



(21) 申请号 202510888572.6

(22) 申请日 2025.06.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 120678882 A

(43) 申请公布日 2025.09.23

(73) 专利权人 上海市农业科学院

地址 201106 上海市闵行区北翟路2901号

(72) 发明人 赵妍 秦玮 张保生 董沁

余昌霞 杨琳 查磊 潘雪玉

(74) 专利代理机构 上海诺衣知识产权代理事务

所(普通合伙) 31298

专利代理师 衣然

(51) Int. Cl.

A61K 38/08 (2019.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103403153 A, 2013.11.20

CN 109985062 A, 2019.07.09

审查员 温婧

权利要求书1页 说明书4页

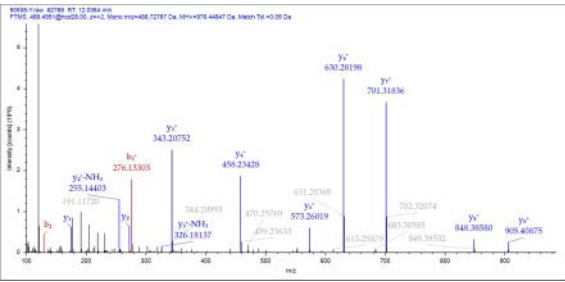
序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

猴头菇降血糖肽在制备抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种猴头菇降血糖肽在制备抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性药物中的应用。所述的降血糖肽的氨基酸序列为AGLQFPVGR。本发明从猴头菇子实体蛋白中提取并纯化多肽,通过LC-MS/MS确定了其中一条降血糖肽的氨基酸序列,经降血糖活性检测,对 α -淀粉酶抑制率为 $75.82\pm 0.12\%$,对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 $63.33\pm 0.28\%$,可作为天然降血糖肽,在制备降低血糖的药物等领域具有潜在的应用前景。



1.猴头菇降血糖肽在制备降血糖药物中的应用,其特征在于,所述的猴头菇降血糖肽的氨基酸序列为AGLQFPVGR。

猴头菇降血糖肽在制备抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物提取物技术领域,涉及一种猴头菇降血糖肽在制备抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性药物中的应用。

背景技术

[0002] 糖尿病已经成为紧随心脑血管疾病和恶性肿瘤之后的第三大慢性非传染性疾病。高血糖是糖尿病最主要的特征,控制餐后高血糖是治疗糖尿病的有效和有吸引力的靶点。在日常生活中,碳水化合物主要以多聚糖的方式存在,这使得它们不能被人体直接吸收和利用。在胃肠道中, α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶负责将寡糖和双糖分解为单糖进而被人体吸收。所以抑制 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶可以延缓体内的葡萄糖吸收,从而降低餐后血糖水平。据研究,从天然产物中提取的降血糖肽具有抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性,与化学合成的药物相比,对人体的毒性和副作用较小。而口服多肽类药物存在吸收障碍的缺点,难以通过肠壁的脂质屏障,吸收效果差。

[0003] 大量研究表明,食用菌内富含多种具有降血糖功效的活性物质,例如蛋白质、肽、多糖、菇类物质等。同时,相较于动植物,食用菌生长周期短、易于栽培,是一种优质的降血糖药物研发材料。刘冰等研究了三地羊肚菌菌丝体胞外多糖的分离纯化及其降血糖和抗氧化活性。研究发现,羊肚菌胞外多糖MEP-H和MEP-N对 α -葡萄糖苷酶的抑制率分别为 $74.93\% \pm 2.72\%$ 和 $69.48\% \pm 2.97\%$,对 α -淀粉酶的抑制率最高分别为 $8.06\% \pm 1.93\%$ 和 $11.08\% \pm 1.05\%$,表现出一定的降血糖活性,但是其对 α -淀粉酶抑制率并没有显著效果(刘冰,李沛,曾馨俞,等.三地羊肚菌菌丝体胞外多糖分离纯化及降血糖和抗氧化活性研究[J].食品安全质量检测学报,2025,16(05):86-93.)。Liu Z.等发现了七种来源于河豚的鲜味肽,其中一个鲜味肽的氨基酸序列为AGLQFPVGR(Liu Z, Zhu Y, Wang W, et al. Seven novel umami peptides from Takifugu rubripes and their taste characteristics[J]. Food Chemistry, 2020, 330:127204.)。

[0004] 猴头菇含有多种活性成分,尤其是丰富的蛋白质。迄今为止没有关于猴头菇子实体为来源的降血糖肽的相关报道。

发明内容

[0005] 本发明提供一种猴头菇降血糖肽在制备抑制 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性药物中的应用。

[0006] 本发明所述的猴头菇降血糖肽,其氨基酸序列为AGLQFPVGR,即Ala-Gly-Leu-Glu-Phe-Pro-Val-Gly-Arg,如SEQ ID NO.1所示。

[0007] 本发明还提供上述降血糖肽在制备降血糖药物中的应用。

[0008] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0009] 本发明首次从猴头菇子实体蛋白中提取并纯化多肽,发现了多条具有良好降低血

糖能力的降血糖肽,并通过LC-MS/MS确定了其中一条降血糖肽的氨基酸序列为AGLQFPVGR,经降血糖活性检测,对 α -淀粉酶抑制率为 $75.82\% \pm 0.12\%$,对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 $63.33\% \pm 0.28\%$,效果显著,可作为天然降血糖肽,在制备降低血糖的药物等领域具有潜在的应用前景。

附图说明

- [0010] 图1为C1、C2、C3三种不同分子量多肽对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率。
- [0011] 图2为通过阴离子柱的分离产物Q1、Q2、Q3。
- [0012] 图3为通过阴离子柱的分离产物q1、q2、q3。
- [0013] 图4为通过阴离子柱的分离产物Q1、Q2、Q3的 α -葡萄糖苷酶抑制率。
- [0014] 图5为通过阴离子柱的分离产物q1、q2、q3的 α -葡萄糖苷酶抑制率。
- [0015] 图6为通过凝胶柱分离产物G1、G2、G3、G4。
- [0016] 图7为分离产物G1、G2、G3、G4的 α -葡萄糖苷酶抑制率。
- [0017] 图8为G2的TIC图谱。
- [0018] 图9为活性多肽的二级质谱图。
- [0019] 图10为活性多肽结构的预测。
- [0020] 图11为活性多肽与 α -葡萄糖苷酶分子对接的2D (a) 和3D (b) 图。
- [0021] 图12为活性多肽与 α -淀粉酶分子对接的2D (a) 和3D (b) 图。

具体实施方式

[0022] 下面结合具体实施例和附图对本发明作进一步详述。

[0023] 下述实施例中, α -淀粉酶抑制率的测定参考(苏娜. 驼乳蛋白中降血糖生物活性肽的制备及鉴定 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.)的方法测定, α -葡萄糖苷酶抑制率的测定:参考(赵红星. 降血糖活性肽制备及抑制 α -葡萄糖苷酶活性肽纯化与鉴定 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.)的方法进行测定。

[0024] 实施例1

[0025] (1)取新鲜的猴头菇子实体洗净并切成小块进行液氮速冻,再使用冷冻干燥机冻干后,利用粉碎机将冻干后的子实体粉碎成粉末,并通过60目筛。将粉末和超纯水按照质量比1:10混合,经超声溶解后,让其静置4 h。将溶液在4 °C、8000 r/min的速度进行离心20分钟后取出上层液体,加入硫酸铵,使其终浓度达到80%的饱和度(每升溶液中加入固态硫酸铵561 g),超声使其溶解后,静置12 h。再将溶液在4 °C、8 000 r/min离心20 min取沉淀。将沉淀物溶解在超纯水中,然后放入一个10 kDa的透析袋里,在4°C的水溶液环境中进行48小时的透析,结束后冻干成粉末得到猴头菇蛋白。

[0026] (2)将猴头菇蛋白溶于超纯水中,使用1 mol/L的氢氧化钠和盐酸将环境调整为碱性蛋白酶适宜条件(pH 9,55 °C)。在环境达到稳定状态后,加入底物质量为4%的碱性蛋白酶,酶解4小时后,在90°C的温度下进行15分钟的水浴以终止该反应,最后在4 °C、8 000 r/min下离心15 min,取上清液冻干后得到酶解产物。将酶解后得到的猴头菇活性肽溶解并过0.22 μ m滤膜,使用10 kDa和3 kDa的超滤管在4000 r/min下离心60 min,得到3种不同分子量的多肽组分,分别为小于3 kDa、介于3 kDa和10 kDa之间、大于10 kDa三部分,并命名为

C1、C2、C3,分别测试三种不同分子量多肽对 α -葡萄糖苷酶和 α -淀粉酶抑制率。结果如图1所示,从图中可以看出具有最优抑制 α -淀粉酶抑制率和 α -葡萄糖苷酶活性的多肽组分为C1。

[0027] (3) C1通过 Q Sepharose FF 阴离子柱第一次步级梯度纯化(洗脱液是 NaCl (2 M pH7.5) B溶液)。如图 2所示,产生 3 个洗脱峰,分别为 Q1、Q2、Q3。通过对 α -葡萄糖苷酶的抑制率来评估这三个洗脱峰的降血糖活性,结果如图 4所示,在这三个组分中,Q2 表现出了更好的活性,其 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 0.4974 ± 0.0166 。根据Q2出现的梯度是25%B处(Buffer B所占的比例为 25%),再次优化洗脱条件,将C1通过 Q Sepharose FF 阴离子柱 0-25%B线性洗脱,洗脱20个柱体积,得到如图3所示,产生3个洗脱峰,分别为q1、q2、q3。通过对 α -葡萄糖苷酶的抑制率来评估这三个洗脱峰的降血糖活性,结果如图5所示,q2表现出更好的活性,其 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 $62.95 \pm 0.13\%$ 。

[0028] 从阴离子柱中分离出来的q2经过Superdex 30 Increase10/300 GL凝胶柱的进一步纯化和220 nm的吸光度检测,成功地分离出了四个不同的组分,结果如图6所示。依据出峰顺序,将得到的4个组分依次命名为 G1、G2、G3、G4。凝胶柱根据分子量大小对组分进行分离纯化,分别测定G1、G2、G3、G4对 α -葡萄糖苷酶抑制率,结果如图7所示。其中G2的降血糖活性显著高于其他三个组分,对 α -葡萄糖苷酶的抑制率高达 $83.24 \pm 0.37\%$,同时相较于离子柱纯化后的q2的降血糖活性也有了一定的提高,说明猴头菇的降血糖肽得到了进一步的纯化,提高了其降血糖活性,并且猴头菇降血糖肽主要集中在G2中。

[0029] (4) 使用LC-MS/MS确定了猴头菇G2 处降血糖肽的氨基酸序列。图8为猴头菇G2处的TIC图谱。得到33条序列,将其上传至PeptideRanker进行活性预测。PeptideRanker给出了G2中34个肽的分数,其中一条降血糖活性肽评分高于0.5,表明这个肽显示出较高的生物活性可能性。这条降血糖活性肽的氨基酸序列为AGLQFPVGR,如SEQ ID NO.1所示,其质谱图如图9所示,分子量为944.53 Da。

[0030] (5) 通过生物信息学分析AGLQFPVGR肽的性能。ProParam在线软件对此肽的理化性质进行了预测:理论等电点为7.97;带有一个正电荷氨基酸残基;稳定性为70.1,具有较好的稳定性;在哺乳动物网织红细胞的预测半衰期为4.4 h,在酵母体内半衰期大于20 h,大肠杆菌体内半衰期大于10 h;为亲水性多肽。

[0031] 在Toxinpred软件对获得的猴头菇降血糖肽安全进行评估测试,预测了其毒性和致敏性,结果显示其是无毒、无致敏性的,具有较高的安全性。

[0032] (6) 在生工生物工程有限公司采用固相合成的方法得到AGLQFPVGR肽,并测定AGLQFPVGR肽的降血糖活性,对 α -淀粉酶抑制率为 $75.82\% \pm 0.12\%$,对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 $63.33\% \pm 0.28\%$ 。PepDraw 对获得的猴头菇降血糖肽的结构进行了预测,ChemDraw绘制它的2D结构,结果见图10。

[0033] 为了探索AGLQFPVGR与 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶结合机制,使用Chem3D将绘制的2D结构转化成3D结构。用MOE (2019) 进行分子对接,通过赵康琦等(赵康琦, 金爱静, 王晓月, 等. 白芷在斑马鱼中的降血糖作用及分子对接研究 [J]. 中医药信息, 2023, 40 (06): 32-7.) 得知, α -淀粉酶的PDB代码是1SMD, α -葡萄糖苷酶的PDB代码是5KZW。在PDB<https://www.rcsb.org/>中输入PDB代码下载蛋白的3D结构。将下载的大分子蛋白导入MOE,除去水分子和小分子配体,删除多余的链,点击QuickPerp即完成大分子处理。由于不知道对接口袋位点,所以将小分子库和大分子蛋白进行全原子对接,对接结束后从对接结

果中选择得分最小、最稳定的结构。通过对接,得到AGLQFPVGR与 α -葡萄糖苷酶分子对接的2D和3D图,如图11所示。AGLQFPVGR与 α -淀粉酶分子对接的2D和3D图,如图12所示。AGLQFPVGR与 α -淀粉酶形成5个氢键,结合位点分别是Gly334、Asp402、Asn408、Arg398、Gly403,Gly334处氢键键能最大;与 α -葡萄糖苷酶形成4个氢键,结合位点分别是Asp397、Gly398、Arg416、Phe401,其中Phe401处键能最大。

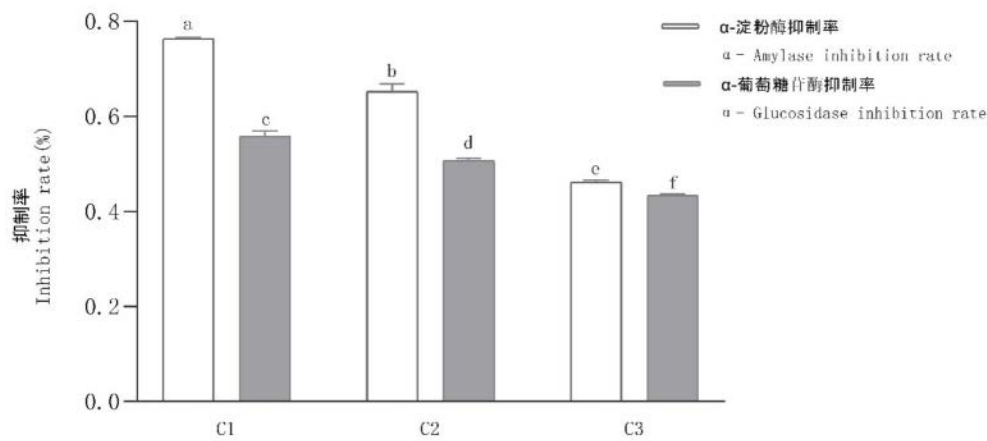


图1

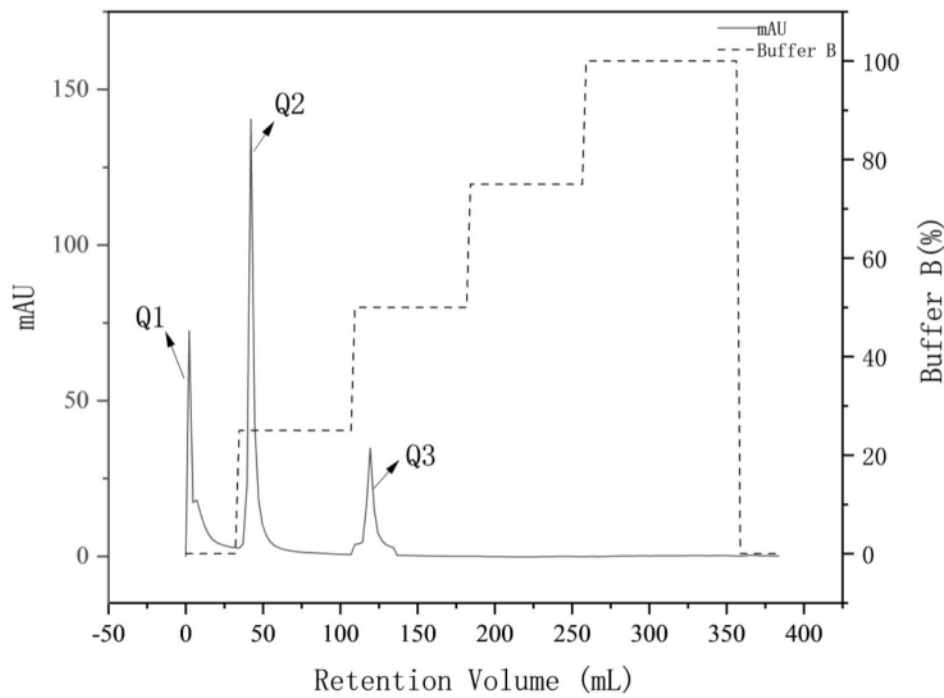


图2

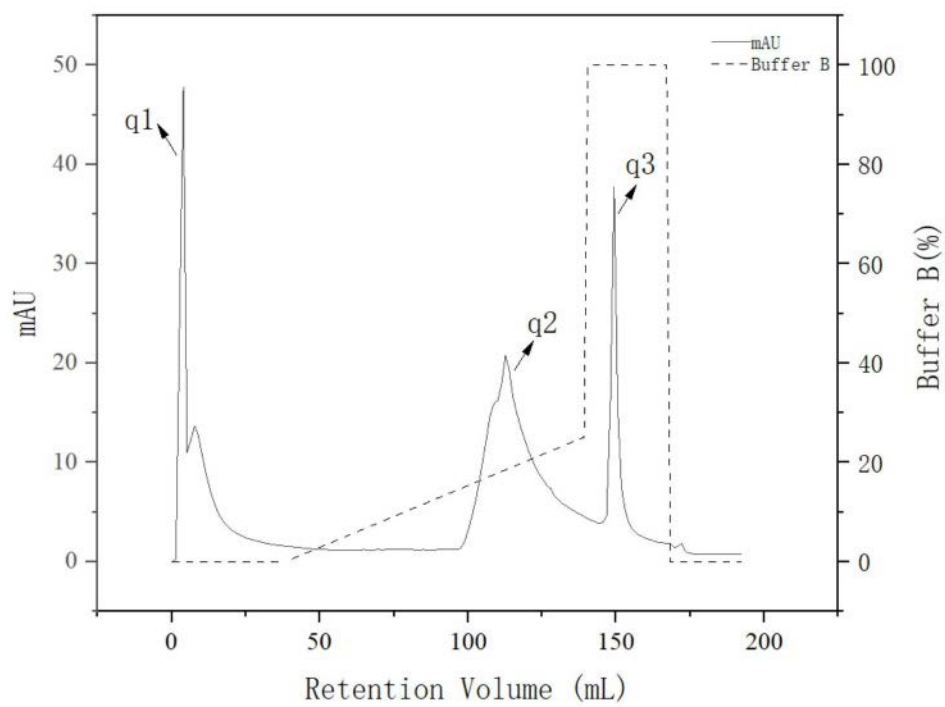


图3

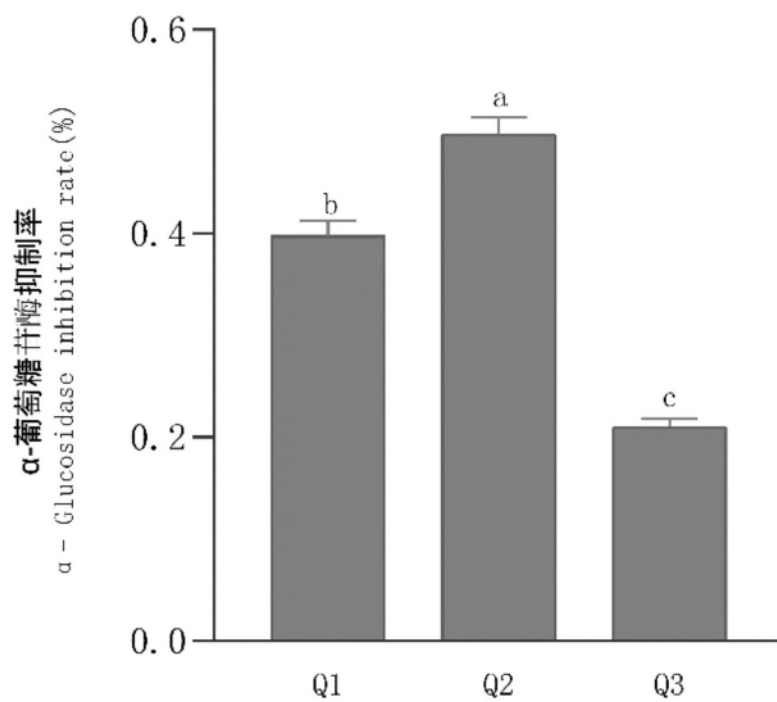


图4

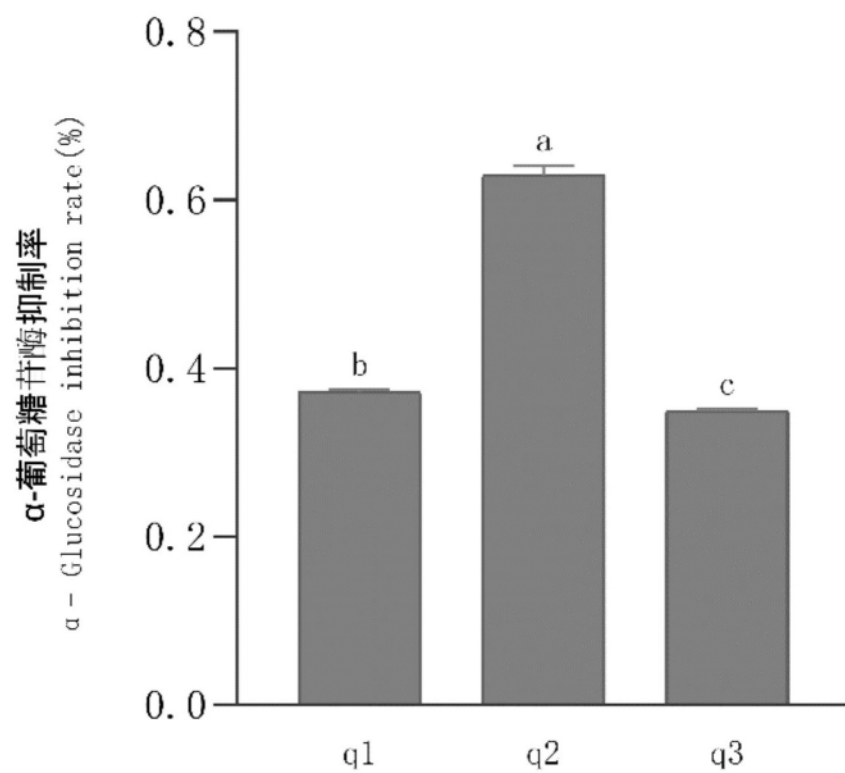


图5

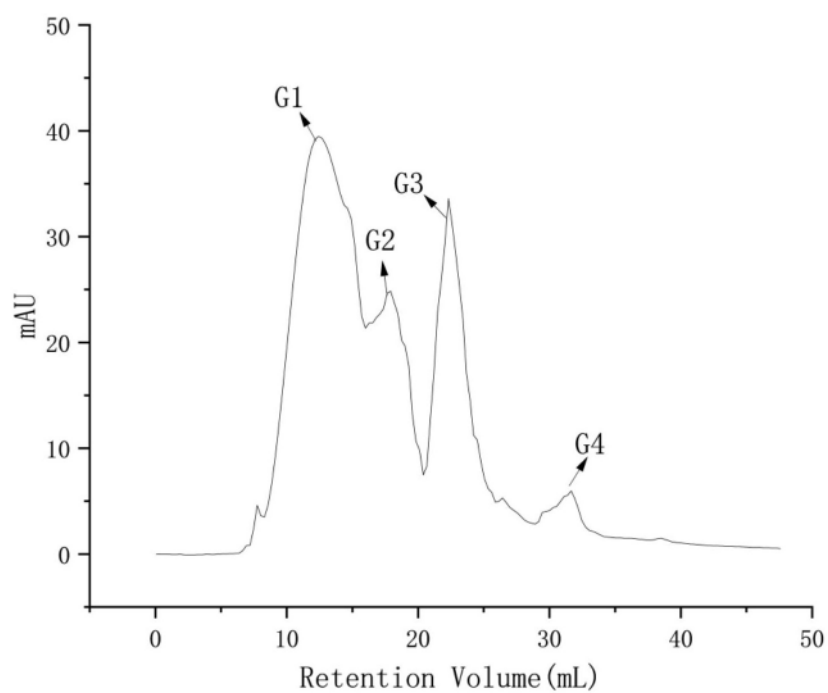


图6

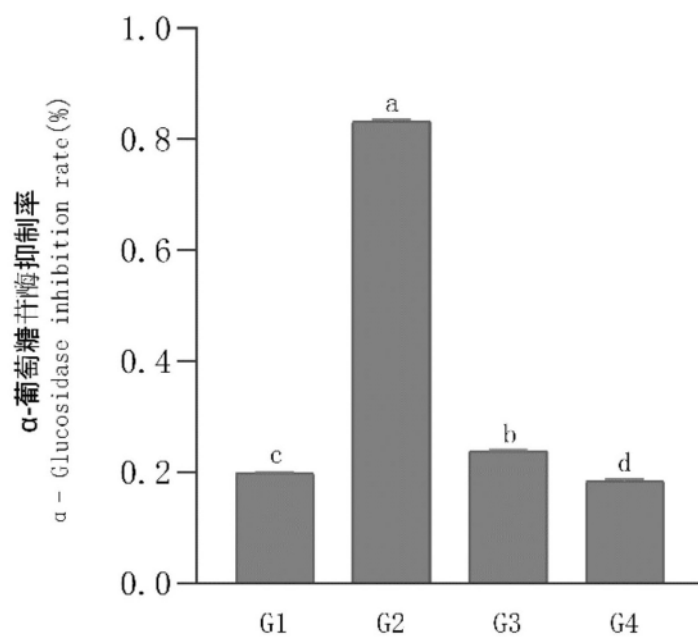


图7

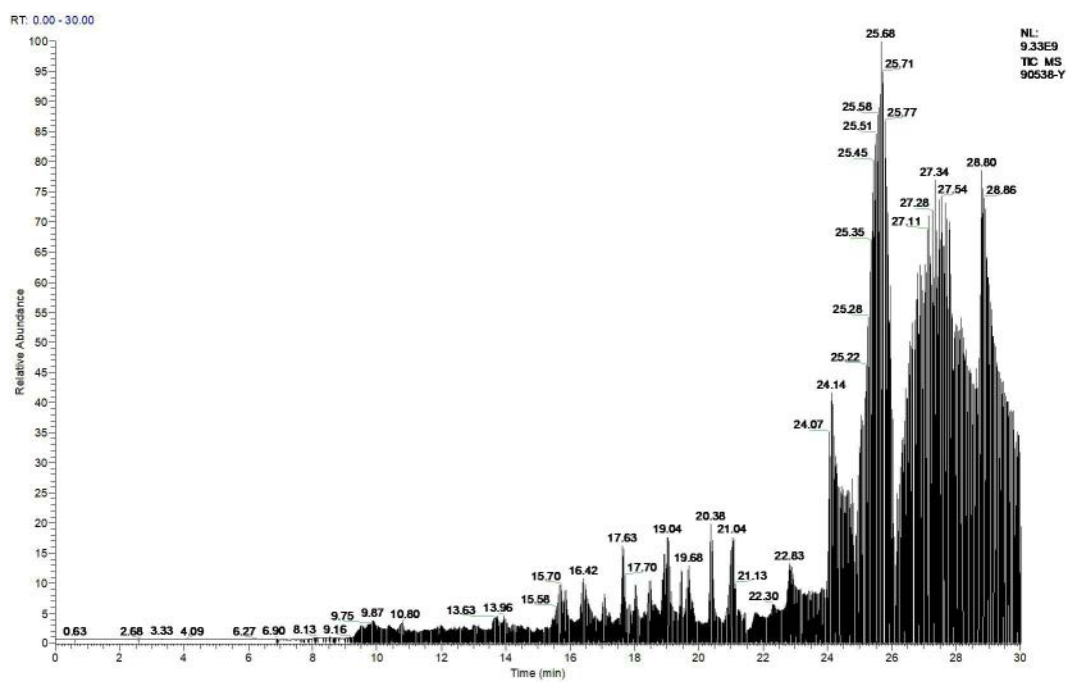


图8

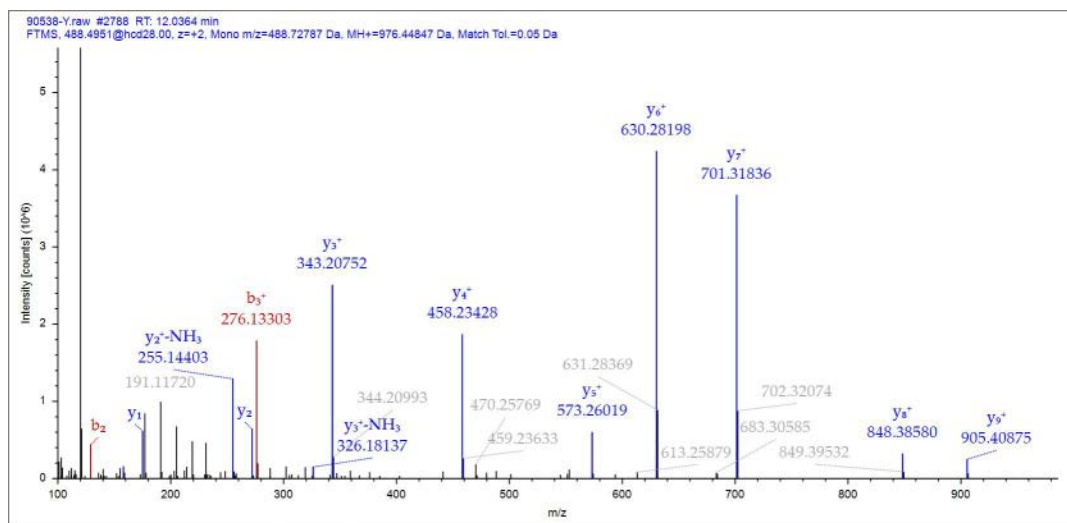


图9

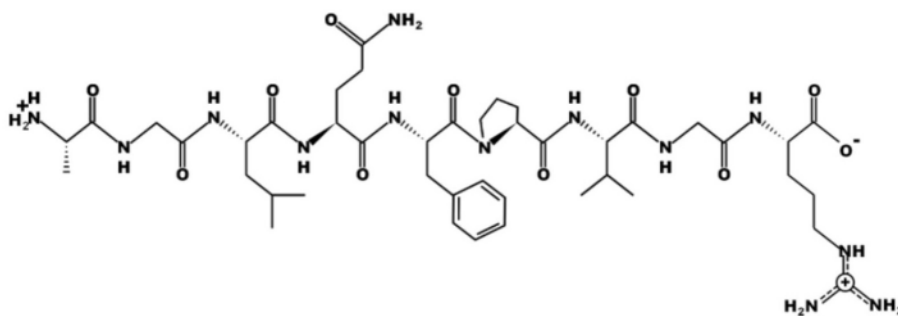


图10

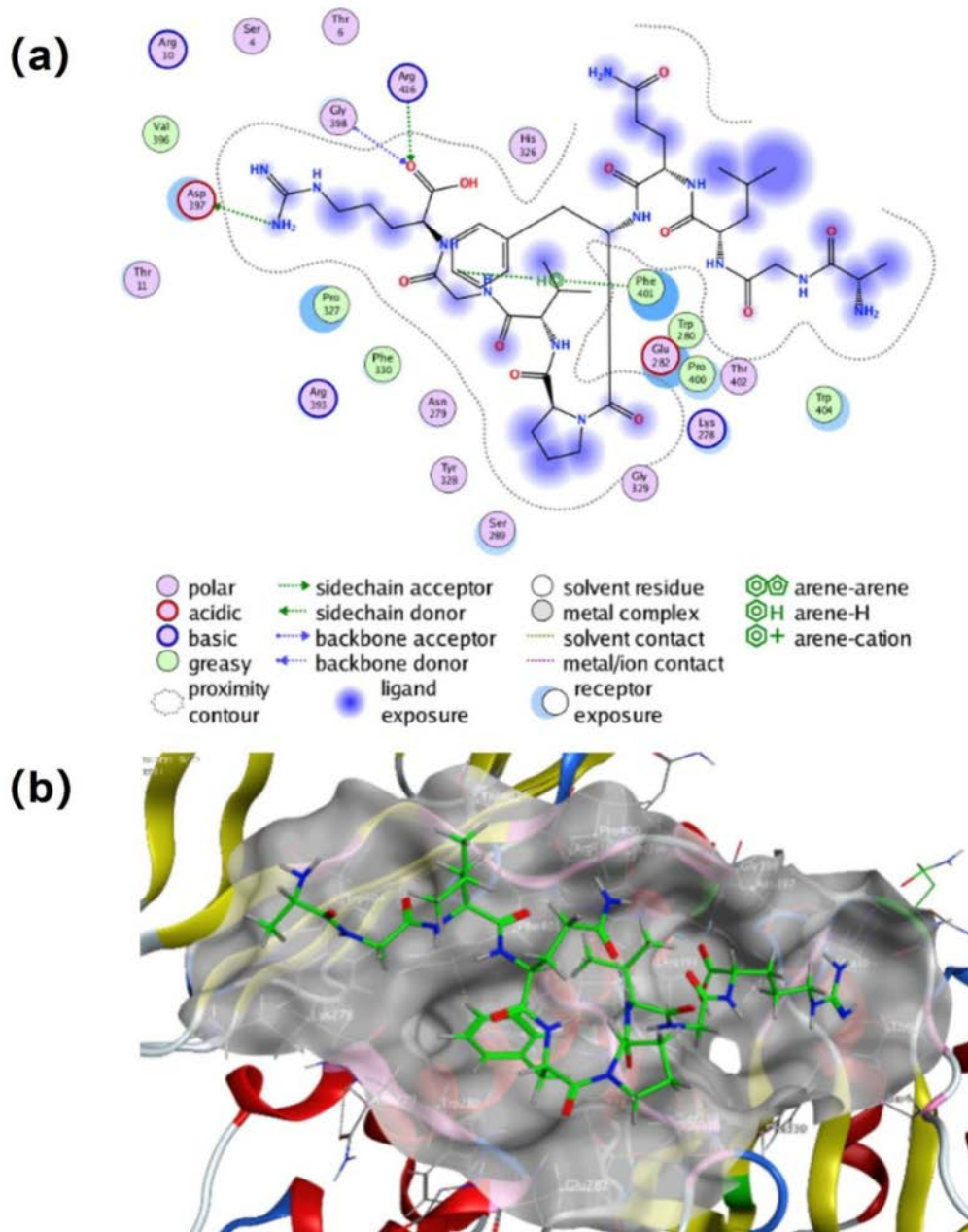


图11

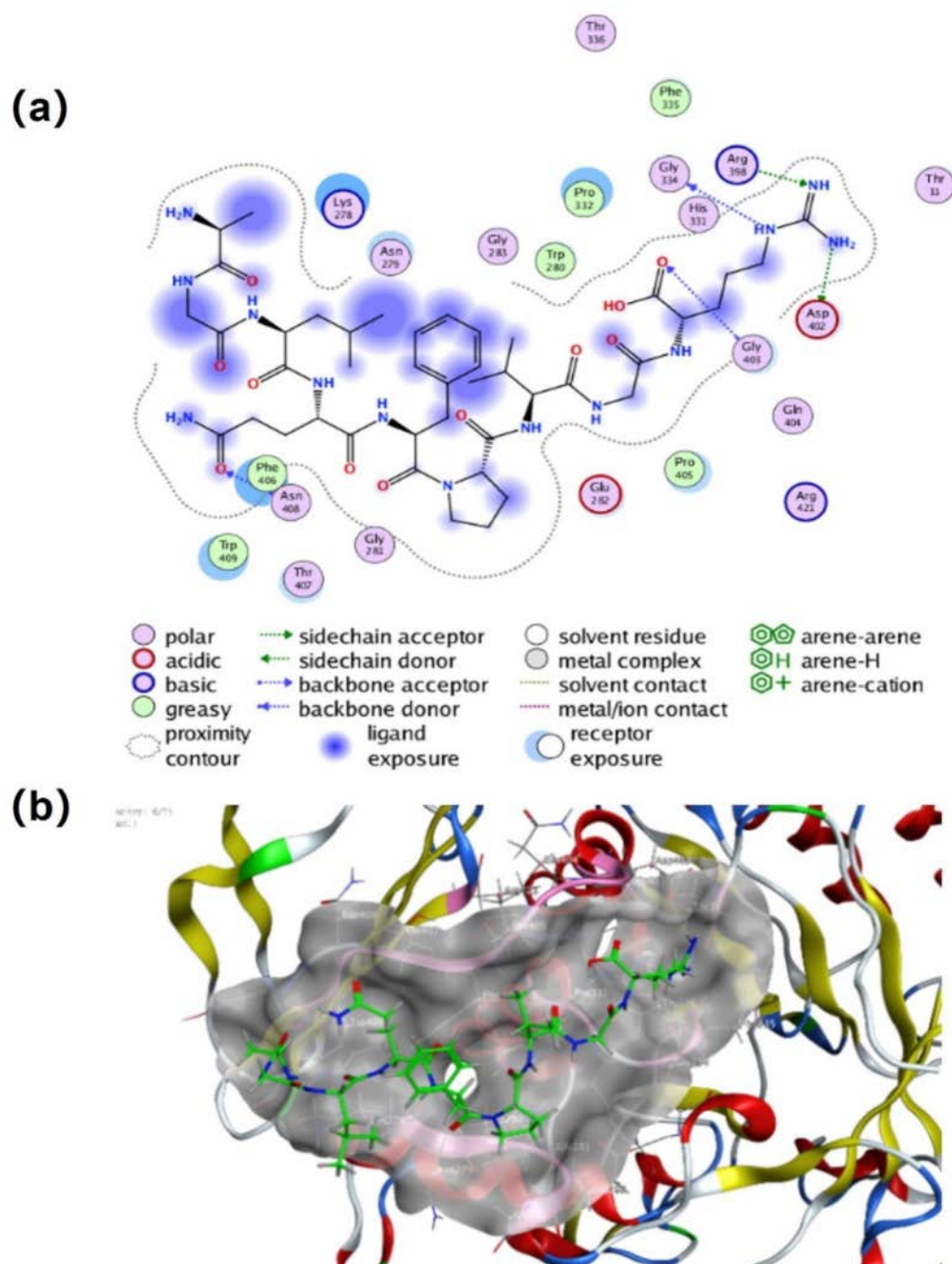


图12