mL量瓶中,加1% NH_4HCO_3 溶液并定容至刻度,转移至150 mL圆底烧瓶中,加0.04 g胰蛋白酶,在温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温磁力搅拌器中酶解12 h,取样,8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心15 min后,取上清液过0.22 μm 水系滤膜,滤液经13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 离心15 min(2次)后置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,进样前 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴迅速溶解后置于干净进样小瓶内衬管中上样,平行制备4份^[18]。

2.2 色谱条件及质谱条件

2.2.1 色谱条件 采用Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μm);体积流量0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$;进样量2 μL ;流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B);采用梯度洗脱:0~6 min,5%~20%B;6~10 min,20%~40%B;10~14 min,40%~90%B;14~18 min,90%~99%B;18~20 min,99%~5%B;20~22 min,

5%B。

2.2.2 质谱条件 采用ESI电喷雾电离源,在正离子模式下进行质谱检测分析。数据采集模式为数据依赖模式(DDA),扫描模式:Full MS/dd-MS², Full MS分辨率为0.07, dd-MS²分辨率为0.017 5;碰撞能量为30~50 eV;四极杆扫描范围为 m/z 150~2 000。排除电荷(charge exclusion)设为3~8和>8,其余设置默认。

2.3 菲牛蛭酶解物中肽段的鉴定

2.3.1 软件分析 利用Qual Browser of Xcalibur 3.0.63(Thermo Fisher Scientific, USA)软件进行数据谱图分析。

2.3.2 Maxquant参数设置 将质谱产生的RAW原始数据使用Maxquant软件(版本1.6.17.0)搜库。以Uniprot数据库收录蛭纲蛋白库hirudinea^[19](26 436条序列, 2021-03-17下载)以及Swiss-Prot全蛋白库(2021-01-07下载)为检索数据库,最小肽段长度设为3,搜库时设置酶切方式为Trypsin/p,最大漏切位点为2,固定修饰设置为Carbamidomethyl(C);可变修饰设置为Acetyl(Protein N-term)、Oxidation(M),假阳性(false-positive discovery rate, FDR)设为1%,其他参数均为默认值^[20]。

2.3.3 统计学分析 数据使用Originpro 2021学习版进行处理及作图。

2.4 菲牛蛭酶解物肽段生物信息学分析

2.4.1 菲牛蛭酶解物肽段生物活性与不良反应预测 通过基于新型N对1神经网络预测生物活性肽的服务器(Peptide Ranker, <http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>)向其提交肽的序列,它将按肽具有

生物活性的概率返回给用户。利用<http://codes.bio/targetantiangio/>预测肽段的抗血管生成作用^[21]。通过在线网站ToxinPred(<http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>)预测肽段毒性^[22]。利用<http://codes.bio/hemopred/>对肽段进行溶血性预测^[23],利用<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html>对肽段进行致敏性预测^[24]。

2.4.2 菲牛蛭酶解物肽段基本分子特性预测 通过在线预测网站Innovagen(<http://www.innovagen.com/>)的子网页(<https://pepcalc.com/>中Peptide property calculator)工具预测酶解产物中鉴定到的肽段的水溶性及净电荷。网站给出肽段水溶性的结果分为“Good water solubility”和“Poor water solubility”2类。与此同时,使用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测肽的不稳定性指数及pI值,给出肽段的化学分子式。不稳定指数可以估算出蛋白质在试管中的稳定性,不稳定指数小于40的蛋白质或肽被预测为稳定,高于40的被预测为可能不稳定。采用Peptide tools(<http://www.chinapeptides.com/tool.aspx>)预测肽的平均亲水性和亲水性氨基酸残基的比例^[25]。

3 结果

3.1 菲牛蛭酶解物中肽段的鉴定

在正离子模式下,菲牛蛭酶解物的总离子流图见图1。利用Maxquant鉴定菲牛蛭生品酶解物中的肽段,去除常见Potential contaminant以及鉴定得分低于50^[26]的肽段后,共32条肽段,FDR均在1%以下,鉴定可信度良好,鉴定所得菲牛蛭酶解物肽段具体见表1。

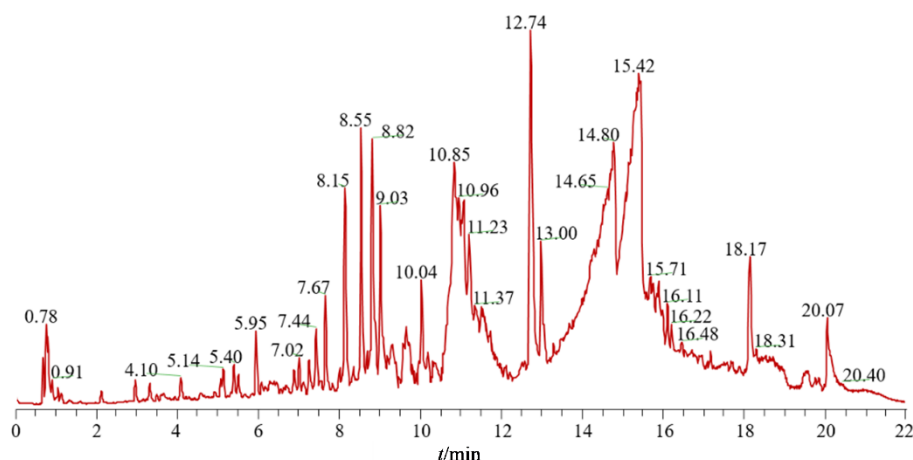


图1 菲牛蛭酶解液质谱总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of enzymatic hydrolysate of *Poecilobdella manillensis*

表1 非牛蛭酶解物肽段鉴定信息

Table 1 Information for peptide identification of enzymatic hydrolysates from *Poecilobdella manillensis*

编号	序列	同源蛋白	长度/ bp	t_R /min	m/z	理论相对 分子质量	得分
1	SSGETSSIIR	T1ECZ8	11	5.100 7	617.822 9	1 192.29	172.23
2	VHVDEVGGEALGR	P04346;P67819;P67820;P09422	13	5.495 2	669.344 0	1 337.46	169.93
3	VLSAADKSNVQAAWGK	Q9TSN9;Q9TSN7	16	5.917 9	822.938 8	1 644.85	149.41
4	VGGHAADYGAEALER	Q9XSK1;Q9TSN8;Q9TSN9;Q9TSN7	15	5.354 6	758.363 0	1 515.60	142.07
5	SYELPDGQVLTIGNER	P18600	16	8.614 2	895.949 6	1 790.95	117.79
6	SYELPDGQVITIGNER	O76950;T1FME7;Q2LDZ7;Q2LDZ8; T1G9A8;T1FMD2;Q2LDZ6;A0A223APW9	16	8.614 2	895.949 6	1 790.95	117.79
7	LILLISFLKK	Q9LIH9	10	8.750 8	594.409 9	1 187.57	107.66
8	VLSAADKTNVK	Q9XSE9;Q9XSN2;Q9TVA3;Q7JFN6; P01961;P01960;P01959;P01958	11	3.336 5	573.329 9	1 145.32	105.94
9	AGFAGDDAPR	Swiss-Prot 数据库:P18600; 蛭纲(hirudinea)数据库:O76950; T1FME7;Q2LDZ7;Q2LDZ8;T1G9A8; T1FMD2;T1FQQ4	10	4.282 2	488.727 8	976.01	103.83
10	VGGHAGEFGAEALER	Q9XSE9	15	6.124 3	750.365 5	1 499.60	96.103
11	LLLILI	T1G2F8	6	7.558 8	697.522 2	696.97	95.617
12	ILIIIVTLKK	O27041	9	9.016 2	520.875 7	1 040.40	94.262
13	QVTINDLPVGR	Q9BGI3	11	7.552 5	606.340 8	1 211.38	92.062
14	VLSAADKSNVK	Q9XSK1;P68239;P21379;P68240;Q0ZA50; P0CH25;P0CH26;P07405;P41327	11	2.925 6	566.322 0	1 131.29	91.584
15	SNETVVKR	T1FM89	8	2.880 4	487.766 9	932.04	87.754
16	HGFSGPTIGPK	T1FWA9	11	5.391 0	549.290 5	1 097.24	85.731
17	SSGETSSIIR	T1ECZ8	10	5.883 5	539.772 4	1 036.11	76.827
18	LILSLKIK	T1FUK9	8	8.823 9	464.333 7	927.24	75.311
19	VLSAADKSNVKAAGWK	Q9XSK1;P68239;P21379;P68240;Q0ZA50; P0CH25;P0CH26	16	5.144 5	822.957 0	1 644.89	72.200
20	EITAMAPSTMK	O76950;T1FME7;Q2LDZ7	11	6.171 9	590.291 0	1 179.41	70.100
21	LEIIVQDKEGEIDR	Q9HKN1	14	10.04	828.943 8	1 656.85	69.276
22	HGVGLK	T1FMV2	6	1.062 2	305.687 2	609.73	67.841
23	GGLEAGR	Q48N21;Q4ZY26	7	5.507 0	330.177 2	658.71	64.563
24	DSYVGDEAQSKR	Swiss-Prot 数据库:P18600; 蛭纲(hirudinea)数据库:O76950; T1FME7;Q2LDZ7;Q2LDZ8;T1G9A8; T1FMD2;Q2LDZ6;T1FQQ4	12	2.982 3	677.815 3	1 354.40	61.650
25	MQKEITAMAPSTMK	O76950;T1FME7;Q2LDZ7	14	5.998 7	783.888 1	1 566.91	61.435
26	TAAQNIIPSSTGAAG	T1FMX4	15	5.707 1	715.385 9	1 429.59	60.255
27	GARRER	O87719;B8GZ98	6	2.963 0	372.714 8	743.82	59.890
28	SLGLLD	Q5ZT13;Q5X2T6;Q5WU94;A5IEF4	6	7.889 6	617.350 5	616.71	57.074
29	VLDSSFSDGMK	P04346	10	6.748 8	549.760 4	1 098.24	53.775
30	LSGLLEV	T1EYV5	7	10.1490	730.434 5	729.87	51.036
31	EEMTPFIVDYVMNNPK [Oxidation (M)]	A6H1N2	16	8.619 8	971.949 9	1 927.22	50.353
32	SIEDQVKR	Q9HKN1	8	3.243 7	487.766 9	974.08	50.039

表1鉴定肽段过程中的同源蛋白来自于Uniprot数据库蛭纲中的蛋白序列以及来自经过手动校准的Swiss-Prot蛋白序列库,其中涉及的水蛭种类包括*Helobdella robusta* (Californian leech)、*Hirudo medicinalis* (Medicinal leech)、*H. triserialis* (Leech)。涉及到总共54种同源蛋白的种类主要为肌动蛋白、血红蛋白亚基、微管蛋白、转移酶、激酶、ATP合成酶等,参与包含白细胞活化、脂多糖介导的信号通路的负调控、核转录因子- κ B(NF- κ B)活性的负调控、MAPK的激活、凝血的正向调节、三羧酸循环、糖酵解、氧气运输、有丝分裂胞质分裂、蛋白质生物合成等生物过程。

在鉴定出的32条菲牛蛭肽段中,肽链长度及相对分子质量分布见图2。从表1及图2可知,鉴定出的肽链长度在6~16个氨基酸残基,相对分子质量在600~2 000。大部分菲牛蛭肽段的肽链长度主要集中在6~10个氨基酸残基,其次集中在11~15个氨基酸残基。而相对分子质量主要集

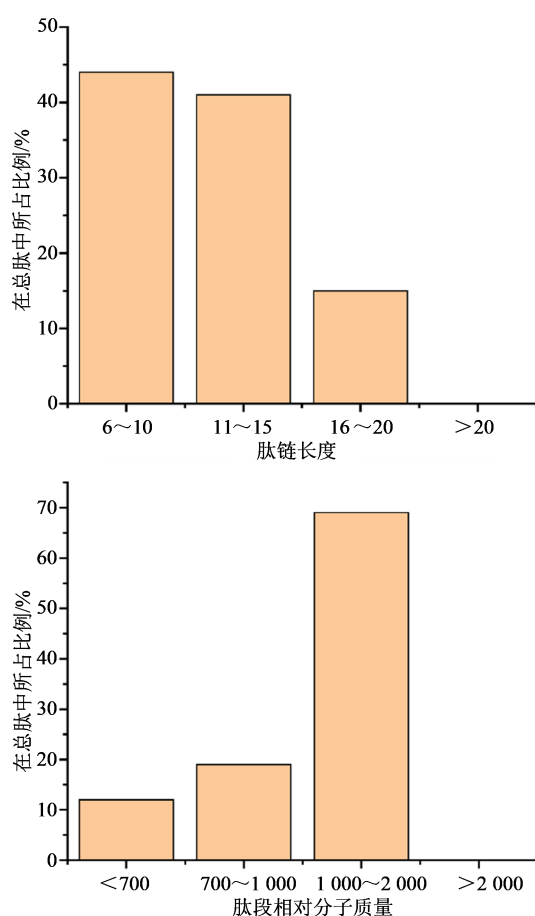


图2 菲牛蛭肽段的各段肽链长度占总肽段比例及相对分子质量分布

Fig. 2 Ratio of length of each peptide to total peptide and molecular weight distribution of *Poecilobdella manillensis*

中在1 000~2 000。目前从蛋白类药物中筛选各类肽类活性成分的研究都倾向于选择相对分子质量小于3 000的肽段^[27],而本研究鉴定得到的菲牛蛭肽段相对分子质量都在此范围内。抗血栓活性肽中大多数属于寡肽,超过87%的肽含有的氨基酸数量不超过20个^[25],所鉴定得到的菲牛蛭肽段基本符合。

3.2 菲牛蛭肽段生物信息学分析

3.2.1 菲牛蛭肽段生物活性、不良反应预测及末端氨基酸种类分析 对活性药物候选者进行生物活性与毒性的预测,为研究海量肽段提供了1种在不失准确性的情况下于前期筛选活性肽段的方法,将节省大量时间、经济和实验成本^[28]。Peptide Ranker中生物活性预测显示的是该活性肽有活性的概率高低,而不是活性高低。通常情况下,在概率值大于0.5时,表明该肽段具有生物活性的概率较高。32条菲牛蛭肽段生物活性与毒性预测及末端氨基酸种类分析见表2与图3,菲牛蛭肽段抗血管生成、致敏性与溶血预测见表3。

从图3可以看出,菲牛蛭酶解物N末端氨基酸种类主要为缬氨酸(V)、丝氨酸(S)和亮氨酸(L);C末端氨基酸种类主要为赖氨酸(K)和精氨酸(R),K和R为C末端主要氨基酸种类可能由于使用胰蛋白酶作为酶解菲牛蛭的酶种类,而胰蛋白酶的酶切位点为K和R^[29]。涂茂林^[25]在目前抗血栓肽的共性特征分析中提到抗血栓活性肽的N末端氨基酸种类主要为甘氨酸(G)、K、V和R,C末端氨基酸种类为K、脯氨酸(P)和甘氨酸(G)。菲牛蛭酶解物N末端氨基酸种类包含V和G,C末端氨基酸种类为K满足此条件。

如表2所示,所有32条菲牛蛭肽段的毒性预测均为无毒;活性概率预测方面结果显示,活性预测值中大于和接近于0.5的共有3条肽段,后续肽段人工合成验证可以作为参考。具潜在生物活性的3条肽段分别为AGFAGDDAPR(9)、HGFSGPTIGPK(16)、VLDSFSDGMK(29)。此3条具有生物活性的肽段具体为何种生物活性有待进一步研究,其余预测活性概率低的菲牛蛭肽段也可经氨基酸突变、修饰等方式提高。

表3为对所鉴定的菲牛蛭肽段进一步的抗血管生成活性预测结果。9条肽段被预测具有抗血管生成的作用,其中预测为具有抗血管生成作用且没有溶血现象的菲牛蛭肽段共6条:SSGETSSIIR(1)、AGFAGDDAPR(9)、SSGETSSIIR(17)、

表2 菲牛蛭肽段生物活性与毒性预测

Table 2 Prediction of bioactivity and toxicity of peptide from *Poecilobdella manillensis*

编号	序列	分子式	活性概率	毒性	N端氨基酸种类	C端氨基酸种类
1	SSGETSSIIR	C ₄₇ H ₈₅ N ₁₇ O ₁₉	0.384 484	无	S	R
2	VHVDEVGGEALGR	C ₅₆ H ₉₂ N ₁₈ O ₂₀	0.169 307	无	V	R
3	VLSAADKSNVQAAWGK	C ₇₂ H ₁₁₇ N ₂₁ O ₂₃	0.263 721	无	V	K
4	VGGHAADYGAEALER	C ₆₄ H ₉₈ N ₂₀ O ₂₃	0.182 958	无	V	R
5	SYELPDGQVLTIGNER	C ₇₇ H ₁₂₃ N ₂₁ O ₂₈	0.228 223	无	S	R
6	SYELPDGQVITIGNER	C ₇₇ H ₁₂₃ N ₂₁ O ₂₈	0.206 175	无	S	R
7	LILLISFLKK	C ₆₀ H ₁₀₆ N ₁₂ O ₁₂	0.385 094	无	L	K
8	VLSAADKTNVK	C ₄₉ H ₈₈ N ₁₄ O ₁₇	0.126 565	无	V	K
9	AGFAGDDAPR	C ₄₁ H ₆₁ N ₁₃ O ₁₅	0.561 859	无	A	R
10	VGGHAGEFGAEALER	C ₆₄ H ₉₈ N ₂₀ O ₂₂	0.366 072	无	V	R
11	LLLILI	C ₃₆ H ₆₈ N ₆ O ₇	0.341 463	无	L	I
12	ILIIIVTLKK	C ₅₁ H ₉₇ N ₁₁ O ₁₁	0.131 297	无	I	K
13	QVTINDLPVGR	C ₅₂ H ₉₀ N ₁₆ O ₁₇	0.239 260	无	Q	R
14	VLSAADKSNVK	C ₄₈ H ₈₆ N ₁₄ O ₁₇	0.131 451	无	V	K
15	SNETVVKR	C ₃₈ H ₆₉ N ₁₃ O ₁₄	0.102 442	无	S	R
16	HGFSGPTIGPK	C ₅₀ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₄	0.495 737	无	H	K
17	SSGETSSIIR	C ₄₁ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₈	0.230 535	无	S	R
18	LILSLKIK	C ₄₅ H ₈₆ N ₁₀ O ₁₀	0.156 407	无	L	K
19	VLSAADKSNVKAAGWK	C ₇₃ H ₁₂₁ N ₂₁ O ₂₂	0.403 485	无	V	K
20	EITAMAPSTMK	C ₄₉ H ₈₆ N ₁₂ O ₁₇ S ₂	0.231 698	无	E	K
21	LEIIVQDKEGEIDR	C ₇₁ H ₁₂₁ N ₁₉ O ₂₆	0.0721 03	无	L	R
22	HGVGLK	C ₂₇ H ₄₇ N ₉ O ₇	0.264 781	无	H	K
23	GGLEAGR	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₀	0.309 677	无	G	R
24	DSYVGDEAQSQR	C ₅₅ H ₈₇ N ₁₇ O ₂₃	0.109 812	无	D	R
25	MQKEITAMAPSTMK	C ₆₅ H ₁₁₅ N ₁₇ O ₂₁ S ₃	0.247 309	无	M	K
26	TAAQNIIPSSTGAACK	C ₆₀ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₂₂	0.183 513	无	T	K
27	GARRER	C ₂₈ H ₅₃ N ₁₅ O ₉	0.185 585	无	G	R
28	SLGLLD	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₁₀	0.422 785	无	S	D
29	VLDSEFSDGMK	C ₄₇ H ₇₅ N ₁₁ O ₁₇ S ₁	0.508 107	无	V	K
30	LSGLLEV	C ₃₃ H ₅₉ N ₇ O ₁₁	0.153 738	无	L	V
31	EEMTPFIVDYVMNNPK	C ₈₆ H ₁₃₁ N ₁₉ O ₂₇ S ₂	0.227 326	无	E	K
32	SIEDQVQR	C ₄₀ H ₇₁ N ₁₃ O ₁₅	0.184 564	无	S	R

S-丝氨酸; V-缬氨酸; L-亮氨酸; A-丙氨酸; I-异亮氨酸; Q-谷氨酰胺; H-组氨酸; K-赖氨酸; R-精氨酸; G-甘氨酸; D-天冬氨酸; M-甲硫氨酸
S-serine; V-valine; L-leucine; A-alanine; I-isoleucine; Q-glutamine; H-histidine; K-lysine; R-arginine; G-glycine; D-aspartic acid; M-methionine

DSYVGDEAQSQR (24)、GARRER (27)、SIEDQVQR(32),可为后续菲牛蛭的抗血管生成作用研究提供参考。

3.2.2 菲牛蛭肽段基本分子特性预测 菲牛蛭肽段的基本分子特性预测具体针对肽段的净电荷、pI值、水溶性、亲水性、不稳定性指数。并将预测结果与涂茂林^[25]研究中目前已知的抗血栓肽分子特性的共性特征研究进行比较分析。具体结果与比较

分析见表4与图4~6。

菲牛蛭肽段的pI值及净电荷总体分布见图4, pI值是一个分子表面不带电荷时的pH值,净电荷是中性pH下带正电荷(碱性)和负电荷(酸性)的总和,能够反映蛋白多肽的基本特性。涂茂林^[25]关于抗血栓肽的共性特征分析中提到超过85%的抗血栓肽含有-2~2个净电荷,大多数活性肽的pI值为4~10。从pI值及净电荷分析菲牛蛭的肽段信息,

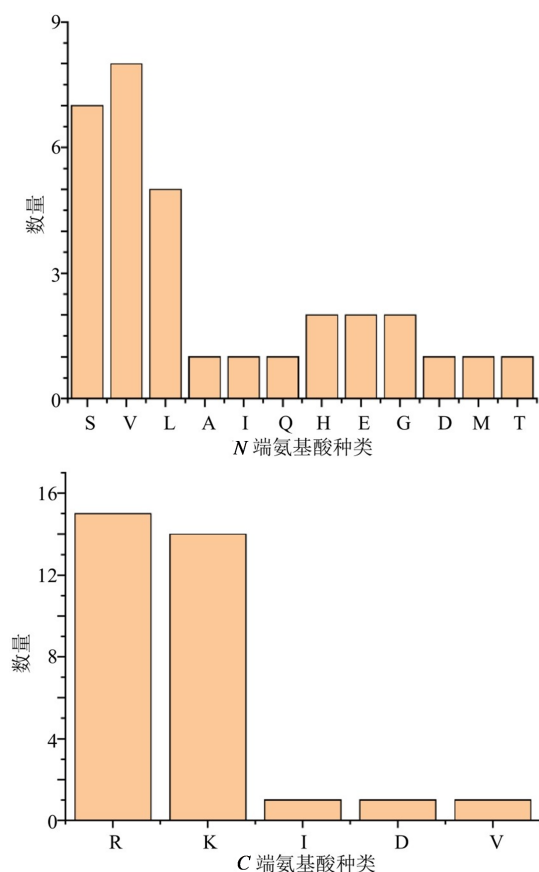


图3 菲牛蛭肽段N及C末端氨基酸种类分布

Fig. 3 Species distribution of N and C terminal amino acids of peptide from *Poecilobdella manillensis*

大部分菲牛蛭肽段符合目前抗血栓肽的pI值及净电荷范围,大部分肽段pI值分布在4~10,极少数小于4或者大于10;肽段的净电荷总体分布在-2~2,只有1例处在-3位置。

菲牛蛭肽段的水溶性预测分析见图5,结合平均亲水性以及亲水性氨基酸比例分析菲牛蛭肽段水溶性,大部分菲牛蛭肽段水溶性良好,属于“Good water solubility”类别。从一条肽的平均亲水性值可以判断其在水中的溶解性如何,平均亲水性是根据多肽序列中各氨基酸残基以及不同修饰的亲/疏水值得到的。平均亲水性值为0~2时,多肽在水中溶解性均很好,无需添加助溶剂即可取得较好的溶解效果;平均亲水性值为0说明多肽在水中的溶解性一般,可通过调整溶剂体系的pH、温度($\leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$)、超声或加入助溶剂等方法来增加多肽的溶解性;平均亲水性值为-3~0,多肽在水中的溶解性较差,可以使用助溶方法助溶,同时也可在多肽序列中增加亲水性氨基酸,以增加多肽的亲水性。如图5所示,32条菲牛蛭肽段的平均亲水性值范围大部分在-0.5~1.9,其中近3/4的肽段处于0及0以上;亲水性氨基

表3 菲牛蛭肽段抗血管生成、致敏性与溶血预测
Table 3 Anti-angiogenesis, allergen and hemolysis prediction of peptide from *Poecilobdella manillensis*

编号	序列	抗血管生成	溶血	致敏性
1	SSGETSSIIR	有	无	有
2	VHVDEVGGEALGR	无	无	有
3	VLSAADKSNVQAAWGK	无	有	有
4	VGGHAADYGAEALER	无	无	无
5	SYELPDGQVLTIGNER	无	无	有
6	SYELPDGQVITIGNER	无	无	潜在
7	LILLISFLKK	有	有	—
8	VLSAADKTNVK	无	无	有
9	AGFAGDDAPR	有	无	—
10	VGGHAGEFGAEALER	无	无	无
11	LLLILI	无	有	—
12	ILIIIVTLKK	无	有	—
13	QVTINDLPVGR	无	无	有
14	VLSAADKSNVK	无	无	有
15	SNETVVKR	无	无	—
16	HGFSGPTIGPK	无	无	有
17	SSGETSSIIR	有	无	—
18	LILSLKIK	有	有	—
19	VLSAADKSNVKAAGWK	无	有	有
20	EITAMAPSTMK	无	无	无
21	LEIIVQDKEGEIDR	无	无	有
22	HGVGLK	无	无	—
23	GGLEAGR	无	无	—
24	DSYVGDEAQSKR	有	无	无
25	MQKEITAMAPSTMK	无	无	去
26	TAAQNIIPSTGAAG	无	无	有
27	GARRER	有	无	—
28	SLGLLD	有	有	—
29	VLDSFSDGMK	无	无	—
30	LSGLLEV	无	有	—
31	EEMTPFIVDYVMNNPK	无	无	有
32	SIEDQVVKR	有	无	—

酸残基比例大部分分布在22%~75%,极少数比例低于20%。总体而言,鉴定得到的菲牛蛭肽段的水溶性良好。

如图6所示,菲牛蛭肽段的不稳定指数(指数值越大则越不稳定,超过40认为在水中不稳定)分布很分散,有的极为不稳定,有的很稳定,但总体来说约有3/4的菲牛蛭肽段分布在40以下,属于稳定范畴。

对所有菲牛蛭肽段进行肽段分子特性分析,结

表4 菲牛蛭肽段基本分子特性预测

Table 4 Prediction of basic molecular properties of peptide from *Poecilobdella manillensis*

编号	序列	pI	净电荷	不稳定性指数	水溶性预测	亲水性值	亲水性氨基酸比例/%
1	SSGETSSIIR	9.31	1.0	89.33	good	0.6	64
2	VHVDEVGGEALGR	4.65	-1.9	-5.17	good	0.4	31
3	VLSAADKSNVQAAWGK	8.56	1.0	-13.03	good	0.0	44
4	VGGHAADYGAEALER	4.65	-1.9	-5.08	good	0.3	27
5	SYELPDGQVLTIGNER	4.14	-2.0	1.97	good	0.2	44
6	SYELPDGQVITIGNER	4.14	-2.0	1.97	good	0.2	44
7	LILLISFLKK	10.00	2.0	19.77	poor	-0.7	30
8	VLSAADKTNVK	8.56	1.0	-22.63	good	0.3	45
9	AGFAGDDAPR	4.21	-1.0	20.72	good	0.5	30
10	VGGHAGEFGAEALER	4.75	-1.9	1.21	good	0.3	27
11	LLLLI	5.52	0	40.43	poor	-1.8	0
12	ILIIIVTLKK	10.00	2.0	1.99	poor	-0.5	22
13	QVTINDLPVGR	5.84	0	21.82	good	0.0	36
14	VLSAADKSNVK	8.56	1.0	-8.96	good	0.4	55
15	SNETVVKR	8.46	1.0	45.90	good	0.8	63
16	HGFSGPTIGPK	8.76	1.1	-0.34	poor	-0.1	18
17	SSGETSSIIR	5.72	0	39.98	good	0.3	60
18	LILSLKIK	10.00	2.0	0.99	good	-0.3	38
19	VLSAADKSNVKAAGWK	9.70	2.0	-14.82	good	0.2	44
20	EITAMAPSTMK	6.10	0	72.84	good	0.0	27
21	LEIIVQDKEGEIDR	4.18	-3.0	27.66	good	0.9	57
22	HGVGLK	8.76	1.1	-37.25	good	-0.1	17
23	GGLAAGR	6.00	0	26.20	good	0.5	29
24	DSYVGDQAQSKR	4.56	-1.0	81.92	good	1.0	67
25	MQKEITAMAPSTMK	8.35	1.0	53.99	good	0.1	36
26	TAAQNIIPSSTGAAG	8.41	1.0	51.07	poor	0.1	33
27	GARRER	11.70	2.0	89.65	good	1.9	67
28	SLGLLD	3.80	-1.0	8.33	poor	-0.3	33
29	VLDSESDGMK	4.21	-1.0	28.26	good	0.3	50
30	LSGLLEV	4.00	-1.0	8.57	poor	-0.5	29
31	EEMTPFIVDYVMNNPK	4.14	-2.0	23.49	good	0.0	38
32	SIQDQVKR	5.79	0	115.47	good	1.2	75

果显示,菲牛蛭肽段的部分或大部分分子特性处在抗血栓共性特征范围之内,且发现其中的肽段AGFAGDDAPR(9)各项分子特性尤其符合目前已有抗血栓肽段的共性特征。AGFAGDDAPR(9)鉴定分数为103.83,可信度高;活性概率为0.56,相对分子质量976.01,小于1 000,肽链长度为10;平均亲水性为0.5,亲水性氨基酸残基比例为30%,处于20%~60%,水溶性良好;pI值为4.21,净电荷为-1,均在目前已有抗血栓的共性特征的范围之内;不稳定性指数为20.72,小于40,在水中稳定性强。

AGFAGDDAPR(9)在与菲牛蛭同为医蛭科的 *H. medicinalis* 的蛋白Q2LDZ7中的序列位置见图7,处在蛋白序列的第20~29位。

4 讨论

动物药是传统中药的重要组成部分,然而长期以来由于缺乏合适的研究思路与技术方法,动物药的药效物质基础研究、质量控制研究等依然远远落后于植物药,如何鉴定菲牛蛭乃至动物药中功效关联的蛋白肽类成分仍然是中药学研究的难题。传统研究蛋白肽类成分的思路为跟踪蛋白肽类活性

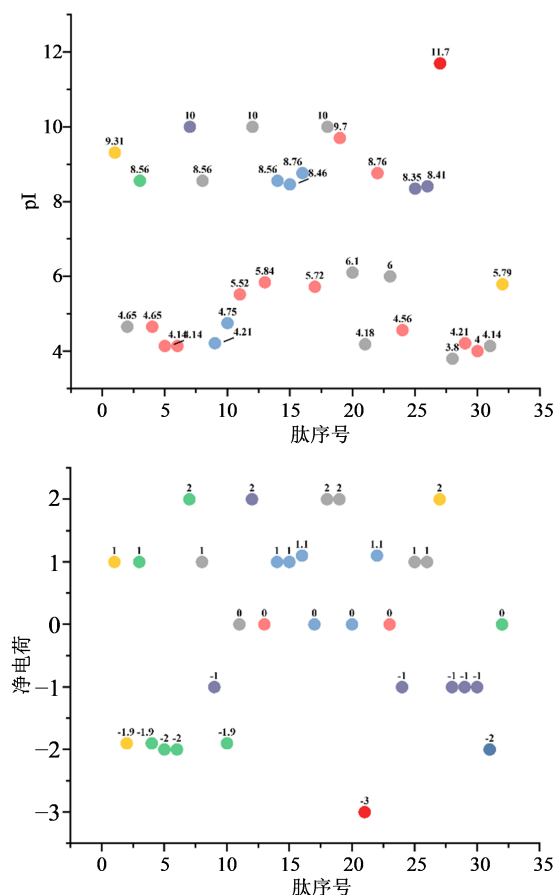


图4 菲牛蛭肽段的pI值及净电荷
Fig. 4 Ip value and net charge of peptide from *Poecilobdella manillensis*

部位,经过层层分离纯化得到较为单一的成分后再进行成分鉴定与活性验证,耗时长且往往结果并不是非常的理想^[30-31]。本研究结合UPLC-Q-Exactive-MS和Maxquant软件对菲牛蛭的胰蛋白酶酶解混合物进行快速的多肽序列鉴定,同时采用生物信息学平台对这些肽段进行生物活性与不良反应预测以及相对分子质量、pI、净电荷、亲水性氨基酸比例、不稳定指数等基本分子特性的预测。首先对鉴定得到的菲牛蛭肽类成分进行初步的活性筛选,然后进行菲牛蛭肽段的基本分子特性预测,并将预测结果与涂茂林文献报道^[25]的目前已知的抗血栓分子特性的共性特征研究进行比较分析。

从菲牛蛭酶解物中鉴定出32条肽段,54种同源蛋白,最终根据Peptide Ranker筛选了3条具有潜在活性的菲牛蛭肽段,然后根据肽段分子特性分析发现其中的AGFAGDDAPR符合已有抗血栓肽段的共性特征,活性概率大且无毒、无溶血及致敏现象,水溶性良好,水中稳定性强,并且同时发现有6条菲牛蛭肽段被预测具有抗血管生成活性且无溶血现

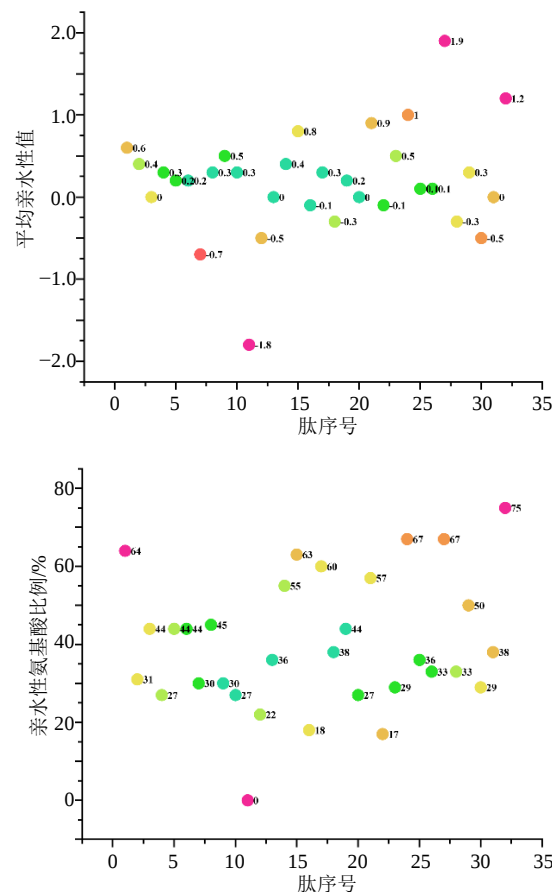


图5 菲牛蛭肽段的平均亲水性值及亲水性氨基酸比例
Fig. 5 Average hydrophilic value and hydrophilic amino acid ratio of peptide from *Poecilobdella manillensis*

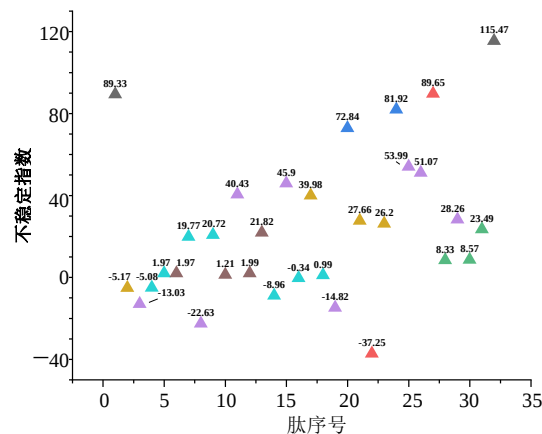


图6 菲牛蛭肽段的不稳定指数
Fig. 6 Instability index of peptide from *Poecilobdella manillensis*

象,其中的AGFAGDDAPR被预测可能同时具有抗血栓以及抗血管生成的活性,值得进一步研究。Chen等^[32]从黄粉虫*Tenebrio molitor*中也发现并验证AGFAGDDAPR体外具有抗血栓活性,并通过修饰使其抗血栓活性进一步提升。本研究为鉴定菲牛蛭肽类活性成分研究做出探索,动物药中多肽成

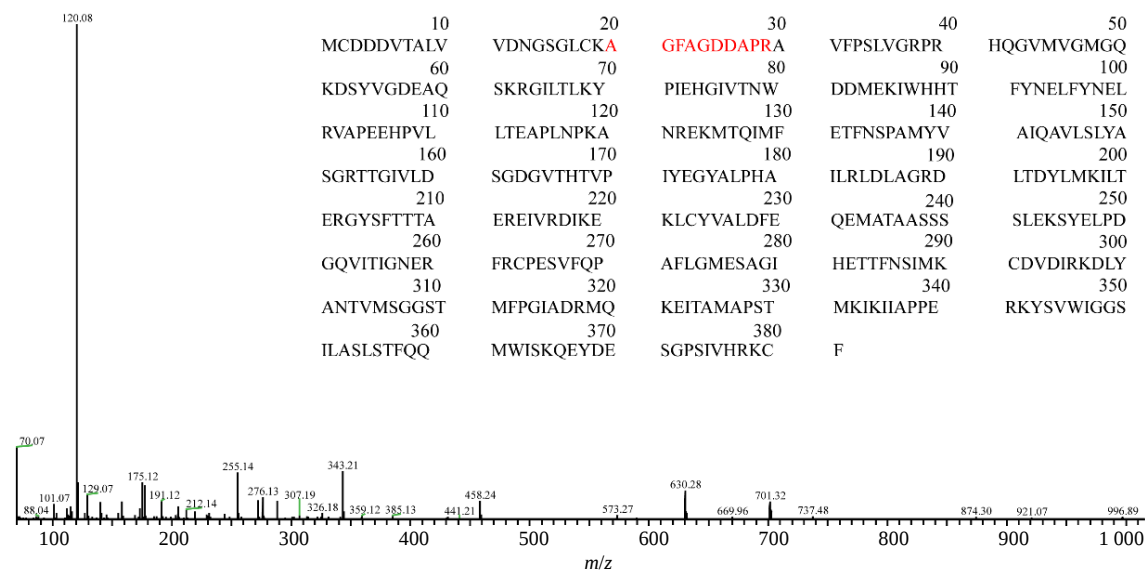


图7 菲牛蛭肽段AGFAGDDAPR(m/z 488.72)的二级碎片信息及在蛋白Q2LDZ7中的序列分析(右上)
Fig. 7 Secondary fragment information of *Poecilobdella manillensis* peptide AGFAGDDAPR (m/z 488.72) and sequence analysis in protein Q2LDZ7 (upper right)

分研究以及进一步的序列分析对于药效物质基础研究具有重要意义。本研究以菲牛蛭为例,提供一种快速从酶解物中鉴定动物药肽段序列的方法,以期为动物药的肽类成分研究提供思路。

不足之处在于本研究中菲牛蛭肽段序列鉴定数量较少以及肽段的活性未经过实验验证。Swiss-Prot数据库为经过人工手动校准的数据库,蛭纲蛋白库(hirudinea)虽然存在一部分不是手动校准的蛋白序列,但都是与菲牛蛭同属于蛭纲的物种,选取这2个数据库共同进行搜库以达到尽可能鉴定得到多的菲牛蛭肽段。但最终鉴定到的菲牛蛭肽段仍然不是特别多,猜测一方面可能是酶解物的浓度较低,另一方面可能是酶解时间过长,涂茂林研究^[25]表明当酶解的时间或者加酶量增加时,酶解程度增加,酶的漏切位点变少,肽段水解更彻底。因此,一部分原本能鉴定到的未被完全酶切的肽段,被完全酶切,肽段的种类变少^[25]。后续若对酶解过程的水解度进行监测便能更好地解决菲牛蛭酶解物中鉴定肽段种类太少的问题。此外,后期本课题组将对菲牛蛭肽段进行分子模拟筛选并对具体活性进行进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵润怀,贾海彬,周永红,等.我国动物药资源供给现状及可持续发展的思考[J].中国现代中药,2020,22(6): 835-839.
- Zhao R H, Jia H B, Zhou Y H, et al. Combination of

protection and development is the way to solve the dilemma of sustainable utilization of animal medicine [J]. Mod Chin Med, 2020, 22(6): 835-839.

- [2] 谭赫,侯觉文,单宇,等.水提法和仿生提取法研究菲牛蛭及其炮制品的抗血栓活性[J].中国药师,2019,22(5): 814-818.
- Tan H, Hou J W, Shan Y, et al. Anti-thrombosis activity of different products of *Poecilobdella manillensis* processed by water extraction or bionic extraction [J]. China Pharm, 2019, 22(5): 814-818.
- [3] 钟苗,雷艳,李尹,等.宽体金钱蛭与菲牛蛭不同炮制品体内抗凝活性研究[J].中药材,2020,43(6): 1351-1353.
- Zhong M, Lei Y, Li Y, et al. Study on anticoagulant activity of different processed products of *Whitmania pigra* Whitman and *Poecilobdella manillensis* Lesson in vivo [J]. J Chin Med Mater, 2020, 43(6): 1351-1353.
- [4] 王雄飞,孙毅坤,林瑞超,等.基于斑马鱼模型比较宽体金钱蛭和菲牛蛭对血管新生的影响[J].中国药师,2017,20(12): 2099-2103.
- Wang X F, Sun Y K, Lin R C, et al. Comparison of the effects on angiogenesis activity between *Whitmania pigra* Whitman and *Hirudinaria manillensis* Lesson based on a zebrafish model [J]. China Pharm, 2017, 20(12): 2099-2103.
- [5] 广西壮族自治区壮药质量标准[S].2011: 183-184.
- Guangxi Zhuang Autonomous region Zhuang Medicine quality standard [S]. 2011: 183-184.
- [6] 黄爱民.广西菲牛蛭中菲牛蛭素的分离纯化及体内外抗凝血实验[D].南宁:广西医科大学,2005.

- Huang A M. Purification Bufrudin from Guangxi *Hirudinaria manillensis* and its effects on human and rabbit plasma coagulation [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2005.
- [7] 张学涛, 庄滢潭, 李 震, 等. 基于抗凝血活性的不同基原水蛭酶解工艺对比研究 [J]. 当代化工, 2020, 49(3): 549-554.
- Zhang X T, Zhuang Y T, Li Z, et al. Comparative study on enzymatic hydrolysis processes of different radicals based on anticoagulant activity [J]. Contemp Chem Ind, 2020, 49(3): 549-554.
- [8] 孙 雪, 袁瑞娟, 赵智婕, 等. 蚂蟥酶解工艺研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2482-2486.
- Sun X, Yuan R J, Zhao Z J, et al. Study on enzymolysis process for *Whitmania pigra* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(17): 2482-2486.
- [9] 丁月珠, 袁瑞娟, 孙 雪, 等. 蚂蟥酶解物不同部位的抗凝活性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(7): 3187-3190.
- Ding Y Z, Yuan R J, Sun X, et al. Study on anticoagulant activity of different fractions from the enzymolysis product of *Whitmania pigra* Whitman [J]. CJTCMP, 2017, 32(7): 3187-3190.
- [10] 钟 超. 菲牛蛭抗凝血肽的酶法制备及其活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- Zhong C. Enzymatic preparation and functional properties of anticoagulant peptides from *Hirudinaria manillensis* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [11] Shen W L, Matsui T. Current knowledge of intestinal absorption of bioactive peptides [J]. Food Funct, 2017, 8 (12): 4306-4314.
- [12] 刘 睿, 赵 明, 段金彪. 基于"蛋白质/肽组学-修饰组学"研究动物药功效物质基础的思路与方法 [J]. 药学报, 2020, 55(8): 1735-1743.
- Liu R, Zhao M, Duan J N. Ideas and strategies for investigating the bioactive constituents of animal derived traditional Chinese medicines based on integrated "proteomics/peptidomics-modifications" methods [J]. Acta Pharm Sin, 2020, 55(8): 1735-1743.
- [13] 杨 彬, 高文远, 张艳军. 基于转录组学-蛋白质组学-多肽组学整合关联分析策略的动物药蛋白多肽类成分研究思路及方法 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1033-1038.
- Yang B, Gao W Y, Zhang Y J. Research ideas and methods of protein and peptides in animal medicine based on transcriptomics-proteomics-peptidomics integrated association analysis strategy [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(5): 1033-1038.
- [14] 刘 琳, 李修乐, 高建萍, 等. 燕窝酶解产物中多肽的液相色谱质谱分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 714-719.
- Liu L, Li X L, Gao J P, et al. Peptides analysis in digested edible bird's nest by HPLC-MS [J]. China J Chin Mater Med, 2013, 38(5): 714-719.
- [15] 苗 鑫, 张 弘, 布 仁, 等. UPLC/Q Exactive MS 检测肉苁蓉多糖促PC12细胞释放神经递质的方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(9): 1667-1674.
- Miao X, Zhang H, Bu R, et al. UPLC/Q exactive MS method for detection of the contents of neurotransmitter released by PC12 cells from *Cistanche deserticola* polysaccharide [J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(9): 1667-1674.
- [16] 谢 博, 傅 红, 杨 方. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用鉴别掺假蜂蜜 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(2): 244-251.
- Xie B, Fu H, Yang F. Identification of adulterated honey by UPLC-Q-exactive quadrupole-electrostatic field track trap high resolution mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(2): 244-251.
- [17] 杨 帆, 冯文斌, 董 馨, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 代谢组学技术的蒙药塔布森-2 对去势大鼠代谢的调控作用研究 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5939-5947.
- Yang F, Feng W B, Dong X, et al. Effect of Tubson-2 on metabolism in ovariectomized rats based on UPLC-Q-Exactive-MS metabolomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(19): 5939-5947.
- [18] 程显隆. 胶类药材质量控制关键技术研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- Cheng X L. Study on key Technology of quality Control of Glues Medicine [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014.
- [19] Huang Q Y, Gao Q, Chai X X, et al. A novel thrombin inhibitory peptide discovered from leech using affinity chromatography combined with ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectroscopy [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020, 1151: 122153.
- [20] Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics [J]. Nat Protoc, 2016, 11(12): 2301-2319.
- [21] Laengsri V, Nantasenamat C, Schaduengrat N, et al. TargetAntiAngio: A sequence-based tool for the prediction and analysis of anti-angiogenic peptides [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12): E2950.
- [22] Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, et al. Peptide toxicity prediction [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1268: 143-157.
- [23] Win T S, Malik A A, Prachayasittikul V, et al. HemoPred: a web server for predicting the hemolytic activity of

- peptides [J]. Future Med Chem, 2017, 9(3): 275-291.
- [24] Saha S, Raghava G P. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Web Server issue): W202-W209.
- [25] 涂茂林. 牛乳酪蛋白抗血栓和降血压活性肽的筛选及结构表征 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019.
- Tu M L. Screening and characterization of bovine casein peptides with anticoagulant and antihypertensive activity [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2019.
- [26] Révész Á, Milley M G, Nagy K, et al. Tailoring to search engines: Bottom-up proteomics with collision energies optimized for identification confidence [J]. J Proteome Res, 2021, 20(1): 474-484.
- [27] 张月圆. 醋豆降压肽的制备及其降压活性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- Zhang Y Y. Preparation of antihypertensive peptide and study on antihypertensive activity from vinegar bean [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.
- [28] 步营, 何玮, 王飞, 等. 基于分子对接技术从虾夷扇贝中筛选抗 SARS-CoV-2 活性肽研究 [J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(4): 54-62.
- Bu Y, He W, Wang F, et al. Screening research of anti-SARS-CoV-2 peptides from *Mizuhopecten yessoensis* based on molecular docking [J]. J Food Sci Technol, 2020, 38(4): 54-62.
- [29] Pan Y B, Cheng K, Mao J W, et al. Quantitative proteomics reveals the kinetics of trypsin-catalyzed protein digestion [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(25): 6247-6256.
- [30] 林朝展, 李宝晶, 韩立炜. 从近5年国家自然科学基金资助项目浅谈中药质量评价研究现状 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 281-286.
- Lin C Z, Li B J, Han L W. Analysis of projects funded by NSFC in field of Chinese materia medica quality evaluation in recent five years [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(2): 281-286.
- [31] 靳艳, 刘晓艳, 邹汉法. 基于蛋白质组学、肽组学的中药动物药活性组分的研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(1): 162-166.
- Jin Y, Liu X Y, Zou H F. Screening bioactive protein and peptides in animal medicine of Chinese materia medica by proteomics and peptidomics [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med, 2011, 13(1): 162-166.
- [32] Chen F Y, Huang G R. Mechanism and inhibition kinetics of peptide P13 as thrombin inhibitor [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 150: 1046-1052.

[责任编辑 兰新新]