



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116836821 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 03

(21) 申请号 202311055902.0

C08B 37/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.08.21

A61K 31/726 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A61K 36/06 (2006.01)

GDMCC No:63583 2023.06.25

A61P 37/02 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

(71) 申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72) 发明人 张晓勇 龚皓彧 程咏仪 陈子慧
黄日明 黄立宇

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

专利代理师 陈思远

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

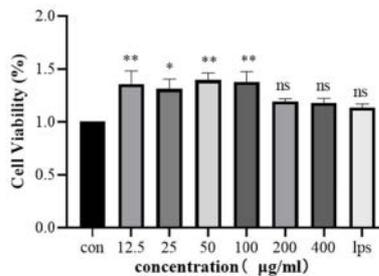
权利要求书1页 说明书10页 附图10页

(54) 发明名称

一种深海来源杂色曲霉SCAU214及其胞外多糖AVP-214-1的制备方法和应用

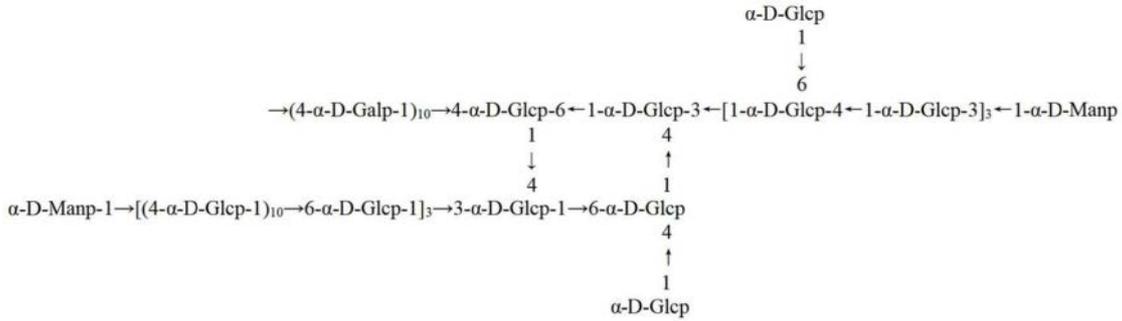
(57) 摘要

本发明公开了一种深海来源杂色曲霉SCAU214及其胞外多糖AVP-214-1的制备方法和应用。所述杂色曲霉SCAU214已于2023年6月25日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,其保藏号为GDMCC No:63583。对其进行发酵培养,提取纯化其代谢产物,获得其胞外多糖AVP-214-1,所述多糖AVP-214-1在较宽的浓度范围内(12.5~400 μg/mL)都可以促进巨噬细胞RAW 264.7的增殖,NO的释放量大于阳性对照组,剂量依赖性地刺激巨噬细胞RAW 264.7分泌的细胞因子IL-6、TNF-α,对巨噬细胞有较强的免疫刺激效果,是具有安全、高效的调节免疫活性作用。



1. 一种杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214, 其特征在于, 所述杂色曲霉 SCAU214 已于 2023 年 6 月 25 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 其保藏号为 GDMCC No: 63583。

2. 一种多糖, 其特征在于, 所述多糖的结构式为式 I 所示:



式 I。

3. 权利要求 1 所述杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214 或权利要求 2 所述多糖在制备调节免疫活性的产品中的应用。

4. 一种多糖的制备方法, 其特征在于, 由权利要求 1 所述的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214 发酵得到。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 对权利要求 1 所述的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214 的发酵产物进行过滤浓缩, 得过滤浓缩发酵产物。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法, 其特征在于, 去除过滤浓缩发酵产物的蛋白质, 得粗多糖。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法, 其特征在于, 对所述粗多糖进行大孔树脂分离纯化, 得大孔树脂分离纯化多糖。

8. 根据权利要求 7 所述的制备方法, 其特征在于, 对大孔树脂分离纯化多糖进行离子交换柱分离, 即得纯化多糖。

9. 一种调节免疫活性的产品, 其特征在于, 所述产品中含有权利要求 1 所述的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214 和/或其发酵产物。

10. 一种调节免疫活性的产品, 其特征在于, 所述产品中含有权利要求 2 所述的多糖。

一种深海来源杂色曲霉SCAU214及其胞外多糖AVP-214-1的制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及海洋微生物技术领域,具体地,涉及一种深海来源杂色曲霉SCAU214及其胞外多糖AVP-214-1的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 如今在化工、食品、化妆品等产业现有的方法普遍依赖化学制剂,在使用过程中可能会对环境或人体造成不可逆的影响,而生物胞外多糖是可生物降解的,通常无毒。多糖是世界上最丰富的有机质,它被用于多个工业领域,在食品中作为增稠剂、稳定剂和凝胶剂,在药理学中作为抗肿瘤、抗氧化剂和/或益生元。工业多糖的常见来源是植物、动物、真菌、藻类和细菌,目前主要来自藻类。但微生物胞外多糖有其独特的优势:由于微生物的生长条件可以严格监测,真菌和细菌具有高结构重现性的优势,而这对于植物和动物的来源是不可能的,因为动植物多糖的结构取决于气候、环境和饲料等不易控条件。

[0003] 另外,海洋由于其特殊的环境条件成为地球上生物多样性最丰富的栖息地之一,深海环境条件更为极端:没有阳光照射、低温、厌氧以及高静水压力。为了适应深海环境,深海真菌进化出了独特的生理结构和代谢途径,能够产生结构新颖的胞外多糖,并展现出了广泛的生物活性,这些生物活性化合物在保护真菌自身的同时,也为海洋药物研发提供了候选化合物。深海曲霉是深海真菌的一个重要组成种群。曲霉的代谢产物成分包括聚酮类、生物碱类、内酯类和萜类等多种结构类型。杂色曲霉作为曲霉属的一种,能产生多种有用的活性代谢产物,分别具有抗病、抗虫、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、细胞免疫和抗炎症等多种生物活性。

[0004] 但曲霉生长的环境条件和其代谢产物的提取方法都对所得多糖的生物活性有显著影响。且目前已公开的曲霉多糖,在稍高浓度下仍然会对细胞有一定毒性,免疫活性不高,依然需要挖掘其他安全、高效的曲霉代谢产物。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的上述不足,提供一种深海来源杂色曲霉SCAU214及其胞外多糖AVP-214-1的制备方法和应用。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)SCAU214。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种多糖。

[0008] 本发明的第三个目的是提供所述杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)SCAU214或所述多糖在制备调节免疫活性的产品中的应用。

[0009] 本发明的第四个目的是提供一种多糖的制备方法。

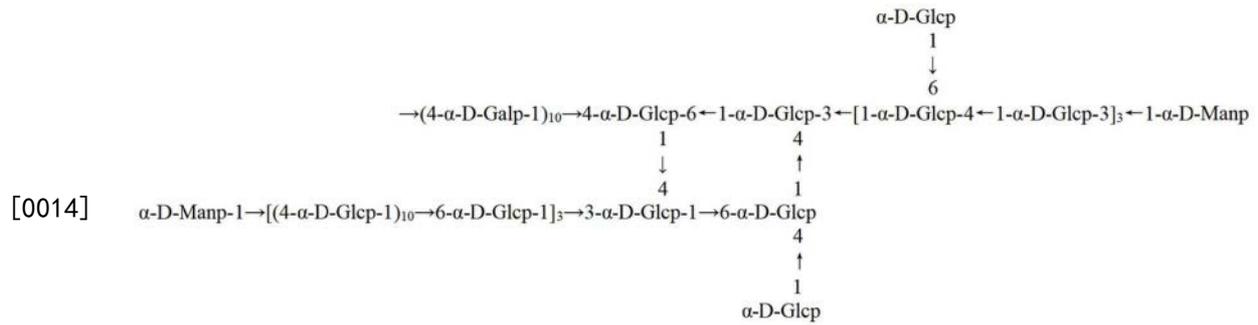
[0010] 本发明的第五个目的是提供一种调节免疫活性的产品。

[0011] 为了实现上述目的,本发明是通过以下方案予以实现的:

[0012] 一种杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)SCAU214,所述杂色曲霉SCAU214已于

2023年6月25日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,其保藏号为GDMCCNo:63583。

[0013] 本发明还请求保护一种多糖,所述多糖的结构式为式I所示:



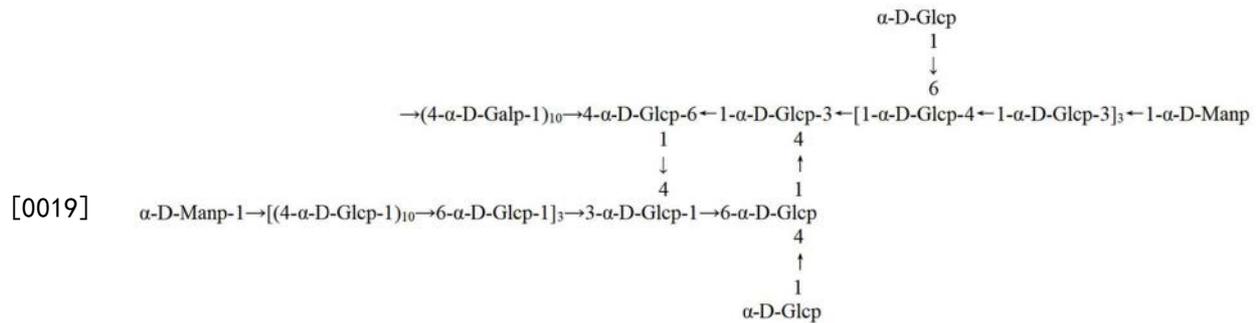
式 I。

[0015] 基于此,本发明请求保护所述杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214或所述多糖在制备调节免疫活性的产品中的应用。

[0016] 本发明还提供了一种多糖的制备方法,由所述的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214发酵得到。

[0017] 进一步地,对所述的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214的发酵产物进行过滤浓缩,得过滤浓缩发酵产物。

[0018] 进一步地,去除过滤浓缩发酵产物的蛋白质,得粗多糖。所述纯化多糖的结构式为式I所示:



式 I。

[0020] 进一步地,对所述粗多糖进行大孔树脂分离纯化,得大孔树脂分离纯化多糖。

[0021] 进一步地,对大孔树脂分离纯化多糖进行离子交换柱分离,即得纯化多糖。

[0022] 本发明还提供一种调节免疫活性的产品,其特征在于,所述产品中含有所述的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214和/或其发酵产物。

[0023] 本发明还提供一种调节免疫活性的产品,其特征在于,所述产品中所述的多糖。

[0024] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0025] 本发明从马里亚纳海沟 (141°57'N, 10°51'E) 的深海沉积物样品中,分离得到杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214,对其进行发酵培养,提取纯化其代谢产物,获得其胞外多糖AVP-214-1,所述多糖AVP-214-1在较宽的浓度范围内 (12.5~400μg/mL) 都可以促进巨噬细胞RAW 264.7的增殖,NO的释放量大于阳性对照组,剂量依赖性地刺激巨噬细胞RAW 264.7分泌的细胞因子IL-6、TNF-α,对巨噬细胞有较强的免疫刺激效果,是具有安全、

高效的调节免疫活性作用。

附图说明

[0026] 图1为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214的系统发育树。

[0027] 图2为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的DEAE-52洗脱曲线图。

[0028] 图3为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的HPGPC出峰图。

[0029] 图4为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的离子色谱图。其中,A为混合单糖标准品的离子色谱图;B为多糖AVP-214-1的离子色谱图。

[0030] 图5为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的乙酰化产物的GCMS色谱图。

[0031] 图6为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基A质谱图。

[0032] 图7为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基B质谱图。

[0033] 图8为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基C质谱图。

[0034] 图9为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基D质谱图。

[0035] 图10为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基E质谱图。

[0036] 图11为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基F质谱图。

[0037] 图12为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基G质谱图。

[0038] 图13为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的甲基化衍生物的残基H质谱图。

[0039] 图14为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的一维核磁共振 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。

[0040] 图15为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的一维核磁共振 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图。

[0041] 图16为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的二维 $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ 谱图。

[0042] 图17为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的二维HMBC谱图。

[0043] 图18为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1的二维HSQC谱图。

[0044] 图19为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1对RAW

264.7巨噬细胞增殖的影响。

[0045] 图20为杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1对RAW 264.7巨噬细胞分泌NO的影响。

[0046] 图21为杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214胞外多糖AVP-214-1对RAW 264.7分泌细胞因子IL-6和TNF- α 的影响。其中,A为IL-6;B为TNF- α ;与空白对照组相比,**: $p < 0.01$,***: $p < 0.001$,****: $p < 0.0001$ 。

具体实施方式

[0047] 下面结合说明书附图及具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0048] 实施例1海洋杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214的分离纯化与鉴定

[0049] 一、实验方法

[0050] 1、采集样品并培养:在马里亚纳海沟(141°57'N,10°51'E)采集深海沉积物样品(深度5455米),在超净台中称取1.0g沉积物样品,加入9mL含有0.1%琼脂的无菌蒸馏水,摇匀,形成样品悬浊液,标记为浓度 10^{-1} g/mL的样品悬浊液。取1mL浓度 10^{-1} g/mL的上述样品悬浊液,加入9mL含有0.1%琼脂的无菌蒸馏水摇匀,标记为浓度 10^{-2} g/mL的样品悬浊液。

[0051] 2、接种样品:配置含0.5g/L青霉素和0.03g/L孟加拉玫瑰的红海水PDA培养基,经高压蒸汽灭菌后,静置至温度为40℃左右,再混合均匀倒入培养皿中,凝固后得固体培养基。吸取200 μ L不同浓度梯度的样品悬浊液,均匀涂布在固体培养基上,每一种浓度涂布3块平板。10℃条件下恒温培养,待水分挥发培养基表面无液体后,倒置培养。

[0052] 3、分离菌株:将步骤2涂布平板于4℃下培养30天,直到能够区分真菌和细菌的形态。然后根据它们的形态差异,挑取转移到新的培养基上。将得到的培养皿在4℃下培养,进行纯化培养。所选纯化菌株在PDA培养基上菌落生长较快,圆形,开始为白色,2~3天后转为绿色,4~5天后转为褐色。分生孢子头的顶囊半球形,小梗双层,第一层短,第二层长,呈放射状排列,顶端有链形孢子。

[0053] 4、菌株鉴定:提取所选纯化菌株的基因组,PCR扩增其ITS DNA基因,PCR扩增条件为:98℃预变10min;98℃变10s、55℃退火10s、72℃延伸1min;最后72℃延伸1min。

[0054] 二、实验结果

[0055] 如图1所示,所选纯化菌株(其ITS序列在GenBank的登录号为OK271389)与GenBank上的标准菌株*Aspergillus versicolor* (MH712291)的ITS序列的相似度为99%,并将其命名为杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) SCAU214,并于2023年6月25日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,其保藏编号为GDMCC No:63583,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

[0056] 实施例2提取与分离纯化多糖AVP-214-1

[0057] 一、实验方法

[0058] 制备发酵液培养基:麦分离的培养基为麦芽提取物5g/L、Czapek Dox肉汤5g/L、蛋白胨10g/L、马铃薯葡萄糖肉汤5g/L、氯化镁0.5g/L、氯化钙0.5g/L、氯化钾0.5g/L、碳酸氢

钠0.5g/L、海盐30g/L、苜蓿青霉素10万单位/L和孟加拉玫瑰1g/L。调整发酵培养基pH值为6.0,发酵培养基配制完成后于高压灭菌锅中121℃灭菌20min。

[0059] 1、接种培养:在上述发酵液培养基上接种实施例1的杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)SCAU214孢子,于18℃培养7d,获得发酵液。

[0060] 2、过滤浓缩:用布氏漏斗过滤发酵液,去除不溶性杂质,在40℃下减压浓缩至原体积的四分之一,得过滤浓缩发酵液。

[0061] 3、除蛋白:向步骤2中所得过滤浓缩发酵液中加入硫酸铵至饱和,然后加入等体积叔丁醇,磁力搅拌3~4h,5000r/min离心10min,保留水相,即为多糖水溶液。将多糖水溶液加入截留分子量为3000Da的透析袋中封口,置于蒸馏水中,放入4℃冰箱内透析,每3h更换一次蒸馏水,直至外界透析液的导电率不再变化、透析袋中小分子物质被透析到外界透析液中。取出袋内溶液,于-80℃超低温冰箱中预冻24h后冷冻干燥,得到海洋来源杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)SCAU214胞外粗多糖,产率约为0.3g/L。

[0062] 4、大孔树脂分离纯化:大孔树脂是大孔径的高分子分离材料,大孔树脂上的吸附作用是以范德华力和氢键为主的分子间作用力的结果。称取步骤3的粗多糖1000mg,溶解在5mL蒸馏水中,配置成200mg/mL溶液,加样于大孔树脂柱中;进一步用超纯水洗脱,洗脱速度为2mL/min,共收集洗脱液500mL,再按照步骤3的方法进行透析和冷冻干燥,得到组分多糖。

[0063] 5、DEAE-52离子交换柱分离:DEAE-52弱阴离子交换柱是利用吸附与解吸附原理来分离多糖的一种办法,将已预处理的DEAE-52填料装入玻璃层析柱(2.6×70cm)中,用蒸馏水平衡4个柱体积,称取0.04g步骤4中组分多糖,用2mL三级水充分溶解后,加样于DEAE-52离子交换柱中。

[0064] 依次用0、0.1、0.3、0.6、0.9和1.2mol/L的NaCl溶液进行洗脱,洗脱液流速为1mL/min,每管收集10mL,收集洗脱液进行并隔管检测,绘制洗脱曲线。

[0065] 二、实验结果

[0066] 如图2所示,得到2个对称的洗脱峰,收集0mol/L NaCl的洗脱液透析、冻干,得到白色絮状组分多糖AVP-214-1。

[0067] 实施例3对多糖AVP-214-1的纯度和基本成分进行分析

[0068] 一、实验方法

[0069] 1、分子量:分别将实施例2的多糖AVP-214-1与已知分子量(5000、116000、23800、48600、80900、148000、273000、409800和667800Da)葡聚糖标准品,配置成5mg/mL的多糖溶液,置于样品瓶中,加入流动相,室温(25℃)放置12h,用凝胶色谱仪对多糖AVP-214-1的分子量进行检测。

[0070] 色谱条件:柱温40℃,色谱柱为BRT105-104-102串联凝胶柱(8mm×300mm),流动相为0.05mol/L NaCl,流速为0.6mL/min,进样体积为20μL,用RI-10A示差检测器记录多糖AVP-214-1的出峰时间图谱。

[0071] 数据分析和标准曲线绘制:以已知葡聚糖标准品相对分子质量的对数(logMw)为纵坐标,以保留时间为横坐标建立回归方程,拟合后的回归方程为: $y = -0.1796x + 11.518$, ($R^2 = 0.9957$), $\lg M_p - RT$; $y = -0.1914x + 12.069$, ($R^2 = 0.9941$), $\lg M_w - RT$; $y = -0.1774x + 11.357$, ($R^2 = 0.9921$), $\lg M_n - RT$;得到标准曲线,根据标准曲线计算AVP-214-1的相对分子量。

[0072] 2、单糖组成：多糖是由若干单糖经脱水缩合而成的聚合物，分析多糖的单糖组成有助于结构解析以及分析构效关系。用离子色谱法测定AVP-214-1组分的单糖组成。精确称取烘干16种单糖标准品(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、核糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、氨基半乳糖盐酸盐、盐酸氨基葡萄糖、N-乙酰-D氨基葡萄糖、古罗糖醛酸、甘露糖醛酸)和AVP-214-1样品配制待测溶液。

[0073] 配制方法为：精密称量5mg样品置于安瓿瓶中，加入3M TFA2mL，120℃水解3h，得酸水解溶液。准确吸取酸水解溶液转移至管中氮吹吹干，加入5mL水，涡旋混匀，得混匀液；吸取50μL混匀液加入950μL去离子水，12000rpm离心5min。取上清进行分析。

[0074] 色谱条件：柱温30℃，色谱柱为DionexCarbopac™ PA20 (3mm×150mm)，流速为0.3mL/min，进样量5μL，梯度洗脱。

[0075] 流动相A:H₂O；流动相B:15mmol/L NaOH；流动相C:15mmol/L NaOH及100mmol/L NaOAc，用电化学检测器记录洗脱曲线。

[0076] 二、实验结果

[0077] 如图3所示，AVP-214-1的HPGPC出峰图，峰型为单一对称，与DEAE-52洗脱曲线相符合，证明AVP-214-1为均一多糖。其峰位分子量(Mp)为7402Da，重均分子量(Mw)为8277Da，数均分子量(Mn)为6340Da。

[0078] 如图4中A和B所示，2.0min左右均为氢氧化钠的峰，41min左右均为乙酸钠的峰。对比两图的离子色谱，表明多糖AVP-214-1中单糖组成为葡萄糖、甘露糖和半乳糖，其含量比分别为86.4%、6.3%和7.3%。

[0079] 实施例4对多糖AVP-214-1进行结构解析

[0080] 一、实验方法

[0081] 1、甲基化分析：甲基化分析是多糖结构分析的一种重要手段，分析经甲基化、完全酸水解、完全乙酰化制成阿尔迪醇乙酸酯衍生物的多糖，能够从数据中分析得到实施例2多糖AVP-214-1的单糖组成、糖苷键类型的重要信息。

[0082] 2、核磁共振分析：采用脉冲傅里叶变换谱仪，对实施例2多糖AVP-214-1进行扫描。

[0083] 二、实验结果

[0084] 1、如图5~图13所示，并整合相关残基信息于表1中，A残基[G1cp-(1→)]的含量为8.0%，B残基[Manp-(1→)]的含量为4.0%，C残基[→3)-G1cp-(1→)]为6.3%，D残基[→4)-Galp-(1→)]的含量为4.6%，E残基[→4)-G1cp-(1→)]的含量为59.0%，F残基[→6)-G1cp-(1→)]的含量为5.6%，G残基[→3,4)-G1cp-(1→)]为3.0%，H残基[→4,6)-G1cp-(1→)]的含量为9.5%，根据分子量大小可得出多糖AVP-214-1各残基组成比例约为A:B:C:D:E:F:G:H=5:2:3:2:30:2:2:5。

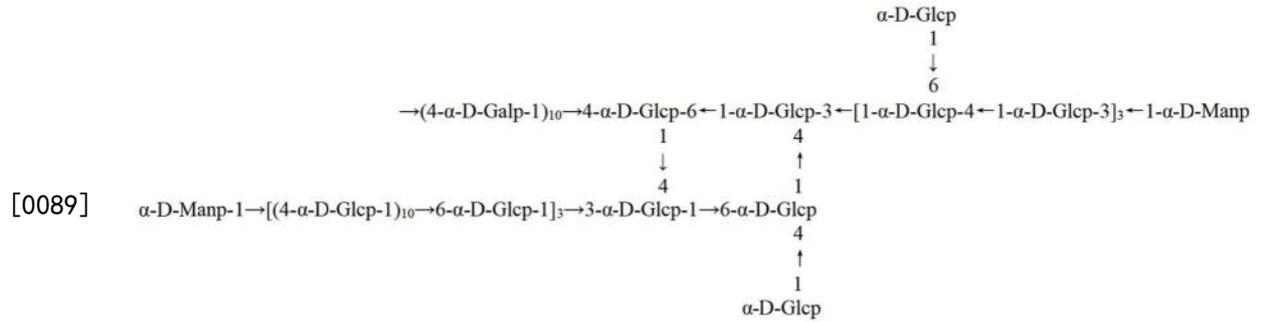
[0085] 表1甲基化AVP-214-1产物分析结果

残基	保留时间 (min)	甲基化残基类型	质荷比 (m/z)	摩尔比	糖苷键类型
A	16.791	2,3,4,6-Me4-Glcp	45,71,87,101,117,129,145,1 61,205	0.080	Glcp-(1→
B	16.882	2,3,4,6-Me4-Manp	45,71,87,101,117,129,145,1 61,205	0.040	Manp-(1→
C	20.572	2,4,6-Me3-Glcp	45,87,99,101,117,129,161,1 73,233	0.063	→3)-Glcp-(1→
[0086] D	20.864	2,3,6-Me3-Galp	45,87,99,101,113,117,129,1 31,161,173,233	0.046	→4)-Galp-(1→
E	21.297	2,3,6-Me3-Glcp	45,87,99,101,113,117,129,1 31,161,173,233	0.590	→4)-Glcp-(1→
F	21.952	2,3,4-Me3-Glcp	45,87,99,101,117,129,161,1 89,233	0.056	→6)-Glcp-(1→
G	24.203	2,6-Me2-Glcp	45,87,97,117,159,185	0.030	→3,4)-Glcp-(1→
H	26.454	2,3-Me2-Glcp	45,71,85,87,99,101,117,127 ,159,161,201,261	0.095	→4,6)-Glcp-(1→

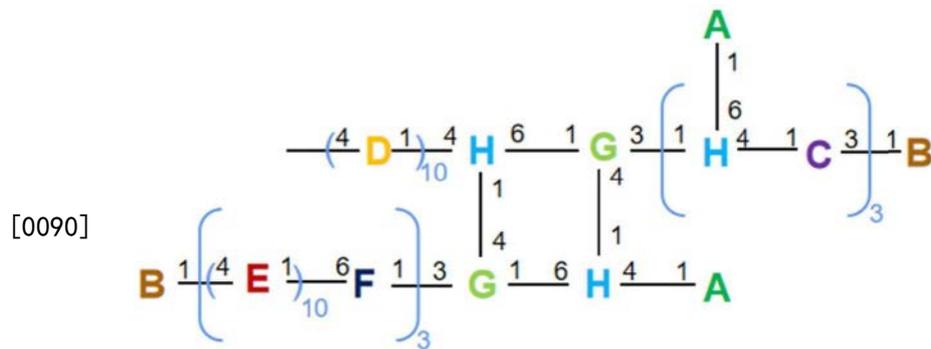
[0087] 2、如图14所示为¹H-NMR一维谱图,如图15所示为¹³C-NMR一维谱图,如图16所示为二维¹H-¹H-COSY谱图,如图17所示为HMBC谱图,如图18所示为HSQC谱图。通过核磁共振分析对多糖AVP-214-1的八个序列残基连接顺序进行了分析,如图14和图15中,残基A为[α-D-Glcp-(1→],残基B[α-D-Manp-(1→],残基C[→3)-α-D-Glcp-(1→],残基D[→4)-α-D-Galp-(1→],残基E为[→4)-α-D-Glcp-(1→],残基F[→6)-α-D-Glcp-(1→],残基G[→3,4)-α-D-Glcp-(1→],残基H[→4,6)-α-D-Glcp-(1→]。结合表2与图14和图15,残基的¹H-NMR化学位移分别为5.25ppm、5.32ppm、5.01ppm、5.21ppm、5.43ppm、4.97ppm、5.00ppm、5.36ppm,残基的¹³C NMR化学位移分别为98.75ppm、92.61ppm、98.74ppm、99.80ppm、99.55ppm、98.06ppm、97.93ppm、99.80ppm,图16的¹H-¹H-COSY谱图,可以区分H-1/H-2、H-2/H-3、H-3/H-4、H-4/H-5和H-5/H-6的分离自旋体系,结合图17的HMBC谱图,这些数据支持葡萄糖残基A的存在。同样,单糖残基A的进一步结构解析是在HMBC实验的帮助下完成的。此外,残基B、C、D、E、F、G和H的化学位移也得到了证实。δH 5.32(B:H-1)与δC 78.26(C:C-3)之间有交叉峰,表示在B和C之间有一个葡萄糖苷键连接,δH 5.32(B:H-1)与δC 75.65(E:C-4)之间有交叉峰,也表示B和E之间存在葡萄糖苷键连接,δH 5.43(E:H-1)与δC 71.16(F:C-6)之间有交叉峰,表示E与F之间存在葡萄糖苷键连接,δH 4.97(F:H-1)和δH 5.36(H:H-1)均与δC 83.52(G:C-3)之间有交叉峰,表示F和A均与G之间存在葡萄糖苷键连接,δH 5.43(E:H-1)与δC 81.43(G:C-4)之间有交叉峰,表示E与G之间存在葡萄糖苷键连接,δH 5.25(A:H-1)、δH 5.01(C:H-1)和δH 5.21(D:H-1)均与δC 75.07(H:C-4)之间也有交叉峰,表示A、C、D与E之间

存在葡萄糖苷键连接, $\delta\text{H } 5.25$ (A:H-1)、 $\delta\text{H } 5.00$ (G:H-1) 与 $\delta\text{C } 68.27$ (H:C-6) 之间有交叉峰, 表示A与G之间存在葡萄糖苷键连接。

[0088] 根据上述证据, 确定实施例2的多糖AVP-214-1的结构式如式I和式II所示。



式 I。



式 II。

[0091] 表2多糖AVP-214-1糖残基的¹³C、¹H的化学位移

糖残基		1	2	3	4	5	6
A.[α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]	^1H	5.25	3.58	3.78	3.45	3.73	3.76
	^{13}C	98.75	71.16	73.64	69.36	71.64	62.88
B.[α -D-Manp-(1 \rightarrow)]	^1H	5.32	4.09	3.86	3.79	3.78	3.75
	^{13}C	92.61	70.06	70.44	67.38	71.64	60.50
C.[\rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]	^1H	5.01	3.60	3.93	3.42	3.72	3.98
	^{13}C	98.74	70.16	78.26	70.06	73.05	61.30
D.[\rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow)]	^1H	5.21	3.44	3.89	3.88	3.99	3.52
	^{13}C	99.80	69.65	71.16	76.59	75.65	61.30
E.[\rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]	^1H	5.43	3.69	3.84	3.64	4.00	3.77
	^{13}C	99.55	72.22	70.06	75.65	76.20	61.30
F.[\rightarrow 6- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]	^1H	4.97	3.59	3.67	3.47	3.92	3.70
	^{13}C	98.06	70.44	74.51	69.26	70.16	71.16
G.[\rightarrow 3,4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]	^1H	5.00	3.56	4.00	4.35	3.68	3.79
	^{13}C	97.93	71.53	83.52	81.43	73.05	61.30
H.[\rightarrow 4,6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow)]	^1H	5.36	3.66	3.74	3.57	3.87	3.42
	^{13}C	99.80	71.53	70.44	75.07	73.79	68.27

[0093] 实施例5多糖AVP-214-1对RAW 264.7细胞增殖的影响

[0094] 一、实验方法

[0095] 用CCK-8法检测AVP-214-1对RAW 264.7巨噬细胞增殖的影响。

[0096] 1、吸弃细胞培养皿中的旧培养基,用2mL PBS缓冲液摇动清洗2次后,加入2mL新的完全培养基,将RAW264.7细胞轻轻吹打下来,形成细胞悬液,并用细胞计数板进行计数。

[0097] 2、吸取步骤1的细胞悬液,移至空白细胞培养皿中,加入新的完全培养液,将细胞密度调整为 1.0×10^4 个/mL,得新的细胞悬液。吸取新的细胞悬液100 μ L移至96孔板中,置于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO_2)中培养24h。弃上清,加入不同浓度的实施例2多糖AVP-214-1样品(0、12.5、25、100、200和400 μ g/mL),每组设置6个复孔,再置于细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO_2)中培养24h。

[0098] 3、在步骤2培养完成后的每孔中,加入10 μ L CCK-8试剂,于37 $^{\circ}$ C中避光孵育2h,测定450nm处吸光值,分析多糖AVP-214-1对RAW264.7细胞增殖的影响。

[0099] 二、实验结果

[0100] 如图19所示,多糖AVP-214-1(12.5~400 μ g/mL)促进巨噬细胞RAW 264.7的增殖,处理组细胞活力都高于对照组,在12.5~400 μ g/mL浓度范围内,多糖AVP-214-1对RAW 264.7巨噬细胞无细胞毒性。当AVP-214-1浓度为12.5~100 μ g/mL,细胞活力与对照组相比

有显著统计学差异;当AVP-214-1浓度为200~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,细胞活力与对照组相比无显著统计学差异,这可能是由于高糖浓度促进细胞增殖后分泌抑制生长的代谢物质。

[0101] 实施例6多糖AVP-214-1对RAW 264.7细胞释放NO的影响

[0102] 一、实验方法

[0103] 在免疫应答中,NO释放量是判断免疫调节活性的标志性指标,在免疫中具有重要地位。NO在多种免疫调节性疾病中起着重要作用,例如抑制癌症、预防心血管疾病、提升生殖性能、增强体内抗氧化能力、促进细胞增殖等。测定海洋来源杂色曲霉组分多糖AVP-214-1处理的RAW 264.7巨噬细胞释放NO的情况,由此判断AVP-214-1对巨噬细胞的刺激作用。实验用NO试剂盒来测定实施例2的多糖AVP-214-1对RAW 264.7细胞释放NO的影响。

[0104] 1、细胞悬液制备方法与实施例5步骤1相同。

[0105] 2、新的细胞悬液细胞密度为 1.0×10^5 个/ mL ,吸取新的细胞悬液500 μL 移至24孔板中,多糖AVP-214-1样品浓度设置为0、12.5、25、50和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,设置1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖LPS溶液为阳性对照组,其他培养方法与实施例5步骤2相同。

[0106] 3、对步骤2培养完成后的每孔溶液进行离心,离心条件为 $1000 \times g$,离心3min,收集上清,按照NO试剂盒说明书进行操作,分析多糖AVP-214-1对RAW264.7细胞对NO释放量的影响。

[0107] 二、实验结果

[0108] 如图20所示,与空白对照组相比,12.5、25、50和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AVP-214-1多糖处理组剂量依赖性地促进NO的释放,且100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多糖AVP-214-1处理组的NO的释放量大于阳性对照组1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS处理组。NO释放量增加说明说明多糖AVP-214-1对巨噬细胞有免疫刺激效果。

[0109] 实施例7多糖AVP-214-1对RAW 264.7细胞分泌细胞因子的影响

[0110] 一、实验方法

[0111] 细胞因子是一类具有广泛生物活性的小分子蛋白质,在调节机体的免疫应答和炎症反应中发挥着重要作用,其中IL-6及TNF- α 就是常见的细胞因子。对AVP-214-1刺激巨噬细胞RAW 264.7分泌的细胞因子IL-6、TNF- α 进行测定,

[0112] 用实施例6检测NO实验中收集的上清,按照TNF- α 试剂盒和IL-6试剂盒说明书进行操作,检测TNF- α 和IL-6分泌情况,分析多糖AVP-214-1对RAW264.7细胞对分泌细胞因子的影响。

[0113] 二、实验结果

[0114] 如图21中A和B所示,与空白对照组相比,细胞因子IL-6及TNF- α 的分泌量在12.5、25、50和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖AVP-214-1处理下呈剂量依赖性增多。

[0115] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,对于本领域的普通技术人员来说,在上述说明及思路的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动,这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

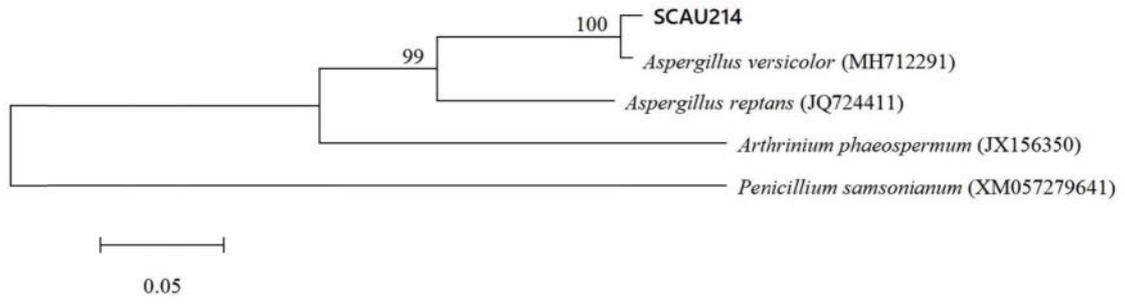


图1

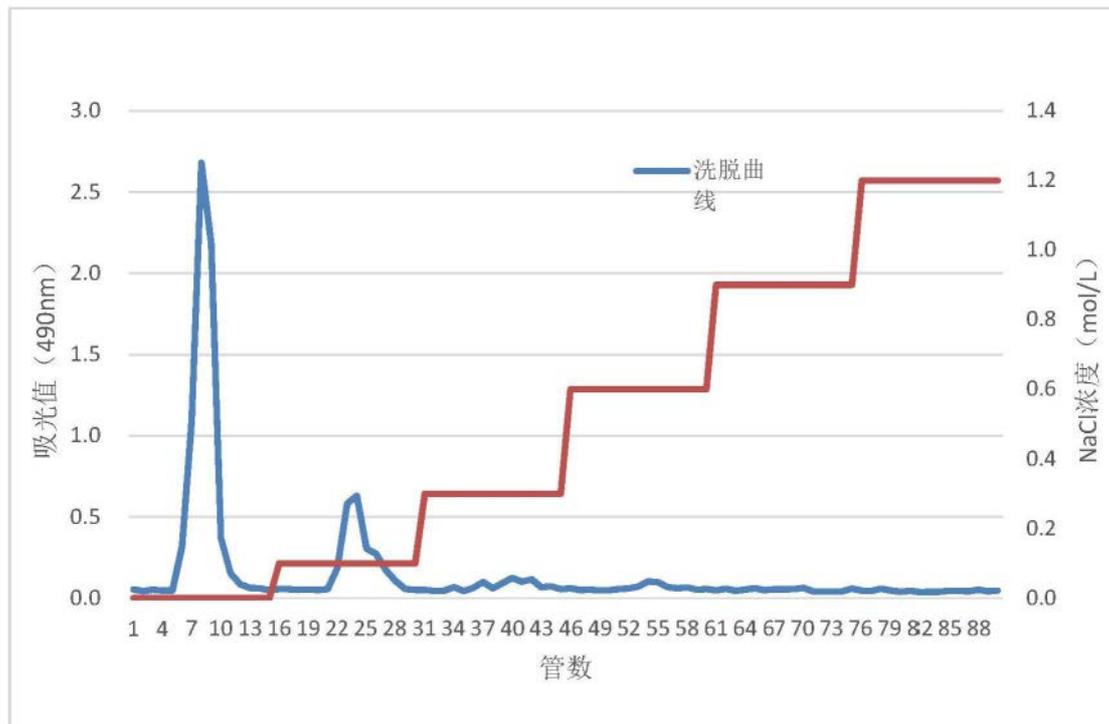


图2

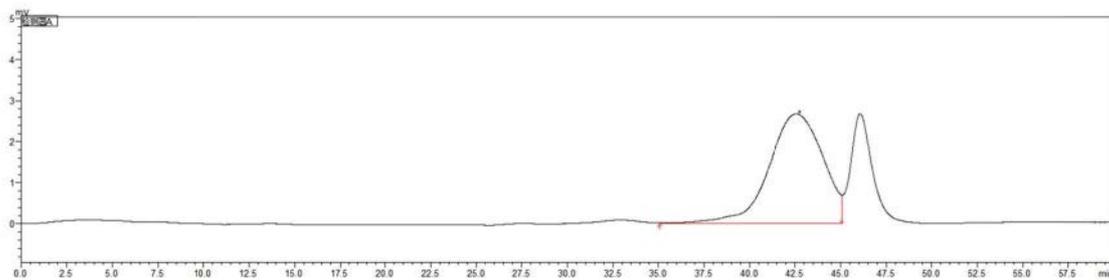


图3

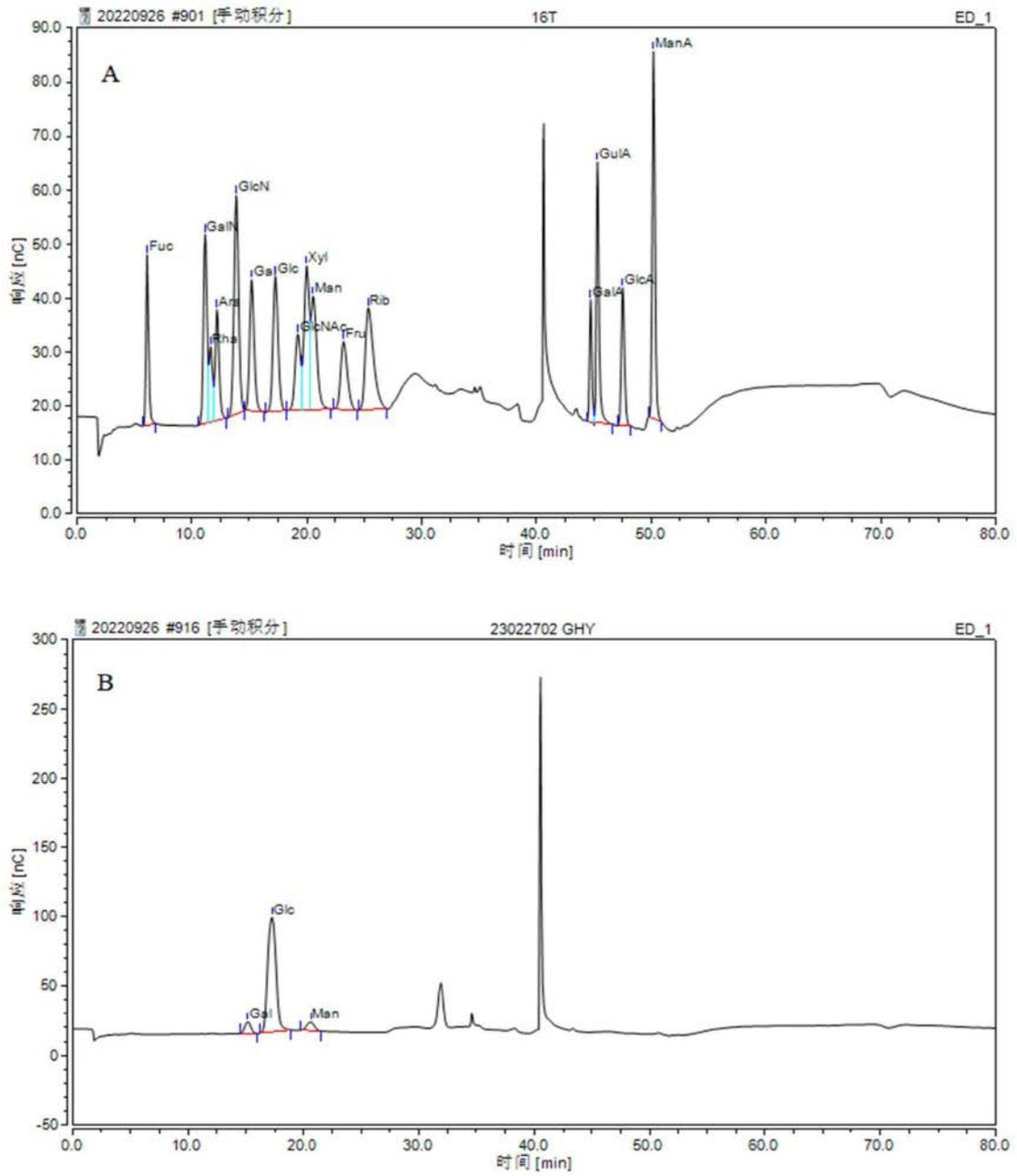


图4

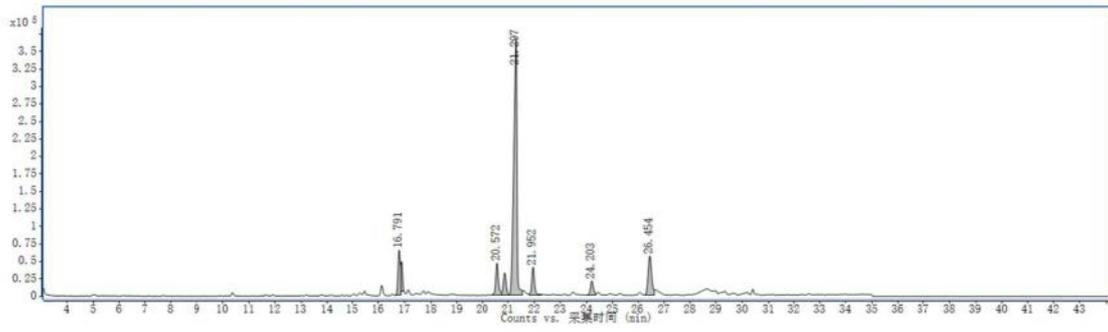


图5

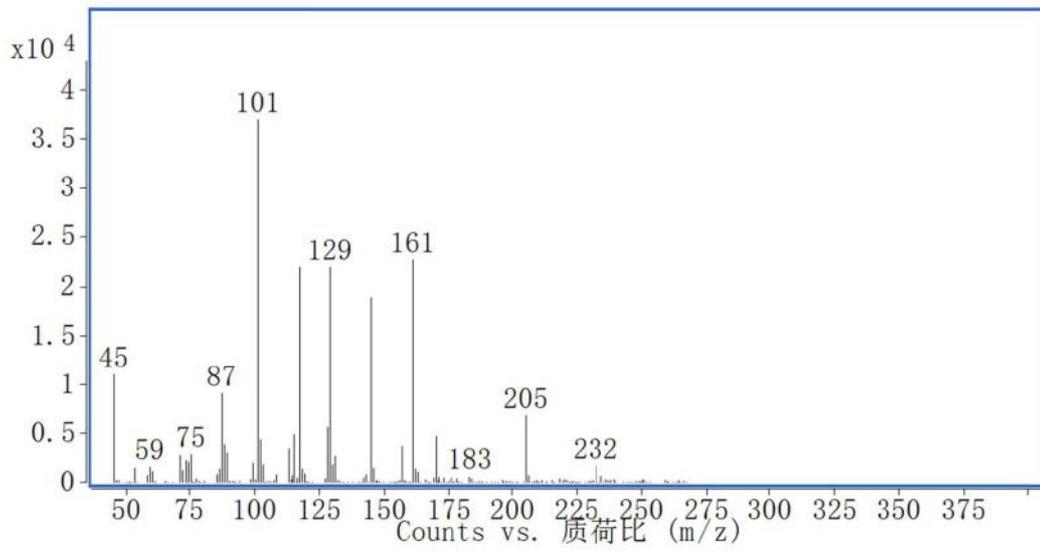


图6

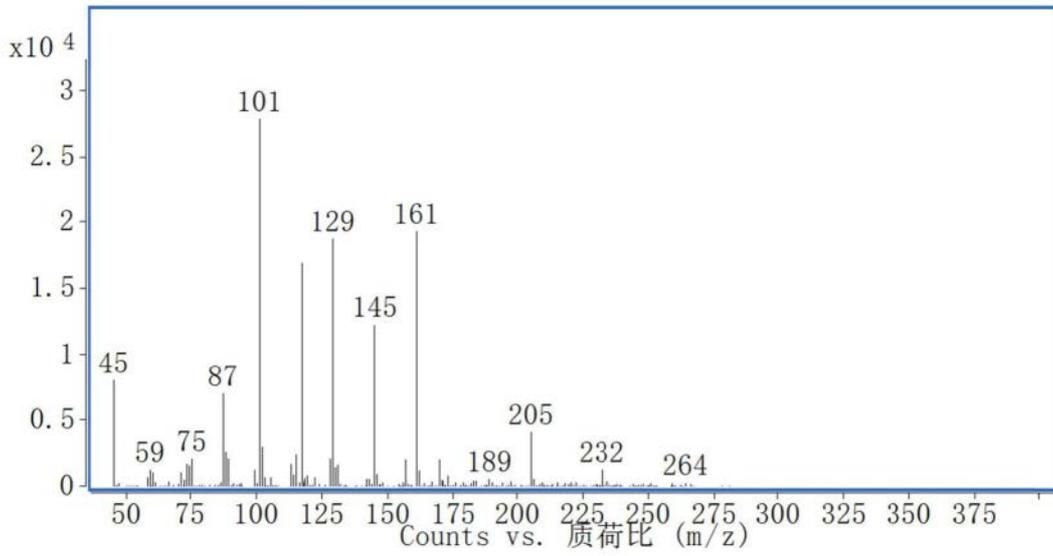


图7

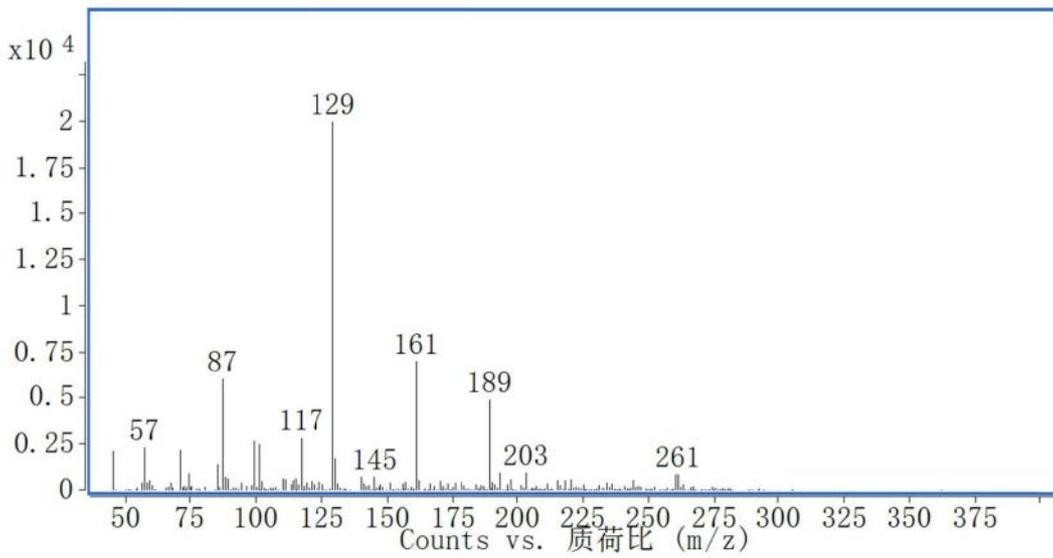


图8

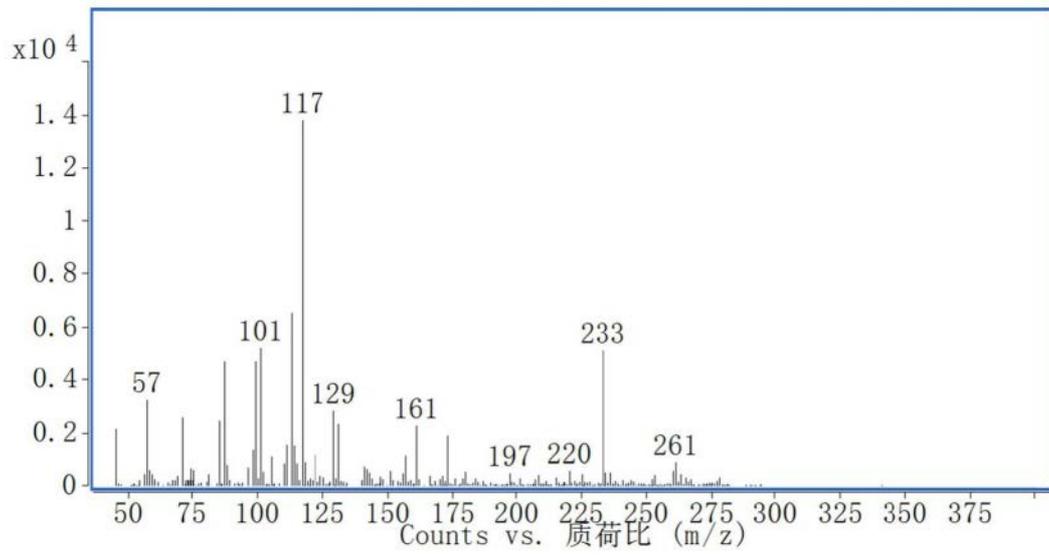


图9

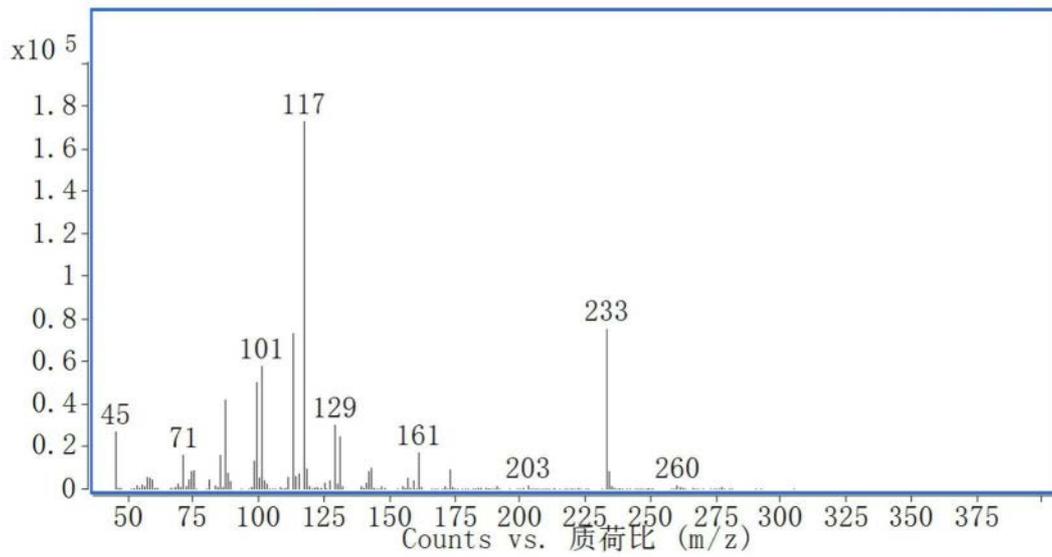


图10

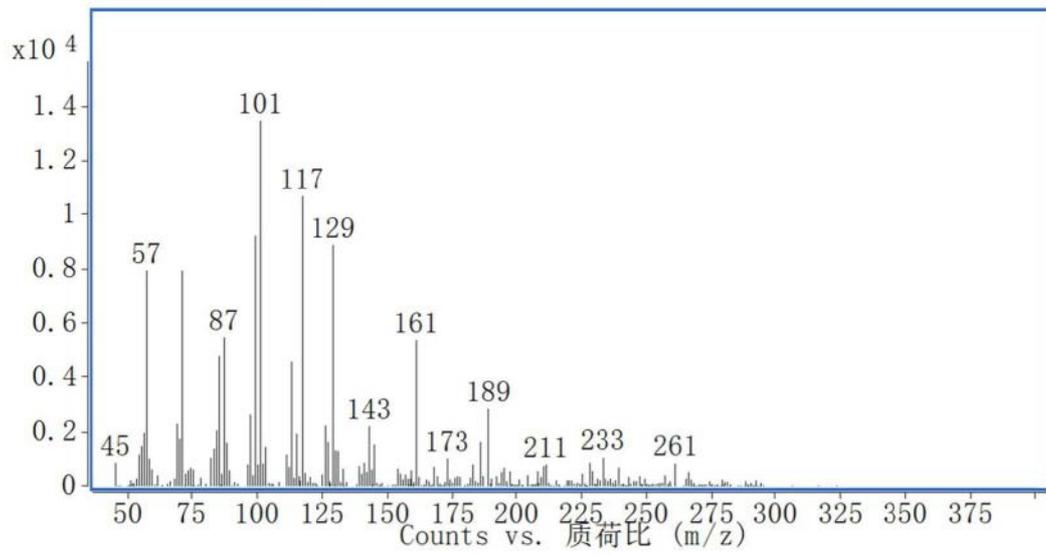


图11

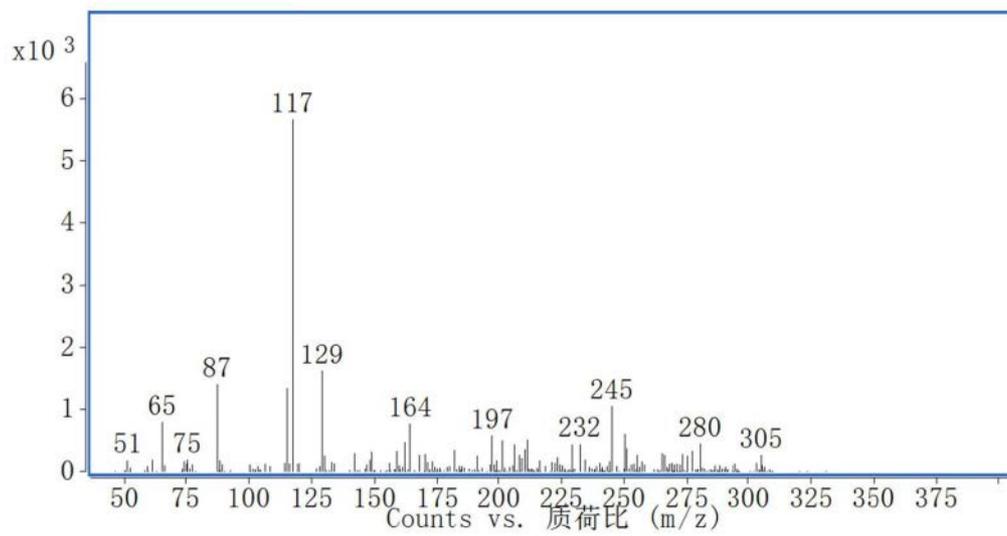


图12

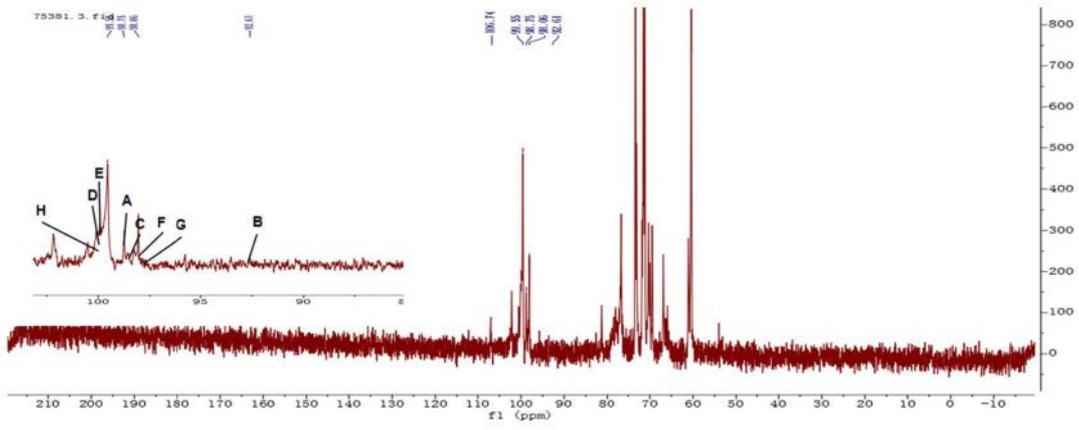


图15

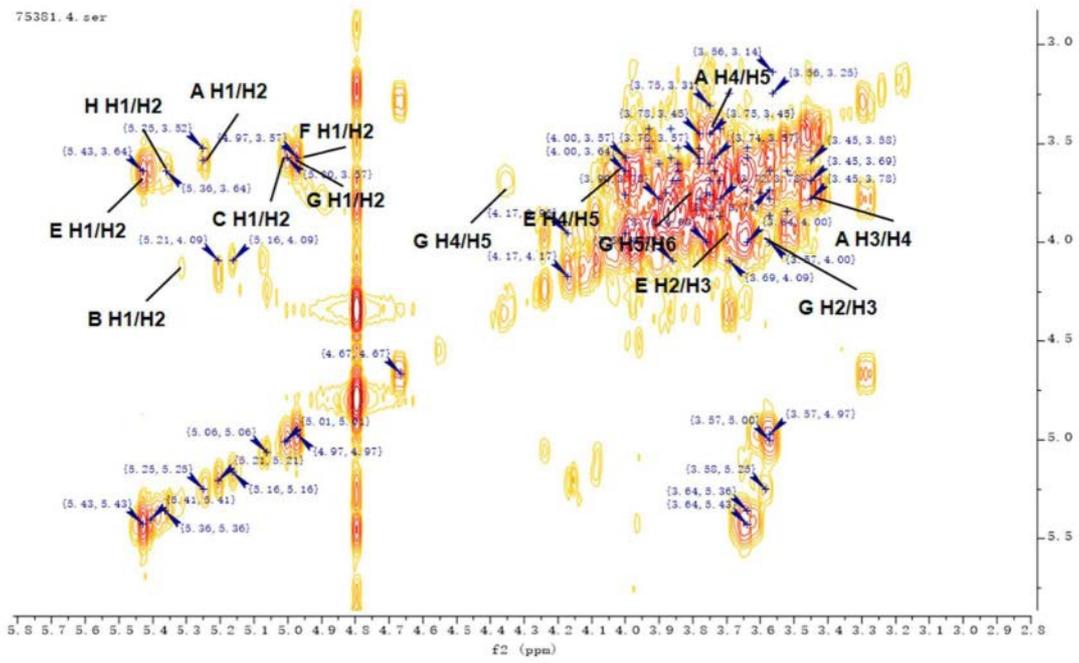


图16

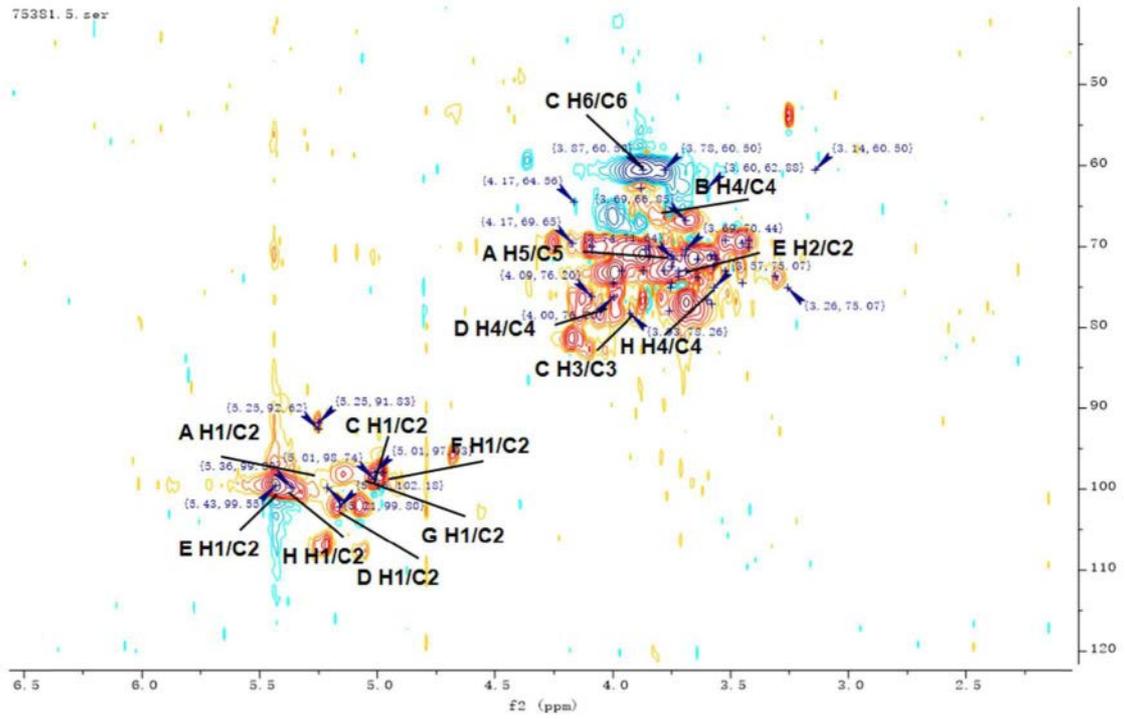


图17

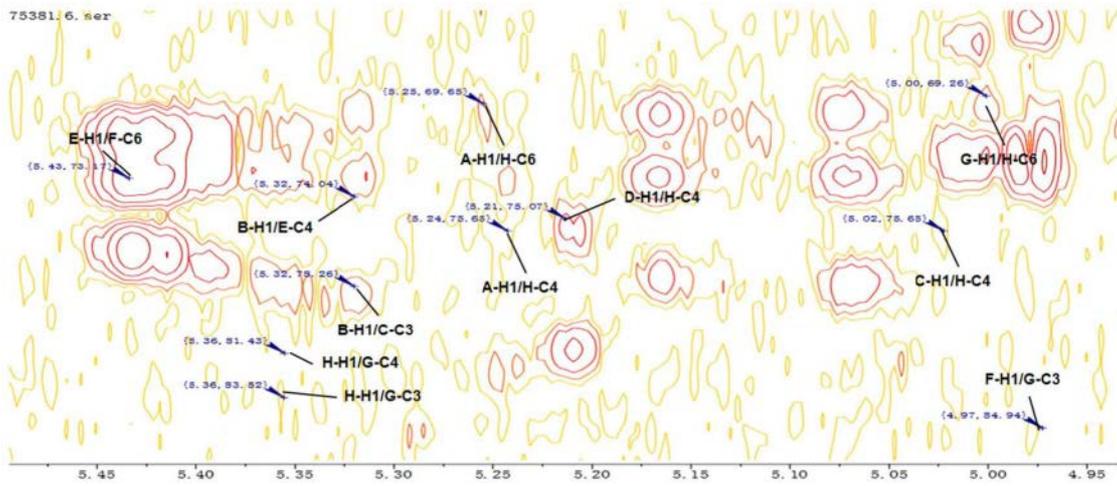


图18

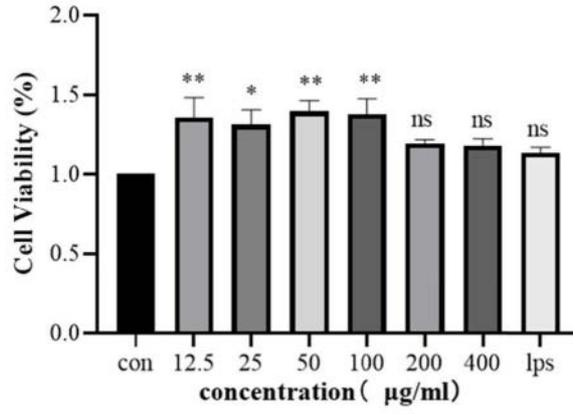


图19

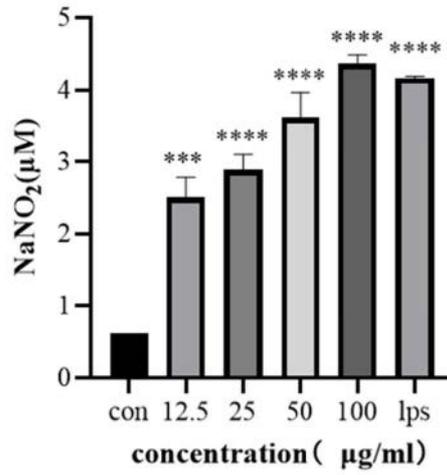


图20

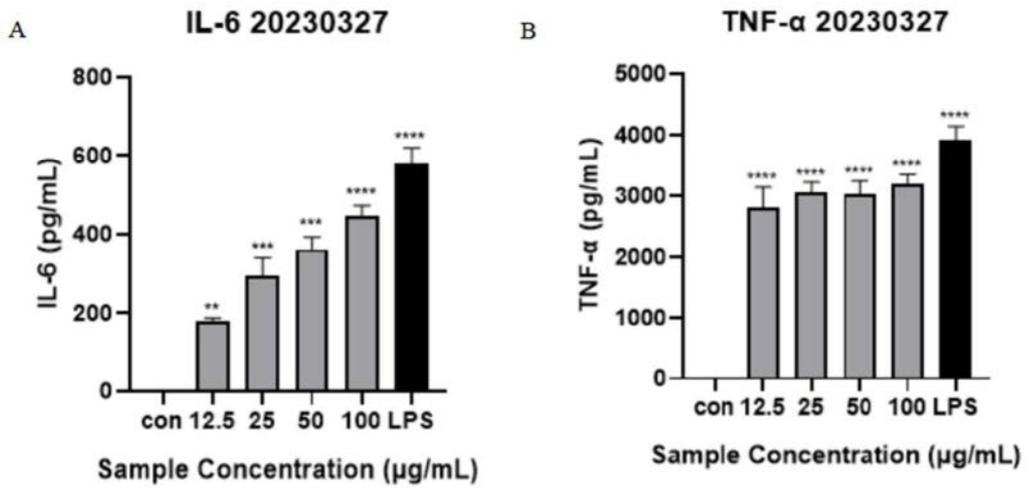


图21