

• 专 论 •

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

杨 彬¹, 高文远², 张艳军^{1*}

1. 天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

摘 要: 动物药是传统中药的重要组成部分, 其特有功效在中药临床应用中具有不可替代性。鉴于目前动物药研究主要存在化学成分、药效物质基础、毒性物质基础不明确, 动物药质量控制体系不健全等关键问题, 通过构建基于转录组学-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, 主要包括基于转录组学的动物药蛋白数据库的构建、动物药蛋白多肽类成分的高分辨质谱分析、蛋白多肽类成分的匹配分析与鉴定以及关联功效的蛋白多肽类成分活性评价等研究内容, 试图为动物药蛋白多肽类成分的分析鉴定提供一种切实可行的研究思路及方法, 为进一步解决动物药研究存在的关键问题提供技术支持。

关键词: 动物药; 蛋白多肽类成分; 转录组学; 蛋白质组学; 多肽组学

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)05-1033-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.001

Research ideas and methods of protein and peptides in animal medicine based on transcriptomics-proteomics-peptidomics integrated association analysis strategy

YANG Bin¹, GAO Wen-yuan², ZHANG Yan-jun¹

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Animal medicine is an important part of traditional Chinese medicine, and its unique efficacy is irreplaceable in clinical application. In consideration of the main problems in the research of animal medicine, such as the uncertainty of chemical composition, pharmacodynamic components and toxic components, and the inadequacy of quality control system, this article established a research method of protein and peptides in animal medicine based on transcriptomics-proteomics-peptidomics integrated association analysis strategy, which mainly include the construction of protein database based on transcriptomics, high resolution mass spectrometry analysis, identification and activity evaluation of protein and peptide components. It attempts to provide a practical research method for the analysis and identification of protein and peptide components in animal medicine and technical support for further solving the key issues of animal medicine research.

Key words: animal medicine; protein and peptides; transcriptomics; proteomics; peptidomics

动物药是以动物整体、器官、生理或病理产物等供药用的中药材, 是传统中药的重要组成部分。动物药应用历史悠久, 我国现存最早的药学专著

《神农本草经》中已收录了包括麝香、阿胶等上品药在内的 67 种动物药。随着用药经验的不断积累, 《中国药用动物志》第 2 版已刊载 2 341 种药用动物^[1]。

收稿日期: 2019-02-01

作者简介: 杨 彬 (1987—), 男, 硕士, 实验师。E-mail: yang3023008@163.com

*通信作者 张艳军 (1967—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理及安全性评价研究。E-mail: zyjsunye@163.com

《中国药典》2015 年版收载动物药 50 种, 含动物药的成方制剂 461 种, 占成方制剂和单味制剂总量的 30.9%^[2]。中医基础理论认为, 动物药为“血肉有情之品”和“行走通窜之物”, 主要体现在滋补精血、滋阴壮阳、破血逐瘀、攻坚破积、消癥散结等功效远强于植物药及矿物药, 在中药防治疾病等临床应用中具有不可替代的重要作用^[3-4]。

近几年, 传统植物药的系统研究取得了长足发展。相比之下, 动物药的系统研究起步较晚, 进展缓慢。目前仍存在以下 4 方面主要问题: 一是动物药化学成分尚不明确。动物药主要含有蛋白质、多肽等大分子初生代谢产物, 这一特点与植物药富含次生代谢产物有着极大差异。与植物次生代谢产物相比, 动物药大分子初生代谢产物的分离、鉴定难度较大, 目前尚缺乏特色的系统研究策略与手段。二是动物药药效物质基础尚不明确。动物药一般具有多功效的特点, 如地龙兼有清热定惊、通络、平喘、利尿的功效。由于动物药化学成分不明确, 因此不同功效是否对应专属性成分, 不同成分是否配伍起效、协同增效尚缺乏系统研究。三是动物药毒性物质基础尚不明确。动物药大多有毒, 且主要含有蛋白质、多肽等异体蛋白类成分, 易引起人体过敏反应。目前, 动物药不良反应、毒性特征、毒性成分不完全清楚, 缺乏系统、有效的安全性评价研究策略与方法。四是现行动物药质量评价体系不健全^[5]。目前, 动物药质量评价方法主要依靠性状鉴定、显微鉴定以及与植物药材相似的理化鉴定方法。《中国药典》2015 年版收载的 50 种动物药中有 19 种动物药项下无任何鉴定方法, 这反映出上述方法专属性和特异性不强。虽然近几年 DNA 条形码^[6-8]、聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)^[9-11] 等技术在一定程度上解决了动物药伪品、混淆品难以鉴定的难题, 但由于动物药化学成分不明确, 化学成分与药效、毒性无法对应及关联, 导致动物药质量评价研究难以实现突破性进展。因此, 化学成分不明确已成为导致动物药上述 4 个主要问题的关键因素, 严重制约了动物药相关研究的深入开展。鉴于此, 建立动物药化学成分研究新策略、新方法, 是动物药相关研究亟待解决的首要问题。

1 动物药化学成分研究现状

动物药化学成分组成复杂, 除含有氨基酸、核苷类成分等小分子物质外, 主要含有蛋白质、多肽等大分子初级代谢产物。由于蛋白质、多肽等大分

子初级代谢产物分子结构复杂、提取分离困难, 动物药化学成分研究主要集中于部分小分子物质。目前, 仅有极少数动物药有专属性小分子成分的研究报道, 如蟾酥中华蟾酥毒基^[12-13]、脂蟾毒配基^[14-15]等强心甙体类化合物, 斑蝥中斑蝥素及其衍生物^[16-17], 麝香中麝香酮及雄烷衍生物^[18-19], 牛黄中胆酸、胆红素^[20-21]等。其余化学成分研究的文献报道多局限于不同动物药中游离氨基酸^[22-24]以及尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤等核苷类成分的定性、定量及指纹图谱研究^[25-28]。由此可见, 多数动物药缺少专属性小分子成分, 而氨基酸、核苷类成分在不同动物药中广泛存在, 很难与动物药不同功效相关联。例如, 《中国药典》2015 年版中, 龟甲胶、阿胶和鹿角胶均以 *L*-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、*L*-脯氨酸 4 种氨基酸作为质控成分。但龟甲胶偏于养阴清虚热, 阿胶偏于滋补阴血, 鹿角胶则偏于温阳补肾。4 种质控氨基酸成分专属性不强, 不能解释不同胶类动物药各自的特有功效^[29]。因此, 鉴于动物药化学成分研究现状, 针对动物药中含量较高、专属性强的蛋白质、多肽类成分开发创新研究方法, 阐明化学成分组成, 对进一步开展药效物质基础等动物药相关研究具有重要的推动作用。

目前, 现有动物药蛋白多肽类成分的研究报道主要集中于 2 方面: 一是总蛋白、相对分子质量水平的相关活性研究。如羚羊角水溶性蛋白^[30]、蜈蚣纤溶性蛋白^[31]、全蝎毒素^[32]、地龙蚓激酶^[33]等。二是基于传统分离纯化方法, 通过多维色谱纯化得到单一组分, 进行结构解析。如赤子爱胜蚓、粉正蚓中 F-III-1、F-III-2 等蛋白多肽成分的研究^[34]。然而, 这种分析手段工作量大、结构解析难度高、耗时耗力, 严重制约着动物药蛋白多肽类成分的研究。除此之外, Bai 等^[35]通过蛋白质组学方法筛选、分离出地龙中相对分子质量为 7×10^4 的蛋白质组分, 并通过制备有效抗体, 建立了基于蛋白质组学及酶免疫分析方法的地龙特定蛋白质组分含量测定方法, 为动物药质量评价提供了一种简单、高效的评价方法。

2 蛋白质组学及多肽组学在蛋白多肽类成分研究中的应用

近年来, 蛋白质组学、多肽组学以及高分辨质谱不断发展, 为建立蛋白多肽类成分高通量研究方法, 开展动物药蛋白多肽类成分的相关研究提供了新的思路与技术支持。蛋白质组学自 Wilkins 和

Williams 首次提出后^[36],已发展为表达蛋白质组学、结构蛋白质组学和差异蛋白质组学等研究方向。目前,蛋白多肽类成分研究中主要采用的是基于自下而上(Bottom-up)质谱鉴定方法的鸟枪法(Shotgun)蛋白质组学研究策略^[37],即将蛋白多肽分离纯化后进行高分辨质谱分析,得到蛋白多肽的二级质谱数据,用 Mascot、SEQUEST 等数据库检索软件进行数据库检索,完成蛋白多肽的鉴定。而多肽组学主要以相对分子质量在 2×10^4 以下的小分子肽段为研究对象,弥补了传统蛋白质组学研究策略不能覆盖小分子区域的缺陷。目前蛋白质组学及多肽组学已主要应用于动物毒液中蛋白多肽成分的研究,在蛇毒、蜂毒等研究中的应用已较为成熟。Tan 等^[38]通过 LC-MS/MS 检测,蛋白质组学分析发现马来西亚竹叶青蛇毒液的主要蛋白质成分为蛇毒金属蛋白酶、蛇毒丝氨酸蛋白酶等。Gonalves-Machado 等^[39]利用蛋白质组学方法发现了不同地域 *Bothrops jararaca* Wied 毒素的共有蛋白和差异蛋白。Durban 等^[40]通过蛋白质组学与转录组学整合分析发现,不同地域响尾蛇 miRNA 的改变,可调节毒性腺体毒素编码 mRNA 响应外部线索的翻译活性,可能有助于阐明毒液变异的机制。此外,研究者还对 *Micrurus altirostris* Cope、*Gloydus intermedius* Strauch、*Bothropoides pauloensis* 等不同种属蛇的蛇毒进行了相关研究^[41-43]。Liu 等^[44]通过蛋白质组学方法,在 *Terastichus brontispae* Ferriere 毒液中发现 2 种新型离子转运肽,并提出新型离子转运肽与寄生蜂的寄生功能有关。Yan 等^[45]通过蛋白质组学鉴定得到 70 种 *Pteromalus puparum* Linnaeus 蜂毒蛋白。Teng 等^[46]鉴定得到 37 种 *Cotesia chilonis* Munakata 毒素蛋白,并明确其大多为蛋白酶、肽酶和脂酶等水解酶。除蛇毒、蜂毒研究外,蛋白质组学及多肽组学还在蝎毒^[47]、蜘蛛毒液^[48]、蜈蚣毒液^[49]、芋螺毒素^[50]、水母毒素^[51]、蜗牛毒液^[52]、蚂蚁毒液^[53]等其他动物毒素研究中取得了一定成果。因此,可以借鉴动物毒素的研究方法,对动物药蛋白多肽类成分开展相关研究。

目前,刘睿等^[54-55]采用相似的研究策略开展了羚羊角及山羊角蛋白多肽类成分的研究。但通过文献分析发现,采用蛋白质组学及多肽组学研究策略进行蛋白多肽类成分研究的关键步骤是要通过数据库检索匹配,完成蛋白多肽的鉴定。而目前仅有个别动物药具有相关数据库,文献中羚羊角及山羊角

成分通过采用牛科数据库进行匹配,鉴定结果的准确性还有待进一步验证。动物本身种属差异较大,《中国药典》2015 年版也对动物药的基原做出了明确规定。因此,为提高动物药蛋白多肽类化学成分研究的专属性与准确度,则必须构建不同动物药专属蛋白数据库。

3 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

通过借鉴动物毒液蛋白多肽类成分研究方法,同时针对动物药缺少蛋白数据库的关键问题,本文提出通过转录组测序、组装、翻译建立动物药蛋白数据库,从而构建了一套基于“转录组学-蛋白质组学-多肽组学整合关联分析”的动物药蛋白多肽类成分的研究策略。主要包括 4 方面内容:(1)基于转录组学的动物药蛋白数据库的构建;(2)动物药蛋白多肽类成分的高分辨质谱分析;(3)蛋白多肽类成分的匹配分析与鉴定;(4)关联功效的蛋白多肽类成分活性评价。技术路线见图 1。该研究策略的应用,可对动物药中蛋白多肽类成分进行专属性鉴别,进而应用于动物药药效物质基础、毒性物质基础、质量控制等研究中,从而为解决动物药关键科学问题提供一条新的研究思路。

3.1 基于转录组学的动物药蛋白数据库的构建

转录组学分析目的是构建动物药转录组文库,并以该文库作为后续质谱二级碎片分析的搜索文库。动物活体或分泌物采用适当的方法提取 mRNA 后,以 mRNA 为模板通过逆转录合成 cDNA,将合成的 cDNA 双链进行末端修复、加碱基 A、加测序接头,然后 PCR 扩增制备得到 cDNA 文库并进行 RNA-seq 测序。采用 Trinity、Oases、Rnnotator、Soapdenovo-Tran 等从头组装软件将测序数据过滤后组装成转录本。转录本序列经过 6 种框架阅读和翻译,并通过开放阅读框(ORF)识别,得到动物药可表达的所有蛋白,并将这些蛋白建库,供后续质谱二级碎片搜索、匹配使用。

3.2 动物药蛋白多肽类成分的高分辨质谱分析

针对动物药中蛋白质及游离多肽成分,分别采用蛋白质组学及多肽组学研究策略进行高分辨质谱分析。将动物药饮片通过适当的提取方法提取总蛋白及游离多肽。采用超滤、双向凝胶电泳、多维液相色谱、固相萃取等技术,对总蛋白及总多肽进行分离纯化。针对蛋白成分,采用蛋白质组学研究策略,将纯化后的总蛋白与胰蛋白酶等蛋白水解酶反

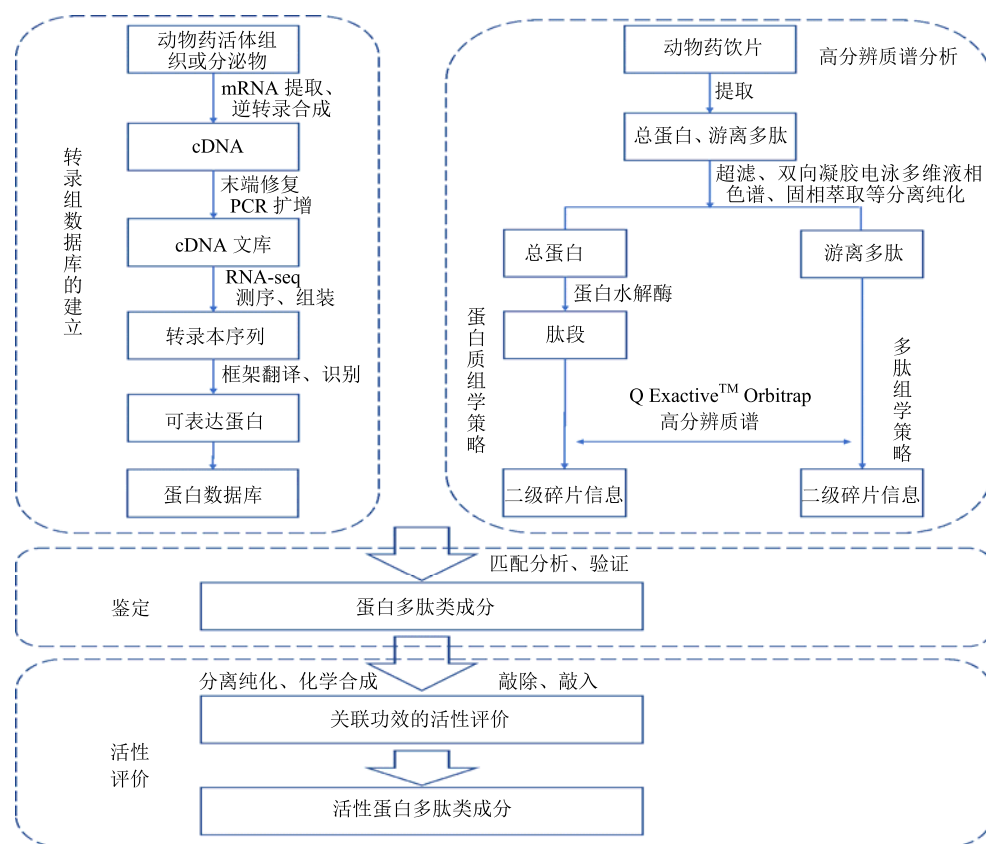


图 1 基于转录组学-蛋白质组学-多肽组学整合关联分析策略的动物药蛋白多肽类成分研究思路及方法

Fig. 1 Research ideas and methods of protein and peptides in animal medicine based on transcriptomics-proteomics-peptidomics integrated association analysis strategy

应、孵育之后，通过建立适宜的色谱、质谱条件，对水解产生的多肽进行高分辨质谱分析，采集质谱二级碎片信息。针对游离多肽成分，则采用多肽组学研究策略，将分离纯化后的多肽复溶后采用适当的色谱及质谱条件采集质谱二级碎片信息。

3.3 蛋白多肽类成分的匹配分析与鉴定

将获得的蛋白多肽类成分质谱二级碎片信息，通过 Mascot 等数据库检索软件与建立的转录组数据库进行匹配分析。匹配分析应设定相应参数，如固定修饰选择、限制性切割酶、允许最大露切位点、肽段的质量容差、二级离子的质量容差等，对肽段序列进行打分。肽段得分超过规定阈值的视为可信的鉴定肽段，获得相应肽段的氨基酸序列。对于得分超过但较为接近阈值的肽段，则应当参照鉴定出的氨基酸序列，对肽段进行人工合成，并采用相同的高分辨质谱分析方法，采集二级碎片信息进行比对，对鉴定结果进行验证。在肽段鉴定的基础上进一步获取来源蛋白、相对分子质量分布、片段重复情况等重要信息，进而

获得较为准确的蛋白多肽类成分信息。

3.4 关联功效的蛋白多肽类成分活性评价

关联功效的生物活性检测是药物生物评价的主要方法。该方法可以定量表征药物的功效、活性或生物学效应，尤其适用于组成复杂、理化方法难以测定，而且理化测定也不能反映其临床功效的动物药。目前，关联功效的生物活性评价方法已广泛应用于动物药整体活性评价中。鉴于本文构建的研究策略可以较为准确地对动物药中蛋白多肽类成分进行分析鉴定。因此，关联功效的生物活性评价方法可进一步用于动物药蛋白多肽类成分的活性评价。在分析鉴定蛋白多肽类成分的基础上，可通过人工合成、分离纯化等方法获得相应的蛋白多肽单体，通过建立相关功效的生物评价模型，采用敲除、敲入等研究手段，对蛋白多肽单体及单体配伍后的功效相关活性进行评价，进而明确动物药的药效物质基础。

4 展望

动物药是传统中药的重要组成部分，其特有功

效在中药临床应用中不可替代。但目前动物药研究存在化学成分不清、药效物质基础及毒性物质基础不明、质量控制体系不健全的关键问题,已严重制约了动物药的现代化进程。随着分子生物学及生物质谱技术的不断发展,应用蛋白质组学及多肽组学研究策略开展蛋白多肽类成分研究已成为可能。本文构建了“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,为动物药蛋白多肽类成分的分析鉴定提供了切实可行的研究方法。但需要注意的是,该策略的 3 个重点和难点问题还需要开展深入研究。一是构建转录组数据库是进行质谱碎片准确匹配的必要条件。因此,需进一步发展高通量、高准确度的全序列转录组测序技术,从而构建全面、准确的转录组数据库。二是对角类、甲壳类等较难提取 RNA 的动物药还需进一步开发有针对性的 RNA 提取技术。三是动物药蛋白多肽成分的提取、分离、纯化方法还需要进一步优化,从而减少在质谱分析中其他成分造成的信号干扰。随着该研究思路及方法在动物药研究中的不断应用与完善,可以在明确动物药化学成分,解决动物药现有关键问题,推动动物药现代化等方面发挥重要作用。

参考文献

- [1] 李德军,黄璐琦,曲晓波. 中国药用动物志 [M]. 第 2 版. 福州:福建科学技术出版社,2013.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 杨振刚. 动物药的鲜用 [J]. 首都医药,2013,20(19): 50.
- [4] 黄招明. 浅谈动物药的应用 [J]. 光明中医,2006,21(1): 27.
- [5] 王海璐,李庆杰,赵海平,等. 动物药材鉴别及质量评价方法研究进展与策略 [J]. 中草药,2018,49(16): 3942-3949.
- [6] 陈梦,方昀,程汝滨,等. 线粒体 DNA 标记在动物类药材分子鉴定中的应用进展 [J]. 中草药,2018,49(13): 3134-3142.
- [7] 荆礼,苏航,睢博文,等. DNA 条形码分子鉴定在动物药中的研究进展 [J]. 中国中药杂志,2018,43(23): 4587-4591.
- [8] 严华,陈俊,石林春,等. 基于 COI 序列的阿胶原材料及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药物分析杂志,2018,38(10): 1761-1766.
- [9] 黄璐琦,袁媛,蒋超,等. 动物药材分子鉴别现状与策略 [J]. 中国现代中药,2017,19(1): 1-10.
- [10] 程素倩,袁媛,刘富艳,等. 特异性 PCR 方法鉴别鳖甲药材和饮片 [J]. 中国中药杂志,2018,43(23): 4569-4574.
- [11] 程波,何江,郭文倩,等. 维药毛菊苣及其易混品菊苣的位点特异性 PCR 鉴别研究 [J]. 中草药,2018,49(18): 4393-4398.
- [12] 盛杰霞,邓旭,包军,等. 华蟾酥毒基通过 FAK/PI3K/Akt 通路抑制食管癌 Kyse-520 细胞迁移和侵袭 [J]. 中国药理学通报,2019,35(1): 139-145.
- [13] Xu L, Zhang X, Feng Q, et al. Alpha-7 nicotinic receptor-targeted cinobufagin induces antinociception and inhibits NF- κ B signaling pathway in DRG neurons [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(1): 497-506.
- [14] 李志东,朱士春,葛朝晖,等. HPLC 法测定不同批次麝香保心丸中华蟾酥毒基与脂蟾毒配基的含量 [J]. 海峡药学,2017,29(12): 72-74.
- [15] Liu L, Liu Y, Liu X, et al. Resibufogenin suppresses transforming growth factor- β -activated kinase 1-mediated nuclear factor- κ B activity through protein kinase C-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(11): 3611-3622.
- [16] Vakharia P P, Chopra R, Silverberg N B, et al. Efficacy and safety of topical cantharidin treatment for molluscum contagiosum and warts: A systematic review [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2018, 19(6): 791-803.
- [17] 颜道宇,郑典鹏,高维鸿,等. 去甲斑蝥素诱导肿瘤干细胞凋亡作用研究 [J]. 中草药,2017,48(11): 2237-2241.
- [18] 蒋且英,罗云,谭婷,等. 气质联用和化学计量学比较不同品种和产地麝香挥发性成分组成 [J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3): 49-55.
- [19] Du Y, Gu X, Meng H, et al. Muscone improves cardiac function in mice after myocardial infarction by alleviating cardiac macrophage-mediated chronic inflammation through inhibition of NF- κ B and NLRP3 inflammasome [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12): 4235-4246.
- [20] 雷凯,刘雅楠,张程亮,等. HPLC-MS/MS 法测定体外培育牛黄与天然牛黄中 26 种胆汁酸成分 [J]. 中草药,2018,49(10): 2447-2453.
- [21] 胡晓茹,孙磊,傅欣彤,等. 牛黄及代用品中胆汁酸类成分指纹图谱及含量测定研究 [J]. 药物分析杂志,2018,38(4): 648-656.
- [22] 黄文芳,石召华,陈立军,等. 指纹图谱技术评价不同干燥方式对地龙氨基酸组分提取物的影响 [J]. 药物评价研究,2015,38(3): 297-301.
- [23] 陈银芳,章常华,魏学鑫,等. 动物药中蛋白质、氨基酸检测分析研究进展 [J]. 时珍国医国药,2017,28(1): 186-189.
- [24] 王燕华,张秀莲,赵卉,等. 不同加工方式对鹿茸中粗蛋白与水解氨基酸量的影响研究 [J]. 中草药,2018,49(15): 3085-3091.
- [25] 刘雪莹,赵雨,何慧楠,等. 不同产地梅花鹿鹿茸药材中 5 种核苷类成分的含量测定及聚类分析 [J]. 中国药房,2018,29(14): 1945-1949.
- [26] 周恒,曹依敏,苗水,等. HPLC 法测定沪地龙中 7 个核苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志,2018,38(1): 97-103.

- [27] 孙印石, 王燕华, 王玉方, 等. UPLC 法测定不同加工方式梅花鹿鹿茸中的核苷类成分 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 840-846.
- [28] 赵恒强, 东莎莎, 崔清华, 等. HILIC-ESI-TOF/MS 测定海龙中的多种成分及其特征指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1836-1841.
- [29] 王 玄, 欧阳罗丹, 代春美, 等. 动物类中药质量控制的生物评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2228-2235.
- [30] 卢焯兴. 羚羊角的主要药效学评价及药效物质基础研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2007.
- [31] 廖 柳, 刘晓斌, 周 青, 等. 蜈蚣提取物对人肝癌 HepG2 细胞 STAT3 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 930-934.
- [32] 吴福林, 董庆海, 王 涵, 等. 中药全蝎研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(12): 108-111.
- [33] 刘 丹, 杨晓波, 王颖等. 蚓激酶对胃癌 SGC7901 细胞增殖抑制和凋亡诱导作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2019, 45(1): 7-11.
- [34] 刘 巧, 毕启动, 谭宁华. 地龙蛋白多肽类成分的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 252-261.
- [35] Bai G, Fujiwara K, Kaminishi Y, *et al.* Enzyme immunoassay for a characteristic protein in the animal crude drug lumbricus [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(3): 197-201.
- [36] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, *et al.* Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 1996, 13(1): 19-50.
- [37] 辛 萍, 匡海学, 李晓亮, 等. 蛋白质组学技术及其在中药作用机制研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 904-912.
- [38] Tan C H, Tan K Y, Ng T S, *et al.* Venomics of *Trimeresurus* (Popeia) *nebularis*, the Cameron Highlands Pit Viper from Malaysia: Insights into venom proteome, toxicity and neutralization of antivenom [J]. *Toxins*, 2019, 6(11): 95-113.
- [39] Gonalves-Machado L, Pla D, Sanz L, *et al.* Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest [J]. *J Proteomics*, 2016, 135: 73-89.
- [40] Durban J, Sanz L, Trevisan-Silva D, *et al.* Integrated venomomics and venom gland transcriptome analysis of juvenile and adult mexican rattlesnakes *crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* revealed miRNA-modulated ontogenetic shifts [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(9): 3370-3390.
- [41] Corrêa-Netto C, Silva D A, Ho P L, *et al.* Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus* [J]. *J Proteomics*, 2011, 74(9): 1795-1809.
- [42] Yang Z M, Yang Y E, Chen Y, *et al.* Transcriptome and proteome of the highly neurotoxic venom of *Gloydius intermedius* [J]. *Toxicon*, 2015, 107(Pt B): 175-186.
- [43] Rodrigues R S, Boldrinifra J, Fonseca F P, *et al.* Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis* [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(9): 2707-2720.
- [44] Liu N Y, Xu Z W, Yan W, *et al.* Venomics reveals novel ion transport peptide-likes (ITPLs) from the parasitoid wasp *Tetrastichus brontispae* [J]. *Toxicon*, 2018, 141: 88-93.
- [45] Yan Z, Fang Q, Wang L, *et al.* Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep19604.
- [46] Teng Z W, Xiong S J, Xu G, *et al.* Protein discovery: Combined transcriptomic and proteomic analyses of venom from the endoparasitoid cotesia chilonis (hymenoptera: braconidae) [J]. *Toxins*, 2017, 9(4): 135.
- [47] Luan N, Shen W, Liu J, *et al.* A combinational strategy upon RNA sequencing and peptidomics unravels a set of novel toxin peptides in scorpion mesobuthus martensii [J]. *Toxins*, 2016, 8(10): 286.
- [48] Abreu T F, Sumitomo B N, Nishiyama M Y J, *et al.* Peptidomics of *Acanthoscurria gomesiana* spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity [J]. *J Proteomics*, 2017, 151: 232-242.
- [49] Rong M, Yang S, Wen B, *et al.* Peptidomics combined with cDNA library unravel the diversity of centipede venom [J]. *J Proteomics*, 2015, 114: 28-37.
- [50] Robinson S D, Safavi-Hemami H, Raghuraman S, *et al.* Discovery by proteogenomics and characterization of an RF-amide neuropeptide from cone snail venom [J]. *J Proteomics*, 2015, 114: 38-47.
- [51] Li R, Yu H, Yue Y, *et al.* Combined proteomics and transcriptomics identifies sting-related toxins of jellyfish cyanea nozakii [J]. *J Proteomics*, 2016, 148: 57-64.
- [52] Himaya S W A, Lewis R J. Venomics-accelerated cone snail venom peptide discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 788.
- [53] Touchard A, Téné N, Song P C T, *et al.* Deciphering the molecular diversity of an ant venom peptidome through a venomomics approach [J]. *J Proteome Res*, 2018, 17(10): 3503-3516.
- [54] 刘 睿, 朱振华, 吴 佳, 等. 羚羊角与山羊角蛋白质类成分比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3329-3334.
- [55] 刘 睿, 朱振华, 钱大玮, 等. 基于 nano LC-LTQ/Q Orbitrap MS 分析山羊角中蛋白质多肽类物质 [J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 109-115.