



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109776652 B

(45)授权公告日 2020.08.18

(21)申请号 201910091803.5

(22)申请日 2019.01.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109776652 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(73)专利权人 浙江省医学科学院
地址 310013 浙江省杭州市天目山路182号

(72)发明人 贾建萍 包国良 李青青

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 朱滕琪

(51)Int.Cl.
C07K 5/087(2006.01)

(续)

(56)对比文件

CN 104372054 A,2015.02.25

CN 105906709 A,2016.08.31

WO 2009115469 A1,2009.09.24

CN 107164445 A,2017.09.15

CN 109182435 A,2019.01.11

Eunice C. Y. Li-Chan等.Peptides

Derived from Atlantic Salmon Skin Gelatin

as Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitors.
《Journal of Agricultural and Food
Chemistry》.2012,第60卷

Tzu-Yuan Wang等.Fish skin gelatin
hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV
inhibitors and glucagon-like peptide-1
stimulators improve glycaemic control in
diabetic rats: A comparison between warm-
and warmand..《ScienceDirect》.2015,第19卷

Adriana C. Nevesa等.Peptide
identification in a salmon gelatin
hydrolysate with antihypertensive,
dipeptidyl peptidase IV inhibitory and
antioxidant activities.《Food Research
International》.2017,第100卷

ERESHA MENDIS等.Antioxidant
Properties of a Radical-Scavenging
Peptide Purified from Enzymatically
Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate.
《J. Agric. Food Chem.》.2004,第53卷

审查员 黎舒婷

权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图5页

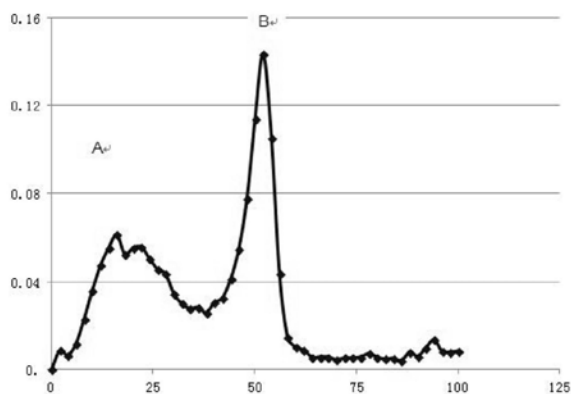
(54)发明名称

鳕鱼皮寡肽及其分离纯化方法和在制备α-
葡萄糖苷酶抑制剂及抗II型糖尿病药物中的应
用

(57)摘要

本发明公开了一种鳕鱼皮寡肽及其分离纯
化方法和应用,该鳕鱼皮寡肽的氨基酸序列分别
为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg或
Phe-Tyr-Glu。分离纯化方法包括:以阿拉斯加狭
鳕鱼皮为原料,蛋白酶酶解法制备鳕鱼皮胶原肽
混合肽;再依次进行超滤处理、葡聚糖凝胶色谱
柱粗分以及高效液相色谱分离;葡聚糖凝胶色谱
柱由葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和葡聚糖凝
胶树脂Sephadex G-50串联而成。经活性试验发
现,这三种鳕鱼皮寡肽具有α-葡萄糖苷酶抑制活

性,能辅助降血糖,可用于制备抗II型糖尿病药
物。



CN 109776652 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C12P 21/06(2006.01)

C07K 1/34(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

C07K 1/36(2006.01)

A61K 38/08(2019.01)

A61P 3/10(2006.01)

1. 一种鳕鱼皮寡肽,其特征在于,氨基酸序列为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg。
2. 一种根据权利要求1所述的鳕鱼皮寡肽的分离纯化方法,其特征在于,包括:
 - (1) 以阿拉斯加狭鳕鱼皮为原料,经蛋白酶酶解法制备鳕鱼皮胶原肽混合肽;
所述蛋白酶酶解法具体为:
将阿拉斯加狭鳕鱼皮、胰酶与水混合,在52~58℃、pH=5.5~6.5下酶解6~10h;
以阿拉斯加狭鳕鱼皮的质量计,所述胰酶的加入量为0.15~0.25wt%;
所述阿拉斯加狭鳕鱼皮与水的质量比为1:4~8;
 - (2) 采用截留分子量为3000Da的超滤膜对步骤(1)制备的鳕鱼皮胶原肽混合肽进行超滤处理,再经浓缩、干燥得到鳕鱼皮胶原肽;
 - (3) 以水为流动相,采用葡聚糖凝胶色谱柱对步骤(2)制备的鳕鱼皮胶原肽进行粗分;
所述葡聚糖凝胶色谱柱的填料由葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成;所述葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25选自100目,葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50选自60目;所述流动相的流速为0.8~1.4mL/min;
 - (4) 利用高效液相色谱技术将步骤(3)的粗分产物进一步分离,得到三种鳕鱼皮寡肽;
色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱;
流动相:A液:0.05%三氟乙酸-水溶液;B液:0.05%三氟乙酸-乙腈溶液;
采用线性梯度洗脱,0~20min,5%~20%B;20~25min,20%~100%B;
流速为1.0mL/min,柱温为30℃,检测波长为220nm。
3. 根据权利要求2所述的鳕鱼皮寡肽的分离纯化方法,其特征在于,步骤(1)中,所述蛋白酶酶解法:
将阿拉斯加狭鳕鱼皮、胰酶与水混合,在55℃、pH=6.0下酶解8h;
以阿拉斯加狭鳕鱼皮的质量计,所述胰酶的加入量为0.20wt%;
所述阿拉斯加狭鳕鱼皮与水的质量比为1:6。
4. 根据权利要求2所述的鳕鱼皮寡肽的分离纯化方法,其特征在于,步骤(2)中,所述超滤膜选自中空纤维聚砜超滤膜。
5. 一种根据权利要求1所述的鳕鱼皮寡肽在制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂中的应用。
6. 一种根据权利要求1所述的鳕鱼皮寡肽在制备抗II型糖尿病药物中的应用。

鳕鱼皮寡肽及其分离纯化方法和在制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂及抗 II 型糖尿病药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及鱼皮寡肽的分离纯化及应用领域,尤其涉及阿拉斯加狭鳕鱼皮寡肽及其分离纯化方法和在制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂及抗 II 型糖尿病药物中的应用。

背景技术

[0002] 阿拉斯加狭鳕鱼。学名为*Theragra chalcogramma*,生活在大西洋北部,是一种冷水性深海鱼类,肉质细嫩,肉味清淡,由于其长期的生长环境特殊(低温、高压),其鱼蛋白(鱼肉、鱼皮等)的氨基酸组成及氨基酸序列可能有别于其他的浅海鱼及淡水鱼等。

[0003] 鳕鱼皮胶原肽是以鳕鱼皮为原料,利用酶法制得而成的一类蛋白质、多肽、寡肽和氨基酸的混合物(含量以寡肽为主)。其中的寡肽是一类氨基酸残基数目在2~12个的小肽。

[0004] 如申请公布号为CN 108530530 A的中国专利文献中公开了一种鳕鱼鱼皮胶原肽的制备方法,包括:1)将鱼皮除杂清洗后粉碎成浆,经酸洗、碱洗后再水洗至中性;2)将步骤1)处理后的鱼皮加入热水中保温;3)将步骤2)得到的蛋白提取液中加入蛋白酶,经两次酶解处理;4)将酶解后的浆液用离心机除去固体残渣,所得清液经超滤膜去除少量大分子杂质,再用纳滤膜去除无机盐和小分子杂质并浓缩,得到鱼皮胶原肽溶液,经喷雾干燥得到鱼皮胶原肽粉末。

[0005] 再如申请公布号为CN 104152518 A的中国专利文献中公开了一种肝病辅食型鳕鱼皮胶原蛋白肽的制备方法,包括:(1)鳕鱼皮预处理;(2)酶解反应:加入胰蛋白酶酶解反应;(3)超滤得GM2组分;(4)DEAE-SepharoseFF离子交换层析分离得到GM2-2组分,冷冻干燥得到胶原蛋白酶。

[0006] 但以上技术方案得到的胶原肽或胶原蛋白酶均属于大分子肽或蛋白质,其分离方法不适用于鳕鱼皮寡肽的分离纯化。

[0007] 分子量较小的鳕鱼皮寡肽之间分子量较为接近,而且其他物性如带电性、疏水性等差别不明显,利用传统膜分离方式或采用单一填料的层析分离法无法分离生物活性较高的组分。

[0008] 目前已报道的鱼皮寡肽的生物活性有抗氧化、降血糖、提高免疫功能等,如WANG等(WANG T Y,HSIEH C H,HUNG CC,et al.Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1stimulators improve glycaemic control in diabeticrats:a comparison between warm-and cold-water fish[J].)对比目鱼和罗非鱼的鱼皮进行水解,经分离纯化后得到一种二肽基肽酶,发现其可以促进胰高血糖素样肽和胰岛素的分泌,进而发挥调节血糖的作用。

[0009] 糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,高血糖则是由于胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损,或两者兼有引起。降糖药按照降糖机理大致分为三种:(1)刺激胰岛素的分泌或胰岛素制剂,如磺脲类药物;(2)增加外周组织对葡萄糖的利用,如双胍类降糖药;(3) α -葡萄糖苷酶抑制剂,如临床上常用的阿卡波糖等。

[0010] 目前公开的具有降血糖功效的鱼皮寡肽均是遵循机理(1)发挥调节血糖的作用, 还未有公开其它的降糖机理。

发明内容

[0011] 本发明针对现有技术中存在的问题, 提供了具有新型氨基酸序列的三种鳕鱼皮寡肽及其分离纯化工艺, 经活性试验发现, 该三种鳕鱼皮寡肽具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 能辅助降血糖, 可用于制备抗 II 型糖尿病药物。

[0012] 具体技术方案如下:

[0013] 一种鳕鱼皮寡肽, 氨基酸序列分别为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg或Phe-Tyr-Glu。

[0014] 本发明还公开了所述鳕鱼皮寡肽的分离纯化方法, 包括:

[0015] (1) 以阿拉斯加狭鳕鱼皮为原料, 经蛋白酶酶解法制备鳕鱼皮胶原肽混合肽;

[0016] 所述蛋白酶酶解法具体为:

[0017] 将阿拉斯加狭鳕鱼皮、胰酶与水混合, 在 $52\sim 58^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}=5.5\sim 6.5$ 下酶解 $6\sim 10\text{h}$;

[0018] 以阿拉斯加狭鳕鱼皮的质量计, 所述胰酶的加入量为 $0.15\sim 0.25\text{wt}\%$;

[0019] 所述阿拉斯加狭鳕鱼皮与水的质量比为 $1:4\sim 8$;

[0020] (2) 采用截留分子量为 3000Da 的超滤膜对步骤(1)制备的鳕鱼皮胶原肽混合肽进行超滤处理, 再经浓缩、干燥得到鳕鱼皮胶原肽;

[0021] (3) 以水为流动相, 采用葡聚糖凝胶色谱柱对步骤(2)制备的鳕鱼皮胶原肽进行粗分;

[0022] 所述葡聚糖凝胶色谱柱的填料由葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成;

[0023] (4) 利用高效液相色谱技术将步骤(3)的粗分产物进一步分离, 得到三种鳕鱼皮寡肽。

[0024] 优选地, 步骤(1)中, 所述蛋白酶酶解法:

[0025] 将阿拉斯加狭鳕鱼皮、胰酶与水混合, 在 55°C 、 $\text{pH}=6.0$ 下酶解 8h , 然后再升温至 90°C 进行灭酶处理;

[0026] 以阿拉斯加狭鳕鱼皮的质量计, 所述胰酶的加入量为 $0.20\text{wt}\%$;

[0027] 所述阿拉斯加狭鳕鱼皮与水的质量比为 $1:6$ 。

[0028] 采用上述优化的酶解工艺, 酶解后得到的鳕鱼皮胶原肽混合肽的得率更高, 可达 75.0% , 经活性测试发现, 该鳕鱼皮胶原肽混合肽对 α -葡萄糖苷酶抑制活性 IC_{50} 为 $50.4\text{mg}/\text{mL}$ 。

[0029] 经测试, 该酶解工艺下得到的鳕鱼皮胶原肽混合肽中:

[0030] 分子质量为 $180\sim 1000\text{Da}$ 的物质占 88.08% , 分子质量小于 180Da 的物质占 7.37% 。

[0031] 大分子蛋白质、肽和游离氨基酸含量分别为 $0.53\text{g}/100\text{mL}$ 、 $5.20\text{g}/100\text{mL}$ 、 $0.38\text{g}/100\text{mL}$, 三者的质量比为 $9:85:6$ 。

[0032] 由此可见, 得到的鳕鱼皮胶原肽混合肽主要是氨基酸残基在 $2\sim 8$ 个之间的寡肽。

[0033] 优选地, 步骤(2)中, 所述超滤膜选自中空纤维聚砜超滤膜。

[0034] 步骤(3)中, 采用葡聚糖凝胶树脂串联的方式进行分离, 层析柱规格为 $2.6\times 50\text{cm}$,

其中上层填充葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25 (20cm), 下层填充葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50 (15cm), 中间用定量滤纸隔离。

[0035] 经试验发现, 本发明的分离纯化工艺中, 葡聚糖凝胶色谱柱的选择尤其关键, 仅有选择葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联的方式才能将超滤后分子量小于3000Da的鳕鱼皮胶原肽得到有效分离。

[0036] 当采用单一的葡聚糖凝胶色谱柱时, 如本发明中采用的Sephadex G-25或Sephadex G-50, 或者是采用其他种类的葡聚糖凝胶色谱柱, 如Sephadex G-10与Sephadex G-15, 均不能实现鳕鱼皮胶原肽的有效分离。

[0037] 优选地, 步骤(3)中, 所述葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25选自100目, 葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50选自60目。

[0038] 经进一步地试验发现, 凝胶树脂粗细程度对实验结果也有影响, 当采用60目的Sephadex G-25与60目的Sephadex G-50串联使用时, 也不能实现有效分离。

[0039] 优选地, 步骤(3)中, 所述流动相的流速为0.8~1.4mL/min, 进一步优选为1.2mL/min。

[0040] 经葡聚糖凝胶色谱粗分后, 根据洗脱的先后顺序分离得到两个分离组分, 记为分离组分A与分离组分B。

[0041] 优选地, 步骤(4)中, 所述高效液相色谱的分离条件为:

[0042] 色谱柱: Angilent Eclipse XDB-C₁₈柱;

[0043] 流动相: A液: 0.05% 三氟乙酸-水溶液; B液: 0.05% 三氟乙酸-乙腈溶液;

[0044] 采用线性梯度洗脱, 0~20min, 5%~20%B; 20~25min, 20%~100%B;

[0045] 流速为1.0mL/min, 柱温为30℃, 检测波长为220nm。

[0046] 经MALDI-TOF-MS/MS分析鉴定, 采用上述分离纯化工艺制备得到的鳕鱼皮寡肽, 氨基酸序列分别为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg和Phe-Tyr-Glu。

[0047] 经活性试验发现, 以上三者的 α -葡萄糖苷酶抑制活性IC₅₀分别为5.2mg/mL, 7.59mg/mL, 13.4mg/mL。

[0048] 因此, 所述三种鳕鱼皮寡肽均可应用于制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂。优选地, 氨基酸序列为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg的鳕鱼皮寡肽具有更佳的 α -葡萄糖苷酶抑制效果。

[0049] α -葡萄糖苷酶抑制剂作用机制为: 竞争性抑制位于小肠的各种 α -葡萄糖苷酶, 使淀粉类分解为葡萄糖的速度减慢, 从而减缓肠道内葡萄糖的吸收, 降低餐后高血糖。II型糖尿病是由于餐后高血糖的葡萄糖毒性可加重胰岛素抵抗及胰岛素分泌缺陷, 当胰岛 β 细胞功能仅剩约50%时, 出现空腹血糖升高, 糖耐量受损。

[0050] 基于以上研究发现, 本发明公开的三种鳕鱼皮寡肽还可进一步用于制备抗II型糖尿病药物, 优选地, 氨基酸序列为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg的鳕鱼皮寡肽具有更佳的血糖抑制效果。

[0051] 与现有技术相比较, 本发明的有益效果在于:

[0052] 本发明公开了三种具有新型氨基酸序列结构的鳕鱼皮寡肽;

[0053] 本发明针对酶解法制备的鳕鱼皮胶原肽分子量小, 而且混合物的分子量集中, 分散性小的特点, 采用由葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联的方式对其进行粗分, 再经高效液相色谱技术进一步分离, 最终得到三种新型的鳕鱼皮

寡肽；

[0054] 经活性试验发现，该三种鳕鱼皮寡肽具有 α -葡萄糖苷酶抑制活性，能辅助降血糖，可用于制备抗II型糖尿病药物。

附图说明

[0055] 图1为实施例1中经葡聚糖凝胶色谱柱分离得到的分离组分的洗脱曲线，横坐标为洗脱体积(mL)，纵坐标为波长为220nm处的吸光值；

[0056] 图2为对比例1中经葡聚糖凝胶色谱柱分离得到的分离组分的洗脱曲线，横坐标为洗脱体积(mL)，纵坐标为波长为220nm处的吸光值；

[0057] 图3为对比例2中经葡聚糖凝胶色谱柱分离得到的分离组分的洗脱曲线，横坐标为洗脱体积(mL)，纵坐标为波长为220nm处的吸光值；

[0058] 图4为对比例3中经葡聚糖凝胶色谱柱分离得到的分离组分的洗脱曲线，横坐标为洗脱体积(mL)，纵坐标为波长为220nm处的吸光值；

[0059] 图5为对比例4中经葡聚糖凝胶色谱柱分离得到的分离组分的洗脱曲线，横坐标为洗脱体积(mL)，纵坐标为波长为220nm处的吸光值；

[0060] 图6为对比例5中经葡聚糖凝胶色谱柱分离得到的分离组分的洗脱曲线，横坐标为洗脱体积(mL)，纵坐标为波长为220nm处的吸光值；

[0061] 图7为实施例2中经葡聚糖凝胶色谱柱分离得到的分离组分的洗脱曲线，横坐标为洗脱体积(mL)，纵坐标为波长为220nm处的吸光值。

具体实施方式：

[0062] 实施例1

[0063] (1) 阿拉斯加狭鳕鱼皮100g，胰酶0.2g，水600mL，置于1000mL烧杯并放在55℃恒温水浴中，调节pH值为6.0，并开动搅拌器搅拌反应液，控制搅拌器转速为300rpm，反应8h，升温至90℃灭酶20min，取出反应液，过滤，得到滤液即为鳕鱼皮胶原肽混合肽。经活性试验发现，该鳕鱼皮胶原肽混合肽对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性IC₅₀为50.4mg/mL。

[0064] (2) 将滤液用截留分子量3000Da的中空纤维聚砜超滤膜进行超滤，取滤过液，并对其浓缩、喷雾干燥，得到分子量<3000Da的鳕鱼皮胶原肽成品，称取鳕鱼皮胶原肽2g，加水2mL溶解，取1mL胶原肽水溶液上葡聚糖凝胶串联色谱柱，控制柱流速1.2mL/min，该葡聚糖凝胶串联色谱柱由100目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成，洗脱后得到分离组分A和B(两分离组分的洗脱曲线见图1)。

[0065] 经活性试验发现，分离组分A和B对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性IC₅₀分别为18.2mg/mL和25.3mg/mL。

[0066] (3) 利用Re-HPLC技术分别分离凝胶层析分离得到组分，分离条件为：色谱柱：Agilent Eclipse XDB-C18柱(250×4.6mm, 5 μ m) 流动相：A液：0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液，B液：0.05%TFA-乙腈溶液，线性梯度洗脱，0-20min, 5%-20%B; 20-25min, 20%-100%B, 流速为1.0mL/min, 柱温：30℃，检测波长：220nm。

[0067] 经MALDI-TOF-MS/MS分析，本实施例分离得到三种鳕鱼皮寡肽，氨基酸序列分别为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg和Phe-Tyr-Glu。

[0068] 经活性试验发现,以上三者的 α -葡萄糖苷酶抑制活性 IC_{50} 分别为5.2mg/mL, 7.59mg/mL, 13.4mg/mL。

[0069] 对本实施例分离得到的三种鳕鱼皮寡肽Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg和Phe-Tyr-Glu,分别进行了降血糖动物试验,发现:

[0070] 这三种鳕鱼皮寡肽均能抑制 α -淀粉酶活性,降低糖的吸收速度,明显改善糖耐量,实验结果如表1、表2和表3所示,表1为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg对四氧嘧啶型小鼠淀粉负荷耐量的影响,结果显示,0.2g/kg剂量组给淀粉1h时间点、0.5g/kg剂量组给淀粉后0.5、1、2、3h时间点,血糖值明显低于模型对照组 ($P < 0.05$)。另外各剂量组均能减少曲线下面积,并呈明显的剂量关系。

[0071] 表1 Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg对四氧嘧啶性糖尿病小鼠淀粉负荷耐量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别与剂量 g/kg	初始血糖 (mmol/L)	给淀粉后血糖 (mmol/L)				曲线下 面积
		0.5h	1.0h	2.0h	3h	
正常对照组	6.0±0.63	9.8±0.77	11.1±1.13	7.7±0.87	6.6±0.46	25.7±1.85
模型对照组	16.6±1.50**	21.8±0.71**	23.5±0.76**	21.0±1.22**	19.7±0.97**	63.5±2.25**
[0072] 拜糖平组 0.01	18.5±1.34 $\Delta\Delta$	19.1±1.08 $\Delta\Delta$	19.3±1.23 $\Delta\Delta$	18.9±1.58 $\Delta\Delta$	18.3±2.18 $\Delta\Delta$	56.6±3.65 $\Delta\Delta$
鱼皮寡肽组 0.5	17.6±1.61 $\Delta\Delta$	20.4±0.90 $\Delta\Delta$	20.2±1.00 $\Delta\Delta$	19.1±1.09 $\Delta\Delta$	17.4±1.50 $\Delta\Delta$	57.6±3.00 $\Delta\Delta$
鱼皮寡肽组 0.2	18.3±1.18 $\Delta\Delta$	21.6±0.71	22.2±0.72 $\Delta\Delta$	20.9±0.82	19.2±0.96	61.8±1.79

[0073] 注: $\Delta\Delta P < 0.05$ (与模型对照组比较), ** $P < 0.05$ (与正常对照组比较)

[0074] 表2为Tyr-Val-Arg对四氧嘧啶性糖尿病模型小鼠淀粉负荷耐量的影响,表2结果显示,1.0g/kg剂量给淀粉0.5、1、2、3h时间点、0.5g/kg剂量给淀粉0.5、1、2h时间点血糖值明显低于模型对照组 ($P < 0.05$)。各剂量与模型对照组比较,血糖值上升缓慢,峰值降低;而且均能减少曲线下面积,并呈明显的剂量关系。

[0075] 表2 Tyr-Val-Arg对四氧嘧啶性小鼠淀粉负荷耐量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别与剂量 g/kg	初始血糖 (mmol/L)	给淀粉后血糖 (mmol/L)				曲线下面积
		0.5 h	1.0h	2.0h	3.0 h	
正常对照组	7.7±0.75	11.6±1.78	12.2±1.48	8.7±1.05	8.1±0.90	29.7±3.01
[0076] 模型对照组	18.2±2.46**	23.4±1.52**	24.8±1.46**	23.1±1.55**	20.8±2.39**	68.3±4.41**
拜糖平组 0.01	18.9±1.53	20.7±2.04 ^{△△}	21.8±2.58 ^{△△}	20.3±4.03	19.7±5.12	61.8±9.54
鱼皮寡肽组 1.0	19.5±1.42	20.7±1.17 ^{△△}	20.4±1.16 ^{△△}	19.2±1.47 ^{△△}	18.7±1.25 ^{△△}	59.1±3.30 ^{△△}
鱼皮寡肽组 0.5	19.3±1.21	22.0±1.00 ^{△△}	22.4±1.36 ^{△△}	21.3±1.53 ^{△△}	21.3±2.07	64.5±3.27

[0077] 注：^{△△}P<0.05 (与模型对照组比较)，**P<0.05 (与正常对照组比较)

[0078] 表3为Phe-Tyr-Glu对四氧嘧啶型小鼠淀粉负荷耐量的影响，结果显示，0.2g/kg剂量组给淀粉1h时间点、0.5g/kg剂量组给淀粉后0.5、1、2、3h时间点，血糖值明显明显低于模型对照组 (P<0.05)。另外各剂量组均能减少曲线下面积，并呈明显的剂量关系。

[0079] 表3 Phe-Tyr-Glu对四氧嘧啶性糖尿病小鼠淀粉负荷耐量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别与剂量 g/kg	初始血糖 (mmol/L)	给淀粉后血糖 (mmol/L)				曲线下 面积
		0.5h	1.0h	2.0h	3h	
正常对照组	6.8±0.65	10.8±0.67	10.1±1.25	8.0±0.97	6.2±0.36	25.3±1.71
[0080] 模型对照组	16.0±1.10**	23.8±0.70**	22.4±0.81**	21.3±1.92**	19.3±0.71**	64.2±2.37**
拜糖平组 0.01	16.5±1.43 ^{△△}	18.7±1.08 ^{△△}	19.0±1.03 ^{△△}	18.5±1.28 ^{△△}	18.1±1.54 ^{△△}	55.8±4.28 ^{△△}
鱼皮寡肽组 0.5	17.0±1.41 ^{△△}	19.7±0.81 ^{△△}	19.6±0.88 ^{△△}	18.9±1.37 ^{△△}	17.2±1.05 ^{△△}	56.2±2.69 ^{△△}
[0081] 鱼皮寡肽组 0.2	18.0±1.25 ^{△△}	22.1±0.65	22.3±0.33 ^{△△}	21.2±0.74	19.0±0.87	63.6±1.86

[0082] 注：^{△△}P<0.05 (与模型对照组比较)，**P<0.05 (与正常对照组比较)

[0083] 对比例1

[0084] (1) 阿拉斯加狭鳕鱼皮100g，胰酶0.2g，水600mL，置于1000mL烧杯并放在55℃恒温水浴中，调节pH值为6.0，并开动搅拌器搅拌反应液，控制搅拌器转速为300rpm，反应8h，升温至90℃灭酶20min，取出反应液，过滤，得到鳕鱼皮胶原肽混合肽。

[0085] (2) 将滤液用截留分子量3000Da的中空纤维聚砜超滤膜进行超滤，取滤过液，并对其进行浓缩、喷雾干燥，得到分子量<3000Da的鳕鱼皮胶原肽成品，称取鳕鱼皮胶原肽2g，加水2mL溶解，取1mL胶原肽水溶液上葡聚糖凝胶色谱柱，控制柱流速1.2mL/min，该葡聚糖凝胶串联色谱柱为100目Sephadex G-25葡聚糖凝胶柱。

[0086] 观察其洗脱曲线发现,该分离工艺无法实现有效分离。

[0087] 对比例2~4

[0088] 步骤(1)与步骤(2)的工艺流程与对比例1中相同,区别仅在于分别采用60目Sephadex G-50葡聚糖凝胶柱、100目Sephadex G-10葡聚糖凝胶柱与100目Sephadex G-15葡聚糖凝胶柱。

[0089] 观察各对比例的洗脱曲线发现,以上分离工艺均无法实现有效分离。

[0090] 对比例5

[0091] 步骤(1)与步骤(2)的工艺流程与对比例1中相同,区别仅在于采用葡聚糖凝胶串联色谱柱,由60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成。

[0092] 观察其洗脱曲线发现,该分离工艺也无法实现有效分离。

[0093] 对比图1与图2~6可以发现,只有采用由100目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成的葡聚糖凝胶色谱柱才能实现对鳕鱼皮胶原肽的有效分离,从而为进一步分离得到三种鳕鱼皮寡肽提供可能。

[0094] 实施例2

[0095] (1)阿拉斯加狭鳕鱼皮200g,胰酶0.4g,水1200mL,置于2000mL烧杯并放在55℃恒温水浴中,调节pH值为6.0,并开动搅拌器搅拌反应液,控制搅拌器转速为300rpm,反应8h,升温至90℃灭酶20min,取出反应液,过滤,得到的鳕鱼皮胶原肽混合肽对 α -葡萄糖苷酶抑制活性 IC_{50} 为52.7mg/mL。

[0096] (2)将滤液用截留分子量3 000Da的中空纤维聚砜超滤膜进行超滤,取滤过液,并对其进行浓缩、喷雾干燥,得到分子量<3000Da鳕鱼皮胶原肽成品。称取鳕鱼皮胶原肽2g,加水2mL溶解,取1mL胶原肽水溶液上凝胶串联柱,该葡聚糖凝胶串联色谱柱由100目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成,控制柱流速0.7mL/min,收集到分离组分A、B(洗脱曲线见图7)。

[0097] (3)利用Re-HPLC技术分别分离凝胶层析分离得到组分,分离条件为:色谱柱:Angilent Eclipse XDB-C18柱(250×4.6mm,5 μ m)流动相:A液:0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液,B液:0.05%TFA-乙腈溶液,线性梯度洗脱,0-20min,5%-20%B;20-25min,20%-100%B,流速为1.0mL/min,柱温:30℃,检测波长:220nm。分离得到三种鳕鱼皮寡肽,氨基酸序列分别为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg和Phe-Tyr-Glu。

[0098] 实施例3

[0099] (1)阿拉斯加狭鳕鱼皮1000g,胰酶2g,水6000mL,置于自制的不锈钢容器中并放在55℃恒温水浴中,调节pH值为6.0,并开动搅拌器搅拌反应液,控制搅拌器转速为300rpm,反应8h,升温至90℃灭酶20min,取出反应液,过滤,得到的鳕鱼皮胶原肽混合肽对 α -葡萄糖苷酶抑制活性 IC_{50} 为51.9mg/mL。

[0100] (2)将滤液用截留分子量3 000Da的中空纤维聚砜超滤膜进行超滤,取滤过液,并对其进行浓缩、喷雾干燥,得到分子量<3000Da鳕鱼皮胶原肽成品。将滤液喷雾干燥得到鳕鱼皮胶原肽成品。称取鳕鱼皮胶原肽2g,加水2mL溶解,取1mL胶原肽水溶液上凝胶串联柱,该葡聚糖凝胶串联色谱柱由100目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成,控制柱流速1.0mL/min,收集到分离组分A、B。

[0101] (3) 利用Re-HPLC技术分别分离凝胶层析分离得到组分,分离条件为:色谱柱:Angilent Eclipse XDB-C18柱(250×4.6mm,5 μ m) 流动相:A液:0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液,B液:0.05%TFA-乙腈溶液,线性梯度洗脱,0-20min,5%-20%B;20-25min,20%-100%B,流速为1.0mL/min,柱温:30℃,检测波长:220nm。分离得到三种鳕鱼皮寡肽,氨基酸序列分别为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg和Phe-Tyr-Glu。

[0102] 实施例4

[0103] (1) 阿拉斯加狭鳕鱼皮2kg,胰酶4g,水12kg,置于自制的不锈钢容器中,控制反应温度55℃,调节pH值为6.0,并开动搅拌器搅拌反应液,控制搅拌器转速为300rpm,反应8h,升温至90℃灭酶20min,取出反应液,过滤,得到的鳕鱼皮胶原肽混合肽对 α -葡萄糖苷酶抑制活性IC₅₀为48.8mg/mL。

[0104] (2) 将滤液用截留分子量3 000Da的中空纤维聚砜超滤膜进行超滤,取滤过液,并对其进行浓缩、喷雾干燥,得到分子量<3000Da鳕鱼皮胶原肽成品。将滤液喷雾干燥得到鳕鱼皮胶原肽成品。称取鳕鱼皮胶原肽2g,加水2mL溶解,取1mL胶原肽水溶液上凝胶串联柱,该葡聚糖凝胶串联色谱柱由100目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成,控制柱流速1.0mL/min,收集到分离组分A、B。

[0105] (3) 利用Re-HPLC技术分别分离凝胶层析分离得到组分,分离条件为:色谱柱:Angilent Eclipse XDB-C18柱(250×4.6mm,5 μ m) 流动相:A液:0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液,B液:0.05%TFA-乙腈溶液,线性梯度洗脱,0-20min,5%-20%B;20-25min,20%-100%B,流速为1.0mL/min,柱温:30℃,检测波长:220nm。分离得到三种鳕鱼皮寡肽,氨基酸序列分别为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg和Phe-Tyr-Glu。

[0106] 实施例5

[0107] (1) 阿拉斯加狭鳕鱼皮50kg,胰酶100g,水300kg,置于酶解反应釜中并设置反应温度55℃,调节pH值为6.0,开动搅拌器搅拌反应液,控制搅拌器转速为300rpm,反应8h,升温至90℃灭酶20min,取出反应液,过滤,得到的鳕鱼皮胶原肽混合肽对 α -葡萄糖苷酶抑制活性IC₅₀为53.8mg/mL。

[0108] (2) 将滤液用截留分子量3 000Da的中空纤维聚砜超滤膜进行超滤,取滤过液,并对其进行浓缩、喷雾干燥,得到分子量<3000Da鳕鱼皮胶原肽成品。将滤液喷雾干燥得到鳕鱼皮胶原肽成品。称取鳕鱼皮胶原肽2g,加水2mL溶解,取1mL胶原肽水溶液上凝胶串联柱,该葡聚糖凝胶串联色谱柱由100目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-25和60目葡聚糖凝胶树脂Sephadex G-50串联而成,控制柱流速1.2mL/min,收集到分离组分A、B。

[0109] (3) 利用Re-HPLC技术分别分离凝胶层析分离得到组分,分离条件为:色谱柱:Angilent Eclipse XDB-C18柱(250×4.6mm,5 μ m) 流动相:A液:0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液,B液:0.05%TFA-乙腈溶液,线性梯度洗脱,0-20min,5%-20%B;20-25min,20%-100%B,流速为1.0mL/min,柱温:30℃,检测波长:220nm。分离得到三种鳕鱼皮寡肽,氨基酸序列分别为Glu-Gly-Gly-Tyr-Thr-Arg、Tyr-Val-Arg和Phe-Tyr-Glu。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江省医学科学院
- [0003] <120> 鳕鱼皮寡肽及其分离纯化方法和在制备 α -葡萄糖苷酶抑制剂及抗 II 型糖尿病药物中的应用
- [0004] <160> 1
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 6
- [0008] <212> PRT
- [0009] <213> 鳕鱼 (Gadus)
- [0010] <400> 1
- [0011] Glu Gly Gly Tyr Thr Arg
- [0012] 1 5

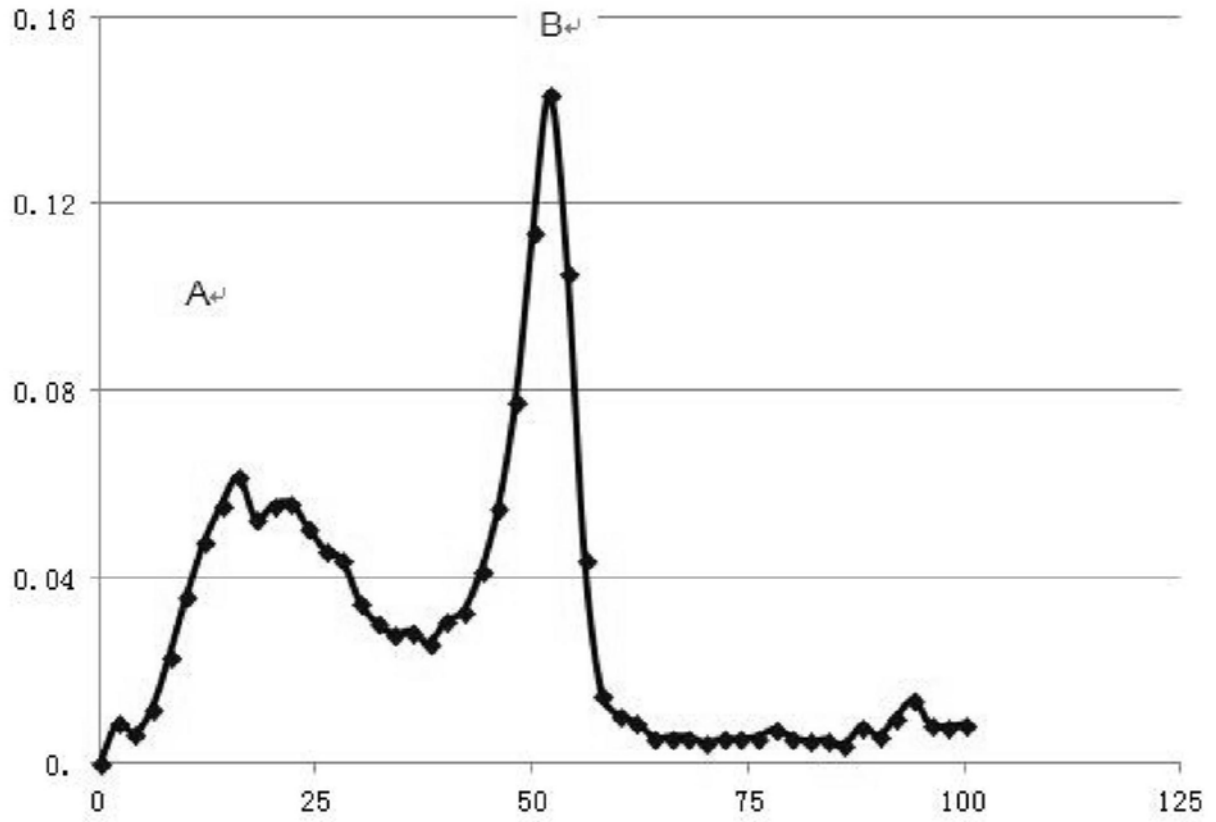


图1

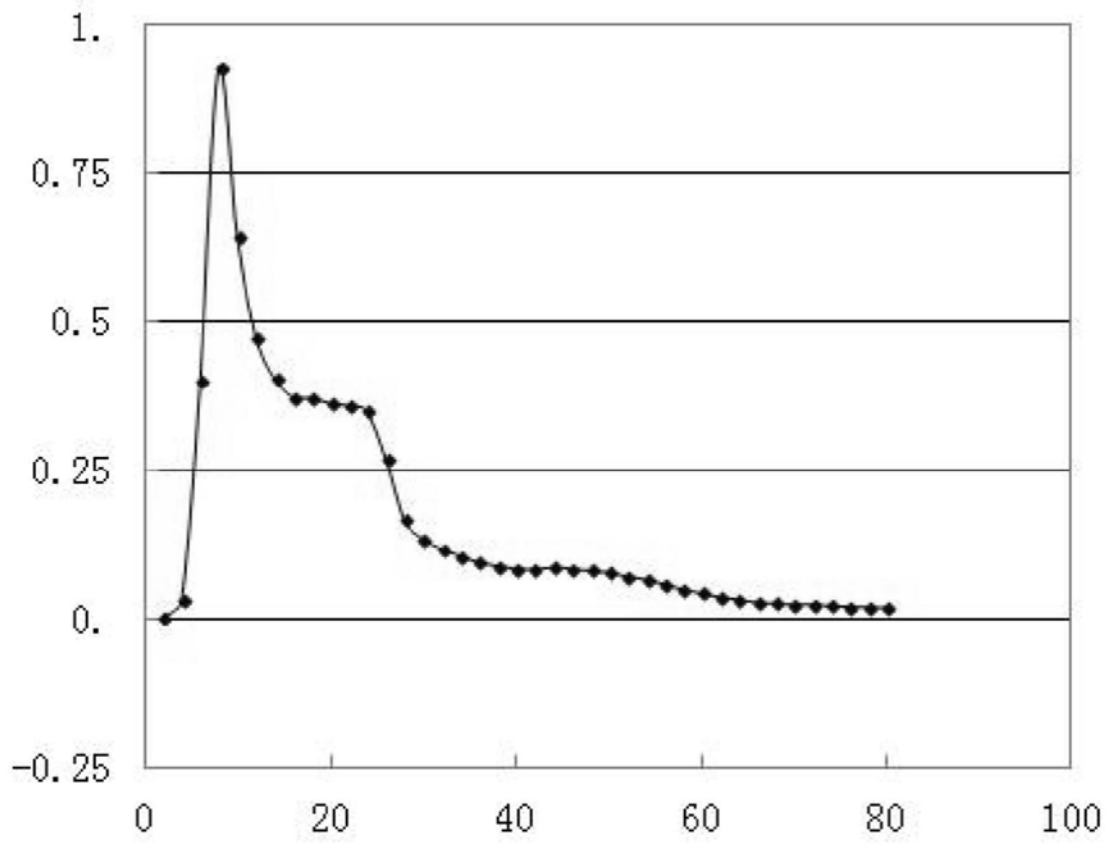


图2

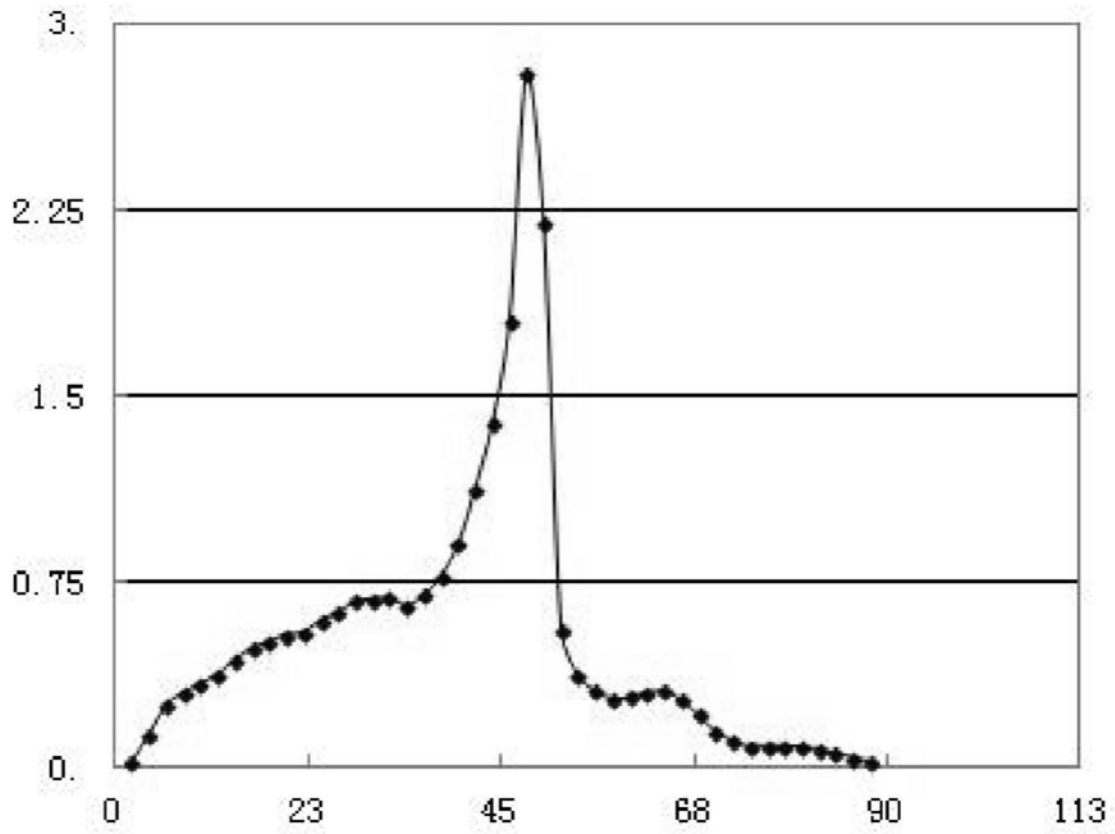


图3

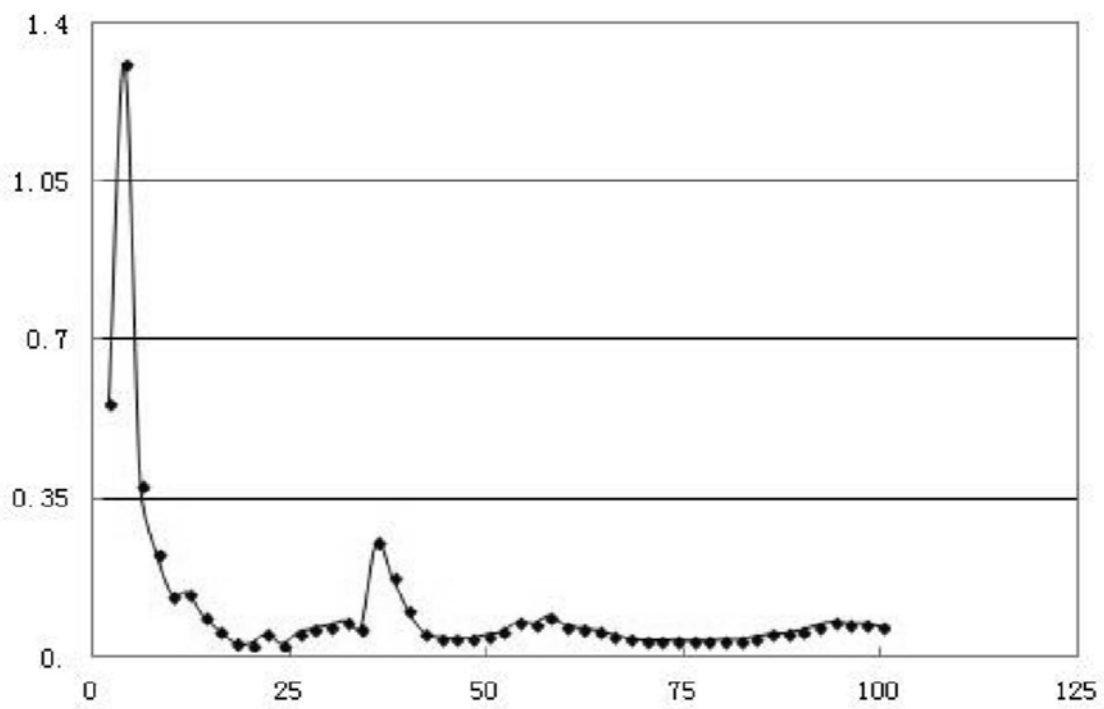


图4

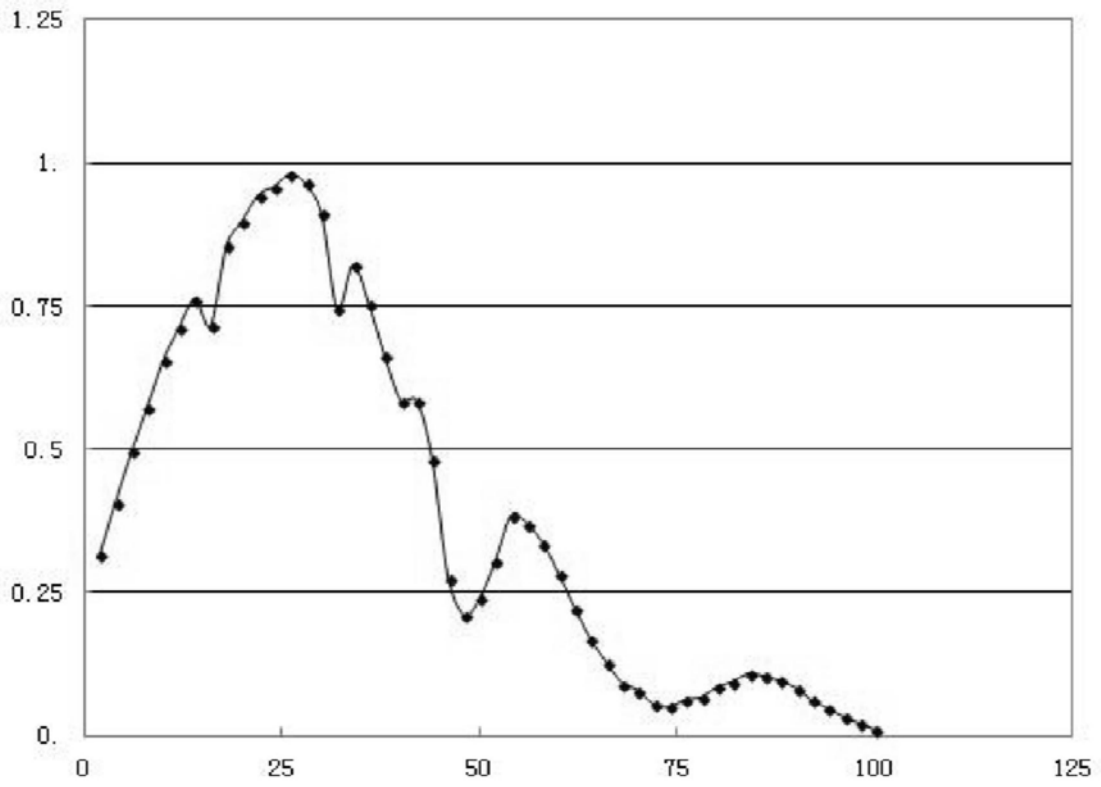


图5

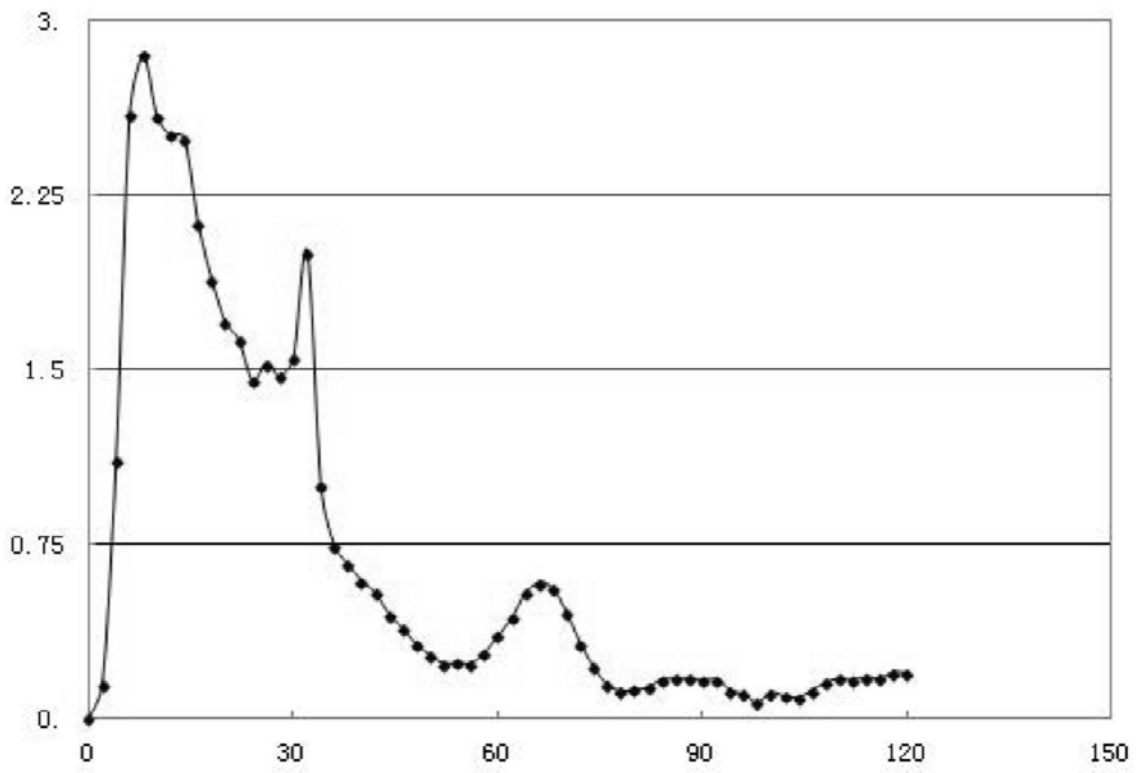


图6

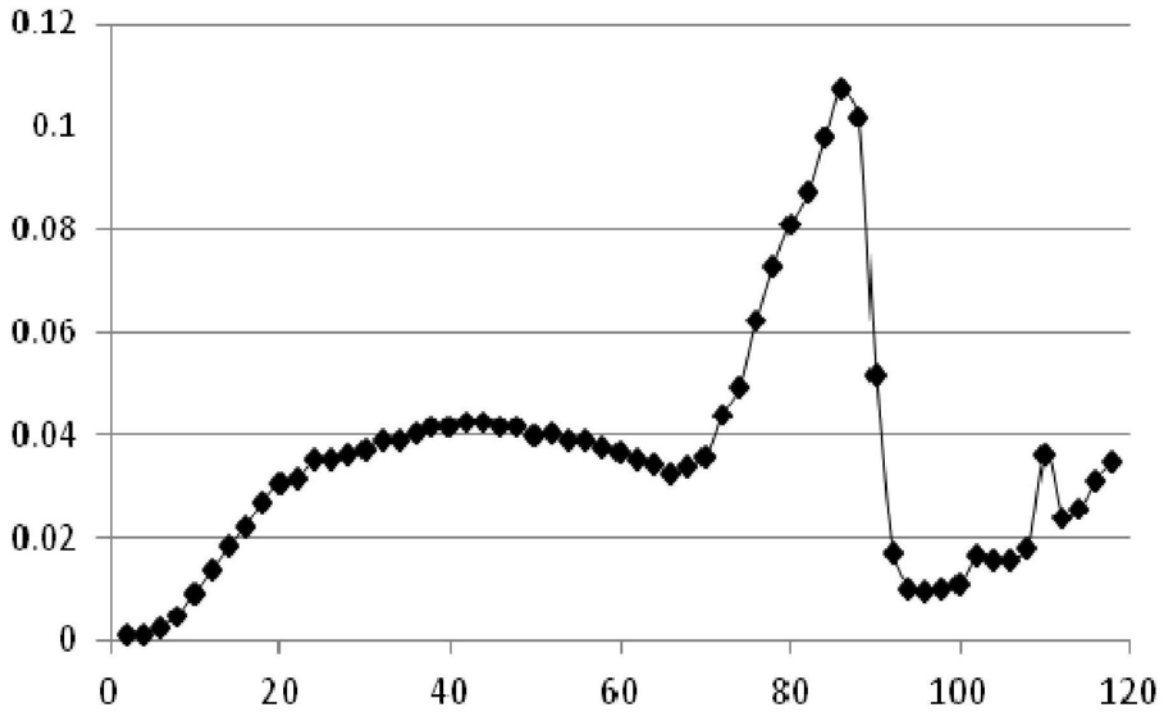


图7