

计算机模拟筛选坛紫菜中新型冠状病毒主蛋白酶抑制肽

曾巧辉¹, 周妙珊¹, 区灿盛¹, 邓森荣¹, 林妙銮¹, 彭名军², 王敬敬^{1*}

(1. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东省食品智能制造重点实验室, 广东佛山 528225)

(2. 广州市食品检验所, 广东广州 511400)

摘要: 新型冠状病毒感染 (COVID-19) 在我国的疫情流行和病亡数得到控制, 但该病毒仍具有感染性和传播性, 抑制新冠病毒主蛋白酶 (SARS-CoV-2 Mpro) 的活性能够降低感染病毒的概率。该研究从坛紫菜蛋白质中筛选出对 SARS-CoV-2 Mpro 具有抑制作用的多肽。通过文献检索搜集到 29 种坛紫菜蛋白质, 结合其预测的理化性质及潜在致敏性筛选出 10 种具有代表性的坛紫菜蛋白, 对 10 种坛紫菜蛋白进行模拟胃肠道水解筛选出 (2 ≤ 肽段长度 ≤ 5) 肽段后, 对坛紫菜源多肽的理化性质进行预测筛选, 得到 21 条亲水、无毒且无潜在致敏性的肽段作为配体, 以 SARS-CoV-2 Mpro 为受体, 采用分子对接技术筛选与靶蛋白有较好亲和作用的生物活性肽, 通过 2D 和 3D 可视化分析生物活性肽与靶蛋白的结合模式及相互作用。结果发现, 部分活性肽可进入靶蛋白的活性中心, 且通过氢键作用、 π 键作用以及烷基作用与 SARS-CoV-2 Mpro 结合。其中, 结合分数最高的多肽是 DGSF (145.441), 其次是 DQF (143.819) 和 DGPW (141.446), 表明多肽对 SARS-CoV-2 Mpro 具有潜在抑制作用。综上所述, 坛紫菜蛋白质具备作为后疫情时代营养补充剂的潜力。

关键词: 坛紫菜; 生物活性肽; 新冠主蛋白酶; 计算机模拟; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2025)05-89-103

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.5.0350

Screening for Novel SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitory Peptides from *Porphyra haitanensis* via Computer Simulation

ZENG Qiaohui¹, ZHOU Miaoshan¹, OU Cansheng¹, DENG Senrong¹, LIN Miaoluan¹, PENG Mingjun²,
WANG Jingjing^{1*}

(1. Guangsong Provincial Key Laboratory of Intelligent Food Manufacturing, College of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, China)

(2. Guangdong Institute for Food Control, Guangzhou 511400, China)

Abstract: While the COVID-19 pandemic and COVID-19-related mortality in China have been under control, SARS-CoV-2 remains infectious and transmissible. Inhibiting the activity of SARS-CoV-2 main protease (SARS-CoV-2 Mpro) can

引文格式:

曾巧辉,周妙珊,区灿盛,等.计算机模拟筛选坛紫菜中新型冠状病毒主蛋白酶抑制肽[J].现代食品科技,2025,41(5):89-103.

ZENG Qiaohui, ZHOU Miaoshan, OU Cansheng, et al. Screening for novel SARS-CoV-2 main protease inhibitory peptides from *Porphyra haitanensis* via computer simulation [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(5): 89-103.

收稿日期: 2024-03-21

基金项目: 广东省教育厅创新强校项目 (2022KTSCX120); 广东省科技创新战略专项资金 (2022B1212010015); 广东省市场监督管理局科研攻关项目 (2022CS01)

作者简介: 曾巧辉 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: z_qh2011@163.com

通讯作者: 王敬敬 (1986-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品蛋白的构效关系及高质化利用, E-mail: w_j2010@126.com

reduce viral infectivity. A screen for peptides from *Porphyra haitanensis* proteins with inhibitory potency toward SARS-CoV-2 Mpro was performed, and twenty-nine *P. haitanensis* proteins identified through a literature search. Ten representative proteins were selected from among them based on predicted physicochemical properties and potential allergenicity. These representative proteins were subsequently subjected to simulated gastrointestinal hydrolysis to screen out the peptides with lengths in the range of 2~5 amino acids. These were subjected to predictive screening based on the physicochemical properties of the peptides of *Porphyra haitanensis*. Twenty-one hydrophilic and non-toxic peptides with no potential allergenicity were identified and assessed as ligands for the receptor SARS-CoV-2 Mpro. Bioactive peptides with high affinity for the target protein were identified by molecular docking, and the binding modes and interactions between the bioactive peptides and the target protein were analyzed by 2D and 3D visualization. Some of the active peptides entered the active center of the target protein and bound to SARS-CoV-2 Mpro forming hydrogen bonds, π -bonds, and alkyl bonds. The peptide that exhibited the highest bound fraction was DDGSF (145.441), followed by DQF (143.819), and then DGPW (141.446). These studies suggest that peptides have the potential to inhibit SARS-CoV-2 Mpro, and that *P. haitanensis* proteins thus have potential as nutritional supplements with possible protective efficacy against SARS-CoV-2.

Key words: *Porphyra haitanensis*; bioactive peptides; SARS-CoV-2 Mpro; computer simulation; molecular docking

天然来源的新型生物活性产品已成为食品科学与技术研究的主要领域之一。坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)属红藻纲红毛菜科,是一类高蛋白、低脂肪等多种功能成分的营养食品,是我国特有的大型经济海藻之一^[1,2]。干坛紫菜中的粗蛋白含量达30%~50%,是蛋白质含量最丰富的海藻之一,且坛紫菜蛋白具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等功效^[3]。鉴于此,本研究以坛紫菜为原料,深入研究坛紫菜蛋白的功能及作用,进一步探索坛紫菜核心价值,发掘坛紫菜作为药用及保健用品所具有的应用潜力。

冠状病毒(SARS-CoV-2)通过入侵人体呼吸系统而导致新型冠状病毒感染(COVID-19)^[4],该病毒具备传染性强、传播性广的特点,对公共卫生造成了严重的威胁^[5]。冠状病毒主蛋白酶(SARS-CoV-2 Mpro)在病毒的复制过程中起着重要作用^[6,7],借鉴前人的研究,SARS-CoV-2 Mpro成为SARS-CoV-2药物研发的理想靶点^[8,9]。SARS-CoV-2 Mpro抑制剂主要分为类肽和非类肽抑制剂,目前人们主要着重于类肽抑制剂的开发^[6]。多肽是蛋白质水解的中间产物,低分子量的食物源多肽被证明具有更高的吸收效率和功能作用,包括抗病毒作用^[10,11]。高立芳等^[12]从食源性蛋白中预测筛选具有蛋白酶激活受体2(Protease Activated Receptor 2, PAR2)抑制作用的生物活性肽,为蛋白酶激活受体2(PAR2)抑制剂的发掘提供参考依据。王浩等^[13]基于一珠一化合物(One-bead-one-compound, OBOC)法建立多肽库用于筛选具有蛋白靶向功能

的多肽,体现了多肽具有良好的抗病毒作用。因此,以SARS-CoV-2 Mpro作为药物理想靶点,探究后疫情时代人体健康与营养,开发新型营养补充剂,避免重大安全事故再次发生十分有必要。

计算机分子对接是模拟受体和配体之间通过能量匹配和几何匹配而相互识别的过程,已被广泛运用于虚拟筛选活性物质等领域^[14,15]。虚拟筛选和鉴定是一种简单高效的方法,可以更快、更经济地预测结果^[16]。将分子对接技术应用于模拟活性肽与SARS-CoV-2 Mpro的对接过程,探究其结合机制可以帮助我们筛选SARS-CoV-2 Mpro的抑制剂^[17]。国内外研究团队在利用分子模拟研究SARS-CoV-2的防治药物方面做出颇多成果。苏可盈等^[18]利用分子对接将石金钱龟低聚肽序列与SARS-COV-2棘突蛋白(S蛋白)进行对接,认为对SARS-COV-2棘突蛋白(S蛋白)具有高亲和力的多肽有较强的抑制SARS-COV-2病毒作用的潜能。计算机模拟分子对接可以有效筛选SARS-CoV-2 Mpro的潜在抑制剂,为COVID-19药物的开发提供了新的思路^[19]。

SARS-CoV-2仍对人类的健康造成威胁^[20],因此探究能够对抗SARS-CoV-2 Mpro的多肽,对人类的生命安全具有重要的意义。本研究以坛紫菜蛋白为目标对象,利用计算机进行虚拟酶解、分子对接等方法,旨在找到对SARS-CoV-2 Mpro具有优秀抑制能力的多肽,从而为以SARS-CoV-2 Mpro为靶点的药物设计及实验研究提供线索与理论参考。

1 材料与方法

1.1 坛紫菜蛋白的查找

查阅文献确定了目前坛紫菜的主要蛋白质，根据 Pan 等^[21]和黄秋颜等^[22]的研究，应用高通量蛋白质组学及生物信息学技术分析坛紫菜蛋白质谱，并通过 GO 分析显示，坛紫菜蛋白质的主要功能是催化活性、结合活性、转运蛋白活性、结构分子活性，发现其中有 29 种蛋白质被鉴定为具有抗氧化活性。29 种蛋白质的具体信息如表 1 所示。

1.2 坛紫菜蛋白理化性质预测及模拟酶解

蛋白质数据库 Expasy (<https://www.expasy.org/>) 可用于预测蛋白质分子的总平均亲水性、分子量、等电

点、不稳定指数、脂溶性指数等理化指标。Allergen FP 数据库 (<https://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/>) 是一个预测蛋白质潜在致敏性的在线平台，可预测蛋白质的潜在致敏性。利用 Expasy 和 Allergen FP 对筛选出来的 29 种坛紫菜蛋白质的理化性质进行预测，筛选得到稳定性高、亲水性好且无潜在致敏性的坛紫菜蛋白作为可用于模拟酶解的候选蛋白。利用活性肽数据库 BIOPEP (https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php) 的“酶作用 (enzyme action)”功能对上述候选坛紫菜蛋白进行模拟酶解，蛋白信息如表 1 所示，用胃蛋白酶 (EC 3.4.23.1)、胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4) 和胰凝乳蛋白酶 (EC 3.4.21.1) 模拟胃肠消化，筛选 2~5 个氨基酸序列的多肽。水解度的计算可通过理论水解度 TDH 来进行表示^[12]。

表 1 坛紫菜蛋白质名称及其基因库

Table 1 Protein names and gene library numbers of *Porphyra haitanensis*

序号	基因库号	蛋白质名称	长度/(aa)
1	ACF21010.1	cytosolic ascorbate peroxidase [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	242
2	PXF43557.1	L-ascorbate peroxidase 3, peroxisomal [<i>Gracilariopsis chorda</i>]	290
3	AFS17267.1	manganese superoxide dismutase [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	224
4	AHA41527.1	Cu-Zn SOD [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	216
5	OSX71607.1	hypothetical protein BU14_0519s0021 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	209
6	OSX72839.1	hypothetical protein BU14_0401s0010 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	203
7	GAO51048.1	hypothetical protein G7K_5160-t1 [<i>Saitoella complicata</i> NRRL Y-17804]	355
8	OSX70349.1	hypothetical protein BU14_0782s0005 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	149
9	OSX69999.1	hypothetical protein BU14_0961s0002 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	198
10	PXF43189.1	NADPH-dependent thioredoxin reductase 3 [<i>Gracilariopsis chorda</i>]	553
11	OSX80786.1	hypothetical protein BU14_0032s0044 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	485
12	AGG09149.1	glutathione reductase [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	548
13	AFX60859.1	glutathione peroxidase [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	184
14	OSX80978.1	hypothetical protein BU14_0027s0004 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	204
15	AJA71277.1	PrxR [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	162
16	OSX69131.1	hypothetical protein BU14_1818s0002 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	296
17	OSX72151.1	hypothetical protein BU14_0463s0013 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	152
18	OSX79089.1	hypothetical protein BU14_0087s0036 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	660
19	OSX73494.1	hypothetical protein BU14_0342s0014 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	682
20	OSX69338.1	hypothetical protein BU14_1608s0003 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	223
21	OSX73494.1	hypothetical protein BU14_0342s0014 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	682
22	OSx70981.1	hypothetical protein BU14_0622s0009 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	689
23	OSX72317.1	hypothetical protein BU14_0446s0012 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	355
24	OSX74390.1	hypothetical protein BU14_0291s0009 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	187
25	AGN54275.1	lipoxygenase 2 [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	899
26	OSX77353.1	hypothetical protein BU14_0152s0048 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	510
27	AFQ59981.1	lipoxygenase [<i>Neoporphyra haitanensis</i>]	898
28	MBL8254545.1	thioredoxin family protein [Candidatus Competibacter sp.J]	193
29	OSX71956.1	hypothetical protein BU14_0486s0002 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	254

$$B=\frac{d}{D}\times 100\%$$

(1)

式中：
B——蛋白质水解过程中被裂解的肽键数与给定蛋白质的总肽键数之比（TDH），%；
D——蛋白质中肽键总数；
d——氢的数目。

1.3 坛紫菜源多肽理化性质预测

使用 PeptideRanker 数据库 (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 筛选具有生物活性潜力的肽段，将 BIOPEP 数据库模拟酶解坛紫菜蛋白质产生的肽段氨基酸序列输入到网站中，可得到一个介于 0~1 之间的评分，分数高于 0.5 表明肽段具有生物活性潜力^[23]。依次对具有生物活性潜力多肽的毒性、水溶性、潜在致敏性进行预测。Innovagen 网站 (<http://www.innovagen.com/>) 可用于预测多肽的亲水性。ToxinPred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi_submit.php) 是一个用于预测多肽潜在毒性的网站。将 BIOPEP 数据库模拟酶解坛紫菜蛋白质产生的肽段输入至 PeptideRanker 数据库中，产生分数高于 0.5 的肽段作为潜在生物活性肽，将潜在生物活性肽的氨基酸序列分别输入至 Innovagen、ToxinPred、Allergen FP 中预测其水溶性、毒性和潜在致敏性^[12]。亲水、无毒且无潜在致敏性的多肽可进一步用于分子对接。

1.4 SARS-CoV-2 Mpro 的获取与制备

选择的受体蛋白晶体为 COVID-19 Mpro 水解酶的高分辨率晶体结构，可从蛋白质数据库 RCSB PDB (<https://www.pdbus.org/>) 中获得，PDB 蛋白库编号为 6lu7。将 SARS-CoV-2 Mpro 的三维结构（PDB 编号：6lu7）导入 Discovery Studio 2019 软件中，对 SARS-CoV-2 Mpro 晶体结构进行修饰，除去晶体结构的水分子和小分子配体，继续处理 SARS-CoV-2 Mpro 晶体三维结构，对其进行加氢处理；选择 SARS-CoV-2 Mpro 复合蛋白晶体结构作为受体。SARS-CoV-2 Mpro 的三维结构见图 1 所示。SARS-CoV-2 Mpro 水解酶蛋白晶体上的 THR24、THR25、THR26、LEU27、ASN28 和 ASN119，共 6 个关键氨基酸，将其定义为 SARS-CoV-2 Mpro 在分子对接中的活性口袋^[23,24]，选中对接活性位点，生成活性口袋球，并将球的半径设为 10。处理好的 SARS-

CoV-2 Mpro 作为受体可与小分子肽进行分子对接。

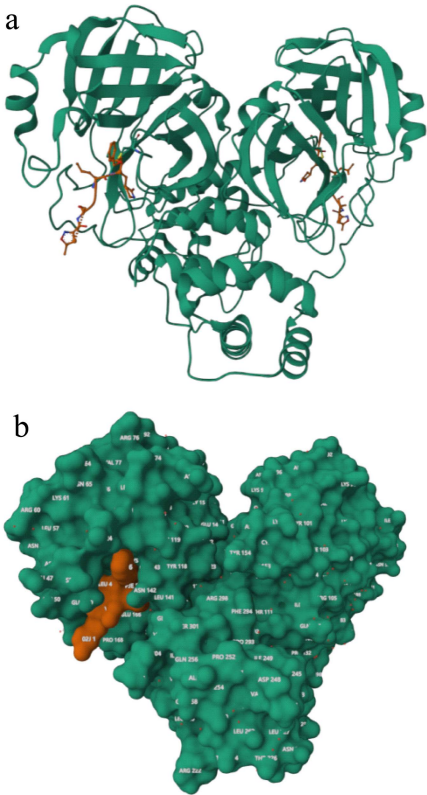


图 1 SARS-CoV-2 Mpro 三维结构

Fig.1 The three-dimensional structure of SARS-CoV-2 Mpro

1.5 高亲和力肽与 SARS-CoV-2 Mpro 的分子对接

首先根据肽段氨基酸序列构建肽段的三维结构，构建好选定肽段的初始结构后对肽段结构的反应环境设置 pH 值，根据血液 pH 值设为默认值即 pH 值为 7.4，对肽段进行能量最小化优化。将得到的小分子肽段与 SARS-CoV-2 Mpro 蛋白上确定的活性结合口袋进行 LibDock 半柔性分子对接，采用半柔性对接兼顾了数据的准确度和计算速度^[25]，选择构象参数为“BEST”，其余参数仍为默认值。对接成功的肽段结果按照 LibDock Score 分值高低降序排列，Libdock score 值越高表明 Libdock 对接结果越好，选定“Libdock score”打分值大于 120 的生物活性肽为分析对象^[26]，分析肽段与两种蛋白活性口袋中关键氨基酸形成的相互作用力，从而筛选出具有潜在 SARS-CoV-2 Mpro 抑制能力的肽段。最后将对接结果进行 2D、3D 可视化，分析其对接的影响及键位作用。

1.6 数据分析

所有数据均采用 Excel 软件进行分析。

表 2 筛选出的10种坛紫菜蛋白质的理化性质

Table 2 The physicochemical properties of 10 selected <i>Porphyra haitanensis</i> protein							
编号	蛋白质名称	总平均亲水性	分子量/ku	等电点	不稳定指数	脂溶性指数	链长/aa
a	hypothetical protein BU14_0152s0048	-0.534	57 235.2	6.04	31.69	72.33	510
b	cytosolic ascorbate peroxidase	-0.424	26 433.73	5.36	36.04	72.73	242
c	hypothetical protein BU14_0622s0009	-0.296	75 195.62	6.57	35.37	78.93	689
d	manganese superoxide dismutase	-0.277	24 476.42	5.75	31.04	74.11	224
e	hypothetical protein BU14_0087s0036	-0.214	70 239.05	8.78	34.29	76.62	660
f	hypothetical protein BU14_0032s0044	-0.154	51 972.92	6.08	25.63	83.24	485
g	hypothetical protein BU14_0486s0002	-0.062	25 489.5	10.01	31.55	77.2	254
h	hypothetical protein BU14_0401s0010	-0.052	21 546.29	7.02	34.03	80.84	203
i	hypothetical protein BU14_1818s0002	-0.039	30 426.43	5.87	24.74	90.14	296
j	glutathione peroxidase	-0.018	19 938.94	8.76	34.95	81.68	184

2 结果与讨论

2.1 坛紫菜蛋白质的理化性质及致敏性模拟

利用蛋白质数据库 Expasy 的 ProtParam 工具对筛选出来的 29 种坛紫菜蛋白质的理化性质进行预测，包括蛋白分子的总平均亲水性、分子量、等电点、不稳定指数、脂溶性指数等理化指标，并对这 29 种蛋白质进行筛选。在 Expasy 数据库中，不稳定性系数的指数小于 40，说明蛋白稳定。由此，从蛋白质稳定性方面着手，筛去不稳定系数大于 40 的蛋白质。在本次实验 29 种蛋白质中，不稳定指数大于 40 的共有 9 种，这 9 种蛋白质均被筛除。再筛选亲水性较好的蛋白质进行后续实验，在数据库中总平均亲水性，定义为序列中所有氨基酸亲水值的总和与氨基酸数量的比值，负值越大表示亲水性越好，正值越大表示疏水性越强，模拟环境为人体胃肠道，亲水性较好的蛋白质更有利于人体内的酶解和吸收，由此筛选亲水性好的蛋白质作为酶解的目标蛋白质，在 20 种蛋白质中总平均亲水性为负数的共有 11 种（-0.018~-0.534），表明这 11 种均具有较好的亲水性。最后利用 Allergen FP 数据库（一个预测蛋白质潜在致敏性的在线平台）预测坛紫菜蛋白质的潜在致敏性，发现在这 11 种蛋白质中有 1 种为可能潜在致敏性，由此筛去此蛋白，剩余 10 种蛋白均无潜在致敏性，最终得到 10 个蛋白质作为进一步筛选的目标蛋白，这 10 种蛋白质分别为 hypothetical protein BU14_0152s0048、cytosolic ascorbate peroxidase、hypothetical protein BU14_0622s0009、manganese superoxide

dismutase、hypothetical protein BU14_0087s0036、hypothetical protein BU14_0032s0044、hypothetical protein BU14_0486s0002、hypothetical protein BU14_0401s0010、hypothetical protein BU14_1818s0002、glutathione peroxidase，分别按 a~j 的顺序给这些蛋白质编号，以方便后续表达。这 10 种蛋白质的理化性质如表 2 所示。10 种蛋白质的分子量在 20~60 ku，其中，分子量范围为 20~30 ku 的蛋白质最多；蛋白质的等电点小于 6.5，属于中性蛋白质（6.5<pl<7.5），等电点大于 7.5 属于碱性蛋白质^[27]，10 种蛋白质的等电点（pI）在 5.36~10.01 之间，其中有 5 种酸性蛋白质，2 种中性蛋白质，其余为碱性蛋白质。

2.2 坛紫菜蛋白的人体胃肠道酶解模拟

用三种胃肠道蛋白酶（胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶）对 10 种坛紫菜蛋白质进行模拟水解，结果如图 2 所示。蛋白的水解度（TDH）在 30%~40% 范围内，水解产物寡肽（2≤肽段长度≤5）的占比在 40%~60% 之间，具体结果如图 2 所示。结果显示，10 种坛紫菜蛋白肽模拟胃肠道水解，水解度最高的是 ypothetical protein BU14_1818s0002（40.12%），水解后 2~5 个氨基酸序列的多肽占比为 51.94%，其次是 hypothetical protein BU14_0401s0010（39.42%），寡肽占比为 49.08%，而水解度最低的是 glutathione peroxidase（31.37%），寡肽占比 51.85%；水解后氨基酸个数为 2~5 个的多肽占比最高的是 hypothetical protein BU14_0152s0048（56.18%），占比最低的是 hypothetical protein BU14_0622s0009（38.89%）。

表 3 坛紫菜蛋白质生物活性肽
Table 3 Bioactive peptides in *Porphyra haitanensis* protein

序号	蛋白质名称	生物活性肽数	生物活性肽
a	hypothetical protein BU14_0152s0048	18	GF、AF、SF、DF、CR、PVF、VF、PL、PQPL、PEW、DDF、GY、QDF、PY、GGIL、EF、GAL、SPGN
b	cytosolic ascorbate peroxidase	12	GF、AF、DGPW、SGF、VGW、TF、GIM、GR、GAVW、CH、DVF、PH
c	hypothetical protein BU14_0622s0009	37	GF、PF、AF、AW、SF、PDW、PSF、PCL、CL、TF、SAF、VF、GGR、IGM、GL、VW、PR、GR、GDM、AM、GPGN、SSF、SADAF、CPK、CN、GQGL、PIR、EW、IGL、SGL、AGR、STW、APAR、QGL、GH、DPAY、AIPDY
d	manganese superoxide dismutase	15	AF、AW、PAF、SF、GSF、GSGW、PPL、PL、GL、PY、SGGL、GGAL、IASW、DVW、SGGGH
e	hypothetical protein BU14_0087s0036	26	GF、PF、PAW、GM、SF、QF、PPL、PPY、TF、PIPL、GAM、PL、GL、PR、GR、AM、DQF、SSF、SGGR、PAL、ADSF、PAR、PGGSY、AGY、ADTIW、DPAY
f	hypothetical protein BU14_0032s0044	19	CF、GF、GW、GM、PM、DF、GGL、VF、PL、SDF、GR、GY、IM、DDGSF、EF、AVF、GAR、GDL、APVPR
g	hypothetical protein BU14_0486s0002	9	AF、DF、GG、GR、AM、IGL、AAM、GDL、PSL
h	hypothetical protein BU14_0401s0010	7	GSF、GSGW、SAF、GL、VW、SM、DVW
i	hypothetical protein BU14_1818s0002	9	AF、DF、GG、GR、AM、IGL、AAM、GDL、PSL
j	glutathione peroxidase	13	PF、QF、QW、PL、GL、PCN、CAL、DPL、DIAAF、TAF、GAEF、PGVL、PQL

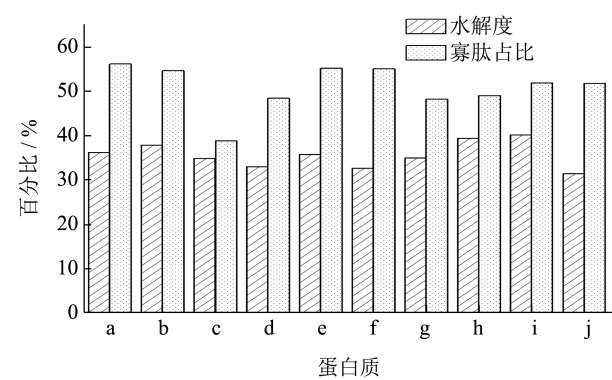


图 2 坛紫菜蛋白质水解度及寡肽占比
Fig.2 Hydrolysis degree of *Porphyra haitanensis* protein and proportion of oligopeptides

对 10 种坛紫菜蛋白质进行计算机虚拟酶解，统计了各蛋白质释放的生物活性肽数如表 3 所示，其中生物活性肽最多的是 hypothetical protein BU14_0622s0009，经活性肽数据库 BIOPEP 模拟胃肠道酶解后得到 37 个其 PeptideRanker 评分高于 0.5 的肽段，这些肽段作为潜在生物活性肽；其次是 hypothetical protein BU14_0087s0036 模拟酶解后得到 26 个潜在生物活性肽。得到的生物活性肽经筛选后可作为下一步对接的主要配体与 SARS-CoV-2 Mpro（受体）进行分子对接。在评估的 10 种坛紫菜蛋白质中，筛去同类型重复肽段，一共得到 107 个生物活性多肽作为分子对接的候选配体，其中

所含的活性肽个数最多的蛋白分别是 hypothetical protein BU14_0622s0009（含 37 种生物活性肽）和 hypothetical protein BU14_0087s0036（含 26 种生物活性肽），两种蛋白的氨基酸数量分别是 689aa 和 660aa，是 10 种坛紫菜蛋白质中氨基酸含量最多的两种蛋白质，同时，上述两种坛紫菜蛋白经模拟酶解后产生的多肽数量较多，如表 3 所示，即可能存在更多的生物活性肽，可作为后续研究的重点关注蛋白质。

虚拟筛选技术与传统实验的高通量筛选相比，是一种更直接并且更可靠的药物发现方法。该方法由于其花费低、效率高等优点，广泛运用于药物的前期筛选^[14,28]。用三种胃肠酶对 10 种坛紫菜蛋白进行水解中含有的蛋白质进行水解，水解度最高的坛紫菜蛋白质是 hypothetical protein BU14_0152s0048，蛋白质的水解度越高表明其在人体中的利用价值越大。随着蛋白质的水解度增加，分子量小于 200 ku 的多肽组分减少，分子量为 200~1 000 ku 的组分含量增加，并通过影响多肽的分子量组成来影响酶解液的生物利用度^[29]。超低分子量寡肽是由 2~4 个氨基酸构成的肽，其分子量一般在 180~480 ku，计算机模拟酶解坛紫菜蛋白质的水解度越高，得到的超低分子量寡肽的概率就越高，酶解得到 2~5 个氨基酸的多肽就越多。

表 4 坛紫菜源生物活性肽的理化性质预测结果

Table 4 The prediction results of bioactive peptides from *Porphyra haitanensis*

序号	生物活性肽	来源蛋白	亲水性	潜在致敏性
1	GF	a、b、c、f	—	致敏
2	AF	a、b、c、d、g、i	—	—
3	SF	a、c、d、e	—	—
4	DF	a、f、g、i	好	致敏
5	CR	a	好	致敏
6	PVF	a	—	—
7	VF	a、c、f	—	—
8	PL	a、d、e、f、j	—	致敏
9	PQPL	a	—	—
10	PEW	a	好	—
11	DDF	a	好	致敏
12	GY	a、f	—	—
13	QDF	a	好	—
14	PY	a、d	—	致敏
15	GGIL	a	—	致敏
16	EF	a、f	好	—
17	GAL	a	—	—
18	SPGN	a	好	—
19	DGPW	b	好	—
20	SGF	b	—	—
21	VGW	b	—	—
22	TF	b、c、e	—	—
23	GIM	b	—	致敏
24	GR	b、c、e、f、g、i	好	致敏
25	GAVW	b	—	致敏
26	CH	b	—	致敏
27	DVF	b	好	致敏
28	PH	B	—	—
29	PF	c、e、j	—	致敏
30	AW	c、d	—	致敏
31	PDW	c	好	致敏
32	PSF	c	—	—
33	PCL	c	—	致敏
34	CL	c	—	致敏
35	SAF	c、h	—	致敏
36	GGR	c	好	致敏
37	IGM	c	—	—
38	GL	c、d、e、h、j	—	致敏
39	VW	c、h	—	—

续表4

序号	生物活性肽	来源蛋白	亲水性	潜在致敏性
40	PR	c、e	好	致敏
41	GDM	c	好	—
42	AM	c、e、g、i	—	—
43	GPGN	c	—	—
44	SSF	c、e	—	—
45	SADAF	c	好	—
46	CPK	c	好	致敏
47	CN	c	好	—
48	GQGL	c	—	—
49	PIR	c	好	—
50	EW	c	好	致敏
51	IGL	c、g、i	—	—
52	SGL	c	—	—
53	AGR	c	好	—
54	STW	c	—	—
55	APAR	c	好	致敏
56	QGL	c	—	—
57	GH	c	—	致敏
58	DPAY	c、e	好	—
59	AIPDY	c	好	致敏
60	PAF	d	—	—
61	GSF	d	—	致敏
62	GSGW	d、h	—	致敏
63	PPL	d、e	—	致敏
64	SGGL	d	—	致敏
65	IASW	d	—	—
66	DVW	d、h	好	致敏
67	SGGGH	d	—	—
68	GF	e	—	致敏
69	PAW	e	—	—
70	GM	e、f	—	—
71	QF	e、j	—	致敏
72	PPY	e	—	—
73	PIPL	e	—	—
74	GAM	e	—	—
75	DQF	e	好	—
76	SGGR	e	好	—
77	PAL	e	—	—
78	ADSF	e	好	—
79	PAR	e	好	—

续表4

序号	生物活性肽	来源蛋白	亲水性	潜在致敏性
80	PGGSY	e	—	—
81	AGY	e	—	—
82	ADTIW	e	—	—
83	CF	f	—	—
84	GW	f	—	—
85	PM	f	—	—
86	GGL	f	—	—
87	SDF	f	好	—
88	IM	f	—	致敏
89	DDGSF	f	好	—
90	AVF	f	—	—
91	GAR	f	好	致敏
92	GDL	f、g、i	好	—
93	APVPR	f	好	—
94	GG	g、i	—	—
95	AAM	g、i	—	致敏
96	PSL	g、i	—	—
97	GSF	h	—	致敏
98	SM	h	好	—
99	QW	j	—	致敏
100	PCN	j	—	—
101	CAL	j	—	致敏
102	DPL	j	好	致敏
103	DIAAF	j	好	致敏
104	TAF	j	—	—
105	GAEF	j	好	—
106	PGVL	j	—	—
107	PQL	j	—	—

注：“—”指多肽无此特性。

2.3 坛紫菜源多肽的理化性质模拟

利用 Innovagen 对上述 107 个生物活性肽的水溶性进行预测，ToxinPred 用于预测多肽毒性，Allergen FP 用于预测多肽的潜在致敏性，发现 107 个坛紫菜源生物活性肽中，预测得到 37 条活性肽具有良好的亲水性，66 条活性肽不存在潜在致敏性，且全部多肽预测均无毒性。从中筛选得到 21 条亲水、无毒且无潜在致敏性的生物活性肽，如表 4 所示。

2.4 高亲和力活性肽与 SARS-CoV-2 Mpro 分子对接

选用 PDB 蛋白库编号为 6lu7（COVID-19 主

蛋白酶与抑制剂 N3 复合物的晶体结构）的 SARS-CoV-2 Mpro 作为分子对接的受体，6lu7 的高分率晶体结构由 Jin 等^[30]测得，为该研究提供了理论基础。本实验选用 6lu7 晶体结构并通过 Discovery Studio 2019 软件进行分子对接预处理和分子对接。图 3 为 SARS-CoV-2 Mpro 加氢前后的比对图，图 3 I 为加氢前的 SARS-CoV-2 Mpro，II 为加氢后的结果图，其主要改变是加氢后 SARS-CoV-2 Mpro 受体中暴露出更多的键位。选择 SARS-CoV-2 Mpro 晶体上的 THR24、THR25、THR26、LEU27、ASN28 和 ASN119 共 6 个关键氨基酸形成的 SARS-CoV-2 对接的活性口袋如图 III 所示，为一个球状体，该

口袋作为分子对接中多肽的对接场所。上述来源 21 条多肽通过 Discovery Studio 2019 软件与 SARS-CoV-2 Mpro 进行半柔性对接，一共得到 9 种 LibDock Score 分值高于 120 的活性肽，其分别为 DDGSF、DQF、DGPW、QDF、GAEF、SADAF、DPAY、SGGR、ADSF，如表 5 所示，这些分子都是被认为与 SARS-CoV-2 Mpro 有较好的结合能力。根据对接结果的 LibDock Score 值变化，筛选出与 SARSCoV-2 Mpro 结合亲和力最好的生物活性肽。结果显示，LibDock Score 最高的是 DDGSF (145.441)，其次是 DQF (143.819) 和 DGPW (141.446)，以上三条多肽可视为与 SARS-CoV-2 Mpro 具有高亲和力的多肽。步营等^[31]发现 15 条海洋生物活性肽与 SARS-CoV-2 Mpro 能够紧密结合，对接分数均高于 140，并在后续实验中证明，具有高结合亲和力的多肽能够抑制 SARS-CoV-2 Mpro 的表达。三条生物活性肽 DDGSF、DQF、DGPW 均能够与 SARS-CoV-2 Mpro 结合且对接分数高于 140，因此上述三条多肽被认为与 SARS-CoV-2 Mpro 具有较好结合能力，并认为以上三条坛紫菜源生物活性肽对 SARS-CoV-2 Mpro 具有较强的潜在抑制作用。

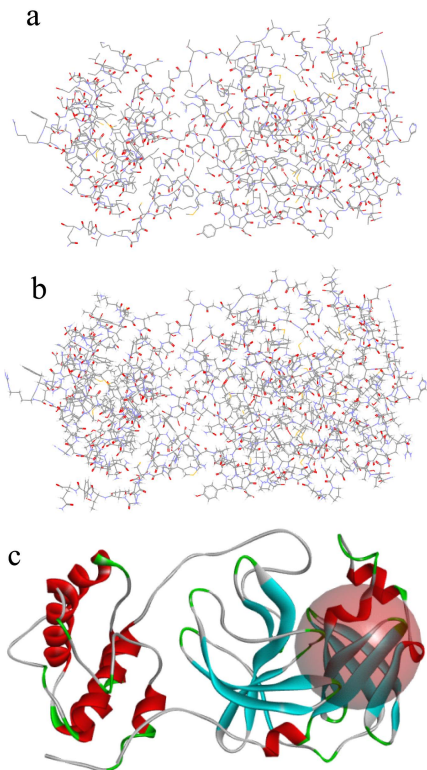
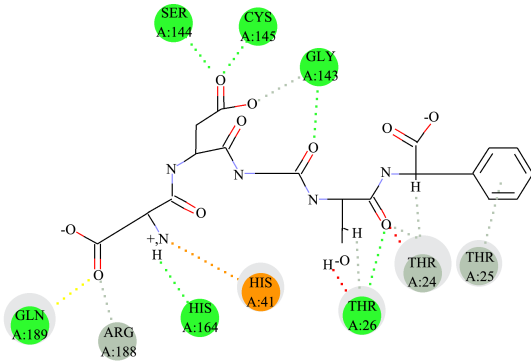
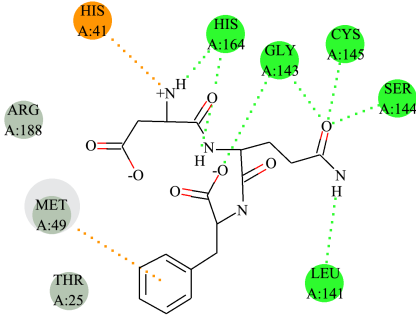


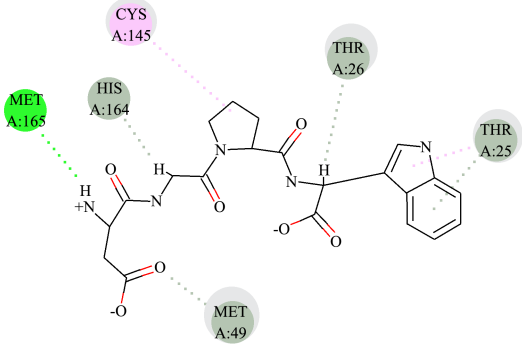
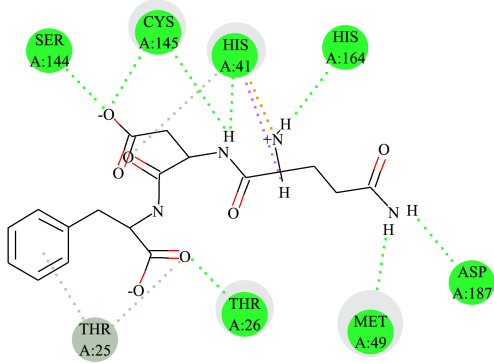
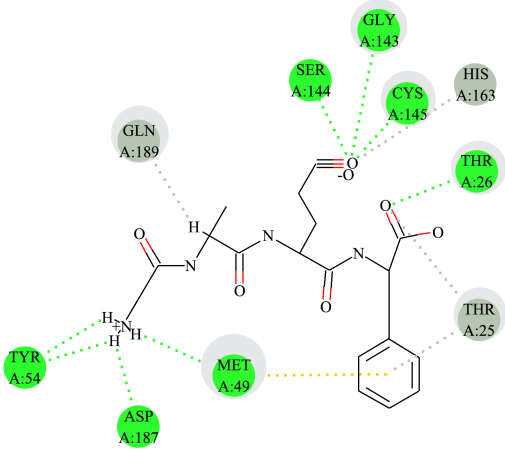
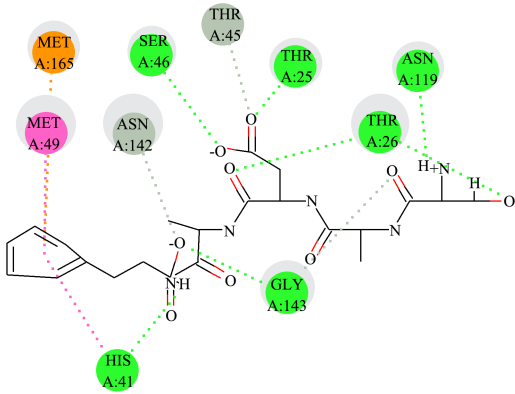
图 3 SARS-CoV-2 Mpro 结构
Fig.3 The structure of SARS-CoV-2 Mpro

注：a 表示 SARS-CoV-2 Mpro 加氢前，b 表示 SARS-CoV-2 Mpro 加氢后，c 红色球体中表示 SARS-CoV-2 Mpro 对接口袋。

表 5 SARS-CoV-2 Mpro高亲和力生物活性肽
Table 5 SARS-CoV-2 Mpro high affinity bioactive peptides

序号	多肽	对接分数	来源蛋白质	与主蛋白酶的结合位点
1	DDGSF	145.441	hypothetical protein BU14_0032s0044	
2	DQF	143.819	hypothetical protein BU14_0087s0036	

续表5

序号	多肽	对接分数	来源蛋白质	与主蛋白酶的结合位点
3	DGPW	141.446	cytosolic ascorbate peroxidase	
4	QDF	137.301	hypothetical protein BU14_0152s0048	
5	GAEF	132.605	glutathione peroxidase	
6	SADAF	129.974	hypothetical protein BU14_0622s0009	

续表5

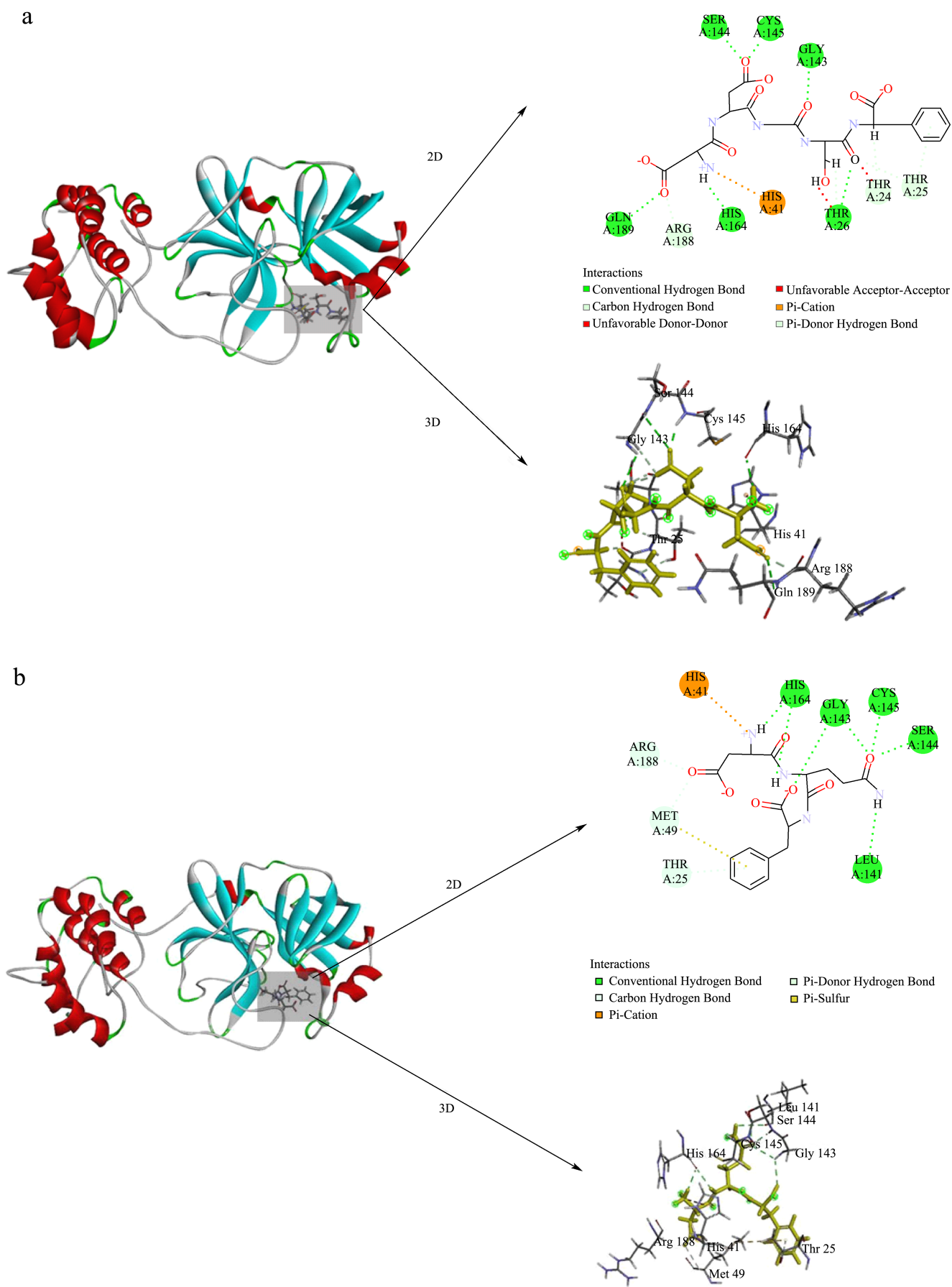
序号	多肽	对接分数	来源蛋白质	与主蛋白酶的结合位点
7	DPAY	128.880	hypothetical protein BU14_0087s0036、hypothetical protein BU14_0622s0009	
8	SGGR	126.986	hypothetical protein BU14_0087s0036	
9	ADSF	125.757	hypothetical protein BU14_0087s0036	

2.5 生物活性肽与SARS-CoV-2 Mpro的作用机制

据报道，抑制主要蛋白酶有助于限制病毒的成熟，从而降低人们感染 SARS-CoV-2 的概率^[32]。根据对接结果的 LibDock Score 值变化，筛选出与 SARS-CoV-2 Mpro 结合亲和力最好的生物活性肽。DDGSF、DQF、DGPW 与 SARSCoV-2 Mpro 具有高亲和力，它们被认为是抑制 SARS-CoV-2 Mpro 的最佳候选多肽。通过 Discovery Studio Visualizer 软件分析高亲和力多肽与 SARS-CoV-2 Mpro 之间的相互作用机制。如图 4 所示，DDGSF 与 SARS-CoV-2 Mpro 中的 Thr24、Thr25、Thr26、Gly143、Cys145、Ser144、Gln189、Arg188、His164 链接成氢键，与 His41 形成 π 键；DQF 与 SARS-CoV-2Mpro 中的 Thr25、Met49、Leu141、Gly143、Cys145、Ser144、

Arg188、His164 链接成氢键，与 His41 形成 π 键；DGPW 与 SARS-CoV-2 Mpro 中的 Thr25、Thr26、Cys145、His164、Met165 链接成氢键，其它高亲和性的生物活性肽亦主要以氢键、 π 键、烷基等方式与 SARS-CoV-2 Mpro 相互作用。

在 Jin 等^[30]的研究中，N3 分子与 6lu7 对应的晶体结构中 Gly143、His164、Glu166、Phe140、Gln189、His170 等位点形成多个氢键相互作用，与 Met49、His41、Met165、Leu167、Pro168、Ala191 形成多个烷基及 π 键相互作用，从而表现出抑制作用。通过分析结合模式，本研究中 3 种生物活性肽 DDGSF、DQF、DGPW 通过氢键、烷基、 π 键等非共价键相互作用与 SARS-CoV-2 Mpro 的关键位点形成稳定结构，而且部分作用残基与 N3 抑制剂的结合残基相似。因此，这些多肽很有可能起到结合并抑制 SARS-CoV-2 Mpro 的作用。



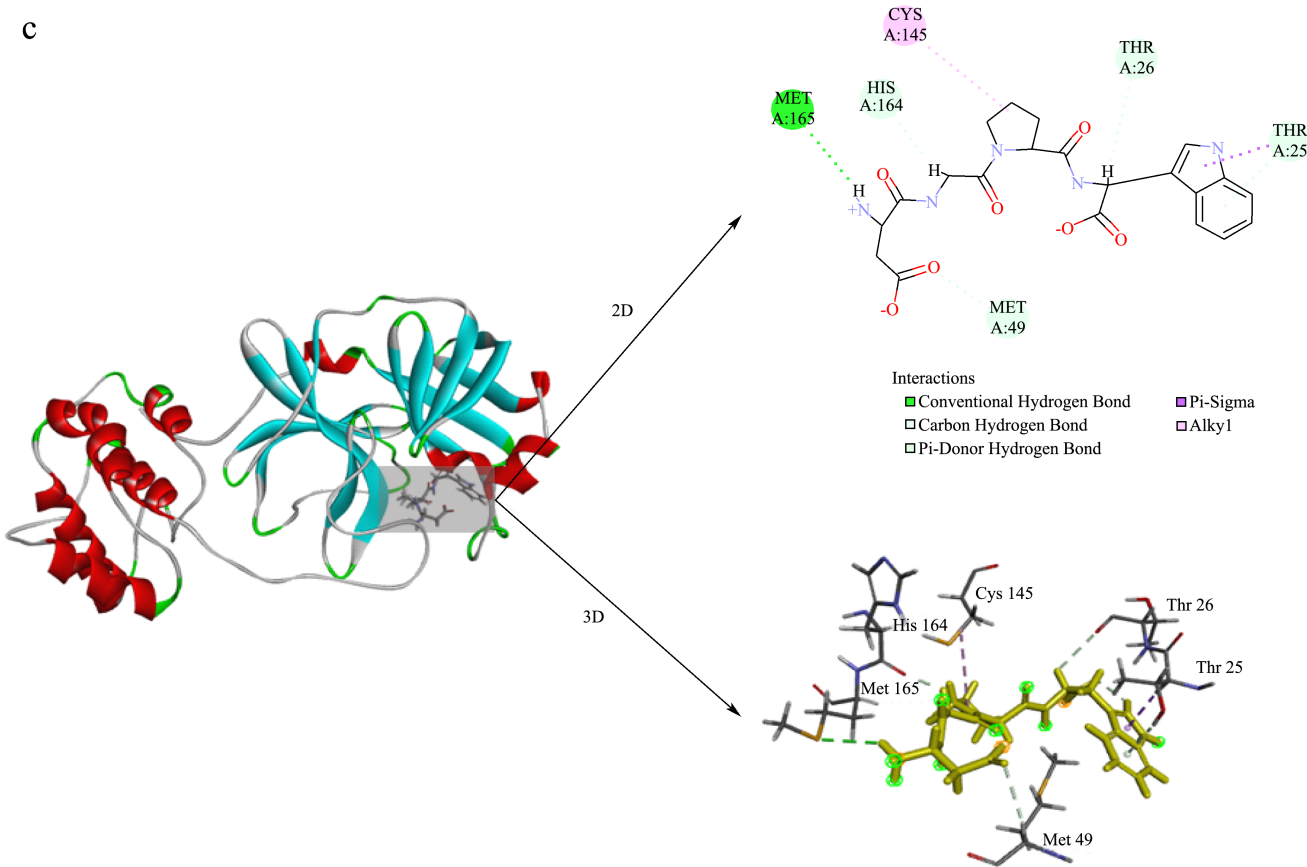


图 4 DDGSF、DQF、DGPW 与 SARS-CoV-2 Mpro 对接图以及 2D 和 3D 结构

Fig.4 The docking diagram, 2D and 3D structures of DDGSF, DQF, DGPW and SARS-CoV-2 Mpro

注：图中 a 为 DDGSF 与 SARS-CoV-2 Mpro 的对接结果，b 为 DQF 与 SARS-CoV-2 Mpro 的对接结果，c 为 DGPW 与 SARS-CoV-2 Mpro 的对接结果。

3 结论

坛紫菜是一类高蛋白、低脂肪、具有丰富多糖和矿物质的多功能营养食品，可广泛的应用于食品、药品、保健品等的开发。本研究以 29 种坛紫菜蛋白质为分析目标，利用 PeptideRanker 数据库对蛋白质进行理化性质的预测和利用，AllergenFP 数据库进行蛋白质致敏性预测，最终筛选得到 10 种坛紫菜蛋白质作为后续研究的目标蛋白质，10 种蛋白质模拟酶解后选用具有生物活性的肽进行虚拟筛选。本文采用分子对接技术，以 SARS-CoV-2 Mpro 为受体，对坛紫菜蛋白质模拟酶解获得的生物活性肽进行虚拟筛选。其中，多肽 DDGSF、DQF、DGPW 与 SARS-CoV-2Mpro 的结合力最强，具有较好的抑制潜力，可被认为是能够很好的预防和治疗 SARS-CoV-2 的候选多肽。因此，本研究可为新型冠状病毒主蛋白酶抑制肽的筛选提供思路。本研究是在计算机模拟下得到的结论，SARS-CoV-2 Mpro 与生物

活性肽之间在细胞或动物模型中的有效作用机制仍需要进一步验证。

参考文献

[1] 叶贤江,苏志琛,林晓娟,等.基于生物信息学与分子对接技术对坛紫菜降血压肽的筛选及活性分析[J].食品科学,2021,42(24):140-148.

[2] QIU Y J, JIANG H, FU L L, et al. Porphyrin and oligo-porphyrin originating from red algae *Porphyra*: Preparation, biological activities, and potential applications [J]. Food Chemistry, 2021, 349: 129209.

[3] 张钰源,翟兴月,佟长青,等.生物活性肽分子修饰的研究进展[J].农产品加工,2023,2:70-72.

[4] DEREK K C, ELIE A A, STEPHANIE D, et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis [J]. The Lancet, 2020, 395(10242): 1973-1987.

[5] SOONTAG J, DASEUL Y, ZHAOQI W, et al. Survival of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in foods

- and its inactivation by different methods [J]. Current Opinion in Food Science, 2024, 55: 101106.
- [6] DIMITRIOS V, ELENI P, THANASIS M, et al. Molecular mechanisms of the novel coronavirus SARS-CoV-2 and potential anti-COVID19 pharmacological targets since the outbreak of the pandemic [J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 146: 111805.
- [7] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. The Lancet, 2020, 395(10224): 565-574.
- [8] SUMIT A, GOVIND L, KESHAV M, et al. Identification of potential flavonoid inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease 6YNQ: a molecular docking study [J]. Digital Chinese Medicine, 2020, 3(4): 239-248.
- [9] NGUYEN M T, TRUNG H N, MINH Q P, et al. Upgrading nirmatrelvir to inhibit SARS-CoV-2 Mpro via DeepFrag and free energy calculations [J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2023, 124: 108535.
- [10] TANG X, JIN H, CHEN Y, et al. A membrane-anchored short-peptide fusion inhibitor fully protects target cells from infections of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and simian immunodeficiency virus [J]. Journal of Virology, 2019, 93(22): e01177-19.
- [11] 曾巧辉,郭槟勇,高立芳,等.计算机模拟纳豆源多肽与DPP-IV和SARS-CoV-2 Mpro的相互作用[J].现代食品科技,2023,39(6):142-153.
- [12] 高立芳,曾新安,金可沆,等.计算机模拟筛选食用藻蛋白源PAR2抑制肽[J].现代食品科技,2023,39(12):158-168.
- [13] 王浩,王磊,杨培培,等.靶向新型冠状病毒COVID-19的多肽及其应用[P].中国, 202010548504.2 2020-06-16
- [14] JIN J C, WANG N, WANG S L, et al. Targeting the main SARS-Cov-2 pathways with peptide inhibitors by molecular docking and molecular simulation approaches [J]. Journal of Molecular Liquids, 2024, 398(15): 124193.
- [15] 杨保军,梁琪,宋雪梅.基于计算机虚拟技术研究牦牛乳硬质干酪苦味肽的抑菌活性差异[J].食品与生物技术学报,2021,40(12):75-87.
- [16] SAMUEL J M S, ANTONINHO V. In silico investigation of Komaroviquinone as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Molecular docking, molecular dynamics, and QM/MM approaches [J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2024, 126: 108662.
- [17] SHI A M, GUO R, WANG Q, et al. Screening and molecular modeling evaluation of food peptides to inhibit key targets of COVID-19 virus [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 330.
- [18] 苏可盈,杨贵卓,戴庞聪,等.石金钱龟低聚肽制备工艺优化及其抑制新冠病毒的潜能[J].现代食品科技,2022, 38(8):80-88.
- [19] LI S M, WANG L X, MENG J H, et al. De Novo design of potential inhibitors against SARS-CoV-2 Mpro [J]. Computers in Biology and Medicine, 2022, 147: 105728.
- [20] CHAGUZA C, HAHN A M, PETRONE M E, et al. Accelerated SARS-CoV-2 intrahost evolution leading to distinct genotypes during chronic infection [J]. Cell Reports Medicine, 2023, 4(2): 100943.
- [21] PAN C, MA J R, TAO F T, et al. Novel insight into the antioxidant proteins derived from laver (*Porphyra haitanensis*) by proteomics analysis and protein based bioinformatics [J]. Food Bioscience, 2021, 42: 101134.
- [22] 黄秋颜,李斌,林晓蓉,等.基于高分辨质谱和网络药理学可可茶多酚降血糖活性研究[J].食品与机械,2023, 39(9):4-11.
- [23] 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.
- [24] XU J B, ZHAO S Z, TENG T S, et al. Systematic comparison of two animal-to-human transmitted human coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV [J]. Viruses, 2020, 12(2): 244.
- [25] 冯建慧.海参卵黄蛋白抗炎活性及机制研究[D].无锡:江南大学,2022.
- [26] 钱思彤,杨婷婷,黄健航,等.基于药效团模型筛选治疗新型冠状病毒肺炎DPP1抑制剂[J].化学研究与应用,2023, 35(2):379-388.
- [27] JI D, UDENIGWE C C, AGYEI D. Antioxidant peptides encrypted in flaxseed proteome: An *in silico* assessment [J]. Food Science and Human Wellness, 2019, 8(3): 306-314.
- [28] PHONGTHON K, AMPA S, SUWIMON M, et al. High-content screening of Thai medicinal plants reveals Boesenbergia rotunda extract and its component Panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 19963.
- [29] 问小龙,向极钎,张亮,等.莖叶碎米菜低聚肽制备工艺优化及结构特征,氧化活性研究[J].食品与机械,2024,1: 189-196.
- [30] JIN Z M, DU X Y, XU Y C, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors [J]. Nature, 2020, 582(7811): 289-293.
- [31] 步营,刘瑛楠,何玮,等.基于分子对接技术筛选抗SARS-CoV-2海洋活性肽的研究[J].包装与食品机械,2021, 39(4):18-23.
- [32] NAVNEET B, SOWMYA R K, GOPALAKRISHNAN B, et al. *De novo* design of new chemical entities for SARS-CoV-2 using artificial intelligence [J]. Future Medicinal Chemistry, 2021, 13(6): 575-585.