



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111763243 B

(45) 授权公告日 2021.01.29

---

(21) 申请号 202010440508.9 *C12P 21/06* (2006.01)  
(22) 申请日 2020.05.22 *C07K 1/34* (2006.01)  
(65) 同一申请的已公布的文献号 *C07K 1/16* (2006.01)  
申请公布号 CN 111763243 A *C07K 1/14* (2006.01)  
(43) 申请公布日 2020.10.13 *C07K 1/36* (2006.01)  
(73) 专利权人 浙江海洋大学 *A23L 33/18* (2016.01)  
地址 316002 浙江省舟山市定海区临城街 *A61K 38/08* (2019.01)  
道长峙岛海大南路1号 *A61P 37/04* (2006.01)  
(72) 发明人 杨最素 叶蕾 唐云平 徐宝贵  
黄芳芳 余方苗  
(74) 专利代理机构 北京国翰知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11696  
代理人 周芸芸  
(51) Int. Cl. *C07K 7/06* (2006.01)  
(56) 对比文件  
CN 104311630 A, 2015.01.28  
审查员 程呈

---

权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54) 发明名称  
小公鱼免疫活性肽及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了小公鱼免疫活性肽及其制备方法和用途,属于生物技术领域,该小公鱼免疫活性肽具有氨基酸序列Tyr-Val-Met-Arg-Phe或Ser-Arg-Gln-Met-Ser。本发明小公鱼免疫活性肽能促进巨噬细胞系RAW 264.7细胞的增殖,可用于制备提高免疫细胞增殖药品或保健品,或者制备治疗免疫疾病的药物。

1. 小公鱼免疫活性肽,其氨基酸序列为Tyr-Val-Met-Arg-Phe。
2. 权利要求1所述的小公鱼免疫活性肽在制备提高巨噬细胞增殖药品或保健品中的用途。

## 小公鱼免疫活性肽及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种小公鱼免疫活性肽及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 免疫系统由免疫器官、免疫细胞及免疫活性物质等多种成分组成,具有免疫防御、免疫监视、免疫调控等功能,与多种疾病的病因学机制相关。一旦人体的免疫系统功能失调或受损,容易引起感染或诱发多种疾病,因此,开发提高人体免疫调节活性的化合物具有重要意义。据报道,免疫调节肽在改善人体免疫功能低下方面最具潜力,能参与机体的免疫调节,从食物蛋白中发现新的免疫调节肽为膳食治疗提供优势。应用酶解法从海洋生物中制备免疫活性肽因其效果好、安全性高、成本低等特性,从而受到研究者的广泛关注。

[0003] 中华小公鱼(*Stolephorus chinensis*),俗称公鱼,隶属鲱形目、鲹科、小公鱼属,属近海小型鱼类,多分布于中国南海、东海沿岸。营养组成分析结果表明,中华小公鱼富含18种常见氨基酸以及锌、锶、钙等多种矿物元素和多种不饱和脂肪酸,粗蛋白质含量较高,含水量为59.54%,含粗脂肪量为3.02%,且每100g中灰分含量高达10.35g,是一种高蛋白、低脂肪的经济实用鱼类。目前国内外对于中华小公鱼的研究主要是其分布特征与环境的关系或是储存方式,但有关小公鱼多肽的提取及活性研究报道较少。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种能促进巨噬细胞系RAW 264.7细胞的增殖的小公鱼免疫活性肽。

[0005] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:

[0006] 一种小公鱼免疫活性肽,具有氨基酸序列Tyr-Val-Met-Arg-Phe或Ser-Arg-Gln-Met-Ser。经MTT实验,本发明小公鱼免疫活性肽能促进巨噬细胞系RAW 264.7细胞的增殖,对RAW264.7细胞的相对增殖率(relative proliferation rates,RPR)较高,因此,可通过制备本发明小公鱼免疫活性肽将小公鱼开发为海洋功能食品。

[0007] 优选地,小公鱼免疫活性肽具有激活免疫细胞的功能。

[0008] 更优选地,免疫细胞包括巨噬细胞。

[0009] 本发明的又一目的,在于提供一种制备得到对巨噬细胞RAW 264.7具有免疫调节活性的小公鱼酶解多肽,小公鱼免疫活性肽的得率高的小公鱼免疫活性肽的制备方法。

[0010] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:

[0011] 小公鱼免疫活性肽的制备方法,包括:

[0012] 预处理:将小公鱼脱盐脱脂后用纯水洗至中性,粉碎,沥干后放入-20℃冷冻得到处理后小公鱼肉,备用;

[0013] 酶解:将预处理后小公鱼肉中加入蛋白酶进行酶解,结束后,将酶解产物煮沸,离心,获得上清酶解液;

- [0014] 超滤:将酶解液进行超滤处理,获得所述含有小公鱼免疫活性肽的超滤液;
- [0015] 分离、纯化:将超滤液经DEAE Sepharose Fast Flow和HPLC分离纯化,获得小公鱼免疫活性肽。
- [0016] 本发明制备方法以中华小公鱼(下称小公鱼)为原料,通过工艺优化和现代海洋生物活性肽的分离纯化技术,制备得到对巨噬细胞RAW 264.7具有免疫调节活性的小公鱼酶解多肽,这为提升小公鱼的生物附加值及免疫调节剂功能食品的开发提供实验依据和理论指导;本发明制备方法使得氨基酸序列为Tyr-Val-Met-Arg-Phe或Ser-Arg-Gln-Met-Ser小公鱼免疫活性肽的得率较高。
- [0017] 优选地,蛋白酶选自胃蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶或木瓜蛋白酶。
- [0018] 更优选地,酶解条件为:蛋白酶为胃蛋白酶,温度30-45℃、pH 1.0-2.5、料液比1:2-5(g/mL)、时间4-7h、加酶量1500-3500u/g。
- [0019] 优选地,超滤是如下进行:将酶解液经1KDa超滤膜超滤,收集<1KDa分子量段的超滤液。
- [0020] 优选地,<1KDa分子量段的超滤液对巨噬细胞的相对增殖率高达70.03%。
- [0021] 本发明的又一目的,在于提供小公鱼免疫活性肽在制备提高免疫细胞增殖药品或保健品中的用途。
- [0022] 优选地,免疫细胞包括巨噬细胞。
- [0023] 本发明的又一目的,在于提供小公鱼免疫活性肽在制备治疗免疫疾病的药物中的用途。优选地,免疫疾病的疾病包括免疫力低下的状况。
- [0024] 本发明的有益效果为:本发明小公鱼免疫活性肽能促进巨噬细胞系RAW 264.7细胞的增殖;本发明制备方法制备得到对巨噬细胞RAW 264.7具有免疫调节活性的小公鱼酶解多肽,这为提升小公鱼的生物附加值及免疫调节剂功能食品的开发提供实验依据和理论指导;本发明制备方法使得氨基酸序列为Tyr-Val-Met-Arg-Phe或Ser-Arg-Gln-Met-Ser小公鱼免疫活性肽的得率较高。因此,本发明是一种能促进巨噬细胞系RAW 264.7细胞的增殖的小公鱼免疫活性肽。

#### 附图说明

- [0025] 图1为不同蛋白酶对RAW 264.7增殖效果的影响;
- [0026] 图2为pH值对RAW264.7细胞增殖率的影响;
- [0027] 图3为温度对RAW 264.7细胞增殖率的影响;
- [0028] 图4为时间对RAW 264.7细胞增殖率的影响;
- [0029] 图5为料液比对RAW 264.7细胞增殖率的影响;
- [0030] 图6为加酶量对RAW 264.7细胞增殖率的影响;
- [0031] 图7为各超滤组分对RAW 264.7细胞增殖的影响;
- [0032] 图8为阴离子DEAE Sepharose Fast Flow洗脱峰;
- [0033] 图9为各洗脱峰RPR值的大小;
- [0034] 图10为RP-HPLC色谱柱洗脱峰;
- [0035] 图11为峰II-IV组分对RAW264.7细胞增殖能力的影响。

## 具体实施方式

[0036] 以下结合具体实施方式和附图对本发明的技术方案作进一步详细描述:

[0037] 实施例1:

[0038] 小公鱼免疫活性肽的制备方法,包括:

[0039] 材料与试剂

[0040] 小公鱼采自浙江省舟山市嵊山海域;小鼠单核巨噬细胞系RAW 264.7细胞中科院上海细胞库;胃蛋白酶,中性蛋白酶北京奥博星生物科技有限公司;胰蛋白酶,碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶北京亚太恒信生物科技有限公司;DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM)Gibco公司;青霉素华北制药股份有限公司;链霉素山东鲁抗医药股份有限公司;四甲基噻唑蓝(Methyl Thiazyltetrazolium,MTT)美国Sigma公司;二甲基亚砜(DMSO)德国AppliChem公司;其余试剂均为国药分析纯。

[0041] 仪器与设备

[0042] DS-1组织捣碎机上海标本模型厂;ZHJH-C1209型超净工作台上海智诚分析仪器制造有限公司;WR0-70型超纯水仪美国Millipore公司;ALPHA 1-4/LD plus型冷冻干燥机德国CHRIST公司;高速低温离心机日本日立公司;LDZF-30KB-立式高压蒸汽灭菌器上海申安医疗器械有限公司;Forma 3111型CO<sub>2</sub>培养箱美国Thermo公司;Spectra Max M<sub>2</sub>多功能酶标仪美国Molecular Devices公司。

[0043] 方法

[0044] MTT法检测细胞活性

[0045] 将RAW 264.7细胞置于含10%无支原体的胎牛血清和双抗的DMEM培养基中,于37、℃5%CO<sub>2</sub>条件下培养。当细胞生长至80%时进行传代。选取对数生长期的细胞,调细胞密度为1×10<sup>4</sup>个/mL,按每孔200μL培养液接种于96孔板上,板边缘用无菌PBS填充,37、℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育12h后弃去上清;加入不同浓度的小公鱼多肽各200μL,每个浓度3-6个复孔,并设置空白对照组;12~36h后吸去上清,每孔加入10%的MTT(5mg/mL)200μL,继续在培养箱中孵育4h;弃上清后加入150μL的DMSO,振荡10min,于酶标仪490nm处测定OD值;计算RPR,按照RPR的大小确定活性组分。相对增殖率按公式(1)计算:

$$[0046] \quad \text{细胞增殖率}\% = \frac{(A_2 - A_1)}{A_1} \times 100 \quad (1)$$

[0047] 式中,A<sub>1</sub>为空白对照组的吸光度,A<sub>2</sub>为样品组的吸光度。

[0048] 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 26.0统计软件对数据进行分析和处理,以P<0.05表示差异具有显著性。

[0049] 1)小公鱼预处理:小公鱼用清水洗净后去杂质,以确保材料的准确性。纯水浸泡4h脱盐,再用0.1mol/mL的NaOH脱脂6h(3h更换一次NaOH,料液比为1:4)后,用纯水洗至中性,经组织捣碎机粉碎,沥干后放入-20℃冷冻备用。

[0050] 2)小公鱼粗品活性肽的制备:称取10.0g预处理的小公鱼肉,按照料液比1:3(g/mL)加入去离子水,然后按如下表1进行酶解,结束后,将酶解产物煮沸15min,于4℃以12000r/min离心5min,取上清酶解液冷冻干燥后,将药物浓度调整为2mg/mL,检测各酶解产物对RAW 264.7相对细胞增殖率的影响。

[0051] 表1实施例1-5的酶解条件

|        |      |       |        |      |                         |       |                          |
|--------|------|-------|--------|------|-------------------------|-------|--------------------------|
| [0052] | 组别   | 酶种    | 温度(°C) | pH   | 酶活力(u.g <sup>-1</sup> ) | 时间(h) | 料液比(g.mL <sup>-1</sup> ) |
|        | 实施例1 | 胃蛋白酶  | 37     | 1.6  | 3500000                 | 6     | 1:4                      |
|        | 实施例2 | 中性蛋白酶 | 40     | 7.0  | 60000                   | 6     | 1:4                      |
|        | 实施例3 | 碱性蛋白酶 | 50     | 10.0 | 200000                  | 6     | 1:4                      |
|        | 实施例4 | 胰蛋白酶  | 50     | 8.0  | 250000                  | 6     | 1:4                      |
|        | 实施例5 | 木瓜蛋白酶 | 55     | 6.0  | 500000                  | 6     | 1:4                      |

[0053] 实施例1-5上清酶解产物对RAW 264.7增殖效果如图1,其中,胃蛋白酶代表实施例1,中性蛋白酶代表实施例2,碱性蛋白酶代表实施例3,胰蛋白酶代表实施例4,木瓜蛋白酶代表实施例5。从图1中可以看出,实施例1酶解产物对RAW 264.7细胞的RPR最高。

[0054] 实施例6:

[0055] 胃蛋白酶酶解的单因素实验

[0056] 在实施例1-5的基础上,选择时间、料液比、温度、pH值、加酶量等五个因素的合理水平进行L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交实验。调整药物浓度,MTT法进行检测,以细胞的RPR为筛选指标确定胃蛋白酶的最佳酶解条件。正交实验因素水平如表2所示。

[0057] 表2正交实验因素水平表

| 水平       | 因素     |     |                          |       |                         |
|----------|--------|-----|--------------------------|-------|-------------------------|
|          | A      | B   | C                        | D     | E                       |
|          | 温度(°C) | pH值 | 料液比(g.mL <sup>-1</sup> ) | 时间(h) | 加酶量(u.g <sup>-1</sup> ) |
| [0058] 1 | 30     | 1   | 4                        | 1:2   | 1500                    |
| 2        | 35     | 1.5 | 5                        | 1:3   | 2000                    |
| 3        | 40     | 2   | 6                        | 1:4   | 2500                    |
| 4        | 45     | 2.5 | 7                        | 1:5   | 3000                    |

[0059] 图2所示为pH值单因素实验结果。随着pH的增加,小公鱼粗肽对RAW 264.7细胞的RPR先上升,当pH为1.5时,RPR达到最高为40.32%。后RPR逐渐下降,在2.5~3范围内趋近于0,表明胃蛋白酶在此条件下酶活力逐渐降低或被灭活,因此对底物没有酶促作用。故pH值选择1~2.5的区间水平进行正交实验。

[0060] 图3所示为温度单因素实验结果。小公鱼粗肽在30~35°C之间对RAW 264.7细胞的RPR基本保持不变为29.9%,当温度达到40°C时RPR最高为42.03%,而后渐下降。因此温度的正交实验区间水平选择为30~45.°C

[0061] 图4所示为时间单因素实验结果,在3~6h时间内,不同产物对细胞的RPR越来越高,当酶解时间为6h时,RPR最高为107.48%,而后随时间再增加RPR略微下降。经综合考虑后,时间的区间水平选择4~7h进行正交试验。

[0062] 图5所示为料液比单因素实验结果,随着反应料液比的增加,RAW 264.7细胞的RPR先缓慢上升后下降,料液比为1:4(g.mL<sup>-1</sup>)时,RPR达到最高为27.11%。故料液比选择1:2~1:5(g.mL<sup>-1</sup>)的区间水平做正交试验。

[0063] 图6所示为加酶量单因素实验结果,当反应加酶量增加时,不同产物对RAW 264.7细胞的RPR先缓慢上升,当加酶量为2000(u.g<sup>-1</sup>)时RPR最高为43.27%。随着加酶量的继续增

加,酶解产物对细胞的增殖率开始下降,而后又缓慢上升。故加酶量选取1500~3000 ( $\text{u.g}^{-1}$ ) 的区间水平进行正交试验。

[0064] 实施例7:

[0065] 胃蛋白酶酶解的正交实验

[0066] 在实施例6的基础上,根据文献所用方法,选择时间、料液比、温度、pH值、加酶量等五个因素的合理水平进行 $L_{16}(4^5)$  正交实验。调整药物浓度,MTT法进行检测,以细胞的RPR为筛选指标确定胃蛋白酶的最佳酶解条件。正交实验因素水平如表3所示。

[0067] 表3正交实验因素水平表

| 水平       | 因素                     |      |                             |       |                            |
|----------|------------------------|------|-----------------------------|-------|----------------------------|
|          | A                      | B    | C                           | D     | E                          |
|          | 温度/ $^{\circ}\text{C}$ | pH 值 | 料液比/ ( $\text{g.mL}^{-1}$ ) | 时间/ h | 加酶量/ ( $\text{u.g}^{-1}$ ) |
| [0068] 1 | 30                     | 1    | 4                           | 1:2   | 1500                       |
| 2        | 35                     | 1.5  | 5                           | 1:3   | 2000                       |
| 3        | 40                     | 2    | 6                           | 1:4   | 2500                       |
| 4        | 45                     | 2.5  | 7                           | 1:5   | 3000                       |

[0069] 表5所示为胃蛋白酶 $L_{16}(4^5)$  的正交实验结果。由表5中RPR的大小可知,选定的五个因素均能影响酶解结果。由极值R得出各因素的影响大小如下:D(时间) > B(pH值) > E(加酶量) > C(料液比) > A(温度),且 $A_4B_1C_2D_1E_4$ 组合效果最好,即温度45、 $^{\circ}\text{C}$  pH值1、料液比1:3 ( $\text{g.mL}^{-1}$ )、时间4h、加酶量3000 ( $\text{u.g}^{-1}$ )。经验证该条件下所得酶解物对RAW264.7细胞RPR为54.60%,故此正交实验结果较可靠。

[0070] 表5胃蛋白酶正交实验结果

|          | A                        | B   | C                    | D     | E        |         |
|----------|--------------------------|-----|----------------------|-------|----------|---------|
| 编号       | 温度( $^{\circ}\text{C}$ ) | pH  | 料液比( $\text{g/mL}$ ) | 时间(h) | 加酶量(U/g) | RPR (%) |
| 1        | 30                       | 1   | 1:2                  | 4     | 1500     | 42.23   |
| 2        | 30                       | 1.5 | 1:3                  | 5     | 2000     | 15.17   |
| 3        | 30                       | 2   | 1:4                  | 6     | 2500     | 3.28    |
| 4        | 30                       | 2.5 | 1:5                  | 7     | 3000     | 17.7    |
| 5        | 35                       | 1   | 1:3                  | 6     | 3000     | 43.16   |
| [0071] 6 | 35                       | 1.5 | 1:2                  | 7     | 2500     | 1.12    |
| 7        | 35                       | 2   | 1:5                  | 4     | 2000     | 25.84   |
| 8        | 35                       | 2.5 | 1:4                  | 5     | 1500     | 7.12    |
| 9        | 40                       | 1   | 1:4                  | 7     | 2000     | 12.13   |
| 10       | 40                       | 1.5 | 1:5                  | 6     | 1500     | 2.75    |
| 11       | 40                       | 2   | 1:2                  | 5     | 3000     | 24.39   |
| 12       | 40                       | 2.5 | 1:3                  | 4     | 2500     | 30.4    |

|        |    |       |       |       |       |       |                                                                              |
|--------|----|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------------------------------------------------------------|
|        | 13 | 45    | 1     | 1:5   | 5     | 2500  | 42.8                                                                         |
|        | 14 | 45    | 1.5   | 1:4   | 4     | 3000  | 38.24                                                                        |
|        | 15 | 45    | 2     | 1:3   | 7     | 1500  | 8.22                                                                         |
|        | 16 | 45    | 2.5   | 1:2   | 6     | 2000  | 7.19                                                                         |
| [0072] | k1 | 19.60 | 35.08 | 18.73 | 34.18 | 15.08 | 由极差 R 大小得                                                                    |
|        | k2 | 19.31 | 14.32 | 24.24 | 22.37 | 15.08 | D>B>E>C>A                                                                    |
|        | k3 | 17.42 | 15.43 | 15.19 | 14.10 | 19.40 | 且 A <sub>4</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>4</sub> |
|        | k4 | 24.11 | 15.60 | 22.27 | 9.79  | 30.87 | 组合效果较好                                                                       |
|        | R  | 6.70  | 20.76 | 9.05  | 24.39 | 15.79 |                                                                              |

[0073] 实施例8:

[0074] 小公鱼免疫活性肽的制备方法,包括:

[0075] 1) 小公鱼预处理:小公鱼用清水洗净后去杂质,纯水浸泡4h脱盐,再用0.1mol/mL的NaOH脱脂6h(3h更换一次NaOH,料液比为1:4)后,用纯水洗至中性,经组织捣碎机粉碎,沥干后放入-20℃冷冻备用;

[0076] 2) 小公鱼粗品活性肽的制备:称取10.0g预处理的小公鱼肉,按照料液比1:3(g/mL)加入去离子水,然后按加酶量3000u/g加入胃蛋白酶,在pH 1、温度45℃的酶解条件下酶解4h,结束后,将酶解产物煮沸15min,于4℃以12000r/min离心5min,取上清酶解液;

[0077] 3) 小公鱼酶解肽的分离、纯化:

[0078] 3a) 超滤酶解液

[0079] 将酶解液经1、3、5、10和30KDa超滤膜超滤,收集>30KDa、10~30KDa、5~10KDa、3~5KDa、1~3KDa、<1KDa六个分子量段的超滤液,将各组分冷冻干燥后以MTT法检测对RAW 264.7细胞增殖的影响,各超滤组分对RAW 264.7细胞增殖的影响结果如图7所示。由图7可知,各超滤组分都能促进RAW 264.7细胞的增殖;与>30KDa组比较,10~30KDa、5~10KDa、3~5KDa、1~3KDa、<1KDa的组分对RAW 264.7细胞增殖的促进作用有显著性差异(P<0.05),尤其是<1KDa的组分对RAW 264.7细胞的RPR最高为70.03%,故选定<1KDa的组分进行下一步分离纯化。

[0080] 3b) DEAE Sepharose Fast Flow分离纯化

[0081] 选取<1KDa的组分经DEAE Sepharose Fast Flow离子柱分离纯化,将预先处理的DEAE Sepharose Fast Flow装入色谱柱中,装柱体积大约为7.1×20cm,用0.05mol/L、pH7.5的Tris-HCl缓冲液平衡3~5个柱体积后上样分离,样品上样前先用0.45μm滤膜过滤。上样浓度:0.2g/mL;上样量:2mL;流速:6mL/min;洗脱液:NaCl溶液(0~1mol/L),采用梯度洗脱的方式,用缓冲液先过一个柱体积,而后依次每个浓度梯度洗脱一个柱体积;每管的收集量为9mL,于280nm处测定各管吸光度值。收集各峰冷冻干燥,通过MTT法检测活性较好的峰组分。

[0082] 阴离子DEAE Sepharose Fast Flow洗脱峰如图8所示,由图8可知,于280nm处测定各管吸光值得5个洗脱峰,即峰I~峰V。收集各洗脱峰,冷冻干燥后进行MTT实验,各洗脱峰RPR值的大小如图9所示。由图9可看出峰II对RAW 264.7细胞的RPR最高为56.14%,故选择峰II组分进一步分离纯化。

[0083] 3c) HPLC分离纯化

[0084] 取3b) 活性较好的峰Ⅱ组分经HPLC分离纯化, 色谱条件为: ZORBAX SB-C18分析型色谱柱(填料粒径: 5 $\mu$ m 9.4 $\times$ 250mm); 上样体积: 20 $\mu$ L; 检测波长: 280nm; 流速: 1mL/min; 流动相A为超纯水、流动相B为乙腈; 洗脱方式见表4; 柱温25;  $^{\circ}$ C进样量为100 $\mu$ L。收集产量较高的峰组分, 冷冻干燥后检测其氨基酸序列。并收集产量最高的组分进行MTT试验。

[0085] 表4HPLC的洗脱方式

| 时间 (min) | A% | B% |
|----------|----|----|
| 0        | 90 | 10 |
| 3        | 50 | 50 |
| 5        | 50 | 50 |
| 10       | 55 | 45 |
| 20       | 80 | 20 |

[0087] RP-HPLC色谱柱洗脱峰如图10所示, 得到五个洗脱峰, 即峰Ⅱ-I、Ⅱ-II、Ⅱ-III、Ⅱ-IV、Ⅱ-V。由图10可知Ⅱ-IV和Ⅱ-V产率较高, 故收集两个峰组分测定其N端氨基酸组成序列。且峰Ⅱ-IV产量最高, 则收集峰Ⅱ-IV冷冻干燥后进行MTT实验, 峰Ⅱ-IV组分对RAW 264.7细胞增殖能力的影响测定结果如图11所示, 可以看出, 峰Ⅱ-IV组分能促进RAW 264.7细胞增殖; 给药浓度为50ug/mL、100ug/mL时, 峰Ⅱ-IV组分对RAW 264.7细胞增殖的影响具有显著性 ( $P < 0.05$ ); 其中, 给药浓度为50ug/mL时, 细胞增殖率最大; 但浓度过低或过高时对细胞增殖的影响则无显著性差异。

[0088] 1.3.4.4目标肽N端氨基酸序列测定

[0089] 采用N端氨基酸测序法对小公鱼酶解目标肽进行序列测定, 经测定, 小公鱼免疫活性肽的氨基酸组成峰Ⅱ-IV序列是Tyr-Val-Met-Arg-Phe, 峰Ⅱ-V序列是Ser-Arg-Gln-Met-Ser。

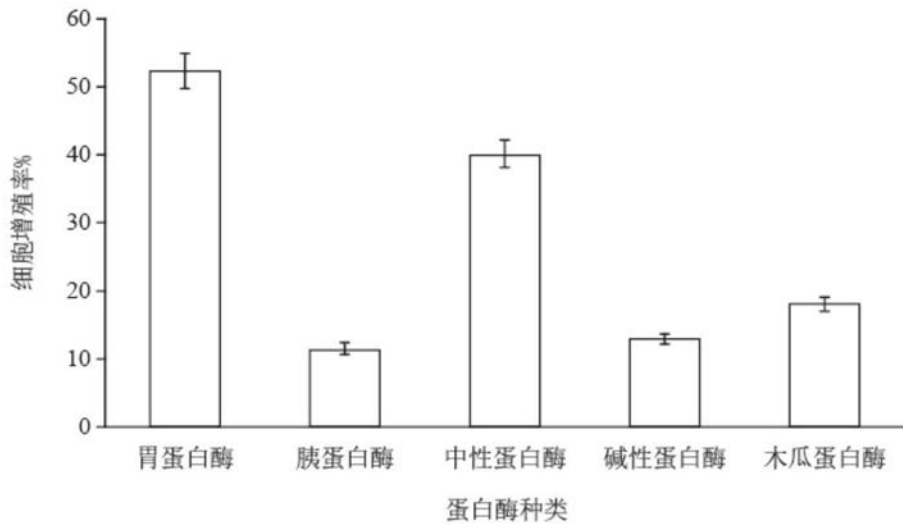


图1

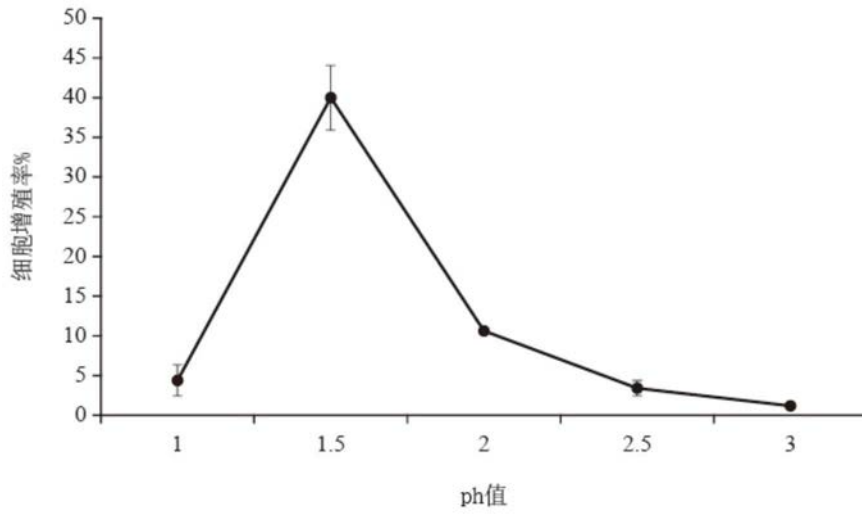


图2

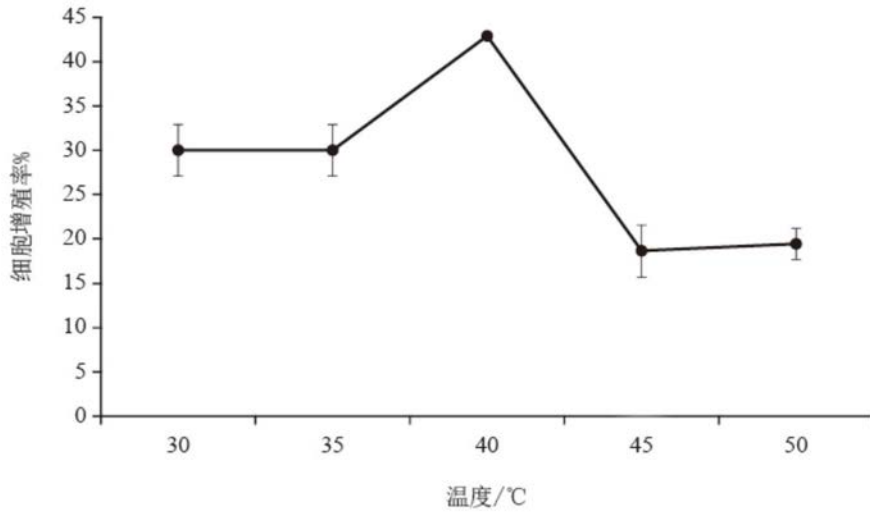


图3

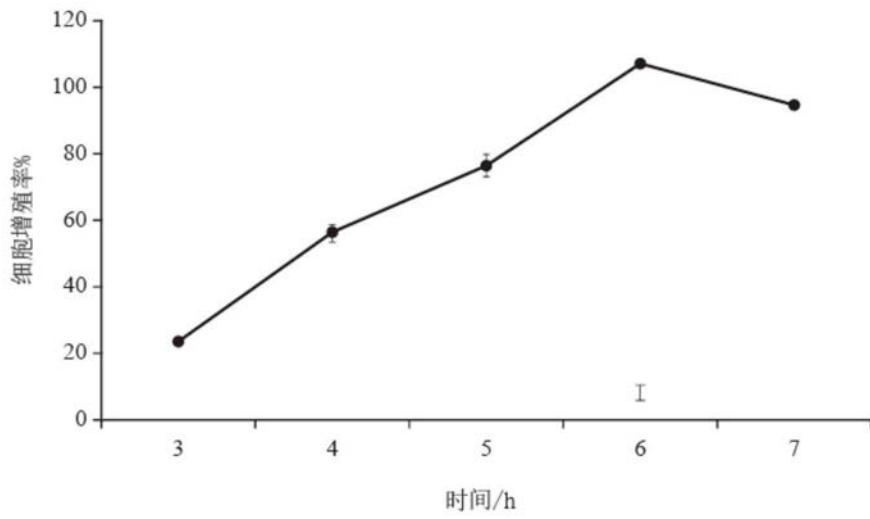


图4

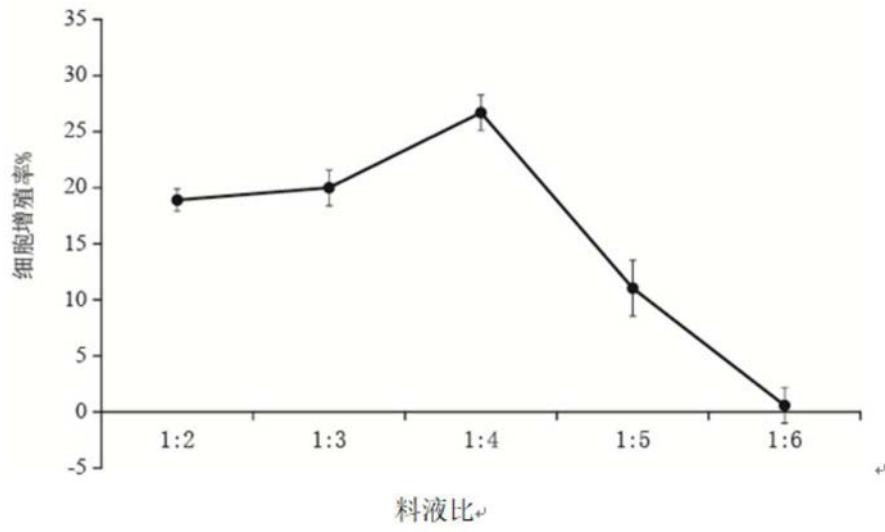


图5

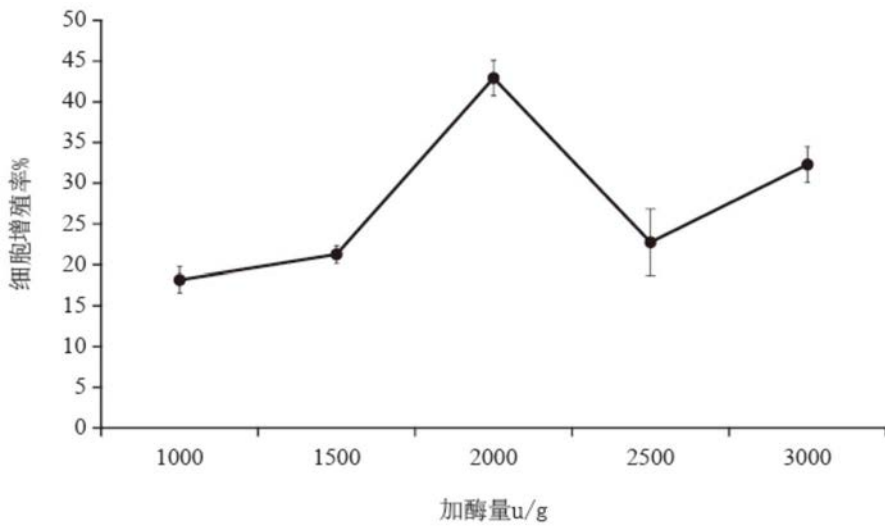


图6

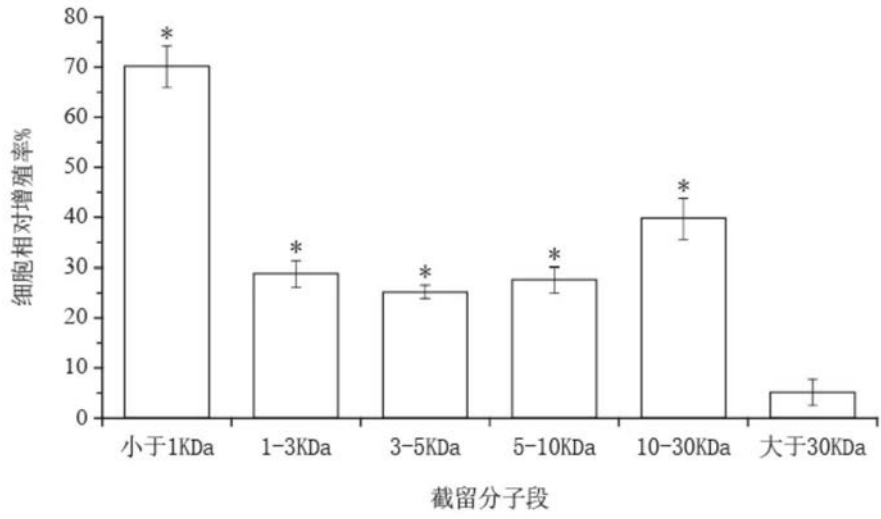


图7

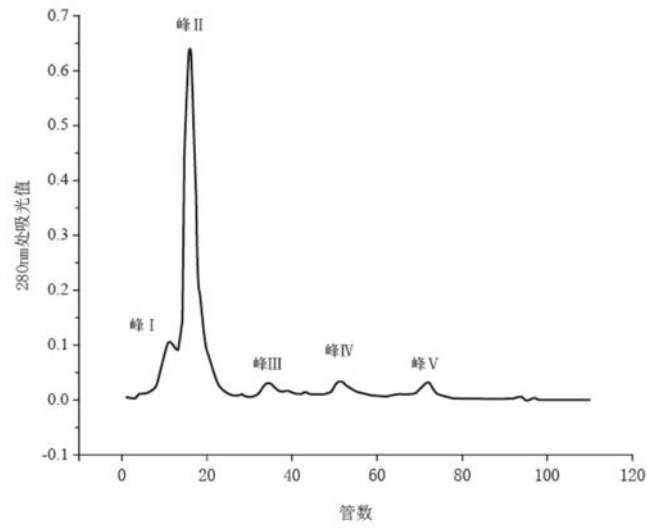


图8

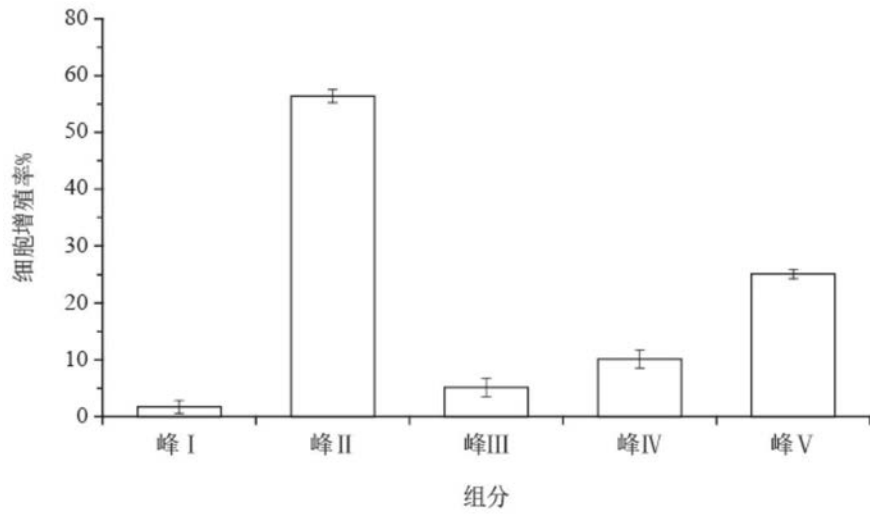


图9

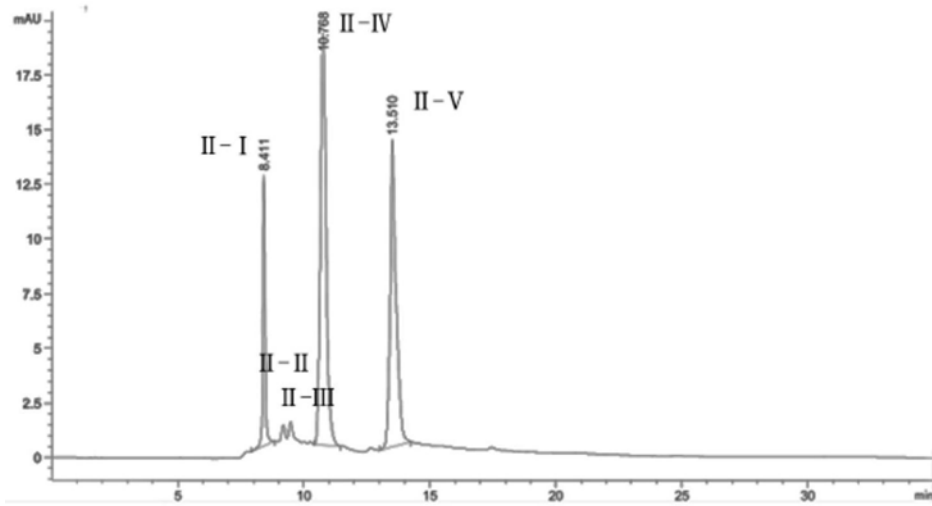


图10

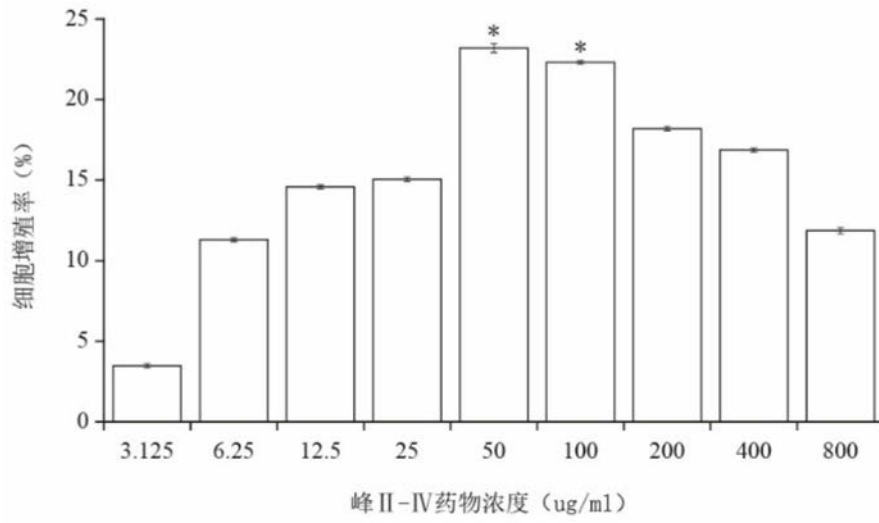


图11