

金枪鱼蛋白水解产物中免疫活性肽的分离、纯化及体外活性研究

徐远芳¹, 沈存宽¹, 刘悦¹, 徐文华², 曹少谦¹, 戚向阳¹, 杨华^{1*}

¹浙江万里学院生物与环境学院 浙江宁波 315000

²中国海洋大学食品科学与工程学院 山东青岛 266555)

摘要 目的:对金枪鱼蛋白水解产物中的免疫活性组分进行分离、鉴定。方法:通过胰蛋白酶水解金枪鱼蛋白,采用葡聚糖凝胶色谱和液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)方法进行分离、纯化和鉴定。以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的相对增殖率、吞噬能力、一氧化氮(NO)生成能力、细胞周期分布为评价指标,筛选具有较强免疫活性的组分,并鉴定组分结构。结果:经 SephadexG-25 和 SephadexG-15 层析分离、纯化,得到的 FF1 组分具有较强的免疫活性,其 RAW264.7 细胞相对增殖率为 73.66%,吞噬能力为 70.04%,NO 生成能力为 4.82 $\mu\text{mol/L}$ 。结论:经 SephadexG-15 分离得到的 FF1 组分具有较强的免疫活性,并从 FF1 组分中筛选出 2 条潜在的免疫活性肽序列,分别为 Gly-Asp-Ala-Glu-Met-Glu-Ala-Tyr-Gly-Lys (GDAEMEAYGK)和 Leu-Leu-Tyr-Gly-Gly-Ser-Val-Thr-Gln-Thr-Cys-Lys(LLYGGSVTQTCK)。研究结果可为金枪鱼免疫活性肽的开发、利用提供重要的理论参考。

关键词 金枪鱼;免疫活性肽;分离和纯化;酶解法

文章编号 1009-7848(2025)01-0372-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.035

免疫系统是生物体内一系列的生物学结构和过程所组成的疾病防御系统,具有识别和排除抗原性异物,与机体其它系统相互协调,共同维持体内环境稳定和生理平衡的功能^[1-2]。食源性免疫活性肽是一类具有调节免疫活性,参与免疫系统信号传递的小分子肽,具有增强巨噬细胞吞噬,刺激淋巴细胞增殖,增强机体免疫力等功能^[3-4]。食源性蛋白质来源广泛,安全性高,成本低廉,是分离提纯免疫活性肽的良好来源。例如:于志成等^[5]利用碱性蛋白酶制备酱油渣中免疫活性肽,其在脂多糖炎症模型中,对 NO 释放量具有显著抑制作用。董晓泽等^[6]以日本黄姑鱼为原料,通过优化酶解工艺得到最优酶解产物,能够有效促进小鼠巨噬细胞增殖。

金枪鱼属硬骨鱼纲鲈形目鲭科,是一种大型鱼类,具有高度洄游特性,广泛分布于全球热带和亚热带海域^[7-8]。在金枪鱼加工过程中,产生的大量

副产物同样含有丰富的营养物质,例如氨基酸、牛磺酸、维生素与矿物质等^[9]。采用酶解法水解金枪鱼蛋白获得活性多肽已有相关研究,如李桂芬等^[10]通过优化酶解工艺从金枪鱼蛋白中发现含有较强抗痛风作用的肽组分。Hsu 等^[11]通过酶解法制备黄鳍金枪鱼抗增殖肽,发现其纯化产物对人乳腺癌细胞具有抗增殖作用。然而,对金枪鱼免疫活性肽分离纯化及体外免疫活性的研究鲜见报道。

本课题组之前以金枪鱼为原料,通过超声波辅助酶解法获得具有较好免疫活性的酶解产物^[12]。本研究继续对其进行分离纯化。首先通过两步凝胶色谱对水解物进行初步分离,筛选出具有免疫活性的组分,然后采用液相二级质谱(Liquid chromatograph-mass spectrometer,LC-MS/MS)鉴定可能的序列,最后利用公共生物信息库对筛选所得序列进行活性分析,旨在为开发金枪鱼免疫活性肽类产品提供科学依据,同时为探索其它海洋生物资源中的免疫活性肽成分提供参考。

收稿日期: 2024-01-16

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2019C02071);宁波市公益项目(202002N3114,2022S149,2023S001);浙江省一流学科“生物工程”学生创新项目(CX2023019)

第一作者: 徐远芳,女,硕士

通信作者: 杨华 E-mail: 24825973@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙腈(质谱级),美国 Fisher Chemical 公司;氢氧化钠(NaOH),国药集团化学试剂有限公司;葡聚糖凝胶(Sephadex G-25、Sephadex G-15)、无菌

磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶(250 000 U/g)、脂多糖(LPS)、一氧化氮(NO)含量检测试剂盒、DNA含量检测试剂盒(细胞周期),索莱宝生物科技有限公司;小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7、高糖 DMEM 培养基,上海赛百慷生物科技有限公司;胎牛血清(FBS),美国 Gibco 公司;Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒,上海宏叶生物科技有限公司;甲酸、碳酸氢铵、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAM)(均为质谱级),Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与设备

CX31 倒置显微镜,日本 OLYMPUS 公司;PHS-29A 数显酸度计,上海虹益仪器有限公司;SpectraMax 酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;HD-A 层析图谱采集分析仪、HD-3 紫外检测仪、BT-100 恒流泵,上海沪西分析仪器厂;Guava EasyCyte™ 毛细管细胞分析仪,美国 Millipore 公司;Orbitrap 质谱仪、SPD121P-230 真空离心浓缩仪、Easy-nLC1200 液相色谱仪、Forma3111 CO₂ 细胞培养箱,美国 Thermo Fisher 公司;CF16RX II 超低温高速离心机,日本 HITACHI 公司;LCJ-25C 真空冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂有限公司;D1008 掌上离心机,美国 SCIOLOGEX 公司。

1.3 方法

1.3.1 金枪鱼蛋白水解产物的制备 采用先前试验中的超声波辅助酶解法制备金枪鱼蛋白水解产物(TAPH)^[12],最佳制备条件为:料液比 1:5,pH 值为 7,酶添加量 6 000 U/g,超声时间 11 min,酶解温度 37 ℃,酶解时间 5 h。

1.3.2 金枪鱼蛋白水解产物的分离和纯化

1.3.2.1 Sephadex G-25 凝胶色谱分离 参考周美含等^[13]的方法,并稍作修改。将冻干后的水解产物溶于超纯水中,调整样品质量浓度为 50 mg/mL,然后用 0.45 μm 水相过滤膜过滤。Sephadex G-25 葡聚糖凝胶柱经平衡后,加入 1 mL 样品,设定流速 1.5 mL/min,检测波长 220 nm,超纯水作为洗脱溶液,收集组分,冷冻干燥后进行免疫活性评估。

1.3.2.2 Sephadex G-15 凝胶色谱分离 取 Sephadex G-25 免疫活性最佳的组分进行二次纯化,将冻干后的 F1 分离组分溶于超纯水中,调整样品质量浓度为 20 mg/mL,然后用 0.45 μm 水相过滤膜过滤。Sephadex G-15 葡聚糖凝胶柱经平

衡后,加入 1 mL 样品,洗脱速度 1.5 mL/min,检测波长 220 nm,超纯水作为洗脱溶液,收集组分,冷冻干燥后进行免疫活性评估。

1.3.3 免疫活性肽的鉴定 使用 LC-MS/MS 对 1.3.2.2 节所分离的肽段进行样品鉴定。样品先溶解于 50 mmol/L NH₄HCO₃,于适量样品中加入 DTT 溶液使其终浓度为 10 mmol/L,于 56 ℃水浴中还原 1 h。加入 IAM 溶液使其终浓度为 50 mmol/L,避光反应 40 min 后,使用色谱柱 C18 柱(300 μm×5 mm,5 μm)脱盐后进行冷冻干燥并贮存于-20 ℃待上机检测。液相条件为:分析柱 C18(150 μm×150 mm,1.9 μm);流动相 A:0.1%甲酸水溶液;流动相 B:含有 0.1%甲酸水的 80%乙腈;流速 600 nL/min。质谱条件:正离子检测模式。一级分辨率为 70 000,Automatic Gain Control (AGC)设置为 1×10⁶,扫描范围 1 000~1 500 *m/z*;二级分辨率为 17 500,AGC 设置为 1×10⁵。所得结果利用 PEAKS Studio 10.6 软件以 Denovo 方法进行多肽序列解析,鉴定金枪鱼免疫活性肽分离组分 R2 的氨基酸序列。

1.3.4 计算机模拟评估肽的理化性质和生物活性

参考 Yu 等^[14]和 Duan 等^[15]研究方法,对经过质谱分析后得到的序列进行鉴定和筛选。采用 BIOPEP 数据库(<https://biochemia.uwm.edu.pl/metachemibio/>)预测所得肽序列的潜在免疫活性;通过 ExPASy ProtParam 工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)计算得到脂肪族指数、亲水性与不稳定性指数,并由 PepDraw 工具(<http://pepdraw.com/>)计算肽序列的疏水性、等电点(pI)和静电荷。

1.3.5 各个分离组分对小鼠巨噬细胞的免疫活性测定

1.3.5.1 CCK-8 法检测小鼠巨噬细胞的相对增殖活性 CCK-8 法是测定细胞增殖或毒性试验中活细胞数目的一种高灵敏度、无放射性的比色检测法^[16]。参考先前试验操作^[12]。收集对数生长周期的 RAW264.7 细胞,调节细胞密度为 1×10⁵ 个/mL,取 100 μL 接种于 96 孔板中,每组设置 5 个复孔。为防止边缘效应,在 96 孔板最外圈每孔加入 100 μL 的无菌 PBS 进行封边处理^[17],于 37 ℃,5%CO₂ 孵箱中培养 24 h 后,每孔均去除上清液,空白对

照组加入 100 μL 的完全培养基(含有 10%胎牛血清的低糖 DMEM 培养基),试验组加入 100 μL 质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液,阳性对照组加入 100 μL 质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液。继续培养 24 h 后,再加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,再置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 细胞培养箱培养 4 h 后,用酶标仪测定其在波长 492 nm 处的吸光值,并根据公式(1)计算出小鼠巨噬细胞的相对增殖率。

$$X(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: X 为细胞相对增殖率,%; A_1 为试验组在波长 492 nm 处的 OD 值; A_0 为空白组在波长 492 nm 处的吸光值。

1.3.5.2 中性红法检测小鼠巨噬细胞的吞噬活性

参考 Repetto 等^[18]方法并稍作修改,前期操作同 1.3.5.1 节,分组给药培养 24 h 后,去除上清液,每孔加入 100 μL 含有 0.09 mg/mL 中性红的 PBS,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱中培养 1 h。吸弃上清液,用无菌 PBS 洗涤 2~3 次,每孔加入 200 μL 细胞裂解液(冰醋酸:乙醇=1:1),吹打均匀,室温振荡 5 min 后,于酶标仪测定其在波长 520 nm 处的 OD 值,并根据公式(2)计算出小鼠巨噬细胞的吞噬活性。

$$X(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: X 为细胞相对吞噬率,%; A_1 为试验组在波长 520 nm 处的 OD 值; A_0 为空白组在波长 520 nm 处的吸光值。

1.3.5.3 Griess 法检测小鼠巨噬细胞生成 NO 能力 前期操作同 1.3.6.1 节,分组给药 24 h 后,收集上清液,每孔加入 50 μL 的 Griess Reagent I 与 Griess Reagent II 试剂,于酶标仪测定其在波长 520 nm 处的 OD 值,并根据标准曲线($y=0.0059x+0.0711$, $R^2=0.9988$)测定细胞上清液 NO 含量。

1.3.5.4 小鼠巨噬细胞的细胞周期 参考 Yuan 等^[19]方法并稍作修改,收集对数生长周期的 RAW264.7 细胞,调节细胞密度为 2×10^5 个/mL,取 2 mL 接种于 6 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后,弃去上清液,空白对照组加入 2 mL 的完全培养基,试验组加入 2 mL 质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液,阳性对照组加入 2 mL 质量浓

度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 溶液,继续培养 24 h。弃上清液,用 PBS 洗涤后,收集每孔细胞后,加入预冷的 70%乙醇溶液放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定 4 h,再离心弃上清,用 PBS 洗涤 2 次后,离心弃上清,加入 400 μL RNase A 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,加入 PI (Propidium iodide) 染料混匀后,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,200 目细胞筛网过滤 1 次,用流式细胞仪进行检测,记录激发波长 488 nm 处的红色荧光强度。使用 FlowJo 软件(version10.8)进行细胞周期分析。

1.4 数据分析

所有试验至少平行 3 次,采用 IBM SPSS Statistics 25 进行数据显著性分析,Graphpad Prism 8 进行数据处理及绘图,氨基酸序列分析采用 LC-MS/MS 序列分析软件和 PEAKS Studio 软件(version10.6)。

2 结果与分析

2.1 金枪鱼蛋白水解产物的 Sephadex G-25 凝胶层析分离

Sephadex 是以葡聚糖为基质的凝胶过滤层析介质,其工作原理主要是利用具有网状结构的葡聚糖凝胶分子筛,根据被分离物质不同分子质量大小进行分离筛选^[20]。试验首先选用 Sephadex G-25 凝胶层析对金枪鱼蛋白水解产物进行初次分离,其分离分子质量范围为 1~5 ku。金枪鱼蛋白水解产物经过 Sephadex G-25 分离后,共得到 3 个组分峰,分别命名为 F1~F3(图 1)。收集各个组分进行冷冻干燥后,待后续的免疫活性研究。

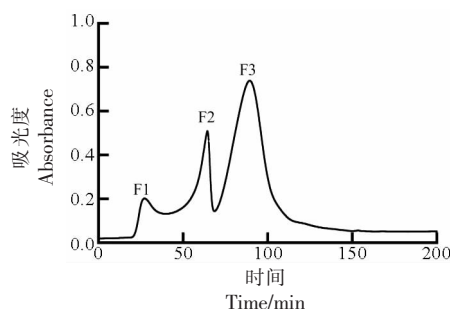


图 1 Sephadex G-25 分离金枪鱼水解产物的色谱图

Fig.1 Chromatographic characterization of enzymolysis products from tuna by Sephadex G-25

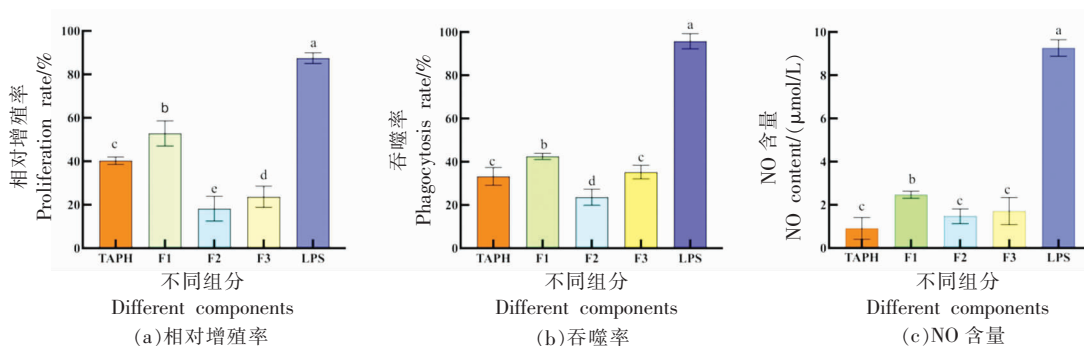
2.2 Sephadex G-25 分离组分的小鼠巨噬细胞免疫活性分析

金枪鱼蛋白水解产物经过 Sephadex G-25 凝胶层析后,得到的 3 个组分对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 相对增殖率的影响如图 2a 所示。可知 3 个分离组分均对 RAW264.7 细胞的相对增殖率有一定的促进作用,其中,F1 组分处理后小鼠巨噬细胞相对增殖率显著升高为 52.82%,且显著高于水解产物和另外 2 种分离组分($P < 0.05$)。

巨噬细胞通过吞噬以及细胞内杀伤病原体,从而参与机体免疫反应,因此其吞噬能力是免疫系统的重要标志之一^[21-22]。本文采用中性红法检测各组小鼠巨噬细胞吞噬功能的变化,结果如图 2b 所示,3 种分离组分均可以促进 RAW264.7 细胞

吞噬作用,其中,F1 分离组分的吞噬能力显著高于其它组分($P < 0.05$),其 RAW264.7 细胞的吞噬率为 42.49%。

NO 是参与免疫反应的重要免疫因子,在内毒素致机体损伤中起到重要作用,是参与免疫反应的重要因子,也是介导炎症反应的关键因子,适量的 NO 能够通过杀灭病原体抑制炎症的发生^[23-24]。分离所得 3 个组分对 RAW264.7 释放 NO 的影响如图 2c 所示,可知 F1 分离组分的 NO 释放量显著高于其它分离组分,可达 2.46 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$),F2 与 F3 分离组分对 RAW264.7 细胞的 NO 释放量的影响均不显著。综上可得,F1 组分具有较强的免疫活性,因此有必要做进一步分离、纯化。



注:不同小写字母表示组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

图 2 Sephadex G-25 分离组分的小鼠巨噬细胞免疫活性

Fig.2 Immune activity of mouse macrophages from Sephadex G-25 isolated components

2.3 F1 组分的 Sephadex G-15 凝胶层析分离

Sephadex G-15 凝胶层析柱分离多肽的分子质量范围为 0.1~1.5 ku。选取上述免疫活性最佳的 F1 组分进一步分离、纯化,该凝胶分离色谱图如图 3 所示,F1 组分经过 Sephadex G-15 分离后共获得了 2 个洗脱峰,分别命名为 FF1、FF2。后续分别对 2 个洗脱峰进行收集,冷冻干燥,用于后续免疫活性研究。

2.4 Sephadex G-15 分离组分的小鼠巨噬细胞免疫活性分析

FF1 和 FF2 分离组分对小鼠巨噬细胞免疫活性结果如图 4 所示,2 个组分均能显著刺激 RAW264.7 细胞增殖,免疫活性均显著优于 F1 分离组分 ($P < 0.05$),其中 FF1 分离组分促进

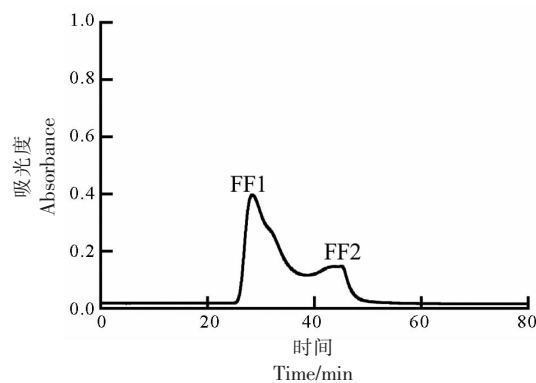
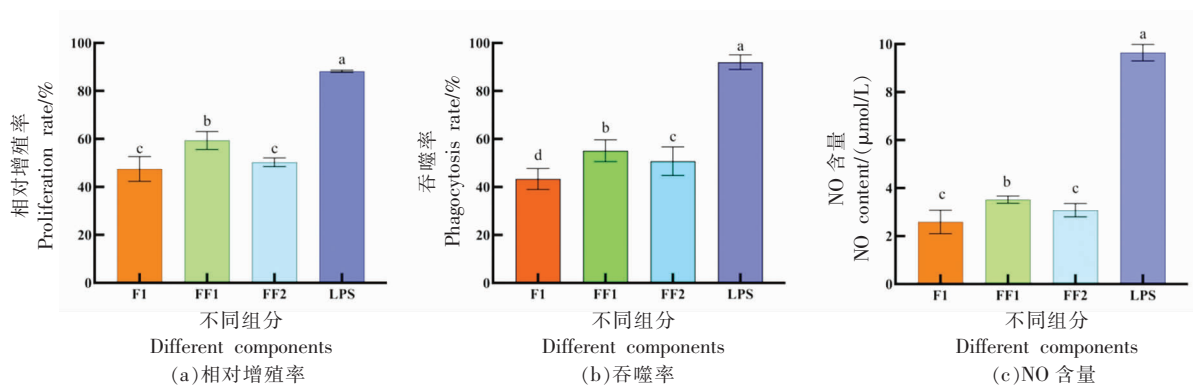


图 3 Sephadex G-15 分离 F1 组分的层析图谱
Fig.3 Chromatographic map of F1 component of tuna separated by Sephadex G-15

RAW264.7 细胞增殖的效果最佳,为 59.35%,相较于 F1 分离组分提高了 11.87%,同时也大于 FF2

分离组分(50.20%)(图4a)。细胞吞噬率方面,FF1分离组也显著促进了RAW264.7细胞吞噬能力,可达55.10%,比FF2组分提高了1.08倍,且比F1组分提高了1.27倍(图4b)。图1c中,与F1相比,FF1显著提高细胞分泌NO能力($P < 0.05$),达到

了 $3.52 \mu\text{mol/L}$,比F1组分提高了1.35倍。综上所述,经过SephadexG-15凝胶层析纯化后的2个组分的免疫活性均优于F1分离组分,且FF1组分的免疫调节活性最佳。



注:不同小写字母表示组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

图4 Sephadex G-15分离组分的小鼠巨噬细胞免疫活性

Fig.4 Immunoactivity of Sephadex G-15 isolated component in mouse macrophages

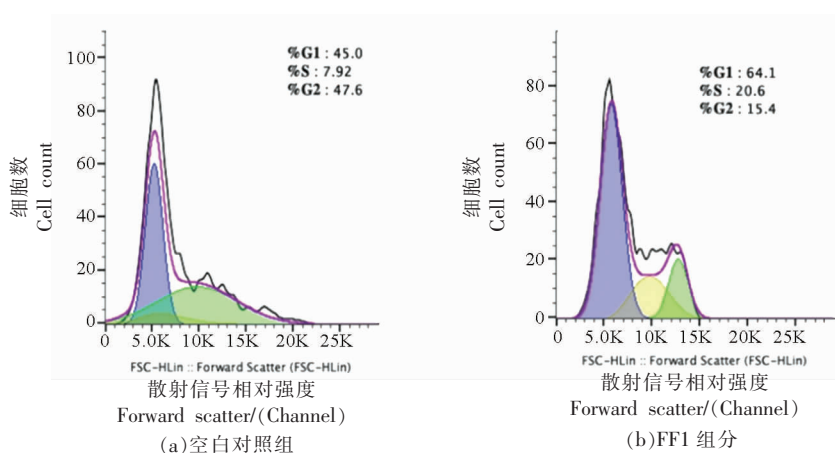
2.5 Sephadex G-15分离组分的小鼠巨噬细胞的细胞周期

细胞周期的分布比例通常被认为是细胞存活、生长、增殖的主要参数^[25]。细胞周期可分为G0期,即为DNA合成前期;S期即DNA合成期;G2期即DNA合成后期^[26]。如图5所示,Sephadex G-15分离组分对小鼠巨噬细胞的细胞周期影响。由图可以看出,与空白对照组相比,经过各个分离组分处理24h后,G1期均有所提高,其中FF1分离组分显著增加了G1期和S期细胞数量,降低了G2期细胞比例,提高了G1期与S期细胞比例。这

与叶盛旺等^[27]研究青蛤酶解产物对小鼠巨噬细胞的细胞周期影响结果相似。

2.6 金枪鱼蛋白水解产物中免疫活性肽的鉴定

使用LC-MS/MS鉴定了FF1分离组分中可能的多肽序列。随后通过蛋白质De novo从头测序技术,鉴定得到多条多肽氨基酸序列,经与BIOPEP数据库对比,筛选得到2条具有潜在免疫活性的肽段如表1和图6所示。其序列分别是Gly-Asp-Ala-Glu-Met-Glu-Ala-Tyr-Gly-Lys(GDAEMEAYGK)和Leu-Leu-Tyr-Gly-Gly-Ser-Val-Thr-Gln-Thr-Cys-Lys(LLYGGSVTQTCK),通



(a)空白对照组

(b)FF1组分

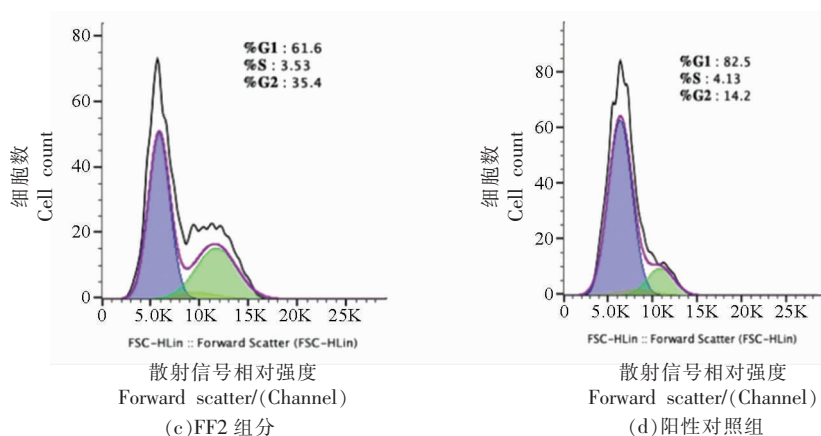


图 5 Sephadex G-15 分离组分的小鼠巨噬细胞的细胞周期影响

Fig.5 Sephadex G-15 isolated fractions of RAW264.7 for fine cell cycle distribution

过检索 BIOPEP 数据库, 并未发现相同的免疫活性肽序列, 故认为获得的肽是新颖的。利用 Ex-PASy ProtParam 和 PepDraw 数据库对其理化性质、生物活性进行预测(表 2)。

序列 GDAEMEAYGK 含有疏水性氨基酸占比 40%, 主要为丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)。序列 LLYGGSVTQTCK 含有疏水性氨基酸占比 41.7%, 主要为甘氨酸(Gly)、亮氨酸(Leu)、缬氨酸(Val)。研究报道大部分免疫活性肽的氨基酸组成中一般会含有 1 个或多个疏水性氨基酸^[28]。有研究表明, 肽链中某些特殊氨基酸在免疫调节过程中发挥关键作用, 例如氨基酸序列中含有亮氨酸(Leu)、缬氨酸(Val)、异亮氨酸(Ile)的多肽会影响机体内免疫标识物的表达^[29]。多肽肽链 N 端或 C 端含有精氨酸(Arg)、色氨酸(Trp)以及谷氨酰胺(Gln)能被免疫细胞表面的阿片受体识别^[30]。精氨酸(Arg)的代谢产物具有调节机体免疫功能的作用^[31]。同时研究报道大部分免疫活性肽的氨基酸组成中一般会含有 1 个或多个疏水性氨基酸^[28]。例如 Yu 等^[32]通过对猴头菇蛋白水解产物分离出 1 段五肽 (Lys-Ser-Pro-Leu-Tyr), 该五肽含有 2 个疏水性氨基酸, 具有促进巨噬细胞分泌 NO、IL-1 β 和 TNF- α 等免疫调节作用。

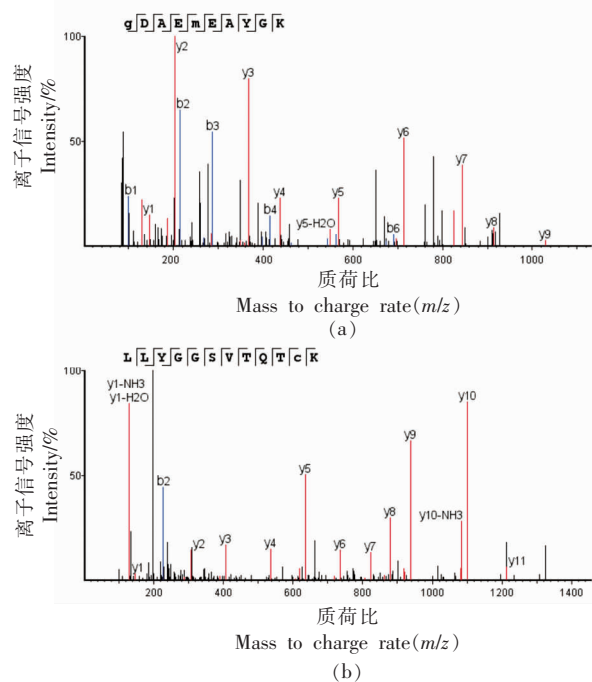


图 6 FF1 组分经质谱鉴定的二级色谱图

Fig.6 Secondary chromatogram of FF1 component identified by mass spectrometry

表 1 模拟鉴定的肽的生物活性

Table 1 Biological potential of identified peptides

氨基酸序列	生物活性
GDAEMEAYGK	免疫活性/ACE 抑制/抗氧化/二肽基肽酶 IV 抑制/二肽基肽酶 III 抑制/糖苷酶抑制剂
LLYGGSVTQTCK	免疫活性/ACE 抑制/抗氧化/二肽基肽酶 IV 抑制/二肽基肽酶 III 抑制/葡萄糖摄取刺激/糖苷酶抑制剂/肾素抑制

表2 模拟鉴定的肽的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of identified anti-inflammatory peptides

氨基酸序列	相对分子质量	静电荷	脂肪族	亲水性	pI	疏水性/ (kcal/mol)	不稳定系数
GDAEMEAYGK	564.7286	-2	20	-1.1	3.73	+23.52	-7.98
LLYGGSVTQTCK	663.8379	+1	89.17	0.217	8.89	+11.04	-0.98

3 结论

金枪鱼水解产物(TAPH)经过 Sephadex G-25 凝胶层析柱分离后共得到3个分离组分(F1-F3),其中F1组分的免疫活性最佳。进一步对F1组分利用 Sephadex G-15 凝胶层析柱分离,获得了2个分离组分FF1和FF2。结果表明,FF1组分能显著促进RAW264.7的增殖率和吞噬能力及NO生成能力,分别为73%,74.06%,4.8 μmol/L。此外,经过FF1处理后的RAW264.7细胞的G0期细胞比例明显提高,说明其FF1组分的免疫活性最好,最后FF1组分经过LC-MS/MS鉴定分析,得到2条免疫活性肽GDAEMEAYGK和LLYGGSVTQTCK。本研究结果可以为后续免疫活性肽的人工合成提供理论基础,为今后金枪鱼来源的免疫活性肽在食品药品的应用提供理论与技术支持。

参 考 文 献

- [1] RYNDA-APPLE A, ROBINSON K M, ALCORN J F. Influenza and bacterial superinfection: Illuminating the immunologic mechanisms of disease[J]. *Infection and Immunity*, 2015, 83(10): 3764-3770.
- [2] TECKLENBORG J, CLAYTON D, SIEBERT S, et al. The role of the immune system in kidney disease[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2018, 192(2): 142-150.
- [3] WANG J, ZHENG M Z, MIN Q X, et al. The dual regulatory function of lienal peptide on immune system[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 55: 245-253.
- [4] BRUNO B J, MILLER G D, LIM C S. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery[J]. *Therapeutic Delivery*, 2013, 4(11): 1443-1467.
- [5] 于志成, 刘步青, 许宙, 等. 酱油渣中免疫活性肽水解用酶的筛选[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(10): 84-90.
- [6] YU Z C, LIU B Q, YU Z, et al. Screening of enzymes for hydrolysis of immunoactive peptides in soy sauce residue[J]. *Journal of Cereals and Oils*, 2020, 35(10): 84-90.
- [6] 董晓泽, 徐书敏, 王丽君, 等. 日本黄姑鱼鱼皮免疫活性肽的酶解制备工艺研究[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 39(2): 110-116.
- [7] DONG X Z, XU S M, WANG L J, et al. Study on enzymolysis of immunoactive peptides from fish skin of Japanese curds[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2020, 39(2): 110-116.
- [7] 张青, 王锡昌, 刘源. 中国金枪鱼渔业现状及发展趋势[J]. *南方水产*, 2009, 5(1): 68-74.
- [8] ZHANG Q, WANG X C, LIU Y. Current situation and development trend of tuna fishery in China[J]. *Southern Aquatic Products*, 2009, 5(1): 68-74.
- [8] 章超. 酶法水解金枪鱼肉制备生物活性肽[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2016.
- [9] ZHANG C. Preparation of bioactive peptide from tuna meat by enzymatic hydrolysis[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2016.
- [9] 翟璐, 杨加成, 陈康, 等. 金枪鱼纳米鱼骨钙对鱼糜制品凝胶特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(5): 180-188.
- [10] ZHAO L, YANG J C, CHEN K, et al. Effect of tuna nano-fish bone calcium on gel properties of surimi products[J]. *Acta Food Sinica*, 2022, 22(5): 180-188.
- [10] 李桂芬, 何定芬, 郑霖波, 等. 响应面法优化金枪鱼蛋白抗痛风活性肽制备工艺[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 39(1): 41-50.
- LI G F, HE D F, ZHENG L B, et al. Optimization of preparation of anti-gout peptides from tuna protein by response surface method[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2020, 39(1): 41-50.

- [11] HSU K C, LI-CHAN E C Y, JAO C L. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7[J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 617-622.
- [12] 徐远芳, 王馨怡, 刘悦, 等. 超声波辅助黄鳍金枪鱼免疫活性肽酶解工艺优化[J]. 食品工业科技, 2024, 45(2): 168-174.
XU Y F, WANG X Y, LIU Y, et al. Optimization of enzymolysis process of immunological activity of yellowfin tuna assisted by ultrasound[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(2): 168-174.
- [13] 周美含, 郭勇, 魏贞, 等. 榛仁降脂活性肽分离纯化及结构鉴定[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 124-129.
ZHOU M H, GUO Y, WEI Z, et al. Isolation, purification and structure identification of active lipid-lowering peptides from hazelnut[J]. Food Science, 2019, 40(16): 124-129.
- [14] YU Z P, WU S J, ZHAO W Z, et al. Identification and the molecular mechanism of a novel myosin-derived ACE inhibitory peptide[J]. Food & Function, 2018, 9(1): 364-370.
- [15] DUAN X J, ZHANG M, CHEN F S. Prediction and analysis of antimicrobial peptides from rapeseed protein using in silico approach[J]. Journal of Food Biochemistry, 2021(9): e13598.
- [16] 常娜, 杨乐. 基础医学专业《Cell Counting Kit-8 法测定贴壁细胞数》实验课程设计[J]. 继续医学教育, 2021, 35(8): 48-49.
CHANG N, YANG L. Experimental course design of 'Cell Counting Kit-8 Method for Determining the Number of Adherent Cells' for basic medicine specialty[J]. Continuing Medical Education, 2021, 35(8): 48-49.
- [17] 李慧娟, 张黎, 姜姗, 等. 抑制 *PRR11* 基因对胰腺癌细胞 SW1990 行为的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12): 1469-1472.
LI H J, ZHANG L, JIANG S, et al. Effect of inhibition of *PRR11* gene on the behavior of pancreatic cancer cells SW1990[J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(12): 1469-1472.
- [18] REPETTO G, DEL PESO A, ZURITA J L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity[J]. Nature protocols, 2008, 3(7): 1125-1131.
- [19] YUAN C, ZHENG X Y, LIU K N, et al. Functional characterization, antimicrobial effects, and potential antibacterial mechanisms of NpHM4, a derived peptide of *Nautilus pompilius* hemocyanin[J]. Marine Drugs, 2022, 20(7): 459.
- [20] HU Y Q, YANG J H, HE C B, et al. Fractionation and purification of antioxidant peptides from abalone viscera by a combination of Sephadex G-15 and Toyopearl HW-40F chromatography[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2022, 57(2): 1218-1225.
- [21] LIN H W, LIU C W, YANG D J, et al. *Dunaliella salina* alga extract inhibits the production of interleukin -6, nitric oxide, and reactive oxygen species by regulating nuclear factor- κ B/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription in virus-infected RAW264.7 cells[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2017, 25(4): 908-918.
- [22] HUNTER M, WANG Y J, EUBANK T, et al. Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease[J]. Frontiers in Bioscience A Journal & Virtual Library, 2009, 14: 4079.
- [23] YANG F, COMTOIS A S, FANG L W, et al. Nitric oxide-derived nitrate anion contributes to endotoxic shock and multiple organ injury/dysfunction[J]. Critical Care Medicine, 2002, 30(3): 650.
- [24] GAO R C, SHU W H, SHEN Y, et al. Sturgeon protein-derived peptides exert anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via the MAPK pathway[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 72: 104044.
- [25] VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE D R, BERNEMAN Z N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. Cell Prolif, 2003, 36(3): 131-149.
- [26] 张弛, 陆俊铭, 周炳刚, 等. 心房利钠肽对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 周期分布的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2020, 42(5): 452-456.
ZHANG C, LU J M, ZHOU B G, et al. Effect of atrial natriuretic peptide on the cycle distribution of MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Journal of Ningxia Medical University, 2020, 42(5): 452-456.
- [27] 叶盛旺, 杨最素, 李维, 等. 青蛤酶解多肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食品科学, 2019, 40(7): 185-191.

- YE S W, YANG Z S, LI W, et al. Effect of enzymolysis polypeptide on immune regulation of RAW264.7 macrophages[J]. Food Science, 2019, 40(7): 185–191.
- [28] JACQUOT A, GAUTHIER S F, DROUIN R, et al. Proliferative effects of synthetic peptides from β -lactoglobulin and α -lactalbumin on murine splenocytes[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(8): 514–521.
- [29] NETO M G O, SANTOS H A, FRAGA R E, et al. Nitric oxide and immune response in infection control of caseous lymphadenitis[J]. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia, 2017, 69(6): 1565–1572.
- [30] HAQUE E, CHAND R, KAPILA S. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin[J]. Food Reviews International, 2008, 25(1): 28–43.
- [31] MONDANELLI G, COLETTI A, GRECO F A, et al. Positive allosteric modulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 restrains neuroinflammation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(7): 3848–3857.
- [32] YU Y H, HU Q H, LIU J H, et al. Isolation, purification and identification of immunologically active peptides from *Hericiium erinaceus*[J]. Food Chem Toxicol, 2021, 151: 112111.

Isolation, Purification and *in Vitro* Activity Evaluation of Immunologically Active Peptides from Tuna Protein Hydrolysis

XU Yuanfang¹, SHEN Cunkuan¹, LIU Yue¹, XU Wenhua², CAO Shaoqian¹, QI Xiangyang¹, YANG Hua^{1*}

¹College of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315000, Zhejiang

²College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266555, Shandong)

Abstract Purpose: To screen and identify immunologically active components in the hydrolysate of tuna protein. Method: Tuna protein was hydrolyzed using trypsin, and separation, purification, and identification were performed using a combination of Sephadex G-25 gel chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). The evaluation criteria included the relative proliferation rate, phagocytic ability, nitric oxide (NO) production capacity, and cell cycle distribution of RAW264.7 cells. Components with strong immunological activity were selected, and their structures were identified. Results: After purification by Sephadex G-25 and Sephadex G-15 chromatography, the isolated FF1 fraction exhibited strong immunological activity, with a relative proliferation rate of 73.66%, phagocytic ability of 70.04%, and NO production capacity of 4.82 $\mu\text{mol/L}$ in RAW264.7 cells. Conclusion: The FF1 fraction obtained after Sephadex G-15 separation demonstrated strong immunological activity, and two potential immunologically active peptide sequences were screened from this fraction, namely, Gly-Asp-Ala-Glu-Met-Glu-Ala-Tyr-Gly-Lys (GDAEMEAYGK) and Leu-Leu-Tyr-Gly-Gly-Ser-Val-Thr-Gln-Thr-Cys-Lys (LLYGGSVTQTCK). This study provides important theoretical references for the development and utilization of immunologically active peptides from tuna.

Keywords tuna; immunologically active peptides; isolation and purification; enzymolysis approach