

腰果过敏原 Ana o 2 结构及抗原表位预测

朱倩倩¹, 吴序栋², 肖杰¹, 成小娟¹, LU Jun³, 刘志刚², 徐宏^{*1}

(1. 深圳大学 化学与化工学院, 广东 深圳 518060; 2. 深圳大学 医学院, 广东 深圳 518060; 3. School of Biological Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand)

摘要: 腰果是引起人们过敏的主要食物之一。作者采用生物信息学方法, 通过 Pubmed 网络服务器、生物信息分析软件 SOPMA、swiss-model 网络服务器、DNASar 生物分析软件等对腰果主要过敏原 Ana o 2 的结构和抗原表位进行预测, 分析 Ana o 2 蛋白的抗原表位可能是 108-111, 181-186, 217-218, 234-238, 244-255, 283-287。这为腰果过敏原的进一步研究提供理论参考, 并对开发低过敏腰果制品提供帮助。

关键词: 腰果; Ana o 2; 结构; 抗原表位

中图分类号: Q 518.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)02-141-05

Prediction of the Structure and Antigenic Epitopes of Cashew Allergen Ana o 2

ZHU Qian-qian¹, WU Xu-li², XIAO Jie¹, CHENG Xiao-juan¹,
LU Jun³, LIU Zhi-gang², XU Hong^{*1}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. College of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 3. School of Biological Science, University of Auckland, Auckland, New Zealand)

Abstract: Cashew is one of the foods which can cause people allergic. In this manuscript, the sequence characteristics, secondary and tertiary structure, antigenic epitopes, hydrophobicities and surface accessibility, flexibility of allergen Ana o 2 from cashew were predicted and analyzed by using bioinformatics methods, such as Pubmed, SOPMA, swiss-model and DNASar. Results demonstrated that the epitopes of Ana o 2 are probably at 108-111, 181-186, 217-218, 234-238, 244-255, 283-287. These should be helpful for the further research of cashew allergen and be useful to develop of low sensitization cashew products.

Key words: cashew, Ana o 2, structure, antigenic epitope

食品过敏反应主要是由 Ig E 介导的 I 型变态反应, 其反应包括呼吸系统、胃肠道系统、中枢神经系统、皮肤等不同形式的临床症状。严重时可能产生过敏性休克, 甚至危及生命^[1]。引起食物过敏的食物有包括坚果、牛乳、鸡蛋、鱼、甲壳类水产动物、

花生、大豆、小麦等 8 大类。腰果与花生、核桃等属于坚果。由于营养丰富, 腰果被大量食用并且存在于很多工业食品中。有过敏体质的人吃了腰果后, 血液中出现一种特殊的物质, 引起过敏反应^[2], 而且能引起过敏休克等严重症状^[3]。美国

收稿日期: 2011-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871752, 30570421); The International Science and Technology (ISAT) Linkages Fund, Royal Society of New Zealand (ISATB09-33); 广东省科技重点专项(2003A3080502); 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。

* 通信作者: 徐宏(1965—), 男, 湖北黄冈人, 理学博士, 教授, 主要从事生物大分子研究。E-mail: xuhong@szu.edu.cn

FDA、欧洲以及香港等地区先后制定了政策法规,要求食品生产厂家必须在产品标签上注明产品含有的过敏成分,其中就包含坚果在内^[4,5]。

Davoren^[6]等应用回顾性图表研究对 213 名对花生或坚果过敏儿童进行为期 42 个月的调查。发现对腰果过敏比对花生过敏更为常见(74.1% vs 30.5%)腰果过敏儿童具有发生过敏反应的高危险性。Fang Wang^[7]等通过免疫印迹法发现,Ana o 2 能被 62% 的腰果过敏患者所识别,并最终证明 Ana o 2 是腰果的主要过敏原。而且,与 Ig E 介导的全身过敏反应密切相关^[8]。因此,腰果过敏已经成为严重的食品安全问题^[9]。

表位是蛋白质抗原性的基础^[10]。作者采用生物信息学方法,运用计算机软件分析预测腰果过敏原 Ana o 2 的蛋白结构和抗原表位,为腰果过敏原的进一步研究提供信息基础,并为低致敏腰果制品的开发提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 腰果过敏原 Ana o 2 的氨基酸序列

通过 Pubmed 网络服务器 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)检索腰果过敏原 Ana o 2 的氨基酸序列。

1.2 Ana o 2 蛋白结构预测

利用生物信息分析软件 SOPMA 网络服务器 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html),输入检索到的 Ana o 2 蛋白的氨基酸序列,得到对蛋白质的二级结构预测结果。用 swiss-model 网络 (<http://swissmodel.expasy.org/>)对蛋白质三维结构在线

软件预测蛋白的三维结构。登录 swiss-model 网站,选择"Automated Mode"模式。在该模式下输入 Ana o 2 的蛋白质序列,送交计算后 24 h 内登陆网站,下载计算返回的蛋白质模型的电子文档。

1.3 Ana o 2 蛋白抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性预测

应用 DNASTar 生物分析软件中的 protean 程序,采用 Jameson-Wolf 法、Kyte-Doolittle 法、Emini 法和 Karplus-Schulz 法分别对 Ana o 2 蛋白的抗原指数、亲水性、表面可及性和柔韧性进行预测。

1.4 抗原表位预测

将 Ana o 2 蛋白的结构预测结果与抗原指数、亲水性、表面可及性和柔韧性预测结果相结合,分析得抗原表位。

2 结果与分析

2.1 Ana o 2 蛋白的二级结构

腰果过敏原 Ana o 2 的氨基酸序列,共有 457 个氨基酸残基。利用 SOPMA 网站对蛋白的二级结构预测结果,如图 1 所示。其中 α -螺旋占 29.10%, β -折叠占 16.19%, β -转角占 21.23%,无规则卷曲为 33.48%。

2.2 Ana o 2 蛋白的三级结构

根据 swiss-model 分析可知,Pru 1 是否的一个过敏原,它和 Ana o 2 同属 legumin 家族(一个 11S 球蛋白),且其相似性达到 49.1%。Pru 1 的结构已经被解析,在 PDB 数据库中的编号为 3fz3^[11]。以 Pru 1 为模板计算出 Ana o 2 蛋白结果,由图 2 可以看到,Ana o 2 的螺旋区域主要在蛋白的外部,中间区域主要是 β -折叠和转角结构。其中 α -螺旋占 16.0%,

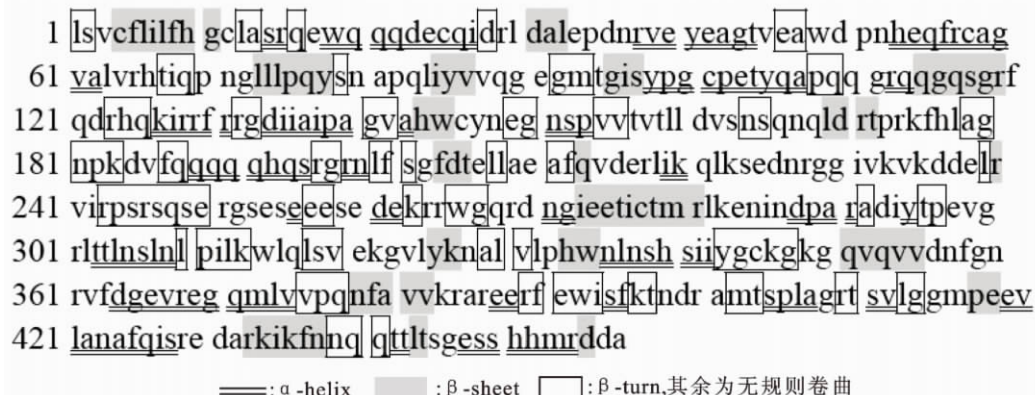


图 1 SOPMA 对蛋白的二级结构预测结果

Fig. 1 Secondary structures of Ana o 2 protein predicted by method of SOPMA

β -折叠占 39.95%, β -转角占 28.61%,无规则卷曲为 15.46%。与 SOPMA 预测结果相比,SWISS-MODEL 所预测的 α -螺旋和无规则卷曲所占的比例分别少了 13.1%和 18.02%;而 β -折叠与 β -转角则分别多了 23.76%和 7.38%。

2.3 Ana o 2 蛋白的抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性

预测的结果如图 3 所示,图中柔韧性为有线段标记区域;抗原指数、亲水性及表面可及性中,横线以上部分为大于 0 的区域,横线以下为小于横线所表示值的区域。具体参数见表 1。



图 2 Swiss-model 预测 Ana o 2 蛋白的三级结构图
Fig.2 Swiss-model prediction result of tertiary structure of Ana o 2 protein

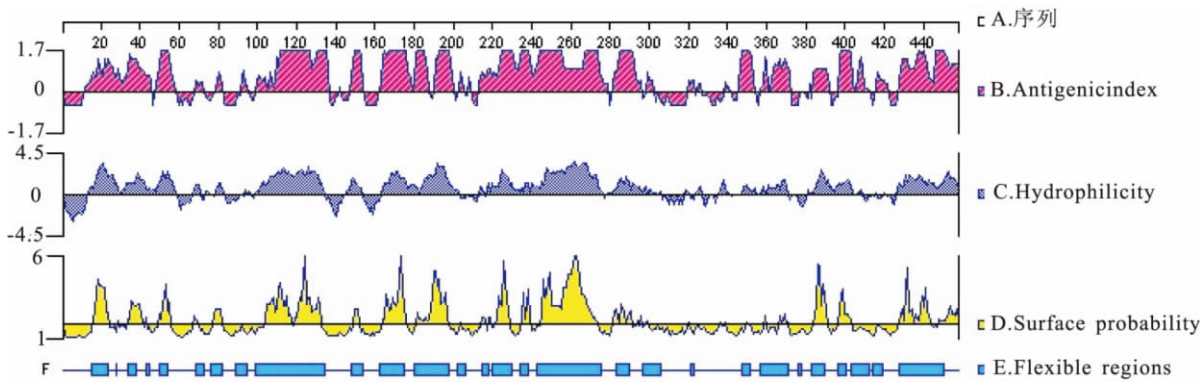


图 3 DNASTar 软件预测 Ana o 2 蛋白的抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性
Fig.3 DNASTar prediction result of antigenicindex, hydrophilicity, surface probability and flexible regions of Ana o 2 protein

表 1 DNASTar 软件预测 Ana o 2 蛋白的抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性的结果

相关参数	预测区域
抗原指数	11-45,49-57,68-71,78-81,91-94,99-135,141,147-153,161-177,179-186,190-199,203-204,207-208,212-278,281-295,298-301,319-322,324-325,338-340,345-353,356-359,361-371,381,383-391,396-411,415-421,427-457
亲水性	13-28,31-56,67-69,74,78-82,93-95,99-133,145-152,162-202,213-275,278-300,305,318-319,323-325,335-338,347-353,357-370,380-403,406-407,426-457
表面可及性	15-23,28,33-40,42,49-54,67-68,77-81,103-116,118-131,149-150,163-175,181-196,203,214-215,217-218,221-227,234-238,244-273,281-290,293,295,297-298,335,338,349,358,366,368,370,384-389,396-402,427-443,447-457
柔韧性	15-24,28,34-38,43-45,50-54,69-73,76-82,89-95,99-134,148-154,162-175,180-198,202-206,215-218,220-230,234-238,243-275,283-290,297-306,321-323,347-351,357-371,376-378,383-389,396-400,403-412,414-419,428-450

蛋白质的亲水性,表面可及性、柔韧性等在抗原的形成方面发挥着重要作用,当亲水性 >0 ,抗原指数 >0 ,表面可及性 >1 时,形成表位的可能性大^[12],而且表位一般由3~5个氨基酸组成,综合以上各参数,根据图3可推导出该蛋白的抗原区分别为氨基酸的15-23,34-38,50-54,78-81,103-116,118-131,149-150,163-175,181-186,190-197,217-218,221-227,234-238,244-273,283-290,384-389,396-400,428-443,447-450。

2.4 Ana o 2 蛋白的抗原表位

蛋白质的结构预测问题是当前分子生物学的一大难题^[13],其中蛋白质的二级结构也是预测抗原决定簇的重要信息^[14-16], α -螺旋、 β -折叠等二级结构的化学键键能比较高,能够较牢固地维持蛋白质的高级结构,不适宜作为抗原的表位。而蛋白质的转角及无规则卷曲等二级结构则是比较松散的结构,易于发生扭曲、盘旋,并展示在蛋白质的表面,因此该区域常含有优势抗原表位^[17,18]。因此,将上述预测的抗原表位与 SOPMA 网络服务器预测的二级结构结合起来,推测 Ana o 2 蛋白的抗原表位可能是108-111,120-125,163-168,173-175,181-186,195-196,217-218,221-227,234-238,244-255,257-260,263-270,283-287,384-386,396-400,429-432。

将上述结论与 swiss-model 所预测的 Ana o 2 的三级结构图分析可以发现,108-111,181-186,217-218,234-238,均属于 β -转角结构,且都暴露在蛋白质的外部。244-255,283-287位于无规则卷曲区域,且属于端结构,而384-386虽然也属于无规则卷曲结构,但从 Ana o 2 蛋白三级结构图上可以看出,该段结构包埋在蛋白质内部。

因此,结合 SOPMA、swiss-model 和 DNASar 综合分析的结果,作者预测 Ana o 2 蛋白的抗原表位可能是108-111,181-186,217-218,234-238,244-255,283-287。

参考文献(References):

- [1] Helm RM, Burks AW. Food allergens[J]. *Clin Allergy Immunol*, 2008,21:219-353.
- [2] 董天恩. 当心幼儿腰果过敏[J]. *学前教育*, 1999,(8):20.
DONG Tian-en. Beware of children's allergy to cashew[J]. *Preschool Education*, 1999,(8):20. (in Chinese)
- [3] Fleischer DM, Conover-Walker MK, Matsui EC, Wood RA, et al. The natural history of tree nut allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005,116:1087-1093.
- [4] FALCPA. Food and Drug Administration, Federal Register, 70, 76463, 2005.

3 结 语

在传统的免疫学技术中,人们要通过克隆、表达和分离纯化完整的蛋白抗原,并利用完整的抗原来获得与之交叉反应性强的抗体,这种方法复杂并且表达效率不高^[19]。近年来,随着生物信息学和计算机科学的发展,通过生物信息学及序列分析软件的预测,可获得蛋白质的基因和氨基酸序列中蕴含的抗原表位或与抗原表位相关的信息^[20]。抗原表位的预测节省了大量的时间和人力物力,提高了实验的成功率^[21],并对于合成相关抗原进行临床诊断和开发低致敏食物有关键的指导意义。

目前,国内对腰果主要过敏原的研究并不多见。作者对腰果过敏原 Ana o 2 蛋白的抗原表位预测,可为开展低过敏性的腰果制品以及过敏原的检测等研究工作提供理论和技术参考。

目前为止,蛋白质结构和抗原表位预测方法已经达到几十种,而且提供结构预测的网站也逐渐增多。但是由于每种方法所采用的测试集不同,参数的选取也不同,迫切需要在统一的标准上对各个方法进行评价的分析,以便为广大研究者在应用这些方法时提供更好的参考^[22]。在对未知结构的蛋白质进行预测时,用多种方法和多参数的综合预测抗原表位可以提高预测的准确性。作者采用 SOPMA 和 DNASar 两种方法对腰果过敏原 Ana o 2 的抗原表位进行综合预测,提高了准确性。并结合 swiss-model 网络服务器所预测到 Ana o 2 的三级结构,能更准确地预测抗原表位,因此,综合多方面的参数,我们预测 Ana o 2 蛋白的抗原表位可能是108-111,181-186,217-218,234-238,244-255,283-287。

作者采用计算机软件对过敏原抗原表位进行分析和预测,存在一定的误差,仍需要通过实验来进行进一步验证,但可作为后续蛋白表位的实验作为参考,并对深入研究腰果过敏原提供了线索。

- [5]<http://europa.eu/scadplus/leg/en/lvb/l21090.htm>
- [6]Drworen M. Cashew nut allergy is associated with a high risk of anaphylaxis[J]. **Arch Dis Child**, 2005,90(10): 1084—1085.
- [7]Fang Wang, Jason M Robotham, Suzanne S Teuber, et al. Ana o 2, a Major Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Allergen of the Legumin Family[J]. **Int Arch Allergy Immunol**,2003,132: 27—39.
- [8]Garcia F, Moneo I, Fernandez B, et al. Allergy to Anacardiaceae; description of cashew and pistachio nut allergens[J]. **J Investig Allergol Clin Immunol**,2000, 10:173—177.
- [9]Hourihane JO B, Harris H, LangtonHewer S, et al. Clinic features of cashew allergy[J]. **Allergy**, 2001,56:252—253.
- [10]李海侠,毛旭虎. 蛋白质抗原表位研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2007,35(1):54—57.
LI Hai-xia, MAO Xu-hu. Progress in the research of epitopes of protein[J]. **Prog in Microbiol Immunol**, 2007, 35(1) :54—57. (in Chinese)
- [11]Jin T, Albillos S M, Guo F, et al. Crystal structure of prunin-1, a major component of the almond (*Prunus dulcis*) allergen amandin[J]. **J Agric Food Chem**, 2009,57: 8643—8651.
- [12]胡纯秋,高金燕,罗春萍,等. 花生过敏原 Ara h 2.02 二级结构和 B 细胞抗原表位预测[J]. 食品科学, 2009,30(21): 13—15.
HU Chun-qiu, GAO Jin-yan, LUO Chun-ping, et al. Prediction of secondary structure and B cell epitopes of peanut allergen Ara h2.02[J]. **Food Sci**, 2009, 30(21): 13—15. (in Chinese)
- [13]管维红,徐振源,朱平. 用非线性预测方法研究蛋白质序列的特性(I) [J]. 食品与生物技术学报, 2008, 2(1): 71—75.
GUAN Wei-hong, XU Zhen-yuan, ZHU Ping. Nonlinear prediction analysis of properties in protein sequences(I) [J]. **J Food Sci Biotech**, 2008, 2(1): 71—75. (in Chinese)
- [14]Chou PY, Fasman GD. Prediction of the secondary structure of protein from the amino acid sequence[J]. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**,1978,47:145—148.
- [15]Krcnak V, Mach O, Maly A. Computer prediction of B-cell determ inants from protein amino acid sequence based on incidence of beta-turns[J]. **Methods Enzymol**,1989,178: 586—611.
- [16]Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MH. Correlation between the location of antigenic sites and prediction of turns in proteins[J]. **Immunol Lett**,1993,36(1): 83—99.
- [17]吕燕波,万瑛,吴玉章. SARS 病毒基因组所编码的 E 蛋白的二级结构和 B 细胞表位预测[J]. 免疫学杂志, 2003,19(6): 407—410.
LV Yan-bo, WAN Ying, WU Yu-zhang. Prediction of the secondary structure and B cell epitope for the E protein of SARS coronavirus[J]. **J Immunol**, 2003,19(6): 407—410. (in Chinese)
- [18]周芙玲,张王刚,王佰言,等. 多发性骨髓瘤 M MSA-1 抗原的二级结构预测及多抗体的制备[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2009, 30(4): 449—452.
ZHOU Fu-ling, ZHANG Wang-gang, WANG Bai-yan, et al. Prediction the secondary structure and preparing polyclonal antibody for a novel antigen MMSA-1 in multiple myeloma[J]. **J Xi An Jiao Tong Univ: Medical Science**, 2009, 30(4): 449—452. (in Chinese)
- [19]章辉,朱荫昌. B 细胞表位预测的研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(3): 236—238.
ZHANG Hui, ZHU Yin-chang. Progress of research on prediction of B cell epitope[J]. **Chin J Schisto Control**, 2006, 18(3): 236—238. (in Chinese)
- [20]韩婷,高金燕,李欣,等. 牛乳 β -乳球蛋白过敏原线性表位串联体的分子设计[J]. 食品科学,2008,29(11): 465—468.
HAN Ting, GAO Jin-yan, LI Xin, et al. Molecular design of A tandern of multiple epitopes of β -lactoglobulin allergern from cow milk[J]. **Food Sci**, 2008,29(11): 465—468. (in Chinese)
- [21]MAEDA K, MIZUKOSHI F, HAMANO M, et al. Development of an equine heipesvirus type 4-specific enzyme-linked immunosorbent assay using a B-cell epitope as an antigen[J]. **J Clin Microbiol**, 2004, 42(3): 1095—1098.
- [22]张海霞,唐焕文,张立震,等. 蛋白质二级结构预测方法的评价[J]. 计算机与应用化学, 2003, 20(6): 735—740.
ZHANG Hai-xia, TANG Huan-wen, ZHANG Li-zhen, et al. Evaluation on prediction methods of protein secondary structure[J]. **Comp Appli Chem**, 2003, 20(6): 735—740. (in Chinese)