

# 基于磁珠配体垂钓和液相色谱-质谱联用技术的威廉环毛蚓抗血栓大分子活性成分研究

吴娅丽<sup>1,2</sup>, 韩冰<sup>3</sup>, 李伟霞<sup>1,2,3</sup>, 王晓艳<sup>1,2,3</sup>, 张明亮<sup>1,2</sup>, 张辉<sup>1,2</sup>, 杨柳青<sup>1,2</sup>, 唐进法<sup>1,2,3\*</sup>

1. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450003

2. 河南省中药临床应用、评价与转化工程研究中心 河南省中药临床药学中医药重点实验室 河南省中药安全评价与风险防控工程研究中心, 河南 郑州 450003

3. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

**摘要:** **目的** 通过构建靶蛋白固定化磁珠, 从威廉环毛蚓 *Pheretima guillemi* 中垂钓出与靶蛋白(纤维蛋白原、纤溶酶原)直接作用的抗血栓活性大分子成分, 并经液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术鉴定。**方法** 优化并合成纤维蛋白原、纤溶酶原固定化羧基磁珠, 分别通过固定化量、透射电镜、傅里叶红外光谱仪、激光纳米粒度分析仪表征功能化磁珠的靶蛋白固定量、微观形态、官能团及表面带电性; 利用功能化磁珠从威廉环毛蚓抗血栓部位 DPf3 中垂钓与靶蛋白直接作用的抗血栓大分子活性成分, 洗脱后经 LC-MS/MS 技术分析, 并结合威廉环毛蚓物种蛋白质数据库比对鉴定。**结果** 靶蛋白固定化磁珠的最佳制备方案为将纤维蛋白原(0.4 mg/mL)或纤溶酶原(1 mg/mL)与磁珠于 4 °C 混旋孵育 8 h, 纤维蛋白原和纤溶酶原的最大偶联量分别为(9.84±2.17) μg/mg 和(7.24±0.91) μg/mg; 经表征, 靶蛋白均已成功固定于磁珠表面。DPf3 经纤维蛋白原、纤溶酶原固定化磁珠垂钓所得洗脱液经扫描比对, 分别鉴定到 20 种和 27 种蛋白质, 多属于丝氨酸蛋白酶类成分。**结论** 通过磁珠配体垂钓策略和 LC-MS/MS 技术可从威廉环毛蚓中快速筛选和鉴定目标生物活性大分子, 可为动物类中药大分子的分离鉴定提供参考。

**关键词:** 威廉环毛蚓; 抗血栓大分子成分; 磁珠配体垂钓; 纤维蛋白原固定化磁珠; 纤溶酶原固定化磁珠

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4318-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.005

## Magnetic ligand fishing and liquid chromatography-mass spectrometry for identification of antithrombotic macromolecular active components in *Pheretima guillemi*

WU Yali<sup>1,2</sup>, HAN Bing<sup>3</sup>, LI Weixia<sup>1,2,3</sup>, WANG Xiaoyan<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Mingliang<sup>1,2</sup>, ZHANG Hui<sup>1,2</sup>, YANG Liuqing<sup>1,2</sup>, TANG Jinfa<sup>1,2,3</sup>

1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

2. Henan Engineering Research Center of Clinical Application, Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine, Henan Key Laboratory for Clinical Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Henan Engineering Research Center of Safety Evaluation and Risk Management of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

3. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

**Abstract: Objective** By constructing the immobilized magnetic beads of target proteins, the antithrombotic macromolecular components directly acting with the target proteins (fibrinogen and plasminogen) were fished from *Pheretima guillemi*, and identified by liquid chromatogram-mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Fibrinogen and plasminogen-immobilized carboxyl magnetic beads were optimized and synthesized. The immobilized amount of target protein, microscopic morphology, functional groups and

收稿日期: 2023-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82104352); 河南省高校科技创新团队(23IRTSTHN026); 河南省中医药科学研究专项课题(重点课题)(2023ZY1003); 中医药高质量发展协同创新转化工程自主立项项目(CXZH03)

作者简介: 吴娅丽, 女, 博士, 主管药师, 研究方向为中药新剂型与新技术及中药合理用药。Tel: (0371)66233612 E-mail: wuyali1993@163.com

\*通信作者: 唐进法, 男, 博士, 主任药师, 研究方向为中药合理用药。Tel: (0371)66233612 E-mail: a0519@163.com

surface electrification of functional magnetic beads were characterized by immobilization amount, transmission electron microscope, Fourier infrared spectrometer and laser nanoparticle particle size analyzer, respectively. Functional magnetic beads were used to fish for antithrombotic macromolecular ingredients that directly interact with target proteins in DPf3, which were prepared from *P. guillemi*, and the elution was analyzed by LC-MS/MS technique and compared and identified via specific species protein database.

**Results** The optimal preparation scheme of immobilized magnetic beads for the target protein was as follows: fibrinogen (0.4 mg/mL) or plasminogen (1 mg/mL) was mixed and incubated with magnetic beads at 4 °C for 8 h, and the maximum coupling amounts of fibrinogen and plasminogen were  $(9.84 \pm 2.17) \mu\text{g}/\text{mg}$  and  $(7.24 \pm 0.91) \mu\text{g}/\text{mg}$ , respectively. The target proteins were successfully fixed on the surface of magnetic beads. By scanning and comparison, 20 and 27 kinds of proteins in DPf3 were identified in the elution obtained from the fibrinogen and plasminogen immobilized magnetic beads, and most of them belonged to serine proteases. **Conclusion** The target bioactive macromolecules can be rapidly screened and identified from *P. guillemi* by using the magnetic beads fishing strategy and LC-MS/MS technique, which can provide a reference for the isolation and identification of macromolecules in the medicinal animal.

**Key words:** *Pheretima guillemi* (Michaelsen); antithrombotic macromolecular components; magnetic ligand fishing; fibrinogen immobilized magnetic beads; plasminogen immobilized magnetic beads

威廉环毛蚓 *Pheretima guillemi* (Michaelsen) 为钜蚓科 (Megasclecolecidae) 环毛蚓属 *Pheretima* 的中医临床常用动物类中药, 最早以“白颈蚯蚓”之名收载于《神农本草经》, 以“地龙”之名首次出现于宋朝《太平圣惠方》中, 亦是《中国药典》2020年版一部 (以下简称《中国药典》) 收录的四大药用地龙品种之一, 为“沪地龙”的一种<sup>[1]</sup>。近现代研究表明地龙抗凝血、溶栓疗效显著, 有众多学者从蚯蚓提取物中发现抗血栓相关活性物质<sup>[2]</sup>; 在《中国药典》<sup>[1]</sup>所收录的含地龙的成方制剂中, 约 90.1%的成方制剂的功效都与活血通络有关。通过查阅国内外文献可知, 绝大多数学者认为地龙的抗血栓活性成分主要为蛋白质类<sup>[2-3]</sup>, 但基于现有的蛋白质数据库很难对威廉环毛蚓中的蛋白质成分进行鉴定, 且药效物质基础研究一直是动物类中药的研究难点。课题组前期构建了威廉环毛蚓的无参考基因转录组数据库<sup>[4]</sup>, 并采用传统研究方法——离子交换法从威廉环毛蚓提取物中分离纯化出其抗血栓部位 DPf3<sup>[5]</sup>, 但传统的化学分离纯化方法研究动物类中药耗时费力、效率较低<sup>[6]</sup>, 故亟需新型技术和方法分离、分析威廉环毛蚓的抗血栓物质基础, 以便对其进一步研究。

随着分离、检测技术的发展, 亲和筛选 (亦为“配体垂钓”) 成为从混合物中识别活性成分的有效技术之一<sup>[6]</sup>, 其基于大分子靶点-配体结合原理, 包括抗原-抗体、受体-配体、酶-抑制剂/激活剂的相互作用, 通过固定于固定相上的靶点分子, 将活性成分捕获, 经洗脱后进一步采用液-质联用等技术进行

分析<sup>[7-8]</sup>, 作为一种从混合物中便捷、有效筛选配体的技术, 配体垂钓成为从中药中发现活性物质的强有力的技术<sup>[7]</sup>。但该技术多用于识别小分子成分, 故运用靶点垂钓技术识别蛋白及多肽类大分子成分仍有待进一步探索<sup>[9]</sup>。

课题组前期研究<sup>[5]</sup>发现纤维蛋白原 (fibrinogen, Fbg) 和纤溶酶原 (plasminogen, Plg) 均为 DPf3 的直接作用靶点, 基于此, 本研究以威廉环毛蚓抗血栓活性部位 DPf3 为研究对象, 合成纤维蛋白原固定化磁珠及纤溶酶原固定化磁珠, 并用于 DPf3 中与靶蛋白直接作用的活性大分子的筛选, 基于前期研究构建的转录组数据库, 采用液相色谱-质谱联用技术鉴定 (图 1), 以期在动物类中药中大分子活性成分的分离鉴定建立一种新方法。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药物与试剂

威廉环毛蚓提取物为云南永安制药有限公司提供, 威廉环毛蚓抗血栓活性部位 DPf3 为实验室自制成分<sup>[5]</sup>, 淡黄色絮状粉末, -20 °C 冰箱保存; PuriMag™ G-COOH 羧基磁珠 (货号 PMG007) 及羧基氨基偶联缓冲液套装 (货号 PB0001) (普睿迈格生物科技有限公司), 纤维蛋白原 (140626-202213) 及纤溶酶原 (140606-202127, 中国食品药品检定研究院), 纤溶酶/纤溶酶原-SK 发色底物 S-2403 (上海船夫生物技术有限公司), 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS, 0.1 mmol/L, pH 7.2~7.4) 及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (PC0020, 北京索莱宝科技有限公司), 其他试剂均为分析纯。

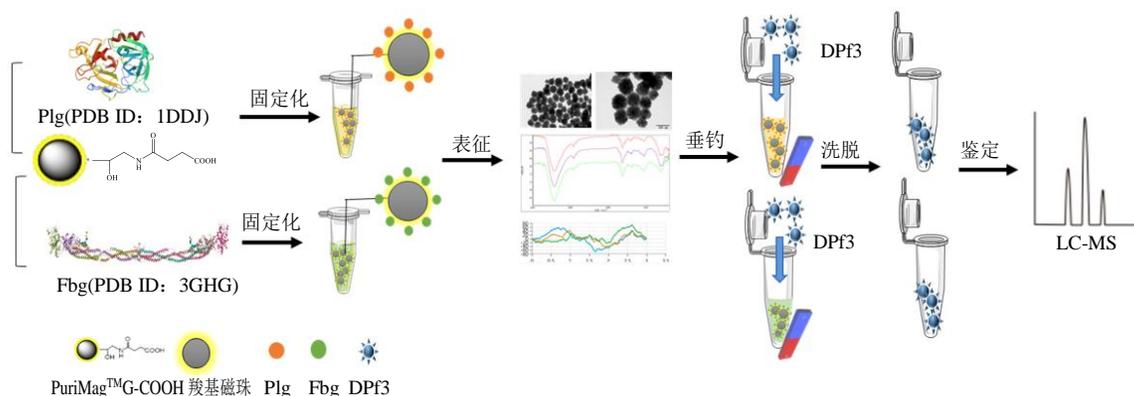


图1 基于磁珠配体垂钓和液-质联用技术的威廉环毛蚓抗血栓活性大分子成分的研究

Fig. 1 Study on antithrombotic macromolecular active components of *P. guillemi* based on magnetic bead ligand fishing and liquid chromatography-mass spectrometry

## 1.2 仪器与设备

Magic Mixer 魔方程式混匀器(宁波拓普森科学仪器有限公司), 多功能酶标仪 (SpectraMax i3x, Molecular Devices), Pall 超滤浓缩离心管 (截留相对分子质量 1 000, 美国颇尔公司), Nicolet IS10 傅里叶变换红外光谱仪 (Thermo 公司), JEM-1200 EX 透射电子显微镜 (日本电子株式会社), D8 ADVANCE X 射线衍射仪 (德国布鲁克公司), Nano-ZS90 激光纳米粒度分析仪 (Malvern 公司), 串联 EASY-nanoLC 1200 的 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, MA, 美国)。

## 2 方法

### 2.1 靶蛋白固定化磁珠的制备及条件优化

取 PuriMag™ G-COOH 羧基磁珠 (10 mg/mL), 分为空白对照组、纤溶酶原固定化磁珠组、纤维蛋白原固定化磁珠组 ( $n=3$ ), 用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC] 50 mg/mL 活化磁珠表面上的羧基, 加入稳定胺反应中间体的 *N*-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐 (50 mg/mL) 以增加 EDC 介导的反应的效率, 使配体通过伯胺基与磁珠偶联, 形成稳定的酰胺键, 进而固定于羧基磁珠表面<sup>[10]</sup>。

**2.1.1 靶蛋白浓度考察** 取羧基磁珠 (1 mg), 经 EDC 活化后分别分散在含纤溶酶原 (0~2 mg/mL) 或纤维蛋白原 (0~0.8 mg/mL) 的 PBS 缓冲液 (100  $\mu$ L) 中, 4  $^{\circ}$ C 孵育 6 h 后磁分离取上清液, 测定固定化量, 磁珠加入淬灭缓冲液孵育 30 min, 磁分离吸弃上清, 加入储存缓冲液 (100  $\mu$ L) 涡旋混匀, 即为靶蛋白固定化磁珠, 放置于 4  $^{\circ}$ C 备用。同时, 以不含靶蛋白的 PBS 缓冲液固定化的磁珠作为阴

性对照磁珠。

**2.1.2 偶联时间考察** 确定靶蛋白偶联浓度后, 考察反应时间对固定化过程的影响, 即分别于 4  $^{\circ}$ C 孵育 4~10 h, 磁分离取上清液, 测定固定化量。

### 2.2 靶蛋白固定化量的测定及活性检测

**2.2.1 靶蛋白固定化量的测定** 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测靶蛋白固定前及经“2.1”项下磁分离所得固定后上清液的蛋白质浓度, 以固定前、后的阴性对照为各自的空白对照, 计算靶蛋白的固定化量。

**2.2.2 纤溶酶原固定化磁珠活性检测** 纤溶酶原能够水解发色底物 S-2403 (pyroGlu-Phe-Lys-pNA·HCl) 产生对硝基苯胺 (pNA), 405 nm 处检测<sup>[11]</sup>, 故以发色底物法, 以 S-2403 为底物评价固定化纤溶酶原的活性, 以阴性对照磁珠为阴性对照。按照公式计算活性值<sup>[12]</sup>。其中,  $A_{405}$  和  $A'_{405}$  分别为纤溶酶原固定化磁珠组和阴性对照磁珠组的反应产物在 405 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值,  $A'_{317}$  为阴性对照组的反应底物 S2403 在 317 nm 处的  $A$  值。

$$\text{纤溶酶原活性} = (A_{405} - A'_{405}) / A'_{317}$$

### 2.3 靶蛋白固定化磁珠的表征

**2.3.1 形貌表征** 用透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 对空白磁珠和纤维蛋白原/纤溶酶原修饰的磁性纳米粒子进行微观形态表征。取少量待测样品, 稀释 5 倍后超声分散 5 min, 取 10  $\mu$ L 样品滴在铜网上, 10 min 后吸去铜网上的多余液体, 静置 1 h 自然晾干; 取制备好的样品进行观察, 设置电压为 100 kV。

**2.3.2 官能团表征** 用傅里叶红外光谱仪 (Fourier infrared spectrometer, FT-IR) 进行官能团表征。样

品经溴化钾压片后进行测定, 参数设置为: 背景扫描次数 16, 样品扫描次数 16, 分辨率 4.000, 采样增益 1.0, 动镜速度 0.474 7, 光阑 80.00。

**2.3.3 表面带电性表征** 用激光纳米粒度分析仪测定样品的 Zeta 电位。以水为分散剂 (pH 值 7.2, 介电常数 78.6 F/m, 折射率 1.33, 黏度 0.887); 测定条件: 温度 25.0 °C, 热平衡时间 6 s; 分别取样品适量, 置于 U 形电位杯中使用激光纳米粒度仪进行电位测定, 每个样品重复测定 3 次。

## 2.4 威廉环毛蚓抗血栓大分子成分的筛选

采用靶蛋白固定化磁珠垂钓的方法筛选威廉环毛蚓的抗血栓大分子成分。取纤维蛋白原固定化磁珠、纤溶酶原固定化磁珠各 4 mg ( $n=3$ ), 重悬于 DPf3 (1 mg/mL, 400  $\mu$ L) 中, 4 °C 混旋孵育 30 min, PBS 缓冲液淋洗 3 次, 磁分离吸弃上清后加入 30% 乙腈-水 (200  $\mu$ L) 涡旋 15 min 洗脱<sup>[12]</sup>, 磁分离收集上清, 即为垂钓所得成分; 以阴性对照磁珠垂钓所得上清液为阴性对照溶液, 超滤浓缩后放置于 4 °C 备用。

## 2.5 SDS-PAGE 及 LC-MS/MS 分析

**2.5.1 SDS-PAGE 分析** 取“2.4”项下经阴性对照磁珠、纤维蛋白原固定化磁珠、纤溶酶原固定化磁珠垂钓所得成分的浓缩液, 经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 考马斯亮蓝染色后观察。

**2.5.2 LC-MS/MS 分析及参数设置** 取经纤维蛋白原固定化磁珠、纤溶酶原固定化磁珠垂钓所得成分的浓缩液适量, 用 8 mol/L 尿素调至 100  $\mu$ L 定容 (pH=8)。加入 2  $\mu$ L 0.5 mol/L 磷酸三氯乙酯, 于 37 °C 下反应 1 h, 随后加入 4  $\mu$ L 1 mol/L 碘乙酰胺, 避光反应 40 min。然后, 按样品-丙酮 1:5 (V:V) 加入预冷丙酮, -20 °C 下过夜沉淀蛋白, 离心 (12 000 r/min, 20 min, 4 °C) 后弃去上清, 加入 1 mL 预冷的 90% 丙酮溶液清洗样品 2 次后, 室温干燥至沉淀表面的丙酮完全挥干, 将其重溶于 100  $\mu$ L 100 mmol/L 三乙基碳酸氢铵缓冲液, 按酶-蛋白 1:50 ( $m:m$ ) 加入胰蛋白酶, 37 °C 过夜酶切, 采用 C<sub>18</sub> 除盐柱除盐后冻干, 即为质谱分析样品。

取 3  $\mu$ L 样品上样 (分析柱: Acclaim PepMap C<sub>18</sub>, 75  $\mu$ m $\times$ 25 cm), 流动相 A: 0.1% 甲酸-水, 流动相 B: 80% 乙腈-0.1% 甲酸-水, 梯度洗脱 60 min 分离样品, 体积流量为 300 nL/min, 柱温为 40 °C,

电喷雾电压为 2 kV。质谱仪在数据依赖采集模式下运行, 自动在 MS 和 MS/MS 采集间切换。质谱参数设置如下: (1) MS: 扫描范围  $m/z$  350~1 500, 分辨率 120 000; AGC target=8 $\times$ 10<sup>5</sup>; 最大注入时间 100 ms; (2) HCD-MS/MS: 分辨率: 50 000 Hz; AGC target=1 $\times$ 10<sup>5</sup>; 最大注入时间: 86 ms; 归一化碰撞能量: 25%、30%、35%; 动态排除时间: 30 s。

**2.5.3 数据库检索鉴定** 串联质谱图经过 PEAKS Studio version 10.6 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, 加拿大) 分析。数据库为 target 序列, 设置 trypsin 酶解以及半酶切。以所构建的威廉环毛蚓蛋白数据库<sup>[4]</sup>为目标库, 搜库参数碎片离子质量容许误差: 0.02, 母离子质量容许误差: 1 $\times$ 10<sup>-5</sup>, 最大漏切数: 2, 固定修饰: Carbamidomethylation 57.02, 可变修饰: Oxidation (M) 15.99, Deamidation (NQ) 0.98, Acetylation (Protein N-term) 42.01。蛋白卡值为 1% FDR, 至少含 1 unique peptide; 肽段卡值为 1% FDR。

## 3 结果

### 3.1 靶蛋白固定化磁珠的条件优化

如图 2 所示, 纤溶酶原的最佳固定化条件为: Plg (1 mg/mL), 与磁珠反应时间为 8 h, 此时纤溶酶原的最大偶联量为 (7.24 $\pm$ 0.91)  $\mu$ g/mg, 最大单位纤溶酶原活力为 (0.37 $\pm$ 0.04) (图 2-Aa~d); 纤维蛋白原的最佳固定条件为: Fbg (0.4 mg/mL), 与磁珠反应时间为 8 h, 此时纤维蛋白原的最大偶联量为 (9.84 $\pm$ 2.17)  $\mu$ g/mg (图 2-Be~f)。

### 3.2 靶蛋白固定化磁珠的表征

运用 TEM 评估阴性对照磁珠、纤维蛋白原固定化磁珠、纤溶酶原固定化磁珠的尺寸和表面形态。可见 3 种磁珠均呈球形, 粒径均一, 磁性纳米粒子分散度较好, 纤维蛋白原和纤溶酶原固定化磁珠边界变得模糊、略显粗糙 (图 3-A)。阴性对照磁珠的直径在 110 nm 左右 (图 3-Aa), 纤维蛋白原固定化磁珠的直径在 130 nm 左右 (图 3-Ab), 纤溶酶原固定化磁珠的直径在 120 nm 左右 (图 3-Ac)。文献记载磁性纳米粒经修饰后直径增大<sup>[13]</sup>, 且靶蛋白固定化磁珠形态变化结果与文献报道<sup>[14]</sup>相符。

运用 FT-IR 表征合成磁性纳米颗粒的官能团。FT-IR 光谱可见 3 种磁性纳米复合物在约 580 cm<sup>-1</sup> 处均具有 Fe-O 键的伸缩振动红外吸收峰; 在约 1 600 cm<sup>-1</sup> 处均具有 C=O 键的伸缩振动吸收峰; 在约 3 400 cm<sup>-1</sup> 处均具有强而宽的红外吸收峰, 归属于 -COOH

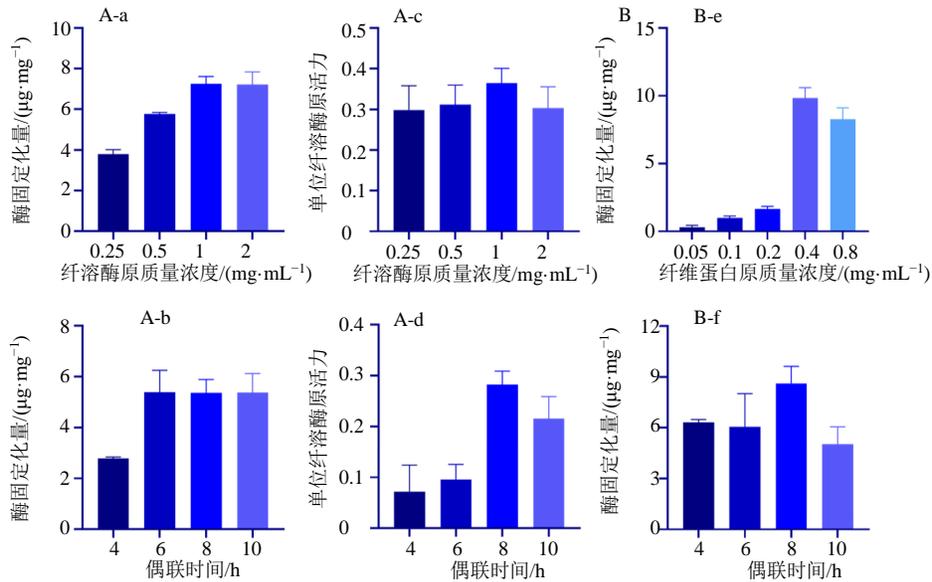


图 2 磁珠固定化纤溶酶原 (A) 及纤维蛋白原 (B) 的条件优化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Conditions optimization of plasminogen (A) and fibrinogen (B)-immobilized magnetic beads ( $\bar{x} \pm s$ )

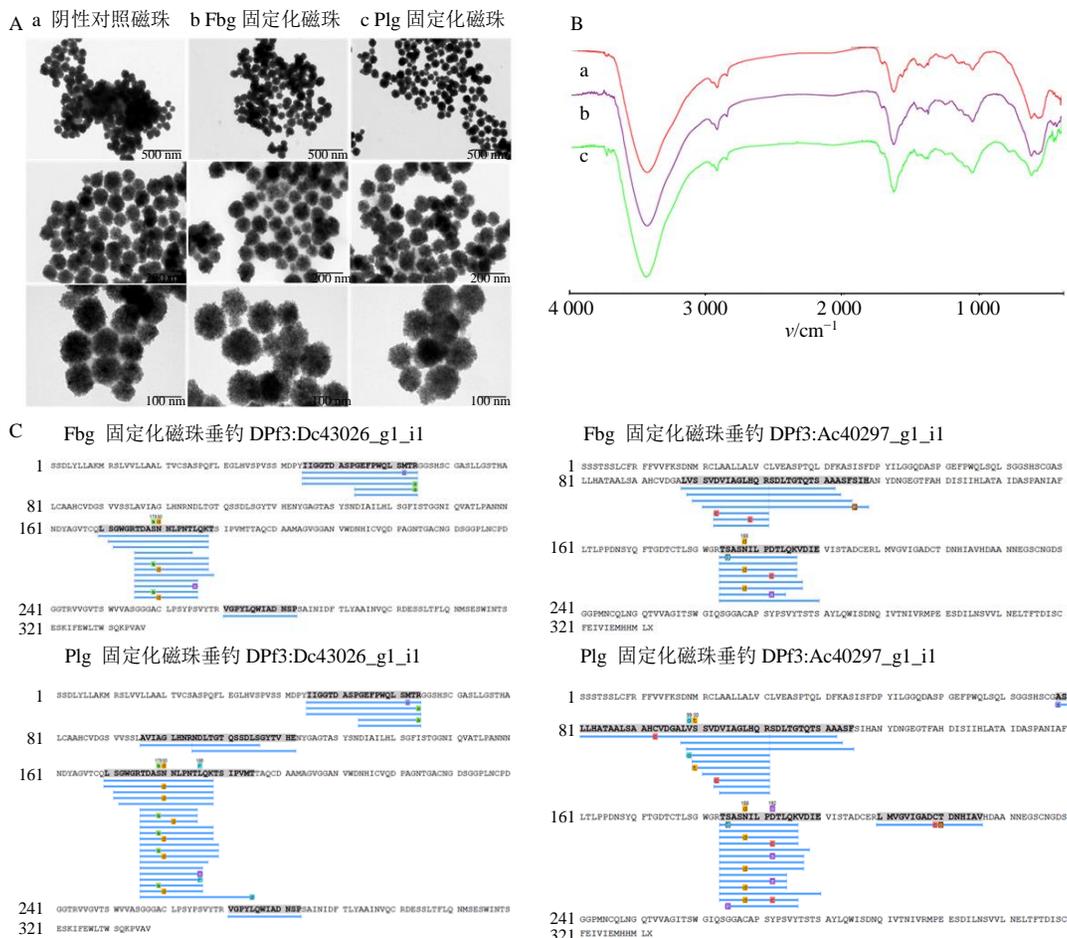


图 3 磁珠在不同放大倍数下的透射电镜表征图 (A) 及红外光谱图 (B) 和 Fbg 及 Plg 固定化磁珠垂钓 DPf3 所得的蛋白质质谱检测比对所得部分谱图 (C)

Fig. 3 Transmission electron microscopy (A) and infrared spectroscopy (B) of magnetic beads; (C) fishing proteins in DPf3 obtained from Fbg and Plg-immobilized magnetic beads detected and compared by mass spectrometry (partially)

的伸缩振动,但纤维蛋白原固定化磁珠、纤溶酶原固定化磁珠该峰的强度与阴性对照磁珠略有不同;固定化磁珠在约 3 700 cm<sup>-1</sup> 处及约 1 400 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰与阴性对照磁珠相比具有较大差异,该吸收峰为酰胺键的特征吸收(图 3-B),证明纤维蛋白原与纤溶酶原已有部分固定于磁珠上。

测定空白磁珠及靶点固定化磁珠的 Zeta 电位以观察各样本的表面带电情况。可以看出纤维蛋白原及纤溶酶原固定后,磁珠的 Zeta 电位发生明显的变化(表 1),证明磁珠表面电荷发生明显变化,纤维蛋白原及纤溶酶原已固定于磁珠表面。

### 3.3 威廉环毛蚓抗血栓大分子成分的筛选及鉴定

BCA 法测得 Fbg 和 Plg 固定化磁珠垂钓所得上清浓缩液的蛋白质量浓度分别为 0.070、0.069 mg/mL,由 SDS-PAGE 分析结果可知,阴性对照磁珠垂钓所得上清浓缩液无条带,Fbg 及 Plg 固定化

磁珠垂钓所得上清浓缩液有极浅的条带。

DPF3 经 Fbg 和 Plg 固定化磁珠垂钓所得样品经质谱检测后,采用 UniProt 蛋白质数据库比对,分别以钜蚓科(Megascolecidae)及环毛蚓属 *Pheretima* 为关键词,仅鉴定到极少数蛋白质;进而采用课题组前期所构建的威廉环毛蚓蛋白质数据库进行比对,分别鉴定到 20 种和 27 种蛋白质(表 2)。

表 1 阴性对照磁珠、纤维蛋白原及纤溶酶原固定化磁珠的 Zeta 电位

样本	Zeta 电位 (ζ/mV)
阴性对照磁珠	-0.13
纤维蛋白原固定化磁珠	-27.91
纤溶酶原固定化磁珠	-27.91

表 2 垂钓所得样本经不同数据库比对的蛋白质鉴定结果

Table 2 Protein identification results of fishing samples compared with different databases

样本	数据库-关键词	总谱图数	有效谱图数	肽段数	蛋白数
Fbg 固定化磁珠垂钓上清	UniProt- <i>Pheretima</i>	26 455	226	0	0
	UniProt-Megascolecida	26 455	165	10	2
	Constructed- <i>P. guillemi</i>	26 455	286	125	20
Plg 固定化磁珠垂钓上清	UniProt- <i>Pheretima</i>	25 940	175	0	0
	UniProt-Megascolecida	25 940	126	13	3
	Constructed- <i>P. guillemi</i>	25 940	388	226	27

总谱图数: 质谱检测产生的二级谱图数; 有效谱图数: 与理论二级谱图匹配的谱图数; 肽段数: 鉴定到的肽段总数; 蛋白数: 定性到的蛋白质总数。  
Total spectrums: The number of MS/MS spectra produced by mass spectrometry; Matched spectrums: The number of spectra that match the theoretical MS/MS spectra; Peptides: The total number of identified peptides; Protein groups: The total number of identified proteins.

DPF3 经 Fbg 和 Plg 固定化磁珠垂钓所得样品经威廉环毛蚓蛋白质数据库比对后,覆盖度及鉴定可信度(-10lgP)水平均为前 10 的蛋白质如表 3、4 所示,匹配谱图数排名前 3 的蛋白质均含有 Dc43026\_g1\_i1 和 Ac40297\_g1\_i1,二者的匹配图谱如图 3-C 所示。

将各蛋白质序列经 NCBI blast,选取序列一致性及置信度较高的蛋白,预测所鉴定到的蛋白质的功能,由结果可知,威廉环毛蚓的抗血栓大分子成分序列比对所得蛋白质多为纤溶酶、蚓激酶类,预测功能多与丝氨酸型内肽酶活性、凝血、纤溶、蛋白水解等相关。

## 4 讨论

从生物提取物中寻找药物先导物一直是国内外研究的热点,故发展快速、可靠的多组分筛选和分

离方法极为重要。配体垂钓是基于药物靶点与活性配体之间的相互作用,将活性配体从复杂的样品体系中“垂钓”出来的亲和-选择筛选策略<sup>[15]</sup>。但该方法用于识别多肽及蛋白质配体较为少见<sup>[9]</sup>。磁性纳米粒子垂钓法操作稳定、易于修饰、选择性高、悬浮稳定性良好,常作为固定化酶的多功能载体,可提高酶的稳定性、有助于酶的分离和再利用,目前主要用于蛋白质的纯化<sup>[16-18]</sup>。在本研究中,以靶蛋白浓度、反应时间为考察因素,发现纤维蛋白原和纤溶酶原在 4 °C 下反应 8 h 可成功固定于羧基磁珠,二者的最大偶联量分别为 (9.84±2.17)、(7.24±0.91) μg/mg,该方法操作简便、重复性良好,适用于蛋白质类靶点的固定化。研究发现,靶点固定化磁珠制备过程中,靶蛋白浓度并非越大越好,可能由于

表3 DPf3经Fbg固定化磁珠垂钓所得样本经威廉环毛蚓蛋白数据库比对的蛋白质鉴定结果

Table 3 Protein identification results of fishing samples in DPf3 via Fbg-immobilized magnetic bead compared with protein database of *P. guillemi*

编号	-10lgP	覆盖度/ %	特异性 肽段	匹配谱 图数	平均相对 分子质量	比对蛋白	UniProt ID	种属	一致性/ %	功能
Ec29745_g1_i1	120.95	26	6	6	25 916	Fibrinolytic enzyme, isozyme C	P83298	<i>Lumbricus rubellus</i>	54.2	丝氨酸型内肽酶活性、 凝血、纤溶、蛋白水解
Cc39199_g1_i1	104.58	19	2	5	17 732	Lumbrokinase	A8ILP4	<i>Eisenia fetida</i>	54.2	激酶活性、丝氨酸型 内肽酶活性、磷酸 化、蛋白水解
Cc38915_g1_i1	165.27	16	12	16	42 802	Fibrinolytic protease P-III-1	Q308Q8	<i>Eisenia fetida</i>	73.9	丝氨酸型内肽酶活 性、蛋白水解
Dc43026_g1_i1	159.84	16	9	18	35 047	Lumbrokinase-Da2	B8ZZ03	<i>Lumbricus rubellus</i>	71.8	水解酶、激酶、蛋白 酶、丝氨酸蛋白酶、 转移酶
Ac40297_g1_i1	164.42	14	10	21	34 943	ARSP1	Q8I6N3	<i>Eisenia fetida</i>	59.8	水解酶、蛋白酶、丝 氨酸蛋白酶
Ec51359_g3_i1	136.44	13	3	10	66 337	Alpha-amylase	A0A173N065	<i>Eisenia fetida</i>	78.6	糖苷酶、水解酶
Fc34611_g1_i1	104.11	13	5	5	18 634	DgyrCDS7171	A0A718VQ77	<i>Dimorphilus gyrociliatus</i>	40.1	脂肪酶活性、脂质代 谢过程
Dc34611_g2_i1	104.11	13	5	5	19 430	DgyrCDS3907	A0A718VGT2	<i>Dimorphilus gyrociliatus</i>	43.4	脂肪酶活性、脂质代 谢过程
Fc37764_g1_i1	104.31	12	3	5	34 912	Lumbrokinase-7T2	B8ZZ02	<i>Lumbricus rubellus</i>	75.1	激酶活性、丝氨酸型 内肽酶活性、磷酸 化、蛋白水解
Fc37764_g1_i2	104.31	12	3	5	37 198	Fibrinolytic protease 1	Q1ZZB7	<i>Eisenia fetida</i>	80.6	丝氨酸型内肽酶活 性、蛋白水解

靶蛋白浓度过大致使磁珠的聚集现象显著，减少磁珠表面活化羧基的暴露位置，从而减少靶点的固定量及固定化靶点的活性。

在磁固相萃取过程中，温度、时间和试剂具较大影响，有机溶剂浓度过高会导致蛋白质或多肽样本的沉淀或变性，降低孵育温度可减少酶活性，但会影响结合程度<sup>[9]</sup>。课题组前期研究发现威廉环毛蚓抗血栓部位 DPf3 对纤维蛋白原和纤溶酶原均为水解作用，鉴于此，故通过较短的孵育时间和较低浓度以降低水解作用，参考文献报道<sup>[9,12]</sup>选择 4 °C 垂钓 30 min，30% 乙腈-水洗脱样本用于后续测定，但由于靶蛋白偶联量有限，垂钓出的活性成分量较少，可通过大量制备靶点固定化磁珠从而起到富集作用。

由于威廉环毛蚓缺乏参考基因组信息，采用现有数据库进行质谱数据的比对鉴定无法得到较好的

效果，但课题组前期构建的威廉环毛蚓物种蛋白质数据库可有效用于本研究的质谱鉴定，专属性强，垂钓所得活性成分经 UniProt 数据库一致性比对，多为纤溶酶、蚓激酶类，预测功能多与丝氨酸型内肽酶活性、凝血、纤溶、蛋白水解等相关。纤溶酶与蚓激酶均属于丝氨酸蛋白酶，具有较强的直接纤溶、纤溶酶原激活等作用<sup>[19]</sup>。鉴于中药具有多成分、多靶点作用的特点，不同成分可以具有同一“印记模板”作用于同一靶点<sup>[20]</sup>，且中药作用的基础是多种有效成分的合理、有机的组合，即有效成分组的作用模式<sup>[21]</sup>。故推测威廉环毛蚓抗血栓成分并非为某一特定蛋白质，其抗血栓活性为一类丝氨酸蛋白酶的综合作用，采用所构建的靶蛋白固定化磁珠可较好地垂钓出该类成分。

但使用该方法仍无法充分实现中药中特定的单

表 4 DPf3 经 PIg 固定化磁珠垂钓所得样本经威廉环毛蚓蛋白数据库比对的蛋白质鉴定结果

Table 4 Protein identification results of fishing samples in DPf3 via PIg-immobilized magnetic bead compared with protein database of *P. guillemi*

编号	-10lgP	覆盖度/ %	特异性 肽段	匹配 谱图数	平均相对 分子质量	比对蛋白	UniProt ID	种属	一致性/%	功能
Ec29745_g1_i1	154.46	39	12	16	25 916	Fibrinolytic enzyme, isozyme C	P83298	<i>Lumbricus rubellus</i>	54.2	丝氨酸型内肽酶活性、凝血、纤溶、蛋白水解
Ec51359_g3_i1	206.04	30	14	32	66 337	Alpha-amylase	A0A173N065	<i>Eisenia fetida</i>	78.6	糖苷酶、水解酶
Dc43026_g1_i1	186.13	26	12	30	35 047	Lumbrokinase-Da2	B8ZZ03	<i>Lumbricus rubellus</i>	71.8	水解酶、激酶、蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、转移酶
Ac40297_g1_i1	174.02	24	14	32	34 943	ARSP1	Q8I6N3	<i>Eisenia fetida</i>	59.8	水解酶、蛋白酶、丝氨酸蛋白酶
Ac44576_g1_i1	114.61	24	1	5	43 327	Actin, beta 2	G3NYK9	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	94.2	细胞骨架、致密体、黏附灶、质膜
Ec45557_g1_i2	114.31	19	6	7	35 780	Uncharacterized protein	T1ERX6	<i>Helobdella robusta</i>	45.2	内切核糖核酸酶活性
Cc38915_g1_i1	180.48	18	16	17	42 802	Fibrinolytic protease P-III-1	Q308Q8	<i>Eisenia fetida</i>	73.9	丝氨酸型内肽酶活性、蛋白水解
Ec48715_g1_i1	184.92	17	5	22	59 925	Alpha-amylase	A0A173N065	<i>Eisenia fetida</i>	82.1	糖苷酶、水解酶
Fc37764_g1_i2	145.83	13	9	10	37 198	Fibrinolytic protease 1	Q1ZZB7	<i>Eisenia fetida</i>	80.6	丝氨酸型内肽酶活性、蛋白水解
Dc34611_g2_i1	125.98	13	5	5	19 430	DgyrCDS3907	A0A7I8VGT2	<i>Dimorphilus gyrocoliatius</i>	43.4	脂肪酶活性、脂质代谢过程

一大分子药效成分的快速分离纯化，重组功能性蛋白可用于获得大量高度纯化且正确折叠的蛋白质，以便对其结构、功能、与靶蛋白间的相互作用进行系统分析<sup>[22]</sup>。故后续可基于蛋白质的鉴定结果，选择可信度较高的蛋白质成分，通过重组表达技术获取单一成分，进行进一步的研究。目前多采用计算机虚拟筛选技术（包括分子对接、药效团模型等）、化学和生物学技术（包括表面等离子共振技术、生物膜干涉技术等）研究中药活性成分与靶标蛋白质的相互作用<sup>[23]</sup>。

据此，提出基于靶标识别中药大分子药效成分的研究模式：首先采用磁珠配体垂钓技术富集中药混合体系中的潜在活性成分，并通过液相色谱-质谱联用技术鉴定生物活性大分子，选取可信度较高的成分，通过计算机虚拟筛选技术识别成分与靶标的结合模式，采用重组表达的方式获得目标活性大分子，并进一步进行生物分子相互作用的定量分析及分子间结合过程的实时监测。

## 5 结论

通过靶蛋白固定化磁珠固相萃取、构建威廉环毛蚓的无参转录组文库并构建其蛋白质数据库、LC-MS/MS 技术，本研究建立了一种从威廉环毛蚓中快速筛选和鉴定目标生物活性大分子的方法，可为动物类中药大分子的分离鉴定提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 127.
- [2] 吴娅丽, 马韞楠, 杜守颖. 中药地龙抗血栓活性研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 3015-3018.
- [3] 宇泉霖, 宋嘉佳, 李寒冰, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 及多种技术研究威廉环毛蚓提取物化学成分组成 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1285-1294.
- [4] Wu Y L, Ma Y N, Hu S N, et al. Transcriptomic-proteomics-anticoagulant bioactivity integrated study of *Pheretima guillemi* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 243: 112101.
- [5] Wu Y L, Hu S N, Ma Y N, et al. Novel *Pheretima*

- guillelmi-derived antithrombotic protein DPF3: Identification, characterization, *in vitro* evaluation and antithrombotic mechanisms investigation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 154: 545-556.
- [6] Zhuo R J, Liu H, Liu N N, *et al.* Ligand fishing: A remarkable strategy for discovering bioactive compounds from complex mixture of natural products [J]. *Molecules*, 2016, 21(11): 1516.
- [7] Lima R C L, Böcker U, McDougall G J, *et al.* Magnetic ligand fishing using immobilized DPP-IV for identification of antidiabetic ligands in lingonberry extract [J]. *PLoS One*, 2021, 16(2): e0247329.
- [8] Xu L, Tang C, Li X, *et al.* Ligand fishing with cellular membrane-coated cellulose filter paper: A new method for screening of potential active compounds from natural products [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(10): 1989-2000.
- [9] Vanzolini K L, Ainsworth S, Bruyneel B, *et al.* Rapid ligand fishing for identification of acetylcholinesterase-binding peptides in snake venom reveals new properties of dendrotoxins [J]. *Toxicon*, 2018, 152: 1-8.
- [10] Zhang Z Y, Cheng X Y, Jiang H L, *et al.* Quantitative proteomic analysis of glycosylated proteins enriched from urine samples with magnetic ConA nanoparticles identifies potential biomarkers for small cell lung cancer [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 206: 114352.
- [11] 王娜, 何成霞, 邹强, 等. 人微小纤溶酶原 cDNA 在毕赤酵母中的高效表达及活性检测 [J]. 西南农业学报, 2019, 32(12): 2807-2814.
- [12] 黄小清, 汪波, 肖凌, 等. 基于磁固相萃取和液相色谱-质谱联用技术的日本医蛭抗凝活性成分研究 [J]. 医药导报, 2021, 40(5): 651-657.
- [13] Kouassi G K, Irudayaraj J. Magnetic and gold-coated magnetic nanoparticles as a DNA sensor [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(10): 3234-3241.
- [14] 张波, 胡瑾洁, 白小琳, 等. 磁珠固定化凝血酶的制备及其在槐米活性化合物筛选中的应用 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(10): 1798-1804.
- [15] 刘翠翠, 王奇升, 田永奇, 等. 配体垂钓: 一种从生物提取物中快速筛选活性化合物的方法 [J]. 药学学报, 2021, 56(4): 996-1005.
- [16] Li D P, Xu L, Qi J, *et al.* Screening and analysis of cyclooxygenase-2 inhibitors from the complex matrix: A case study to illustrate the important effect of immobilized enzyme activity in magnetic ligand fishing [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 175: 112795.
- [17] Qing L S, Xue Y, Zheng Y, *et al.* Ligand fishing from *Dioscorea nipponica* extract using human serum albumin functionalized magnetic nanoparticles [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(28): 4663-4668.
- [18] 张玮玮, 杨慧霞, 薛屏. 功能化磁性纳米粒子在固定化酶研究中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(4): 392-400.
- [19] 孙兆军, 袁桂枝, 梁国栋. 蚯蚓纤溶酶分子生物学进展 [J]. 生物工程进展, 2001, 21(6): 15-18.
- [20] 李海英, 潘雪, 王敏存, 等. 基于超分子“气析”理论定量整合与验证中药成分及靶点群 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 207-213.
- [21] 杜冠华, 王月华, 张冉, 等. 多成分多靶点是对中药作用机制的表面认识 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(4): 480-484.
- [22] 苏鹏, 龚国利. 重组蛋白表达技术的研究进展 [J]. 中国酿造, 2016, 35(10): 9-12.
- [23] 赵珊, 张文青, 张欣悦, 等. 基于药物靶标识别中药活性成分的研究方法及应用 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(7): 1578-1586.

[责任编辑 王文倩]