

基于耐消化肽的核桃主要过敏原 Jug r 2 的线性表位筛选

郝梦真, 李欣芮, 牟瑶, 陈锡, 车会莲*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 食品质量与安全北京实验室 北京 100083)

摘要 由于核桃 Jug r 2 是核桃中的主要过敏原, Jug r 2 的线性表位是引发核桃过敏反应的关键因素, 因此筛选 Jug r 2 线性表位工作是必要的。本研究利用免疫信息学中的 DNASTar Protean 系统和 ABCpred 在线工具预测 Jug r 2 中的 B 细胞线性表位。利用体外模拟胃肠消化和 HPLC-MS/MS 对抗消化肽段的一级序列进行分析, 并对两种免疫信息学工具预测得到的 B 细胞线性表位和抗消化肽段在 Jug r 2 模拟三维结构上进行定位分析。结果表明: 预测得到 8 个 B 细胞线性表位 (AA186~199、AA226~230、AA257~263、AA284~289、AA373~382、AA389~398、AA408~414、AA472~487) 和 11 个抗消化肽段 (AA215~220、AA250~260、AA323~337、AA351~356、AA363~388、AA428~438、AA470~483、AA488~513、AA514~526、AA527~541、AA545~572)。在抗消化肽段中, 4 条与预测或已知真实的 B 细胞线性表位序列重合, 8 条与已知真实的 T 细胞表位序列重合, 并且抗消化肽段在 Jug r 2 三维结构的定位中表现出亲水性和柔韧性的良好抗原性质。综上, 研究食物过敏原的耐消化特性可能是研究 Jug r 2 的线性表位的一个潜在策略。

关键词 线性表位; Jug r 2; 免疫信息学; 抗消化肽段

文章编号 1009-7848(2022)02-0001-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.001

树坚果过敏是常见的食物过敏之一, 估计其全球流行率为 0.05% 至 4.9%, 而且流行率还在增加^[1]。据美国国家自报登记处的记录, 树坚果尤其是核桃, 是食物过敏导致致命或接近致命反应的主要原因^[2]。Jug r 2 是核桃中的主要过敏原^[3], Jug r 2 为 7S 球蛋白, 通过 BLAST 搜索发现, 其蛋白序列不仅与黑核桃中 7S 球蛋白过敏原 Jug n 2 相似, 而且与其它植物来源的 7S 球蛋白过敏原相似, 例如花生 Ara h 1 和大豆 Gly m 5^[4]。7S 球蛋白由 3 个亚基组成^[5], 与其它 7S 球蛋白相似, 一个成熟的 Jug r 2 蛋白亚基是由约 66 ku 前体蛋白在其第 173 个氨基酸位点断裂而形成的, 其分子质量约为 44 ku^[3]。

食物过敏原线性表位是研究过敏原结构及其致敏性关系的重要方面。食物过敏原的线性表位可分为 T 细胞表位和 B 细胞线性表位。其中 T 细胞仅能识别抗原呈递细胞(如树突状细胞)的主要组织相容性复合体分子中出现的抗原衍生肽^[6]。由过敏原来源的肽激活 2 型 CD4⁺T 细胞是食物过敏反应中的关键步骤, 该肽通常至少由 13 个连续氨

基酸组成^[7]; 过敏原连续氨基酸序列形成的 B 细胞线性表位可与特异性 IgE 结合, 是食物过敏反应中肥大细胞或嗜碱性粒细胞释放过敏介质的关键触发点^[8], 该肽通常由 8~15 个连续氨基酸组成^[9]。目前, 免疫信息学方法是一种预测过敏原 B 细胞线性表位的常见高效方法, 该方法利用过敏原的理化性质对抗原的线性表位进行预测, 例如蛋白质局部亲水性、表面可及性、可塑性和抗原性等, 这极大程度降低了合成试验成本和时间, 并提示某些连续氨基酸序列具有与 IgE 结合的可能^[9]。

食物过敏是发生在在胃肠道的免疫反应^[10], 食物过敏原可通过多种屏障进入机体, 例如皮肤、呼吸道、胃肠道, 与其它屏障相比胃肠道对食物蛋白的消化作用会造成蛋白质结构的破坏, 从而影响其生物活性, 食物过敏原内在消化稳定性和致敏性之间似乎不存在确定的核心关系^[11]。某些食物过敏原对消化高度敏感, 其消化产物在到达肠道黏膜诱导免疫系统时仍保持足够的结构和大小, 可以被抗原呈递细胞摄取^[12], 这依赖于耐消化肽重组特定结构和肠道免疫系统对其识别及摄取的能力, 因此食物过敏原在胃肠道的消化情况以及消化产物是影响过敏原致敏潜能的关键因素^[13]。除此之外, 在肠道中耐消化肽具有与肠道部位 IgE 结合的活性, 从而可能引发过敏反应中的

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573158)

作者简介: 郝梦真(1998—), 女, 硕士生

通信作者: 车会莲 E-mail: chehuilian@cau.edu.cn

胃肠道症状。最近的一项研究强调胃肠组织中局部 IgE 反应的重要性,证明了胃肠道组织是产生 IgE⁺ B 系细胞的重要募集场所^[14]。评估食物过敏原抗消化肽成为研究食物过敏原在肠道部位致敏性的潜在方法。有研究者^[15]对花生过敏原 Cupin 家族的 Ara h 1 的胃肠道消化产物进行分析,发现其消化短肽仍具有与特异性 IgE 结合和致敏活性,而 Ara h 1 与 Cupin 家族的其它蛋白相似,极易在胃肠道内被分解,因此推测食物蛋白的耐消化性并不是其具备免疫原性或免疫反应性的必要条件。目前,在评估食物过敏原的胃肠道保存能力时,大部分研究关注完整蛋白的消化稳定性,很少关注食物过敏原消化肽的稳定性、大小及组成。

本研究的目的是通过将核桃过敏原体外胃液模拟消化降解产物,与已知的线性表位和通过生物信息学预测得到的线性表位进行比较,并将其定位至模拟 Jug r 2 三维结构上,以进一步认识 Jug r 2 的结构特点,旨在为评估核桃过敏原 Jug r 2 免疫原性和免疫反应性,以及进一步研究导致食物过敏的过敏原分子结构条件提供试验参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本文所用血清取自 6 名对核桃过敏的患者,具有摄食核桃后产生系统性过敏反应的病史,或在医院进行皮肤点刺试验时对核桃产生阳性反应。研究获得血清提供者的知情同意。

英国核桃购自天津蓟县。BCA 蛋白定量试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司;标准蛋白分子量 Marker, Thermo Fisher 公司;牛血清白蛋白 BAS、生物素标记的山羊抗人 IgE 抗体、胃蛋白酶 P7000、胰蛋白酶 P3292, Sigma 公司;HRP 标记链霉亲和素, Thermo Scientific 公司;HRP-TMB 显色试剂盒, Millipore 公司;0.22 μm 硝酸纤维薄膜, Whatman 公司。

1.2 仪器与设备

电子天平,瑞安市英衡电器有限公司;多功能酶标仪, Thermo Scientific 公司;DYY-7C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;Geno Sens 1850 凝胶成像分析系统、ChemiScope 3300 mini 化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器有限公司;JB-3 磁力搅

拌器,上海富磁新径仪器有限公司;TGL-16M 台式高速冷冻离心机,广州广一科学仪器有限公司;生化培养箱,宁波莱福科技有限公司;数显圆周摇床, Scilogex 公司;CC-K6 加热制冷型恒温水浴锅,德国 Huber 公司;漩涡混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 核桃粗蛋白的浸提 按姜松松等^[16]的方法提取核桃中的粗蛋白。将核桃剥壳,去除核桃外硬壳并去皮,打碎成细粉末。称取 10 g 所得核桃粉,加入 100 mL 正己烷溶液,于 4 ℃磁力搅拌脱脂 2 h,然后于 4 ℃、8 000×g 离心 30 min,弃上清,将所得沉淀再经过上述方法重复脱脂 2 次,于通风橱内将沉淀部分充分晾干,得到脱脂核桃粉末。将脱脂核桃粉于 PBS 缓冲液(0.1 mol/L)按质量:体积比 1:10 进行混合,于 4 ℃环境中使用磁力搅拌器搅拌 12 h,然后于 4 ℃、10 000×g 离心 20 min,取上清,-80 ℃保存备用。

1.3.2 免疫印迹 按照 Downs 等^[17]的方法进行血清 IgE 识别核桃过敏原的免疫印迹试验。对蛋白粗提物进行 SDS-PAGE 电泳后,在 80 V 恒压下电转 2 h,将蛋白条带印迹到硝酸纤维薄膜(NC)上。使用封闭液(5% BSA-TBST)室温封闭 1 h 后,加入用稀释液(5% BSA-TBST)以 1:10 比例稀释的过敏患者混合血清作为一抗在 4 ℃下孵育过夜。用 TBST 洗涤 6 次后,加入 1:8 000 稀释的生物素标记山羊抗人 IgE 抗体作为二抗室温孵育 1 h。用 TBST 洗涤 6 次后,加入 1:500 稀释的 HRP 标记链霉亲和素作为三抗孵育 1 h。TBST 洗涤后,使用化学发光底物显色,成像系统拍照。

1.3.3 免疫信息学预测 Jug r 2B 细胞线性表位 使用免疫信息软件 DNASTar Protean 系统和 ABCpred 在线工具,预测 Jug r 2 的线性表位。

在 DNASTar Protean 系统中,以氨基酸序列的亲水性、柔韧性、可达性和抗原性 4 种性质作为表位预测的参数。亲水性、柔韧性、表面可及性和抗原性的预测分别按照 Kyte 等^[18]、Karplus 等^[19]、Emmini 等^[20]和 Jameson 等^[21]的方法进行。基于以上的方法,用 DNASTar 预测了具有合适的亲水性、高柔韧性、表面可及性和高抗原性的肽段为线性表位。BPAP 系统和 BepiPred 1.0 服务器是基于氨基酸

的亲水性、柔韧性、接触性、转角和表面暴露等理化性质来预测线性表位的。

1.3.4 体外模拟胃液消化 模拟胃液和肠液由 Toomer 等^[22]所述制备,并进行了一些调整。模拟胃液:在 100 mL ddH₂O 中溶解 131.6 mg 胃蛋白酶和 0.2 g NaCl,用 HCl 调节 pH 值至 1.2,胃蛋白酶的活性 $\geq 2\ 000$ U/mg。模拟肠液:在 100 mL ddH₂O 中溶解 1 g 胰蛋白酶和 0.7 g KH₂PO₄,用 NaOH 调整 pH 值至 7.5,胰蛋白酶的活性需要满足如下条件:在 40 ℃、pH 7.5 时,60 min 内胰蛋白酶水解酪蛋白质量是胰蛋白酶质量的 25 倍。参照 Guo 等^[23]的方法进行体外胃肠消化试验。

1.3.5 Jug r 2 抗消化肽序列分析 利用纳米级的 HPLC 系统 Easy-nLC 1000 对 Jug r 2 消化产物进行分析。流动相:0.1%甲酸水溶液(A)和 0.1%甲酸乙腈溶液(B)。用 95%的 A 液平衡色谱柱。样品通过自动取样器加载到柱前 C18 柱(3 mm,0.10 mm \times 20 mm),然后用 C18 分析柱分离(1.9 mm,0.15 mm \times 120 mm),流速 600 nL/min。用毛细管高效液相色谱对样品进行分离,用 Q-Exactive 质谱仪对样品进行裂解。

使用 PFind 2.6 软件对通过串联质谱分析得到的 Jug r 2 消化产物序列进行鉴定,该过程数据库检索。数据库检索参数如下:胃蛋白酶或胰酶;漏切位点:2;固定修饰:酰甲基化修饰(C);可变修饰:乙酰化(N)、谷氨酰胺修饰为焦谷酰胺(N 段)、

氧化(M);前体质量偏差: ± 1.5 u;碎片质量偏差: ± 0.5 u;肽段可信度:高;肽段长度: >4 ;肽段 FDR: ≤ 0.01 。

1.3.6 Jug r 2 的同源建模 在 Protine Data Bank,使用 BLAST 来搜索一个已知的蛋白质作为模板^[24]。这个模板应该与 Jug r 2 具有高度的序列同源性。因此,推测 Car i 2 与 Jug r 2 约有 91.65%的一致性。利用 7S 球蛋白的 SWISS-MODEL 网站中的比对模式作为模板,建立了较为准确的三维模型^[25]。通过分子动力学模拟和能量最小化,得到了 Jug r 2 的三维模型。利用可视化软件 RasMol 查看 Jug r 2 预测 B 细胞线性表位和抗消化肽段在三维结构中的位置。

2 结果与分析

2.1 核桃主要过敏原 Jug r 2 的 B 细胞线性表位的生物信息学预测

DNASar Protean 系统是基于表面可及性、柔韧性和氨基酸亲水性对线性表位进行预测。如图 1 所示,表面可及和柔韧区域出现频率增高说明这些区域在 Jug r 2 中是柔软的且易拉伸的,容易暴露在蛋白质表面。完整序列中的高抗原指数区域具有形成线性表位的高度倾向。如表 1 所示,根据这些性质,使用 DNASar 软件分析最终得到 Jug r 2 的 8 个潜在 B 细胞线性表位。

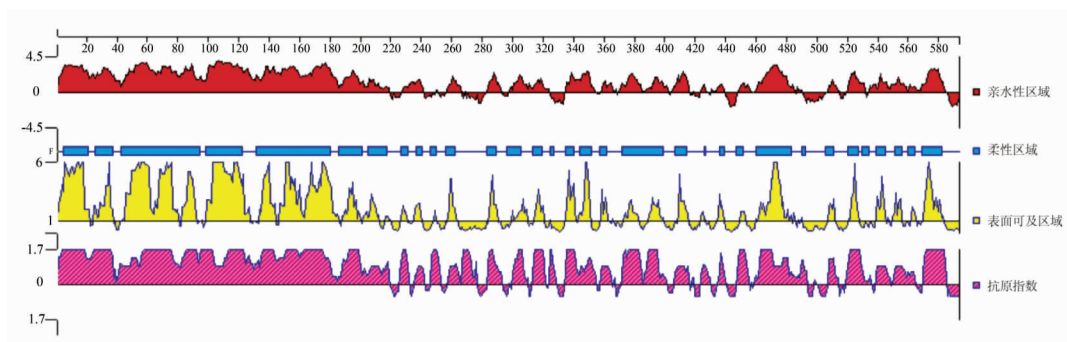


图 1 DNASar 分析 Jug r 2 序列亲水性、柔韧性、表面可及性和抗原指数情况

Fig.1 Hydrophilicity plot, flexible regions, surface probability plot and antigenic index of Jug r 2 analyzed by DNASar

之后利用了 ABCpred 在线工具对 Jug r 2 的 B 细胞线性表位进行预测,阈值设置为 0.8,其结果如表 1 所示。两种工具所预测的 B 细胞线性表

位存在很多重叠的部分,以两种工具预测的线性表位作为最终结果,不考虑存在争议的结果。如表 1 所示,最终通过两种生物信息学预测得到 8 条 B

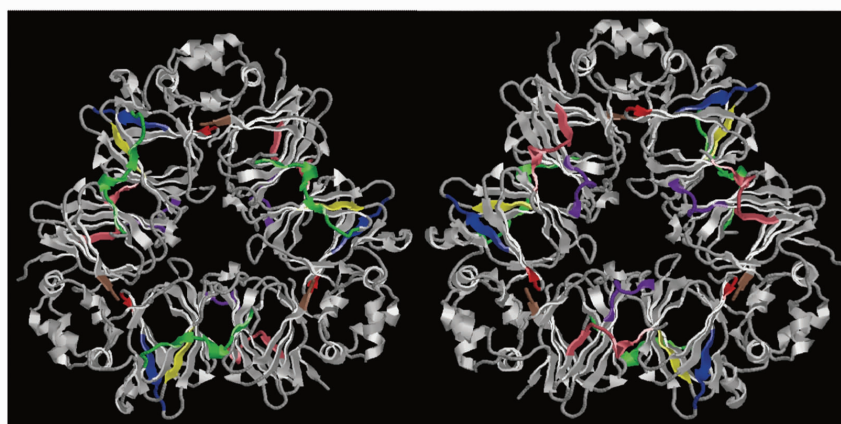
细胞线性表位,分别为 AA186~199、AA226~230、AA257~263、AA284~289、AA373~382、AA389~398、AA408~414、AA472~487。利用 DNAS tar 联合 ABCpred 预测得到的 Jug r 2 的 8 条 B 细胞线性

表位在 Jug r 2 模拟三维模型中的定位。如图 2 所示,预测得到的 8 条线性表位均位于 Jug r 2 表面的 β 折叠、转角和无规卷曲处,这些区域的可变程度更大,可能具有更强的 IgE 结合活性。

表 1 DNAS tar 和 ABCpred 两种免疫信息学工具预测的 B 细胞线性表位

Table 1 B cell linear epitopes predicted by two immunoinformatics tools of DNAS tar and ABCpred

方法	表位位置
DNAS tar	AA174~180、AA186~199、AA204~216、AA226~230、AA257~263、AA284~289、AA299~305、AA314~319、AA335~340、AA344~352、AA357~362、AA373~382、AA389~398、AA408~414、AA461~480、AA507~511、AA520~527、AA539~544、AA551~555、AA569~582
ABCpred	AA186~208、AA213~243、AA239~254、AA254~269、AA283~298、AA366~398、AA400~415、AA407~422、AA449~464、AA458~473、AA472~487、AA492~507、AA500~515、AA555~570
DNAS tar+ ABCpred	AA186~199、AA226~230、AA257~263、AA284~289、AA373~382、AA389~398、AA408~414、AA472~487



(a) Jug r 2 模拟三维模型的正面

(b) Jug r 2 模拟三维模型的反面

注:AA186~199 用绿色标记;AA226~230 用黄色标记;AA257~263 用红色标记;AA284~289 用蓝色标记;AA389~398 用粉色标记;AA408~414 用紫色标记;AA472~487 用棕色标记。

图 2 两种免疫信息学预测得到的 B 细胞线性表位在 Jug r 2 模拟三维结构上的定位

Fig.2 Location of B cells linear epitopes analyzed by two combined immunoinformatics tools in the tertiary structure of Jug r 2

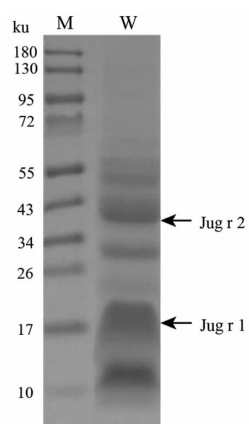
2.2 核桃蛋白粗提物的 SDS-PAGE 的电泳分析

核桃蛋白粗提物的 SDS-PAGE 电泳结果如图 3 所示。核桃总蛋白在 17 ku 和 10 ku 处有明显的条带,经灰度值分析分别占总蛋白含量的 28%和 26%,其中分子质量为 17 ku 的蛋白质对应于核桃中另一主要过敏原 Jug r 1。分子质量为 10 ku 左右的蛋白条带对应于 7S 球蛋白 Jug r 2 前体蛋白翻译后修饰所切除的 6~9 ku 小亲水性肽段^[9]。该

肽段经过质谱鉴定确实为 Jug r 2 的产物。成熟的 Jug r 2 单亚基分子质量位于 44 ku 处,占总蛋白含量的 16%,此证明了本次核桃中过敏原 Jug r 2 提取成功。提取的总蛋白经过 BCA 试剂盒测定其质量浓度为 20.66 mg/mL。

2.3 核桃蛋白粗提物与核桃过敏患者血清池 IgE 结合情况

使用 6 名核桃过敏患者血清建立血清池,通过免疫印迹试验检测其中与血清 IgE 结合的主要



注:M表示蛋白标准分子质量 Marker;W表示核桃总蛋白。

图 3 核桃总蛋白电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis analysis of walnut proteins

的核桃过敏原。如图 4 所示,患者血清池与 44 ku 处的 Jug r 2 有明显的结合,强度显著高于其它蛋白质。

2.4 核桃蛋白粗提物抗胃蛋白酶和胰蛋白酶消化肽段的质谱分析

将核桃蛋白粗提物经胃蛋白酶或胰蛋白酶消化 60 min 后的产物进行 HPLC-MS/MS 检测以确定属于过敏原 Jug r 2 的抗消化肽段。核桃蛋白粗

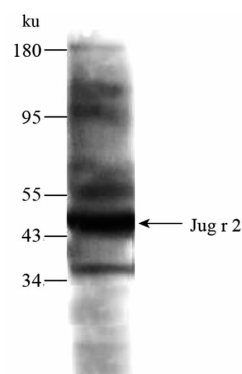


图 4 核桃蛋白粗提物的免疫印迹分析

Fig.4 Western blot analysis of walnut proteins crude extracts

提物经过 60 min 的胃蛋白酶消化后,经 HPLC-MS/MS 检测共产生了 4 953 个二级质谱。根据 Uniprot 数据库提供的核桃过敏原氨基酸序列构建检索数据库,使用 pFind 软件搜索,鉴定出来源于 Jug r 2 的 4 条肽段(如表 2 所示),覆盖其 11%的氨基酸序列。核桃蛋白粗提物经过 60 min 的胰蛋白酶消化后,经 HPLC-MS/MS 检测共产生了 6 493 个二级质谱,据 Uniprot 数据库提供的核桃过敏原氨基酸序列构建检索数据库,使用 pFind 软件搜索,鉴定出来源于 Jug r 2 的 13 条肽段(如表 3 所示),覆盖其 46%的氨基酸序列。

表 2 胃蛋白酶消化质谱与 Jug r 2 匹配的肽段

Table 2 Peptide matched with Jug r 2 by pepsin digestion through mass spectrometry

序号	位置	理论分子质量/u	观察分子质量/u	误差/u	多肽序列
1	AA363~388	2 762.4259	2 762.4205	0.0054	RALSQHAMSAGQRPWGRSSGGPISL
2	AA489~494	677.3497	677.3482	0.0015	ARGDIF
3	AA515~528	1 578.7539	1 578.7499	0.0040	LGF DINGENQRDF
4	AA519~528	1 261.5800	1 261.5773	0.0026	INGENQRDF

注:误差为观察分子质量与理论分子质量之差。

表 3 胰蛋白酶消化质谱与 Jug r 2 匹配的肽段

Table 3 Peptide matched with Jug r 2 by trypsin digestion through mass spectrometry

序号	位置	理论分子质量/u	观察分子质量/u	误差/u	多肽序列
1	AA215~220	750.3660	750.3668	-0.0007	GIENYR
2	AA250~260	1 217.6616	1 217.6614	0.0001	ATLTLVSQETR
3	AA323~337	1 628.8886	1 628.8851	0.0035	VFSNDILVAALNTPR
4	AA351~356	685.4123	685.4121	0.0002	EGVIIR
5	AA428~438	1 233.5634	1 233.5656	-0.0022	GAMMVPHYNSK
6	AA470~483	1 751.8075	1 751.8078	-0.0003	REQEEEESTGRFQK
7	AA471~483	1 595.7063	1 595.7058	0.0005	EQEEEESTGRFQK

(续表 3)

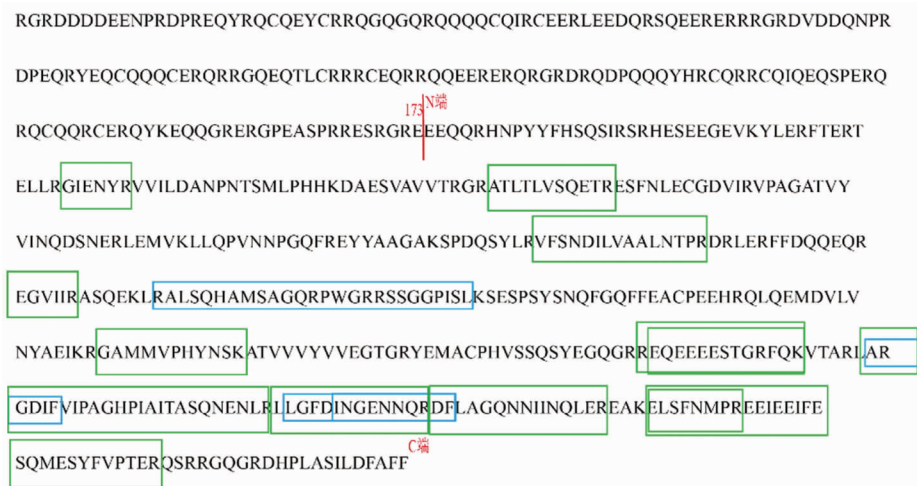
序号	位置	理论分子质量/u	观察分子质量/u	误差/u	多肽序列
8	AA488~513	2 772.5035	2 772.4936	0.0099	LARGDIFVIPAGHPAIITASQENLR
9	AA491~513	2 432.2812	2 432.2811	0.0001	GDIFVIPAGHPAIITASQENLR
10	AA514~526	1 430.7266	1 429.7417	0.9849	LLGFDINGENNQR
11	AA527~541	17 43.8904	1 744.8697	-0.9793	DFLAGQNNIINQLER
12	AA545~552	992.4750	992.4737	0.0012	ELSFNMPR
13	AA545~572	3 465.5745	3 464.5430	1.0315	ELSFNMPREEIEEIFESQMESYFVPTER

注:误差为观察分子质量与理论分子质量之差。

2.5 抗消化肽在 Jug r 2 一级序列和三维结构上的分布情况

为了进一步观察这些抗消化肽在过敏原 Jug r 2 一级序列上的分布情况,从 NCBI 数据库中获取了 Jug r 2 的序列。如图 5 所示,这些抗消化肽段主要分布于 Jug r 2 的 C 端区域,覆盖了 AA428~572 位点,约占 74% 的序列。其中,经胃蛋白酶消化后,在 AA515~528 处产生了两条重叠肽段(3 号和 4 号),经胰蛋白酶消化后分别在 AA470~483(6 号和 7 号)、AA488~513(8 号和 9 号)和 AA545~572(12 号和 13 号)处产生重叠肽段,证明了这些区域具有较强的抗消化性。相比胃蛋白酶,Jug r 2 经过胰蛋白酶消化可获取更多的肽段,这可以提高耐消化肽预测 B 细胞线性表位的效率。值得注意的是抗胃蛋白酶消化肽段与 8~11 号抗胰蛋白酶消化肽段存在重合区域,进一步

说明 Jug r 2 经过连续的胃肠道主要消化酶的消化,肽段 AA494~513、AA515~526、AA519~528 可以得以保留。最终筛选得到 11 条抗消化的非重叠肽段,分别为 AA215~220、AA250~260、AA323~337、AA351~356、AA363~388、AA428~438、AA470~483、AA488~513、AA514~526、AA527~541、AA545~572。11 条抗消化肽段在 Jug r 2 模拟三维模型中的定位如图 6 所示,11 条抗消化肽段中有 2 条仅位于 α 螺旋处,2 条同时存在 α 螺旋和转角结构,3 条同时存在 β 折叠和转角结构,2 条位于无规卷曲处。相比预测得到的 8 条 B 细胞线性表位的定位特点,11 条抗消化肽段中出现了更多的 α 螺旋结构,尽管 α 螺旋的结构可能会降低与 IgE 结合能力^[23],然而 11 条抗消化肽段所处的 α 螺旋均处于 Jug r 2 表面,并且部分消化肽段同时位于 α 螺旋和转角处,即认为这些抗消化肽段可能位于



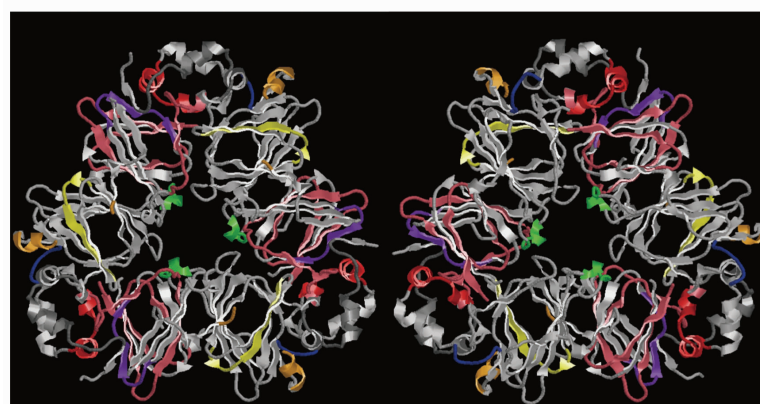
注:蓝色框标记抗胃蛋白酶消化肽段,绿色框标记抗胰蛋白酶消化肽段。

图 5 抗消化肽段在 Jug r 2 氨基酸序列中的定位

Fig.5 Positioning of anti-digestive peptides in Jug r 2 amino acid sequences

α 螺旋的连接处。按照 Ktyle 等^[18]的原则,对 11 条抗消化肽段在 Jug r 2 中的疏水性分析如图 7 所示, 本研究发现 11 条抗消化肽段处于 Jug r 2 亲水性区域的比例较高。李平等^[26]对 Cupin 家族的食物过敏原的 B 细胞线性表位的特点进行总结, 发现其 B 细胞线性表位具有处于高度暴露于溶剂的

区域; 含有亲水性侧链; 有一定的柔韧性的 3 个特点。在本研究中所得到的 11 条抗消化肽段均位于 Jug r 2 的表面, 亲水性良好, 且这些肽段所处转角和无规卷曲结构具有可变性, 会提高其与 IgE 的结合活性。



(a) Jug r 2 模拟三维模型的正

(b) Jug r 2 模拟三维模型的反

注: 用绿色标记 AA215-220, 用黄色标记 AA250-260, 用红色标记 AA323-337, 用蓝色 AA351-356, 用橙色标记 AA363-388, 用紫色标记 AA428-438, 用棕色标记 AA428-438, 用粉色标记 AA483-541, 用深灰色标记 AA545-572。

图 6 11 条抗消化肽段在 Jug r 2 模拟三维结构上的定位

Fig.6 Location of 11 digestion-resistant peptides in the tertiary structure of Jug r 2

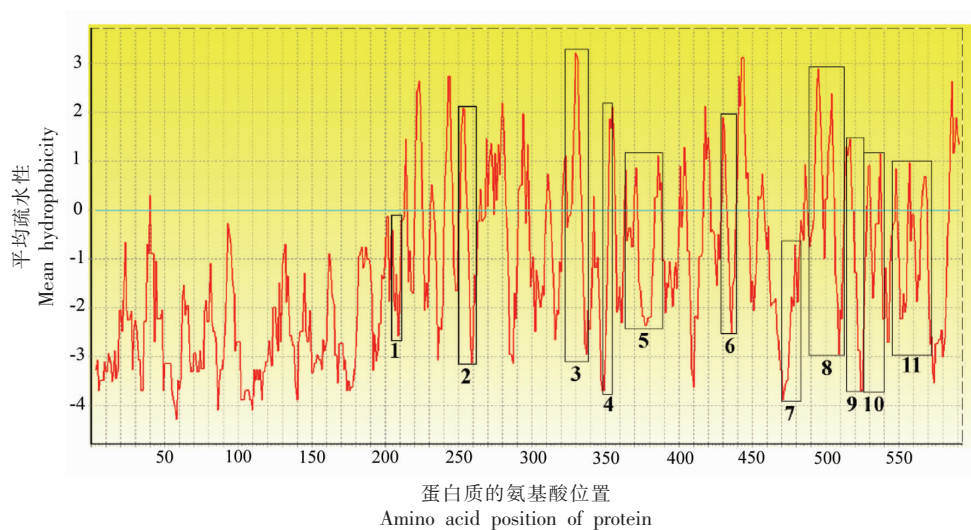


图 7 11 条抗消化肽段的疏水分析

Fig.7 Hydrophobicity analysis of 11 anti-digestible peptides

2.6 Jug r 2 抗消化肽段与 Jug r 2 线性表位重合程度分析

如图 8 所示, Jug r 2 的抗消化肽段在蛋白质全序列的 AA545~572 位置附近含有已知的 B 细

胞线性表位^[27], 在 AA250~260、AA363~388 和 AA470~483 位置的抗消化肽均与预测的线性表位存在部分氨基酸序列的交叉, 说明 B 细胞线性表位可能具有一定的抗消化性。除此之外, 在

AA215~220、AA250~260、AA323~337、AA363~388、AA428~438、AA470~483、AA545~572位置的抗消化肽段与已知的T细胞表位交叉,核桃Jug r 2的T细胞表位可能是诱导核桃过敏患者外周血

T细胞向Th2中枢记忆表型分化的因素^[28],Th2细胞驱动IgE类转换和过敏效应细胞的扩大是引发过敏反应的关键环节^[29]。

>英国核桃s球蛋白前体

```
RGRDDDEENPRDPREYRQCQEYCRRRQGQGRQQQCQIRCEERLEEDQRSQEERERRGRDVEDDQNP
DPEQRYEQCQQCERQRGQEQTLRRRCEQRRQEEERERQRGRDRQDPQQYHRCQRRCQIQEQSPERQ
RQCQQRCERQYKEQGRERGPEASPRRESRGREEEQQRHNPYYFHSQSIRSRHSEEGEVKYLERTFT
ELLRGIENYRVVILDANPNTSMLPHHKDAESVAVVTRGRATLTLVSOETRESFNL ECGDVIRVPAGATVY
VINQDSNERLEMVKLLQPVNPGQFREYYAAGAKSPDQSYLRVFSNDILVAALNTPRDLRERFFDQEQR
EGVIIRASQEKLRALSQHAMSAGQRPWGRSSGGPISLKSESPSYSNQFGQFFEACPEEHRQLQEMDVLV
NYAEIKRGAMMVPHYNSKATVVVVVVEGTGRYEMACPHVSSQSYEGQRRREEEEEESTGRFQKVTARLAR
GDIFVIPAGHPAIATASQENLRLLGFDINGENNQRDFLAGQNNIINQLEREAKELFSFNPREEIEEIFE
SQMESYFVPTERSRRGQGRDHPLASILDFAFF
```

注:红色标记的是真实Jug r 2的T细胞表位;蓝色下划线标记真实Jug r 2的B细胞线性表位;橙色下划线标记生物信息学预测得到的Jug r 2的B细胞线性表位;绿色框标记抗消化肽段;该氨基酸序列收录在NCBI库中的编号为AAF18269.1。

图8 抗消化肽段和预测表位在Jug r 2氨基酸序列中的定位

Fig.8 Position of anti-digestive peptides and predicted epitopes in amino acid sequence of Jug r 2

食物过敏原进入机体的主要途径是消化道黏膜表面,过敏原在消化道内所具有的特定分子特性与肠道驻留免疫细胞相互作用所必需的,这些特定分子特性包括食物过敏原的消化特性^[30]。某些食物过敏原经过模拟胃肠道消化后形成的蛋白片段仍保持与IgE结合活性,例如花生过敏原Ara h 1^[15]、Ara h 3^[31]和猕猴桃蛋白^[32]。在本研究中同样也发现了核桃主要过敏原Jug r 2的抗胃蛋白酶和胰蛋白酶消化短肽,与预测和实际得到的B细胞线性表位存在重叠,因此Jug r 2抗消化肽段成为筛选B细胞线性表位的方法。除此之外,Jug r 2的抗消化肽段与实际T细胞表位存在重叠,这进一步指出胃肠道消化对核桃主要过敏原Jug r 2消化后引起肠道黏膜免疫细胞反应的作用机制可能与抗消化肽段有关。

本研究中核桃蛋白所处的体外消化环境较为简单,所采用的体外胃肠模拟消化并不能完全反映核桃蛋白在核桃整个食物基质中的消化行为,特别是由于肠道不同部位发挥作用的消化酶种类的不同^[33],可能导致该研究结果具有一定的局限性。除此之外,核桃主要过敏原Jug r 2抗消化肽是否具有与IgE结合能力仍需更多的核桃过敏患

者血清来进一步验证。

3 结论

尽管固相肽合成法是研究Jug r 2线性表位的金方法,但是由于合成成本高且盲目性大,因此目前寻找相关辅助方法以提高Jug r 2线性表位的识别效率是重要的研究方向。本研究发现了Jug r 2抗消化肽段具有B细胞线性表位所具备的亲水性和柔韧性的特点,并且通过一级序列和三维定位分析发现了Jug r 2抗消化肽段与预测和真实的B细胞线性表位以及T细胞线性表位重叠。基于Jug r 2抗消化肽段的一级序列和三维定位的分析可能是预测Jug r 2线性表位的有效策略,并且本研究也有助于研究核桃主要过敏原Jug r 2在胃肠道致敏机制。

参 考 文 献

- [1] MCWILLIAM V, KOPLIN J, LODGE C, et al. The prevalence of tree nut allergy: A systematic review [J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2015, 15 (9): 54.

- [2] BOCK S A, MUÑOZ-FURLONG A, SAMPSON H A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001, 107(1): 191-193.
- [3] TEUBER S S, JARVIS K C, DANDEKAR A M, et al. Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, Jug r 2, from English walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1999, 104(6): 1311-1320.
- [4] COSTA J, CARRAPATOSO I, OLIVEIRA M B P P, et al. Walnut allergens: Molecular characterization, detection and clinical relevance[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2014, 44(3): 319-341.
- [5] CABANOS C, URABE H, TANDANG-SILVAS M R, et al. Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1[J]. *Molecular Immunology*, 2011, 49(1/2): 115-123.
- [6] MURPHY K, WEAVER C. *Janewa's immunology*[M]. New York: Garland Science, 2017: 158-163.
- [7] MALHERBE L. T-cell epitope mapping[J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2009, 103(1): 76-79.
- [8] HILEMAN R E, SILVANOVICH A, GOODMAN R E, et al. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, 128(4): 280-291.
- [9] 胡永芯, 李欣, 程剑锋, 等. 食物致敏原表位定位技术的研究进展[J/OL]. *食品科学*, (2020-06-01) [2020-10-31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200601.1504.080.html>.
- HU Y X, LI X, CHENG J F, et al. Advances in food allergen epitope localization technologies[J/OL]. *Food Science*, (2020-06-01) [2020-10-31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200601.1504.080.html>.
- [10] MACDONALD T T, MONTELEONE G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut[J]. *Science*, 2005, 307(5717): 1920-1925.
- [11] VERHOECKX K, BØGH K L, DUPONT D, et al. The relevance of a digestibility evaluation in the allergenicity risk assessment of novel proteins. Opinion of a joint initiative of COST action ImpARAS and COST action INFOGEST[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 129: 405-423.
- [12] BØGH K L, MADSEN C B. Food allergens: Is there a correlation between stability to digestion and allergenicity? [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2016, 56(9): 1545-1567.
- [13] BREDEHORST R, DAVID K. What establishes a protein as an allergen? [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001, 756(1): 33-40.
- [14] HOH R A, JOSHI S A, LEE J Y, et al. Origins and clonal convergence of gastrointestinal IgE⁺ B cells in human peanut allergy[J]. *Science Immunology*, 2020, 5(45): 4209.
- [15] BØGH K L, KROGHSBO S, DAHL L, et al. Digested Ara h 1 has sensitizing capacity in brown norway rats[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2009, 39(10): 1611-1621.
- [16] 姜松松, 赵博, 韩诗雯, 等. 不同热加工方式对核桃蛋白致敏性的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(13): 94-99.
- JIANG S S, ZHAO B, HAN S W, et al. Effect of different thermal processing treatments on allergenicity of walnut proteins[J]. *Food Science*, 2018, 39(13): 94-99.
- [17] DOWNS M L, SEMIC-JUSUFAGIC A, SIMPSON A, et al. Characterization of low molecular weight allergens from English walnut (*Juglans regia*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(48): 11767-11775.
- [18] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105-132.
- [19] KARPLUS P A, SCHULZ G E. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. *Naturwissenschaften*, 1985, 72(4): 212-213.
- [20] EMINI E A, HUGHES J V, PERLOW D S, et al. Induction of hepatitis a virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide[J]. *Journal of Virology*, 1985, 55(3): 836-839.
- [21] JAMESON B A, WOLF H. The antigenic index: A novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. *Bioinformatics, Division of Biology*, 1988, 4(1): 181-186.
- [22] TOOMER O T, DO A, PEREIRA M, et al. Effect of simulated gastric and intestinal digestion on temporal stability and immunoreactivity of peanut, al-

- mond, and pine nut protein allergens[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(24): 5903–5913.
- [23] GUO X, JIANG S, LI X, et al. Sequence analysis of digestion-resistant peptides may be an efficient strategy for studying the linear epitopes of Jug r 1, the major walnut allergen[J]. *Food Chemistry*, 2020, 322: 126711.
- [24] LI X, YANG H W, CHEN H, et al. *In silico* prediction of T and B cell epitopes of Der f 25 in *Dermatophagoides farinae*[J]. *International Journal of Genomics*, 2014, 2014: 1–10.
- [25] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [26] 李平, 王转花. Cupin 家族食物性过敏原表位研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(5): 590–592.
- LI P, WANG Z H. Research for epitopes on Cupin family food allergen[J]. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2011, 27(5): 590–592.
- [27] ROSENFELD L, SHREFFLER W, BARDINA L, et al. Walnut allergy in peanut-allergic patients: Significance of sequential epitopes of walnut homologous to linear epitopes of Ara h 1, 2 and 3 in relation to clinical reactivity[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2012, 157(3): 238–245.
- [28] ARCHILA L D, JEONG D, PASCAL M, et al. Jug r 2-reactive CD4⁺ T cells have a dominant immune role in walnut allergy[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 136(4): 983–992.
- [29] TORDESILLAS L, BERIN M C, SAMPSON H A. Immunology of food allergy[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 32–50.
- [30] PEKAR J, RET D, UNTERSMEYER E. Stability of allergens[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 100: 14–20.
- [31] DI STASIO L, PICARIELLO G, MONGIELLO M, et al. Peanut digestome: Identification of digestion resistant IgE binding peptides[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 107: 88–98.
- [32] LUCAS J S A, COCHRANE S A, WARNER J O, et al. The effect of digestion and pH on the allergenicity of kiwifruit proteins[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2008, 19(5): 392–398.
- [33] DI L, PICARIELLO G, FERRANTI P, et al. *In vitro* gastroduodenal and jejunal brush border membrane digestion of raw and roasted tree nuts[J]. *Food Research International*, 2020, 136: 109597.

Linear Epitopes Screening Study of Major Walnut Allergen Jug r 2 Based on Anti-digestion Peptides

Hao Mengzhen, Li Xinrui, Mu Yao, Chen Xi, Che Huilian*

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing Laboratory for Food Quality and Safety, Beijing 100083)

Abstract Jug r 2 is the major allergen of walnut. And the linear epitopes on Jug r 2 is a key factor in triggering a severe allergic reaction. Hence, the research on the efficient strategy for analyzing the linear epitopes of Jug r 2 is necessary. In our study, two immunoinformatic tools including DNASTar Protean and ABCpred were used to predict the B cells linear epitopes on Jug r 2. *In vitro* simulated gastrointestinal digestion and HPLC-MS/MS were used to identify anti-digestion peptides. And anti-digestion peptides were located on the 3D model of Jug r 2. The results showed that eight predicted B cells linear epitopes were AA186–199, AA226–230, AA257–263, AA284–289, AA373–382, AA389–398, AA408–414, AA472–487; eleven anti-digestion peptides were AA215~220, AA250~260, AA323~337, AA351~356, AA363~388, AA428~438, AA470~483, AA488~513, AA514~526, AA527~541, AA545~572. Of all anti-digestion peptides, four coincided with the predicted or true B cells linear epitope sequences and eight coincided with true T cells epitopes sequences. Anti-digestion peptides showed good antigenic properties in hydrophilic and flexible on the localization of Jug r 2 3D structure. Therefore, the anti-digestion property of food allergens may be a promising direction for studying linear epitopes of Jug r 2.

Keywords linear epitopes; Jug r 2; immunoinformatic; anti-digestion peptides