

生物检定

纳升级反相液相色谱串联质谱法分析海马蛋白质组

张冬梅, 马慧萍, 贾正平*

(兰州军区兰州总医院全军高原环境损伤防治研究重点实验室, 兰州 730050)

摘要 目的: 为了全面了解海龙的蛋白质成分, 对其蛋白表达谱进行蛋白质组学分析。方法: 应用三氯乙酸/丙酮沉淀法提取海马药材的蛋白质, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离分析, 将聚丙烯酰胺凝胶电泳条带切下进行胶内酶解处理后, 应用纳升级反相液相色谱串联质谱(nanoRPLC-MS/MS)法系统分析海马提取蛋白质胶内酶解产物, 并进行数据库检索鉴定蛋白质。结果: 共鉴定到海马蛋白 192 种, 等电点范围为 4.06~12.18, 相对分子质量范围为 $3.06 \times 10^3 \sim 3.52 \times 10^6$, 多肽 10 680 个; 通过生物信息学方法分析了海马提取蛋白质的分子功能。得到海马提取物中的蛋白质具有结合、酶催化、肌动、ATP 酶等功能活性, 其中结合活性的蛋白质占的比例较大。结论: 本研究建立了海马的蛋白质表达谱, 可为海马药材中蛋白质的深入研究奠定基础, 对海马药材有效成分的分析 and 海马药材鉴别具有重要意义。

关键词: 海马; 蛋白表达谱; 蛋白质组; 生物信息学; 三氯乙酸/丙酮沉淀法; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 纳升级反相液相色谱串联质谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)01-0118-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.01.15

Proteomic analysis of Hippocampus using nanoflow reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Dong-mei, MA Hui-ping, JIA Zheng-ping*

(Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command of PLA;

Key Lab of PLA for Prevention and Treatment of Injuries Induced by High Altitude, Lanzhou 730050, China)

Abstract **Objective:** To fully understand the protein composition of Hippocampus, the protein expression profiles were analyzed by proteomics in this study. **Methods:** Trichloroacetic acid/acetone precipitation method was used to extract proteins from dried Hippocampus and the proteins were separated by SDS-PAGE. The protein bands were cut from the gel and digested with trypsin to generate peptide mixture. The peptide fragments were then analyzed using nanoflow reversed phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoRPLC-MS/MS) method. The protein was identified with database searching. **Results:** A total of 192 proteins and 10 680 peptides were identified. The proteins relative molecular mass values ranged from $3.06 \times 10^3 \sim 3.52 \times 10^6$ and

* 通信作者 Tel: (0931) 8994671; E-mail: jiazp166@sina.com

第一作者 Tel: (0931) 8994671; E-mail: 835935150@qq.com

pI values ranged from 4.06 to 12.18. In order to explore possible molecular functions of the identified proteins, bio-information analysis was conducted on the raw data using the DAVID Bioinformatics Resources 6.8 Gene Ontology (GO) analysis tool. The function of proteins included binding activity, enzyme catalytic activity, motor activity and antioxidant activity, where binding activity was the major molecular functions involved in the energy metabolism.

Conclusion: The study has established the protein expression profile of Hippocampus, which can set up a foundation for further research on proteins from Hippocampus, and has significant impact on the analysis of its effective components and the identification of Hippocampus.

Keywords: Hippocampus; protein expression spectrum; proteome; trichloroacetic acid/acetone precipitation method; polyacrylamide gel electrophoresis; bioinformatics; nanoLC-MS/MS

海马 (Hippocampus) 是海龙科 (Syngnathidae) 海马属 (Hippocampus) 动物, 是中国传统的强壮补益中药, 性温味甘, 入肝、肾经, 具有补肾壮阳、消肿散结的功效, 临床上用于治疗阳痿、遗尿、虚喘、症积、疔疮肿毒等症^[1]。海马主要含有微量元素、氨基酸、脂肪酸、磷脂和甾体成分等^[2], 蛋白质是其主要成分, 含量高达 70%^[3]。近代药理研究表明海马有强壮、抗血栓、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、增强记忆力等药理活性^[4]。目前对于海马的研究主要集中在传统的分离鉴定和药理研究等方面, 而对提取的海马蛋白进行系统分析目前未见报道^[5]。

纳升级反相液相色谱-串联质谱法 (nanoRPLC-MS/MS) 具有高通量高灵敏度的特征, 已被广泛应用于蛋白质组学分析中^[6-9]。本研究引入蛋白质组学研究策略, 实验设计如图 1 所示, 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对海马提取蛋白质进行分离, 经胶内酶解处理后采用高灵敏、高通量的纳升级反相液相色谱-串联质谱方法分析, 并对鉴别到的蛋白质进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析^[10], 较系统地研究了海马的提取蛋白质, 为中药海马的蛋白质成分研究奠定基础。

1 仪器、试剂与材料

纳升级液相色谱系统: Thermo Scientific EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific, Odense, Denmark) 液相色谱系统; 高分辨质谱系统: Thermo Scientific™ Q Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪 (Thermo Scientific, Bremen, Germany), 配有纳升电喷雾离子源 (nano-electrospray ion source)、Mascot 蛋白质分析软件 (Version 1.2)。酶标仪 Genios (Tecan 公司)、垂直凝胶电泳仪 (Bio-rad 公司); 离心浓缩仪 (Labconco 公司)。

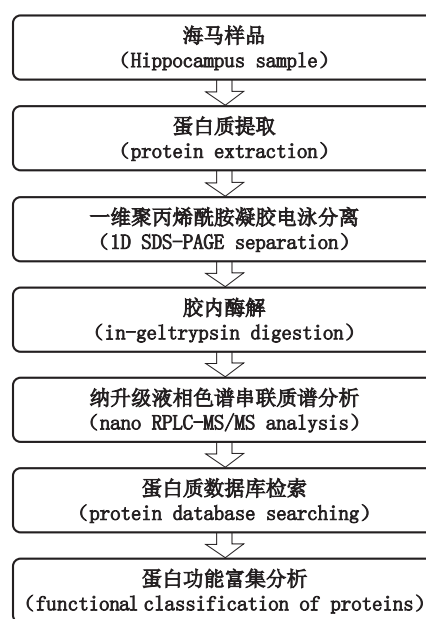


图 1 海马蛋白质分析实验设计流程图

Fig. 1 Flow chart of experimental design for Hippocampus protein analysis

二硫苏糖醇 (DTT) 购于 Sigma-Aldrich (USA) 公司, 十二烷基磺酸钠 (SDS)、尿素 (UREA) 购于 Thermo Fisher Scientific (USA) 公司, 碘乙酰胺 (IAA) 购于 Aladdin 公司, 丙酮、三氯乙酸 (TCA)、 β -巯基乙醇、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、NP-40、琼脂糖、溴酚蓝、乙酸钠、丙三醇、氯化钠、聚乙二醇辛基苯基醚、脱氧胆酸盐、SDS、乙二醇四乙酸购于上海生工生物工程有限公司, 测序级胰蛋白酶购于 Promega (Germany) 公司, 乙腈、甲醇、甲酸等质谱用试剂 (质谱级) 购于 Merck 公司。海马药材由中国海洋大学李国强教授友情赠送并鉴定为线纹海马 (*Hippocampus kelloggi* Jordan et Snyder) 的干燥体, 产自广西壮族自治区, 购买于青岛同仁堂药店。

(2013-11-23)。

2 试验方法

2.1 溶液的配制 Bradford 储存液: 称取考马斯亮蓝 G-250 350 mg, 依次加入 95% 乙醇 100 mL, 88% 磷酸 200 mL, 待考马斯亮蓝 G250 完全溶解后置于棕色瓶中保存。Bradford 工作液: 量取 Bradford 储存液 30 mL, 依次加入去离子水 425 mL, 95% 乙醇 15 mL, 88% 磷酸 30 mL, 搅拌混匀, 滤纸过滤后保存于棕色瓶中, 室温放置, 使用时需再次过滤, 即得。Tris-Gly SDS-PAGE 浓缩胶 (6%, 15 mL): 依次加入 30% 聚丙烯酰胺溶液 3 mL, $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.8) 3.8 mL, 10% SDS 0.15 mL, 10% 过硫酸铵 (AP) 0.15 mL, TEMED 12 μL 及水 7.9 mL 至烧杯中, 混匀, 即得。Tris-Gly SDS-PAGE 分离胶 (12%, 45 mL): 依次加入 30% 聚丙烯酰胺溶液 18 mL, $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.8) 11.4 mL, 10% SDS 0.45 mL, 10% 过硫酸铵 (AP) 0.45 mL, *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺 (TEMED) 18 μL 及水 14.7 mL 至烧杯中, 混匀, 即得。考马斯亮蓝 R-250 染色液: 称取考马斯亮蓝 R-250 0.25 g, 依次加入甲醇 45 mL, 冰醋酸 10 mL, 待其完全溶解后加去离子水定容至 100 mL, 即得。考马斯亮蓝脱色液: 量取甲醇 250 mL, 冰醋酸 80 mL, 加入去离子水定容至 1 L, 即得。10 $\times$ SDS 电泳缓冲液: 分别称取 Tris 30.3 g, 甘氨酸 187.7 g, SDS 10 g, 加去离子水溶解, 定容至 1 L, 室温保存, 使用时加 9 倍的去离子水稀释至 1 $\times$ SDS 电泳缓冲液。碳酸氢铵溶液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取 1.58 g 碳酸氢铵溶于 200 mL 超纯水中, 搅拌溶解, 即得。二硫苏糖醇溶液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取二硫苏糖醇 0.0154 g 溶于 1 mL 碳酸氢铵溶液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 震荡使之溶解, 即得。碘乙酰胺溶液 ($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取碘乙酰胺 0.037 g 溶于 1 mL 碳酸氢铵溶液 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 震荡使之溶解, 即得。测序级胰蛋白酶 ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$): Promega 公司试剂盒成品质量浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 使用时用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碳酸氢铵溶液稀释 50 倍使用。

2.2 海马总蛋白的提取 海马蛋白质提取采用三氯乙酸/丙酮沉淀法^[11]。干燥海马药材粉碎后, 取粗粉 100 mg, 加入丙酮 (含 10% 三氯乙酸, 0.07% β 巯基乙醇) 5 mL, 放入 -20°C 冰箱过夜, 4°C $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 弃去上清, 沉淀物用含 0.07% 巯基乙醇的丙酮溶液清洗 3 遍, 冻干, 将此干燥粉末中加入 [RIPA] 裂解缓冲液 (三(羟甲基)氨基甲烷,

$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4; 氯化钠 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1% 聚乙二醇辛基苯基醚; 脱氧胆酸盐, 1%; SDS, 0.1%; 乙二胺四乙酸) 5 mL 裂解 1 h, 4°C $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清即得海马总蛋白, 应用 Bradford 法测定^[12]蛋白浓度, 具体实验方法: 首先用去离子水配制 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清白蛋白 (BSA) 的溶液, 然后根据表 1 加入考马斯亮蓝工作液, 去离子水, BSA 溶液或者样品。当加入 BSA 溶液或者样品后, 需立即在涡旋振荡仪上混合, 使蛋白和考马斯亮蓝 G250 染料充分结合。室温放置 2~3 min 后, 从每个离心管中吸取 200 μL 加入到 96 孔板中, 每组设 4 个复孔, 然后用酶标仪测定 570 nm 处的吸收值, 然后根据 BSA 溶液的浓度和相对应的吸收值绘制标准曲线。最后借助于标准曲线, 将样品组的吸收值代入其中得到样品中的蛋白浓度。 -80°C 保存备用。

2.3 SDS-PAGE 及胶内酶解 将海马总蛋白 100 μg 经上样液 (SDS, 2%; 溴酚蓝, 0.02%; Tris-HCl, $0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.0; 丙三醇 40%) 溶解, 煮沸 5 min 后上样到配好的凝胶 (分离胶浓度 12%, 浓缩胶 6%), 上样量为 20 μg 总蛋白量, 应用垂直凝胶电泳仪跑胶, 先恒压 60 V 电泳 30 min, 使样品跑完浓缩胶; 然后 90 V 恒压跑分离胶, 距凝胶边缘约 5 mm 时, 停止电泳, 分离胶分子筛的作用使得蛋白质根据其各自分子量的大小而被分离。取出凝胶, 放入 100 mL 考马斯亮蓝染色液中, 置于水平摇床上缓慢摇动室温染色 2 h, 取出凝胶放入 200 mL 考马斯亮蓝脱色液中, 置于水平摇床上缓慢摇动室温脱色 12 h, 直至蓝色背景被全部脱去, 即得 SDS-PAGE 条带 (图 2)。

将图 2 中 SDS-PAGE 标注的条带切下, 共切得 17 个条带, 分别放入离心管中, 将条带切成约 1 mm^3 大小的小块, 用 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液 [含 30% (v/v) 乙腈] 溶液洗涤至无色, 去除上清液, 冻干, 每管加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液 90 μL 和 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇溶液 10 μL , 在 56°C 孵育 30 min, 去上清, 加入 50 μL 乙腈洗涤 2 次, 冻干, 每管加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液 70 μL 和 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺溶液 30 μL , 室温避光孵育 20 min, 去上清, 加入 50 μL 乙腈洗涤 2 次, 冻干, 加入测序级胰蛋白酶 ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 5 μL , 放入 4°C 冰箱 30 min, 再加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液 30 μL , 放入 37°C 恒温培养箱中过夜消化得酶解液, 吸取酶

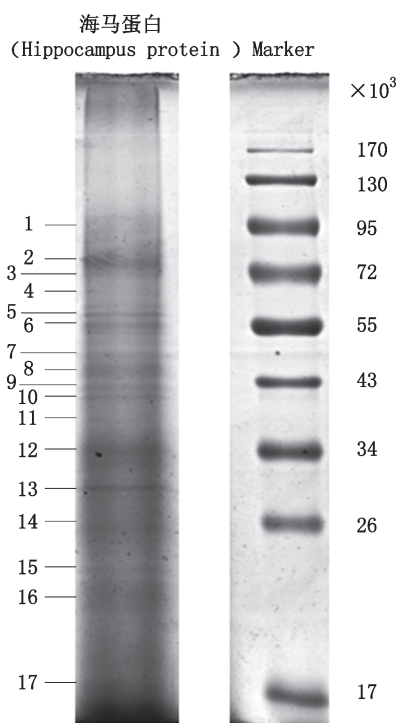


图2 海马提取蛋白 SDS-PAGE

Fig. 2 The SDS-PAGE images of protein extracted from Hippocampus

解液到新的离心管中,原管加入含 0.1% (v/v) 甲酸和 60% (v/v) 乙腈的水溶液 100 μ L,超声 15 min,吸出溶液并入前次溶液,此步骤重复 3 次,合并,冻干,得海马蛋白质胶内酶解物。

2.4 纳升级反相液相色谱串联质谱分析 将上述胶内酶解物用 30 μ L 0.1% 甲酸溶液复溶,13 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 20 min 后取上清液注入 nanoLC-MS/MS 仪器分析。EASY-nLC system 液相系统色谱条件: 采用 Easy-spray C_{18} 毛细管柱 (75 μ m $\times$ 50 mm, 2 μ m, 120 $\text{\AA}$),流动相 A 为 3% 乙腈 (0.1% 甲酸),流动相 B 为 97% 乙腈 (0.1% 甲酸),梯度洗脱 (0~5 min, 3%B $\rightarrow$ 8%B; 5~195 min, 8%B $\rightarrow$ 20%B; 195~220 min, 20%B $\rightarrow$ 30%B; 220~225 min, 30%B $\rightarrow$ 90%B; 225~240 min, 90%B), 流速 300 $nL \cdot \min^{-1}$, 自动进样, 上样 5 μ L, 分析时间 240 min。质谱检测条件: 采用正离子扫描方式,典型的质谱参数设置为离子喷雾电压 2 kV,加热毛细管温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 一级质谱扫描范围 m/z 300~1 750; 动态排除设置为 30 s; 高能碰撞解离 (HCD) 设置为 60 ms 17 500 分辨率; 碰撞能量为 27% 250 ms; 应用数据依赖模式选择一级图谱峰进行二级扫描。

2.5 海马蛋白质数据库搜索 对实验得到的质谱数

据结果应用蛋白质发现软件在 Uniprot 中辐鳍鱼纲 (Actinopterygii Group) 蛋白质数据库 (Actinopterygii (ray-finned fishes).fasta) 中进行检索,数据库下载于 NCBI Taxonomy: Actinopterygii (ray-finned fishes) database。数据库检索软件为 Mascot search engines of proteome discoverer (Thermo Scientific, Version 1.2), 设置参数如下: 蛋白质以及多肽的假阳性率小于 1%,酶为胰蛋白酶,固定修饰为酰胺甲基化,可变修饰为 N 端甲基化和甲硫氨酸氧化,最大允许 1 个错切,母离子质量偏差小于 10,二级碎片离子偏差小于 0.25 个单位。

2.6 鉴定蛋白质功能分析 采用 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, USA) 在线工具分别对鉴定到的海马蛋白质进行基因本体功能富集分析,探索鉴定到蛋白质的分子功能。

3 结果与讨论

3.1 干燥海马蛋白质的提取 对于干燥海马药材的蛋白质提取,是本研究的重点和难点,本研究应用三氯乙酸/丙酮沉淀法和 RIPA 试剂盒提取干燥海马蛋白质,提取蛋白使用 Bradford 法^[12],测定蛋白质的浓度测定体系如表 1 所示,测得蛋白质质量浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,100 mg 干燥海马蛋白共提取到 45 mg 蛋白质,提取效率是 45%。蛋白提取液应用 SDS-PAGE 电泳分离,上样量为 0.1 mg ,电泳结果见图 2。

表 1 Bradford 法测定蛋白浓度

Tab. 1 Bradford method for concentration determination

No.	考马斯亮蓝 G250 溶液 (Coomassie brilliant blue G250 solution) / μ L	去离子水 (deionized water) / μ L	2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 溶液 (BSA solution, 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) / μ L	样品 (sample) / μ L
1	980	20	0	—
2	980	18	2	—
3	980	16	4	—
4	980	14	6	—
5	980	12	8	—
6	980	10	10	—
7	980	8	12	—
8	980	4	16	—
9	980	0	20	—
10	980	10	—	10

如图所示海马蛋白质相对分子质量覆盖范围为 $1.7 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$ 。

3.2 干燥海马蛋白质组学分析 将海马的 SDS-PAGE 蛋白质条带经胶内酶解处理和 nano-RPLC-MS/MS 系统进行分析后,将质谱分析的数据应用 Mascot 搜索软件,在辐鳍鱼纲蛋白质数据库中进行检索比对,共检索得到假阳性率小于 1% 而置信度大于 95% 的蛋白 192 种,等电点范围为 4.06~12.18,相对分子质量范围为 $3.06 \times 10^3 \sim 3.52 \times 10^6$ (如附表 1 所示),共检测到 10 680 条多肽。然而目前尚缺乏海马的蛋白质组数据库,海马的基因组数据尚未检测,所以质谱检测到的图谱在现有辐鳍鱼纲数据库中无法完全比对,有效图谱利用率仅为 20%,也就是说还有 80% 的二级质谱图谱没有得到有效利用,对海马蛋白质组学的进一步研究还依赖于海马蛋白质组学数据库和基因组数据的完善。

以往对于海马的研究主要集中在传统的分离鉴定和药理研究等方面,而对提取的海马蛋白进行系统分析目前未见报道。应用高通量蛋白质组学方法即应用液质方法结合数据库比对的策略,研究海马蛋白质组对海马有效成分的分析 and 海马药材的鉴定具有重要意义。

3.3 提取海马蛋白质组功能分析 对鉴定到的 192 种蛋白质在 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 数据库中搜索分析,考察了海马蛋白质的分子功能,具体分布见图 3。由图 3 可见,在所鉴定的蛋白质中,具有结合活性的蛋白质占较大比例 (54.2%),进一步分析结合活性蛋白,ATP 结合活性蛋白含量最高 (20.3%),嘌呤核苷酸结合活性次之 (16.9%),此外还包括肌动蛋白活性、微丝结合蛋白活性、平滑肌 α 肌动蛋白结合蛋白活性 (如表 2 所示),这些功能都参与人体重要的代谢过程^[13]。除了

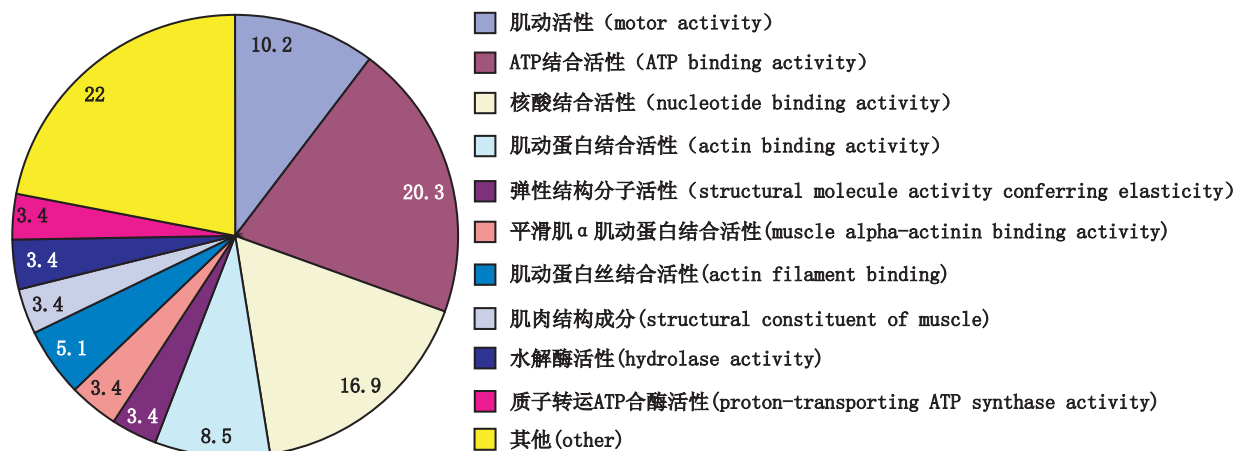


图 3 海马提取蛋白质功能分布饼图

Fig. 3 Pie chart of functional classification of proteins extracted from Hippocampus

表 2 海马提取蛋白质组功能分析结果

Tab. 2 Results of functional classification of proteins extracted from Hippocampus by proteomic analysis

功能条目 (term of function)	蛋白质数目 (protein number)	百分率 (percentage) /%	P
ATP 结合活性 (ATP binding activity)	12	20.3	1.60×10^{-8}
肌动活性 (motor activity)	6	10.2	3.70×10^{-9}
核酸结合活性 (nucleotide binding activity)	10	16.9	4.60×10^{-6}
肌动蛋白结合活性 (actin binding activity)	5	8.5	7.40×10^{-5}
肌动蛋白丝结合活性 (actin filament binding)	3	5.1	2.80×10^{-3}
弹性结构分子活性 (structural molecule activity conferring elasticity)	2	3.4	1.90×10^{-3}
平滑肌 α 肌动蛋白结合活性 (muscle alpha-actinin binding activity)	2	3.4	1.90×10^{-3}
肌肉结构成分 (structural constituent of muscle)	2	3.4	2.80×10^{-3}
水解酶活性 (hydrolase activity)	2	3.4	8.50×10^{-3}
质子转运 ATP 合酶活性 (proton-transporting ATP synthase activity)	2	3.4	1.60×10^{-2}

有结合活性功能的蛋白质外,海马提取物中的蛋白质主要有以下几大生物功能:肌动活性(motor activity) 10.2%,肌动蛋白(actin)具有 ATP 酶活性,促使 ATP 发生水解而释放自由能,为肌肉收缩和细胞运动提供能量^[14]。弹性结构分子活性 3.4%,肌肉结构成分 3.4%,水解酶活性 3.4%,质子转运 ATP 合酶活性 3.4%^[15-17],通过对鉴定蛋白功能的分析,主要参与能量代谢过程以及结构成分,这些功能可能与海马药材的强壮补益功效有关。

4 结论

本研究以重要海马干燥体为原料,经三氯乙酸/丙酮沉淀法得到海马蛋白提取物,利用蛋白质组学的研究思路,应用高通量、高灵敏度的 nanoRPLC-MS/MS 技术结合聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,系统分析了海马提取蛋白质胶内酶解产物,并进行数据库检索鉴定蛋白质,对部分蛋白质的功能进行了分析,为海马蛋白质的生物活性以及海马药材的鉴别和有效成分研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版.一部[S]. 2015: 275
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 275
- [2] 朱苗,谢勇,卢忠英,等. 海马活性成分提取技术研究进展[J]. 广州化工, 2015, 43(10): 19
ZHU M, XIE Y, LU ZY, et al. Research progress of active ingredient extraction technology from seahorses[J]. Guangzhou Chem Ind, 2015, 43(10): 19
- [3] 王斌,任西杰,王燕,等. 基于聚类、主成分和判别分析的海马醇提取物红外指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(4): 253
WANG B, REN XJ, WANG Y, et al. Fingerprint analysis of Hippocampus's ethanol extracts coupled with cluster analysis, principal component analysis and discriminant analysis[J]. Chin Pharm J, 2013, 48(4): 253
- [4] 严家彬,马润娣,于立坚. 海马的药用价值[J]. 中国海洋药物, 2002, 21(6): 48
YAN JB, MA RD, YU LJ. Medicinal values of Hippocampus[J]. Chin J Mar Drugs, 2002, 21(6): 48
- [5] KUMARAVEL K, RAVICHANDRAN S, BALASUBRAMANIAN T, et al. Seahorses—a source of traditional medicine[J]. Nat Prod Res, 2012, 26(24): 2330
- [6] NYNCA J, ARNOLD GJ, FROHLICH T, et al. Proteomic identification of rainbow trout sperm proteins[J]. Proteomics, 2014, 14(12): 1569
- [7] SKIPP P, ROBINSON J, O'CONNOR CD, et al. Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*[J]. Proteomics, 2005, 5(6): 1558
- [8] LAGRAIN B, BRUNNBAUER M, ROMBOUTS I, et al. Identification of intact high molecular weight glutenin subunits from the wheat proteome using combined liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58682
- [9] POSSENTI A, FRATINI F, FANTOZZI L, et al. Global proteomic analysis of the oocyst/sporozoite of *Toxoplasma gondii* reveals commitment to a host-independent lifestyle[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 183
- [10] FORNÉ I, ABIÁN J, CERDÀ J. Fish proteome analysis: model organisms and non-sequenced species[J]. Proteomics, 2010, 10(4): 858
- [11] NATARAJAN S, XU C, CAPERNA TJ, et al. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soy-bean seed proteins[J]. Anal Biochem, 2005, 342(2): 214
- [12] JIN MY, DONG L, DAI JD, et al. Determination of the content of protein in pilose antler processed by different methods with bradford method[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2015, 33: 592
- [13] LIU S, CERIONE RA, CLARDY J. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(5): 2743
- [14] CORNER MA, SCHENCK CH. Perchance to dream? Primordial motor activity patterns in vertebrates from fish to mammals: their prenatal origin, postnatal persistence during sleep, and pathological reemergence during REM sleep behavior disorder[J]. Neurosci Bull, 2015, 31(6): 649
- [15] CHATERJI S, KIM P, CHOE SH, et al. Synergistic effects of matrix nanotopography and stiffness on vascular smooth muscle cell function[J]. Tissue Eng, 2014, 20(15-16): 2115
- [16] HONECKER F, ROHLFING T, HARDER S, et al. Proteome analysis of the effects of all-trans retinoic acid on human germ cell tumor cell lines[J]. J Proteomics, 2014, 96(2): 300
- [17] OWEN A, SENER A, MALAISSE WJ. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. II. Divalent cations and ATPase activity in pancreatic islets[J]. Enzyme, 1983, 29(1): 2

(本文于 2017 年 1 月 3 日收到)