

日本沼虾原肌球蛋白线性表位预测研究

华希玮^{1,2}, 谢彦海^{1,3}, 陈红兵^{1,4,*}

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室,江西南昌 330047;

2.南昌大学食品学院,江西南昌 330047;

3.南昌大学实验动物科学中心,江西南昌 330006;

4.南昌大学中德联合研究院,江西南昌 330047)

摘要:本文旨在预测日本沼虾原肌球蛋白的线性表位,为相关食物过敏的识别与检测提供依据,同时为基于抗原表位的致敏性消减提供靶标。采用 DNASTar 软件、SOPMA、BepiPred 1.0 Server 及 ABCpred 在线网站预测日本沼虾原肌球蛋白的 B 细胞线性表位,应用 SYFPEITHI、NetMHCII 2.3 Server 与 NetMHCIIpan 3.2 Server 预测 T 细胞表位。综合分析以上预测结果,表明日本沼虾原肌球蛋白可能的 B 细胞线性表位有²¹RADTLEQQNKEANN³⁴、³⁷EKTEEEIRTQKKMQQ⁵²、⁷¹LEEKEKA⁷⁷、⁹⁹LERSEERLN¹⁰⁷、¹¹⁹AADER¹²⁵、¹³⁴SLSDEER¹⁴⁰、¹⁵⁸ADRKYDE¹⁶⁴、¹⁷⁷ERAEERAETG¹⁸⁶、²¹⁰SEKANQREEAYKE²²³、²⁶²NEKEKYK²⁶⁸,可能的 T 细胞表位有⁸²EGEVAALNRRRIQLL⁹⁵、¹⁰⁵RLNTATTKLAEAS¹¹⁷、¹⁶⁵VARKLAMVEADLE¹⁷⁷、¹⁹⁵EELRVVGNLKSLE²⁰⁸、²²²KEQIKTLTNKLA²³⁵。该结果可为继续深入开展日本沼虾过敏原基础性研究提供更精准的靶标。

关键词:日本沼虾,原肌球蛋白,B 细胞表位,T 细胞表位,预测

Prediction of Linear Epitope of Tropomyosin in *Macrobrachium nipponense*

HUA Xi-wei^{1,2}, XIE Yan-hai^{1,3}, CHEN Hong-bing^{1,4,*}

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2.College of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3.Science Center of Laboratory Animal, Nanchang University, Nanchang 330006, China;

4.Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The linear epitopes of tropomyosin in *M.nipponense* were predicted, which provided the basis for the identification and detection of related food allergies and the targets for the reduction of allergenicity based on the epitope. In this study, the B-cell linearepitopes of tropomyosin in *M.nipponense* were predicted by DNASTar and online network servers including SOPMA, BepiPred 1.0 Server and ABCpred. The T-cell epitopes were predicted by SYFPEITHI, NetMHCII 2.3 Server and NetMHCIIpan 3.2 Server. Based on the above comprehensive analysis, the probable B-cell linear epitopes might contain ²¹RADTLEQQNKEANN³⁴, ³⁷EKTEEEIRTQKKMQQ⁵², ⁷¹LEEKEKA⁷⁷, ⁹⁹LERSEERLN¹⁰⁷, ¹¹⁹AADER¹²⁵, ¹³⁴SLSDEER¹⁴⁰, ¹⁵⁸ADRKYDE¹⁶⁴, ¹⁷⁷ERAEERAETG¹⁸⁶, ²¹⁰SEKANQREEAYKE²²³, ²⁶²NEKEKYK²⁶⁸ and the possible T-cell epitopes were ⁸²EGEVAALNRRRIQLL⁹⁵, ¹⁰⁵RLNTATTKLAEAS¹¹⁷, ¹⁶⁵VARKLAMVEADLE¹⁷⁷, ¹⁹⁵EELRVVGNLKSLE²⁰⁸, ²²²KEQIKTLTNKLA²³⁵. This research can provide a more accurate target for further study on *M.nipponense* allergen.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; tropomyosin; B-cell epitope; T-cell epitope; prediction

中图分类号: TS251.95

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)17-0084-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.014

引文格式: 华希玮, 谢彦海, 陈红兵. 日本沼虾原肌球蛋白线性表位预测研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(17): 84-90, 97.

水产种类繁多,因其营养价值高而在全球被广泛食用,但其体内的过敏原蛋白能够引起严重的过

敏反应。水产品过敏中由甲壳类引起的过敏最为普遍^[1]。而虾类由于营养丰富、口感极佳,深受喜爱,故

收稿日期: 2019-11-27

作者简介: 华希玮(1994-),女,硕士研究生,研究方向:营养与食品卫生,E-mail:huaxw1319@163.com。

* 通讯作者: 陈红兵(1967-),男,博士,教授,研究方向:食品营养与安全,E-mail:chenhongbing@neu.edu.cn。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2013AA102205);南昌大学食品科学与技术国家重点实验室开放基金课题(SKLF-KF-201806);江西省博士后基金项目(2016KY23)。

在甲壳类过敏中也有显著贡献^[2]。常见的虾类过敏症状有荨麻疹、血管性水肿,也会影响到胃肠道及呼吸系统,严重者甚至发生过敏性休克^[3]。源自甲壳类的过敏原有多种,有原肌球蛋白(Tropomyosin)、精氨酸激酶(Arginine kinase)、肌球蛋白轻链(Myosin light chain)和肌钙蛋白(Troponin)等,其中原肌球蛋白是主要的过敏原,通常能引起甲壳类动物之间以及甲壳类与其他无脊椎动物之间的交叉反应^[4]。日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*),又称河虾,广泛分布于中国等亚洲国家淡水低盐度河口地区,它被认为是中国重要的渔业资源^[5]。然而,目前国内外鲜有对日本沼虾原肌球蛋白抗原表位的分析研究。

抗原表位是致敏蛋白中决定抗原特异性的特殊化学基团,是过敏原与抗体结合的物质基础。表位可根据结构分为线性表位和构象表位;也可根据其结合受体细胞分为T细胞表位与B细胞表位^[6]。B细胞表位可以是线性表位或构象表位,而T细胞表位一般为线性表位。在加工过程中蛋白质的结构变化,会导致抗原表位被破坏或者被掩盖,从而致敏性降低。一些加工方法例如酶解、超高压等会使部分食物致敏性降低甚至消失^[7]。因此,针对过敏原表位的研究对于过敏原消减技术以及开发低致敏食品尤为重要。

研究表位的方法有多种,许多传统的表位鉴定方法经费成本较高,时间也较长。生物信息学的兴起拓展了对食物过敏原的研究方法,通过计算机技术与生物学数据库的结合,对过敏原蛋白的表位、同源性、过敏原之间的交叉反应性以及过敏原刺激机体产生免疫应答的能力进行预测^[8]。

原肌球蛋白的空间结构较简单,多数研究认为在原肌球蛋白引起的免疫反应中起主导作用的是线性表位^[9],对其抗原表位的报道也多为线性表位。因此,本研究利用生物信息学技术对日本沼虾原肌球蛋白进行分析并预测其抗原表位,以期为基于过敏原表位靶点的检测提供依据,为针对抗原表位的过敏原性消减提供新靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

通过NCBI蛋白数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>)检索日本沼虾原肌球蛋白的氨基酸序列(登录号为AHJ10946.1)。

1.2 实验方法

1.2.1 日本沼虾B细胞线性表位的预测 利用SOPMA^[10](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对日本沼虾原肌球蛋白的二级结构进行预测。利用DNASar软件中Protean模块,导入氨基酸序列,分别采用Chou-Fasman^[11]法及Garnier-Robson法分析日本沼虾原肌球蛋白的二级结构,Karplus-Schulz^[12]法分析柔韧性(Flexibility),Kyte-Doolittle^[13]法分析亲水性(Hydrophilicity),Emini^[14]法分析表面可及性(Surface probability)、Jameson-Wolf^[15]法分析抗原性指数(Antigenic index),从蛋白质多方面性质综合分析

预测表位。分别在BepiPred 1.0 Server^[16](<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-1.0/>)和ABCpred^[17](http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html)两个网站中输入蛋白序列来预测B细胞表位。综合分析不同方法的预测结果筛选出可能的B细胞线性表位。

1.2.2 日本沼虾T细胞表位的预测 在SYFPEITHI^[18](<http://www.syfpeithi.de/>)网站的表位预测界面选择合适的MHC类型及肽段长度,输入氨基酸序列提交后根据得分预测T细胞表位。应用NetMHCII 2.3 Server^[19](<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>)与NetMHCIIpan 3.2 Server^[20](<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>)两个服务器,输入氨基酸序列并选择相应基因型及氨基酸长度,预测蛋白质与MHC-II类分子的结合能力,从而预测出T细胞表位。综合分析几个服务器的预测结果筛选出可能的T细胞表位。

1.2.3 日本沼虾与其它种类原肌球蛋白序列比对 通过NCBI蛋白数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>)检索8种水产类原肌球蛋白的氨基酸序列,并利用ClustalX软件对这些不同种间的序列进行比对。褐美对虾(*Penaeus aztecus*),登录号为AAZ76743.1;中国对虾(*Penaeus chinensis*),登录号为ADA70137.1;斑节对虾(*Penaeus monodon*),登录号为AAX37288.1;南美白对虾(*Penaeus vannamei*),登录号为ACB38288.1;刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*),登录号为AAA60330.1;锯缘青蟹(*Scylla serrata*),登录号为ABS12233.1;章鱼(*Octopus vulgaris*),登录号为BAE54433.1;太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*),登录号为BAH10152.1。

2 结果与分析

2.1 日本沼虾原肌球蛋白B细胞线性表位预测

2.1.1 二级结构的预测结果 从SOPMA对日本沼虾原肌球蛋白的二级结构预测中发现,该蛋白质以 α -螺旋(Alpha helix)结构为主,伴随少许无规则卷曲(Random coil)结构(图1A)。通过DNASar软件中Protean模块中的两种方法对蛋白质的二级结构预测(图1B),发现Garnier-Robson法得到的结果与前者几乎一致,而Chou-Fasman法结果表明还存在一小部分 β -转角(Beta turn)结构。有研究表明原肌球蛋白是两个 α -螺旋多肽链相互缠绕形成的超螺旋结构^[21]。由此可见,预测得到的二级结构与文献报道基本一致。在蛋白质二级结构中, α -螺旋一般位于蛋白质内部,不易与抗体结合, β -转角与无规则卷曲多位于蛋白质表面,更容易与抗体结合,有较大可能成为表位^[22]。因此,不能通过日本沼虾原肌球蛋白的二级结构准确地预测出表位,而需要结合亲水性、抗原指数等其他性质综合分析。

2.1.2 基于Protean的预测结果 应用DNASar的Protean预测蛋白质结果如图2所示,图2中显示了蛋白质的亲水性、柔韧性、抗原指数和表面可及性。从图2中可以发现该蛋白质亲水性非常高,几乎整个蛋白质的亲水指数 >0 ,蛋白质的亲水基团多位于

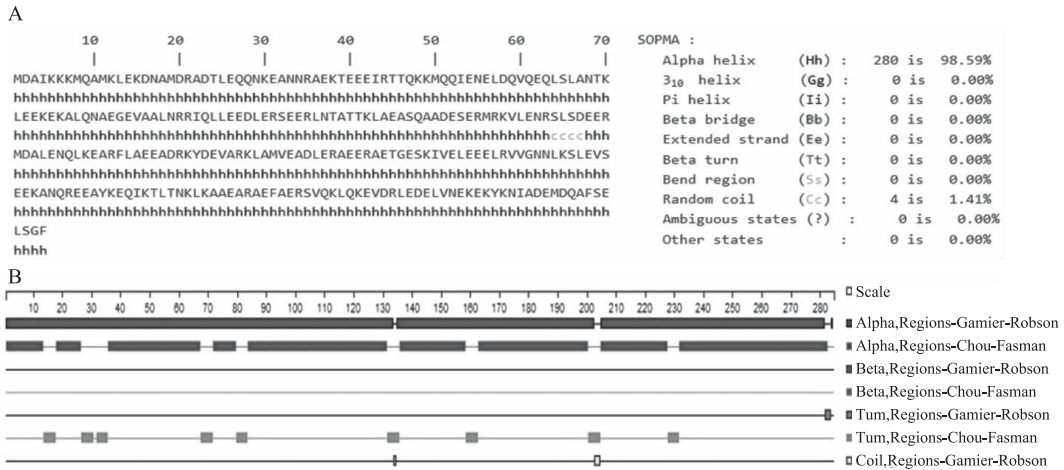


图1 通过 SOPMA 与 Protean 预测的日本沼虾原肌球蛋白的二级结构

Fig.1 The secondary structure of tropomyosin in *M.nipponense* predicted by SOPMA and Protean

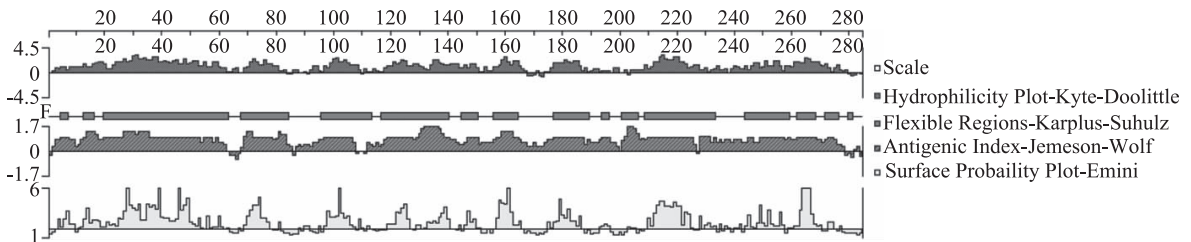


图2 通过 Protean 预测的日本沼虾原肌球蛋白的结果

Fig.2 The results of tropomyosin in *M.nipponense* predicted by Protean

蛋白质表面,更容易形成与抗体等结合的抗原表位;柔韧性分析结果显示该蛋白质柔韧性区域较多且范围较大,由于具有柔韧性的区域发生改变的几率较高,容易与抗体契合,形成表位的可能性较大;从抗原指数结果而言,该蛋白质大部分区域抗原指数 > 0,抗原指数较高更容易形成表位;对表面可及性进行分析,以表面可及性指数 > 1 作为选择标准,这些区域呈现于蛋白质表面,具有与抗体结合的可能性,更易形成表位^[23]。综合考虑,预测出的日本沼虾原肌球蛋白 B 细胞线性表位如表 1 所示。

2.1.3 基于 BepiPred 的预测结果 BepiPred 1.0 server 采用了隐马尔可夫模型和倾向标度法,结合氨基酸性质进行表位预测,表位分配的分数阈值设置为默认值(0.35),得分高于 0.35 则被认为是可能的 B 细胞线性表位^[22,24]。BepiPred 预测日本沼虾原肌球蛋白中所有得分高于 0.35 的区域序列如表 2,可以发现预测区域平均分布在整个蛋白序列上。

2.1.4 基于 ABCpred 的预测结果 ABCpred 基于标准前馈与递归神经网络开发^[24]。运用 700 个 B 细胞表位和 700 个最大长度为 20 的非 B 细胞表位的随机肽的数据库,在不同的输入窗口长度和隐藏单元下对网络进行了训练和测试,经交叉验证,结果显示递归神经网络及窗口长度为 16 时准确度达到 65.93%^[17]。选择 16 个氨基酸的长度以及阈值 0.7 作为标准来筛选表位。预测的 B 细胞表位根据训练后的递归神经网络得到的分数进行排序,肽得分越高,作为表位的概率越高。所有得分高于阈值的肽排列如表 3。

表 1 通过 Protean 预测的日本沼虾原肌球蛋白表位

Table 1 The epitopes of tropomyosin in *M.nipponense* predicted by Protean

序号	表位序列	氨基酸位点
1	KKK	5~7
2	LEKD	13~16
3	RADTLEQQNKEANNRAE KTEEEIRTTQKKMQQI	21~53
4	TKLEEKEKA	69~77
5	EDLERSEERLN	97~107
6	AADESERM	119~126
7	RSLSDDEER	133~140
8	NQLK	146~149
9	EADRKYDE	157~164
10	ERAERAETG	177~186
11	EEE	194~196
12	SEKANQREEAYKEQ	210~224
13	NKLL	230~233
14	RSVQKLQKEVDRL	244~257
15	NEKEYK	262~268

2.1.5 综合分析 B 细胞线性表位 B 细胞线性表位预测通常是依据氨基酸序列信息,分析二级结构、亲水性、柔韧性、表面可及性、序列保守性、残基失序等,利用机器学习方法对 Bcipep、AntiJen 等数据集进行训练,将蛋白质的氨基酸序列输入模型中进行鉴定^[24-25]。综合 Protean、BepiPred 以及 ABCpred 的预测结果,将重复区域作为潜在抗原表位,得到了共有

表2 通过 BepiPred 预测的日本沼虾原肌球蛋白表位
Table 2 The epitopes of tropomyosin in *M.nipponense* predicted by BepiPred

序号	表位序列	氨基酸位点
1	DNAMDRADTLEQQNKEANN RAEKTEEEIIRTQKKMQQ	16~52
2	NELDQ	55~59
3	LEEKEKALQNAEGEV	71~85
4	LERSEERLNT	99~108
5	TKLAEASQAADSESR	111~125
6	SLSDEERMDA	134~143
7	ADRYDE	158~164
8	LERAEERAETGES	176~188
9	VSEKANQREEAYKE	209~223
10	KA	233~234
11	EARAEF	236~241
12	DR	254~255
13	VNEKEYKNIAD E	261~273
14	DQ	275~276

表3 通过 ABCpred 预测的日本沼虾原肌球蛋白表位
Table 3 The epitopes of tropomyosin in *M.nipponense* predicted by ABCpred

排名	表位序列	氨基酸 起始位点	得分
1	DELVNEKEYKNIAD E	258	0.92
2	NRSLSDEERMDAL ENQ	132	0.88
3	NQREEAYKEQIKTL TN	215	0.87
3	MDRADTLEQQNKEANN	19	0.87
4	YKEQIKTLTNKLKAAE	221	0.86
4	SQAADSESRMRKVLEN	117	0.86
4	AMKLEKDNAMDRADTL	10	0.86
5	QLLEEDLERSEERLNT	93	0.85
6	EKTEEEIIRTQKKMQQ	37	0.83
7	FLAEEADRYDEVARK	153	0.82
8	LAMVEADLERAEERAE	169	0.80
9	KKMQQIENELDQVQEQ	48	0.78
10	LSLANTKLEEKEKALQ	64	0.76
10	LKAAEARAEFAERSVQ	232	0.76
10	VSEKANQREEAYKEQ	209	0.76
10	AEERAETGESKIVELE	179	0.76
11	KLQKEVDRLEDELVNE	248	0.75
12	VELEELRVVGNLKS	191	0.72
13	EGEVAALNRRIQLEE	82	0.70

的 10 个潜在 B 细胞线性抗原表位, 分别是²¹RADTLEQQNKEANN³⁴、³⁷EKTEEEIIRTQKKMQQ⁵²、⁷¹LEEKEKA⁷⁷、⁹⁹LERSEERLN¹⁰⁷、¹¹⁹AADESER¹²⁵、¹³⁴SLSDEER¹⁴⁰、¹⁵⁸ADRYDE¹⁶⁴、¹⁷⁷ERAEERAETG¹⁸⁶、²¹⁰SEKANQREEAYKE²²³、²⁶²NEKEYK²⁶⁸。此前已有一些研究利用生物信息学预测得到相应的 B 细胞线性表位并进行了验证。李雪娇等^[26]利用生物信息学软件 DNASTar 中的 Protean 预测出 4 个 CM16 的 B 细胞线性表位, 与来自 CM16 的 3 条抗消化肽段的序列

进行比对分析后, 发现与其中 2 条肽段存在部分重合。Fu 等^[27]利用多种免疫信息学工具综合预测得到中国对虾原肌球蛋白与精氨酸激酶的线性表位后用 Fmoc 法固相合成多肽, 经间接竞争 ELISA 验证, 准确率分别高达 83% 与 70%。由此可见, 利用生物信息学预测 B 细胞线性表位具有一定的可行性与可靠性。不过, 这些方法也存在一定的局限性。表位预测工具使用的数据集不够完善导致预测结果不够精准, 不同工具使用的算法与模型也不尽相同, 致使预测结果存在一定差异, 因此均不能得出标准的预测结果^[24]。虽然综合分析不同方法的预测结果可以提高预测的准确率, 但还是需要实验进一步验证。目前较为常见的方法是将预测的表位合成多肽后与过敏患者血清采用 Dot-blot 等方法进行初步鉴定^[27-28]。

2.2 日本沼虾原肌球蛋白 T 细胞表位的预测

2.2.1 基于 SYFPEITHI 的预测结果

SYFPEITHI 为定性分析, 它采用结合基序的方法对多肽与 MHC-II 类分子的结合能力进行评分, 用于筛选可能的 T 细胞表位^[29]。在页面选择 HLA-DRB1 基因型以及 15mers 的氨基酸残基长度, 输入序列后可以得到预测结果。若肽段得分超过 25 分, 则认为其与 MHC-II 类分子结合力较强, 是潜在 T 细胞表位^[30]。预测结果如表 4 所示。该蛋白对表中几种基因型都表现出较强的结合力, 其中 HLA-DRB1 * 0401 基因型预测发现较多的表位, 因此该基因型人群对该蛋白序列表现出更高的敏感性。

2.2.2 基于 NetMHCII 与 NetMHCIIpan 的预测结果

NetMHCII 和 NetMHCIIpan 已被证明是预测多肽与 MHC-II 类分子结合亲和力的准确率较高的方法^[31]。这两种方法都是基于来自 IEDB 的数据及人工神经网络, 使用 NNAlign 框架进行训练的^[32-33]。它们的主要区别之一是, NetMHCII 是每个 MHC 分子的独立网络的集合, 而 NetMHCIIpan 则包含一个单一的通用网络, 可以预测已知蛋白质序列的所有 MHC 分子的肽结合亲和力^[32]。研究者开发的 NetMHCIIpan-3.2 与 NetMHC II-2.3 服务器, 则将 NetMHCII 和 NetMHCIIpan 预测范围扩大并可以显著地提高预测准确性。MHC-II 类分子能结合长度达 10~28 个氨基酸残基的表位, 最佳长度为 12~16 个氨基酸残基^[34]。因此, 应用这两个服务器, 选择中国人群中常见的 HLA 等位基因^[35-36]以及 15 的肽段长度进行 T 细胞表位预测。Affinity (nM) < 50 即该肽段与 MHC-II 类分子结合呈强亲和力, 50 < Affinity (nM) < 500 为弱亲和力^[37]。结合亲和力值与该肽段在 1000000 个随机自然肽中的排名筛选出 T 细胞表位。预测结果如表 5 所示。从表 5 中发现 NetMHCII 服务器预测的表位更多, 并且与 NetMHCIIpan 结果均有重复。同时, 可以发现表位主要分布在 80 位氨基酸之后的区域中, 并且分布较均匀。

2.2.3 综合分析 T 细胞表位

外源性蛋白质抗原一般经抗原递呈细胞处理后由 MHC-II 类分子递呈给 T 细胞^[38]。因此, 预测蛋白质的 T 细胞表位可通过

表4 通过 SYFPEITHI 预测的日本沼虾原肌球蛋白表位
Table 4 The epitopes of tropomyosin in *M.nipponense* predicted by SYFPEITHI

等位基因	表位序列	氨基酸位点	得分	
HLA-DRB1 * 0101	KTLTNKLKAAEARAE	226	27	
	DAIKKKMQAMKLEKD	2	26	
	SERMRKVLENRSLSD	123	26	
HLA-DRB1 * 0301	IQLLEEDLERSEERL	92	28	
	LAMVEADLERAEERA	169	28	
HLA-DRB1 * 0401	DRKYDEVARKLAMVE	159	28	
	DNAMDRADTLEQQNK	16	26	
	EGEVAALNRRIQLE	82	26	
	EERLNTATTKLAEAS	103	26	
	NRSLSDDEERMDALEN	132	26	
	EERMDALENQLKEAR	138	26	
	EEELRVVGNNLKSLE	194	26	
	KEQIKTLTNKLKAAE	222	26	
	HLA-DRB1 * 0701	EERLNTATTKLAEAS	103	26
	HLA-DRB1 * 1101	DRKYDEVARKLAMVE	159	31

表5 通过 NetMHCII 与 NetMHCIIpan 预测的日本沼虾原肌球蛋白表位
Table 5 The epitopes of tropomyosin in *M.nipponense* predicted by NetMHCII and NetMHCIIpan

预测方法	序号	氨基酸位点	表位序列	核心序列
NetMHCII	1	3	AIKKKMAMKLEKDN	IKKKMQAMK
	2	81	AEGEVAALNRRIQLL	EVAALNRRI
	3	83	GEVAALNRRIQLLEE	VAALNRRIQ
	4	104	ERLNTATTKLAEASQ	TATTKLAEAE
	5	106	LNTATTKLAEASQAA	TATTKLAEAE
	6	109	ATTKLAEASQAADDES	AEASQAADDE
	7	148	LKEARFLAEADRKY	EARFLAEAE
	8	163	DEVARKLAMVEADLE	LAMVEADLE
	9	183	AETGESKIVELEEEEL	SKIVELEEE
	10	185	TGESKIVELEEEELRV	SKIVELEEE
	11	193	LEELRVVGNNLKSLE	VVGNNLKSLE
	12	194	EEELRVVGNNLKSLE	LRVVGNNLK
	13	196	ELRVVGNNLKSLEVS	ELRVVGNNL
	14	218	EEAYKEQIKTLTNKL	QIKTLTNKL
	15	219	EAYKEQIKTLTNKLK	YKEQIKTLT
	16	221	YKEQIKTLTNKLKAA	IKTLTNKLK
	17	223	EQIKTLTNKLKAAEA	IKTLTNKLK
	18	225	IKTLTNKLKAAEARA	TNKLKAAEA
	19	229	TNKLKAAEARAEFAE	LKAAEARAE
NetMHCIIpan	1	81	AEGEVAALNRRIQLL	VAALNRRIQ
	2	105	RLNTATTKLAEASQA	TATTKLAEAE
	3	106	LNTATTKLAEASQAA	TKLAEASQA
	4	165	VARKLAMVEADLEREA	LAMVEADLE
	5	195	EELRVVGNNLKSLE	VVGNNLKSLE
	6	221	YKEQIKTLTNKLKAA	IKTLTNKLK

评估 MHC-II 类分子与多肽的结合能力来实现。在人体中负责编码相关分子的 HLA-II 类基因主要包括 DP、DQ、DR 三个亚区^[39]。因 HLA 基因组高度多态性,故选择中国人群中常见的 HLA 等位基因型进行预测。综合 SYFPEITHI、NetMHCII 和 NetMHCIIpan 的预测结果,选取重复区域作为潜在

表位,得到了共有的 5 个潜在 T 细胞抗原表位,分别是 ⁸²EGEVAALNRRIQLL⁹⁵、¹⁰⁵RLNTATTKLAEAS¹¹⁷、¹⁶⁵VARKLAMVEADLE¹⁷⁷、¹⁹⁵EELRVVGNNLKSLE²⁰⁸、²²²KEQIKTLTNKLKAA²³⁵。T 细胞表位预测在基础研究中可以减少工作量,降低成本,同时,一些准确性较高的预测工具的预测结果也能得到验证。伍慧妍

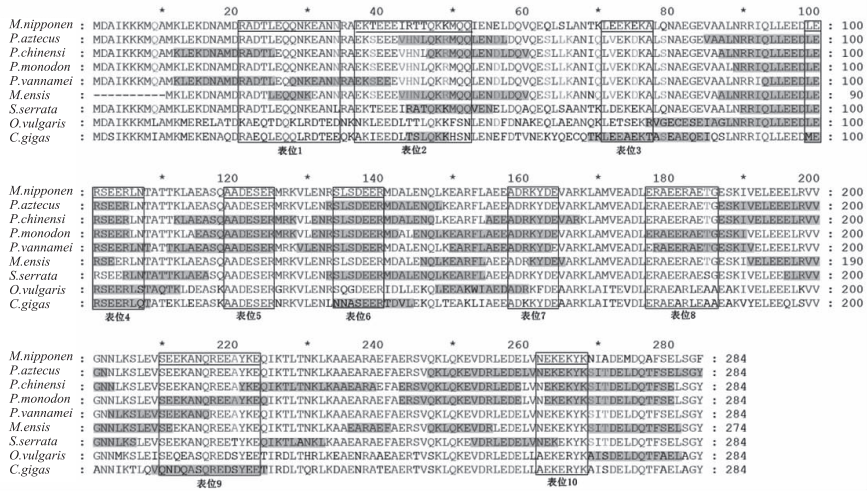


图3 不同物种间原肌球蛋白序列比对及 B 细胞表位对比
Fig.3 The comparison of sequences and B-cell epitopes between different species

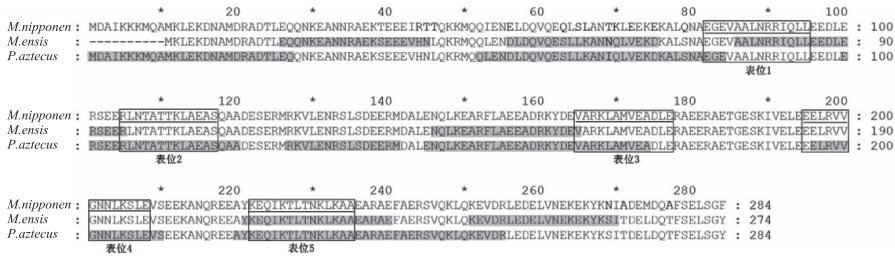


图4 不同物种间原肌球蛋白序列比对及 T 细胞表位对比
Fig.4 The comparison of sequences and T-cell epitopes between different species

等^[30]利用 NetMHCII 预测得到牡蛎原肌球蛋白的 T 细胞表位,发现与前人经实验鉴定的表位几乎一致。在目前的 T 细胞表位预测工具中,预测多肽与 MHC-II 类分子的结合位点和结合亲和力是预测与 MHC-II 类分子结合的表位的主要方法。然而大多数方法仅考虑表位的核心结合序列,而忽略了两侧氨基酸残基及 TCR 对结合力的影响^[29]。因此,表位预测结果可以通过合成多肽后进行淋巴细胞增殖实验、免疫保护实验等来进一步验证^[38]。

2.3 日本沼虾与不同种间原肌球蛋白序列比对

2.3.1 日本沼虾原肌球蛋白 B 细胞表位对比 日本沼虾与不同物种序列比对结果如图 3。从图 3 中可以发现这几种原肌球蛋白序列相似度很高,虾蟹类之间序列相似度均高于 80%,而虾蟹类与软体动物之间相似度为 60%~80%,由此可见,原肌球蛋白具有较高的保守性。一些学者已经鉴定出几种水产原肌球蛋白的表位^[27-28,40-45]。这些表位多位于保守区内,且不同种间表位有部分或完全重叠。此次预测的日本沼虾原肌球蛋白 B 细胞表位也基本位于保守区内,且与已鉴定的表位均有重叠,其中预测的表位 4 与表位 6 重叠部分最多,因此该区域更有可能发生交叉反应。

2.3.2 日本沼虾原肌球蛋白 T 细胞表位对比 原肌球蛋白相关的 T 细胞表位研究不多,然而 T 细胞在免疫过程中也起着重要作用。Wai 等^[46]合成 18 个重叠肽,利用肽段刺激致敏小鼠中分离出的脾细胞,通过其增殖与细胞因子的反应鉴定 T 细胞表位。

Ravkov 等^[47]综合体外的 MHC-肽结合实验及体内的增殖及细胞因子释放实验鉴定了 17 个 T 细胞表位。此次预测的日本沼虾原肌球蛋白 T 细胞表位与已鉴定的表位均有重叠,其中表位 5 与鉴定表位完全一致,其他 4 个表位也均位于保守区。

3 结论

本研究在 NCBI 蛋白数据库中找到日本沼虾原肌球蛋白的氨基酸序列,运用 DNASTar、BepiPred 和 ABCpred 对日本沼虾原肌球蛋白进行 B 细胞线性表位预测,最终定位出潜在的 B 细胞线性表位有 10 个肽段。同时,应用 SYFPEITHI、NetMHCII 和 NetMHCIIpan 分别对序列与 MHC-II 类分子结合力评估,最终筛选出可能的 T 细胞表位有 5 个肽段。预测的表位与已鉴定的表位均有部分重叠,这可能一定程度上会导致交叉反应。总之,本研究利用生物信息学技术预测出了日本沼虾原肌球蛋白的 B 细胞线性表位及 T 细胞表位,将有助于对日本沼虾过敏原的认识,为未来基于表位的相关研究提供了新的研究靶标。另外,日本沼虾原肌球蛋白的准确的表位以及优势表位还有待实验进一步确证。

参考文献

[1] Khora S S. Seafood - associated shellfish allergy: A comprehensive review [J]. Immunol Invest, 2016, 45 (6): 504-530.
[2] Ruethers T, Taki A C, Johnston E B, et al. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens [J]. Mol

- Immunol, 2018, 100:28-57.
- [3] 韩建勋, 陈颖, 葛毅强. 虾类主要过敏原及其消减技术研究进展[J]. 中国食品学报, 2016, 16(7):201-208.
- [4] Faber M A, Pascal M, El Kharbouchi O, et al. Shellfish allergens: Tropomyosin and beyond [J]. Allergy, 2017, 72(6):842-848.
- [5] Jin S B, Jiang S F, Xiong Y W, et al. Molecular cloning of two tropomyosin family genes and expression analysis during development in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* [J]. Gene, 2014, 546(2):390-397.
- [6] 孙娟, 王愉涵, 刘艳, 等. 抗原表位鉴定方法的研究进展[J]. 国外医学(医学地理分册), 2017, 38(3):291-295.
- [7] 费丹霞, 徐赞美, 肖宇, 等. 水产品过敏原消减技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(8):1764-1768.
- [8] 杜智华, 刘志刚. 生物信息学在变态反应学中的应用[J]. 热带医学杂志, 2006(4):470-472, 476.
- [9] Ayuso R, Sanchez - Garcia S, Pascal M, et al. Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? [J]. Clin Exp Allergy, 2012, 42(2):293-304.
- [10] Geourjon C, Deleage G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. Comput Appl Biosci, 1995, 11(6):681-684.
- [11] Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence [J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1978, 47(6):145-148.
- [12] Karplus P A, Schulz G E. Prediction of chain flexibility in proteins - a tool for the selection of peptide antigens [J]. Naturwissenschaften, 1985, 72(4):212-213.
- [13] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. J Mol Biol, 1982, 157(1):105-132.
- [14] 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.
- [15] Jameson B A, Wolf H. The Antigenic index - a novel algorithm for predicting antigenic determinants [J]. Comput Appl Biosci, 1988, 4(1):181-186.
- [16] Larsen J E, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B - cell epitopes [J]. Immunome Res, 2006, 2(2):2.
- [17] Saha S, Raghava G P S. Prediction of continuous B - cell epitopes in an antigen using recurrent neural network [J]. Proteins, 2006, 65(1):40-48.
- [18] Rammensee H G, Bachmann J, Emmerich N P N, et al. SYFPEITHI: Database for MHC ligands and peptide motifs [J]. Immunogenetics, 1999, 50(3-4):213-219.
- [19] Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10(1):296.
- [20] Andreatta M, Karosiene E, Rasmussen M, et al. Accurate pan-specific prediction of peptide - MHC class II binding affinity with improved binding core identification [J]. Immunogenetics, 2015, 67(11-12):641-650.
- [21] Reese G, Ayuso R, Lehrer S B. Tropomyosin: An invertebrate pan-allergen [J]. Int Arch Allergy Imm, 1999, 119(4):247-258.
- [22] 闰慧丽. 大豆主要过敏原 Gly m Bd 28 K IgG 结合表位的定位研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2016.
- [23] 王金宝. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 原肌球蛋白抗原表位和关键氨基酸的筛选及糖基化对其过敏原性的影响 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.
- [24] 羊红光, 张立佳, 成彬. B 细胞表位预测研究进展 [J]. 河北省科学院学报, 2019, 36(3):21-27.
- [25] Potocnakova L, Bhide M, Pulzova L B. An introduction to B-cell epitope mapping and in silico epitope prediction [J]. J Immunol Res, 2016, 2016:1-11.
- [26] 李雪娇, 李欣芮, 范卓妍, 等. 小麦主要过敏原 CM16 线性 B 细胞表位的预测及初步鉴定 [J]. 食品科学, 2019, 40(24):136-141.
- [27] Fu L L, Wang J B, Ni S Q, et al. Identification of allergenic epitopes and critical amino acids of major allergens in chinese shrimp (*Penaeus chinensis*) by immunoinformatics coupled with competitive-binding strategy [J]. J Agr Food Chem, 2018, 66(11):2944-2953.
- [28] Zheng L N, Lin H, Pawar R, et al. Mapping IgE binding epitopes of major shrimp (*Penaeus monodon*) allergen with immunoinformatics tools [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(11):2954-2960.
- [29] 李皖豫, 余崴, 李金钱, 等. CD4 + T 细胞表位预测方法的研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(2):167-173.
- [30] 伍慧妍, 何颖, 许晨霞, 等. 牡蛎过敏原 Crag1 的二级结构及其 B 细胞和 T 细胞表位分析 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(19):12-15, 19.
- [31] Jensen K K, Andreatta M, Marcatili P, et al. Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules [J]. Immunology, 2018, 154(3):394-406.
- [32] Nielsen M, Andreatta M. NNAlign: A platform to construct and evaluate artificial neural network models of receptor-ligand interactions [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45 (Web Server issue):W344-W349.
- [33] Vita R, Overton J A, Greenbaum J A, et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0 [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(D1):D405-D412.
- [34] Vita R, Overton J A, Seymour E, et al. An ontology for major histocompatibility restriction [J]. J Biomed Semant, 2016, 7(1):1.
- [35] 中国常见及确认的 HLA 等位基因表 (CWD) [C]. 中华骨髓库年会, 2013.
- [36] He Y, Li J, Mao W, et al. HLA common and well - documented alleles in China [J]. Hla, 2018, 92(4):199-205.
- [37] 郭晓晓, 李文, 王永飞, 等. 大豆过敏原 Gly m 4 蛋白抗原表位特征预测 [J]. 大豆科学, 2017, 36(3):365-370.
- [38] 周涛, 贾怀杰, 何小兵, 等. CD4 + T 细胞表位分析鉴定技术研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2013, 29(6):531-534.
- [39] 杜娟, 姚新生, 于红松. HLA 基因与常见自身免疫病相关性研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(1):118-122, 128.
- [40] 周瑾茹. 水产品主要过敏原毛细管电泳检测方法的建立及抗原表位的研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017.
- [41] Ayuso R, Lehrer S B, Reese G. Identification of continuous,

(下转第97页)

- [6]孙帅楠.甘蔗汁饮料混菌发酵工艺的研究[D].南宁:广西大学,2017.
- [7]邹春悦.酵母菌在食品中的作用研究进展[J].当代化工研究,2018(3):96-97.
- [8] Yuyun Lu, Satya Dwi Putra, Shao-Quan Liu, et al. A novel non-dairy beverage from durian pulp fermented with selected probiotics and yeast [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 265: 1-8.
- [9] Li Liang, Guimei Liu, Guoyong Yu, et al. Simultaneous decoloration and purification of crude oligosaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch) by macroporous adsorbent resin [J]. Food Chemistry, 2019, 138: 744-752.
- [10] Hee-Yun Kim, Sun-Young Nam, Shi-Young Yang, et al. *Cucurbita moschata* Duch. and its active component, β -carotene effectively promote the immune responses through the activation of splenocytes and macrophages [J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2016, 38(5): 319-326.
- [11] Mi Young Kim, Eun Jin Kim, Young-Nam Kim, et al. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts [J]. Nutrition Research and Practice, 2012, 6(1): 21-27.
- [12] M Makni, H Fetoui, N K Gargouri, et al. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in ω -3 and ω -6 fatty acids in hypercholesterolemic rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 46: 3714-3720.
- [13]熊玲,陈京晓,牟明远,等.南瓜的营养保健价值分析及产品的开发现状[J].食品工业科技,2013,34(23):395-400.
- [14]金晖.南瓜多糖的功能性质及其降糖作用机制研究[D].杭州:中国计量学院,2013.
- [15]马欣,古绍彬,吴影.凝结芽孢杆菌复合干酪乳杆菌发酵南瓜饮料的研制[J].食品与发酵工业,2018,44(7):161-167.
- [16]梁莉,程晨,张柳茵.乳酸菌和酵母菌复合发酵南瓜汁工艺研究[J].食品研究与开发,2016,37(13):88-92.
- [17]殷辉,周建波,吕红,等.藜麦尾孢叶斑病的病原鉴定[J].植物病理学报,2019,49(3):408-414.
- [18]云月英,徐娟,张小利.4株乳酸菌对模拟胃肠环境的耐受性及生长特性研究[J].中国酿造,2018,37(3):53-57.
- [19]程晨.发酵果蔬低醇饮料专用酵母菌的选育及其发酵技术研究[D].南昌:南昌大学,2014.
- [20]赵小燕,高鹏飞,姚国强,等.酿酒酵母益生特性分析及其与植物乳杆菌 IMAU10120 共生菌株筛选[J].乳业科学与技术,2014,37(2):1-5.
- [21]吕源玲.耐酸耐胆盐益生乳酸菌的筛选与鉴定[J].食品与机械,2017,33(6):42-45.
- [22]李利,孔丽,张宁,等.耐酸耐胆盐乳酸菌的鉴定及筛选[J].食品科学,2015,36(21):123-128.
- [23] Belén Pero mingo, María J. Andrade, Josué Delgado, et al. Biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* by native *Debaryomyces hansenii* in dry-cured meat products [J]. Food Microbiology, 2019, 82: 269-276.
- [24] E.A. Helmy, S.A. Soliman, Tarek M. Abdel-Ghany, et al. Evaluation of potentially probiotic attributes of certain dairy yeasts isolated from buffalo sweetened Karish cheese [J]. Heliyon, 2019, 5(5): e01649.
- [25] Marco Ambrogio Murgia, Antonella Marongiu, Maria Aponte, et al. Impact of a selected *Debaryomyces hansenii* strain's inoculation on the quality of Sardinian fermented sausages [J]. Food Research International, 2019, 121: 144-150.
- [26] Catarina Prista, Carmen Michán, Isabel M. Miranda, et al. The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts [J]. Yeast, 2016, 33(10): 523-533.
- [27]柳志强,李晓宇,李海雷,等.5株海洋酵母的鉴定及耐盐性分析[J].热带农业科学,2010,30(12):13-16.
- [28]武俊瑞.东北传统发酵特色食品中主要微生物多样性研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2013.
- [29]孙淑英.荔枝汁混菌发酵工艺及其功能活性成分研究[D].广州:华南农业大学,2016.
- [30] Yadira Rivera-Espinoza, Yoja Gallardo-Navarro. Review non-dairy probiotic products [J]. Food Microbiology, 2010, 27(1): 1-11.
- [31] Xu X X, Bao Y J, Wu B B, et al. Chemical analysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple and Chinese jujube juice fermented by selenium-enriched probiotics [J]. Food Chemistry, 2019, 289: 250-258.

(上接第90页)

- allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2002, 127(1): 27-37.
- [42] Guang-Yu, Liu, Xue-Jiao, et al. Analysis of the allergenic epitopes of tropomyosin from mud crab using phage display and site-directed mutagenesis [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018, 66: 9127-9137.
- [43] Fang L, Li G, Zhang J, et al. Identification and mutational analysis of continuous, immunodominant epitopes of the major oyster allergen Crag 1 [J]. Clin Immunol, 2019, 201: 20-29.
- [44] Ishikawa M, Suzuki F, Ishida M, et al. Identification of tropomyosin as a major allergen in the octopus *Octopus vulgaris* and elucidation of its IgE-binding epitopes [J]. Fisheries Science, 2001, 67(5): 934-942.
- [45] Wai C Y, Leung N Y, Ho M H, et al. Immunization with hypoallergens of shrimp allergen tropomyosin inhibits shrimp tropomyosin specific IgE reactivity [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111649.
- [46] Wai C Y, Leung Y, Leung P S, et al. T cell epitope immunotherapy ameliorates allergic responses in a murine model of shrimp allergy [J]. Clin Exp Allergy, 2016, 46(3): 491-503.
- [47] Ravkov E V, Pavlov I Y, Martins T B, et al. Identification and validation of shrimp-tropomyosin specific CD4 T cell epitopes [J]. Hum Immunol, 2013, 74(12): 1542-1549.