

牛乳 β -乳球蛋白过敏原表位及其潜在应用

陈红兵^{1,2*}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047;

2. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047)

摘要: 过敏原表位是过敏原直接参与免疫反应的物质基础, 也是导致过敏反应的“元凶”。牛乳 β -乳球蛋白是 lipocalin 家族的代表和常用模式蛋白, 它的表位信息比较完整, 拥有 7 个人血清 IgE 和 6 个 IgG 的线性表位、3 个 IgE 结合的构象性表位以及 7 个 T 细胞表位。另外, 它的动物源血清 IgE、IgG 和 T 细胞表位也在不断被发现。牛乳 β -乳球蛋白的表位信息为基于表位的应用提供了重要的支撑, 它们的应用主要涉及到预测食物过敏原的致敏性, 食物过敏的交叉反应, 食物过敏的诊断, 食物过敏的免疫治疗以及食物过敏原的检测等 5 个方面。

关键词: 牛乳过敏; 表位; β -乳球蛋白

Epitopes on bovine β -lactoglobulin and its potential application

CHEN Hong-Bing^{1,2*}

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

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

ABSTRACT: Epitopes is the binding sites between allergen and the relevant antibody, and it is the triggering element of immune reaction. Bovine β -lactoglobulin belongs to lipocalin family and is one of the model proteins. It was found that 7 IgE binding and 6 IgE binding linear epitopes, 3 IgE binding conformational epitopes and 7 T cells binding epitopes existed in milk allergy patients, and the binding epitopes of other animal resource were also reported. The epitopes information plays a very important role in the application based on epitopes, and the application includes the prediction of food allergen allergenicity, cross-reactivity of food allergen, diagnosis of food allergy, immunotherapy of food allergy and analysis of food allergen.

KEY WORDS: milk allergy; epitope; β -lactoglobulin

1 引言

牛乳过敏是一种常见的食物过敏反应, 是人体对牛乳中蛋白质产生的一种变态反应。据国外流行病学调查表明, 0.3%~7.5%的人群对牛乳产生食物过敏反应^[1]。虽然国内缺乏大规模流行病学调查数据, 但牛乳过敏仍然是我国常见的食物过敏之一。牛乳过敏严重影响部分人群的生活质量, 尤其危及婴幼儿的

身体健康。

目前, IgE 介导的食物过敏机制表明, 过敏原蛋白激发机体产生特异性 IgE 并与之结合的过程是过敏反应的关键步骤。在此过程中, 过敏原蛋白不是通过它的完整分子发挥功能, 而是由过敏原表位的直接参与来完成的。所以, 食物过敏原的 IgE 结合表位是导致食物过敏的“元凶”, 也是食物过敏反应的物质基础。已报道的一些食物过敏原表位研究工作也证

基金项目: 国家自然科学基金(31171716); 国家科技支撑计划项目(2011BAK10B03, 2012BAK17B02); 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室项目(SKLF-MB-201002, SKLF-TS-201109)

*通讯作者: 陈红兵, 男, 博士, 教授, 研究领域: 食品科学。E-mail: chbgjy@hotmail.com

实了过敏原 IgE 结合表位在食物过敏中的作用。此外,食物过敏原的免疫学特性最终通过过敏原表位的免疫特异性体现。因此,过敏原表位的免疫学功能及其研究价值激起了人们极大的兴趣,人们已把对过敏原表位的认识视为开启“解决食物过敏问题”的钥匙。

在众多的食物过敏原中,牛乳 β -乳球蛋白属于强过敏原 lipocalin 家族,是最主要的牛乳过敏原蛋白之一,82%的牛乳过敏患者对牛乳 β -乳球蛋白过敏^[2],而且人乳中又缺乏 β -乳球蛋白。另外,它还是蛋白质科学研究的一种模式材料^[3]。因此,牛乳 β -乳球蛋白备受关注,已经开展了一些卓有成效的工作,定位出了牛乳 β -乳球蛋白一系列表位。同时随着人们对食物过敏原表位功能的不断认识,基于表位功能的应用也在不断拓展。

2 牛乳 β -乳球蛋白过敏原表位的研究

目前有关牛乳 β -乳球蛋白表位的文献报道,大部分是关于表位定位的工作。在 B 细胞线性表位定位方面,最具有代表性的成果包括 Sélo 课题组和 Järvinen 课题组的工作。Sélo 课题组通过酶法“切割”抗原,开展了牛乳 β -乳球蛋白的人血清 IgE 结合表位的定位工作,他们把筛选到的表位划分为最主要过敏原表位,主要过敏原表位以及次要过敏原表位,一共 8 个表位^[4]。最主要过敏原表位有肽片段 AA102-124, AA41-60 和 AA149-162,它们分别被 97%、92%和 89%的牛乳过敏患者血清所识别;主要过敏原表位有肽片段 AA1-8 和 AA25-40,它们分别被 58%和 72%的牛乳过敏患者的血清所识别;次要过敏原表位有肽片段 AA9-14, AA84-91 和 AA92-100,它们仍被大于 40%的牛乳过敏患者的血清所识别。Järvinen 则通过肽扫描技术定位出了牛乳 β -乳球蛋白过敏原的人血清 IgE 结合表位,它们分别是肽片段 AA1-16, AA31-48, AA47-60, AA67-78, AA75-86, AA127-144 和 AA141-152,共 7 个表位^[4]。这些研究结果显示,大部分肽片段在这两个研究小组中均可以找到。由于酶法“切割”抗原定位法的操作过程复杂,测定结果所受影响因素更多。而肽扫描定位法相对简单,其研究结果的可靠性更高。

在 B 细胞线性表位定位方面,除开展了 IgE 结合表位的工作,还定位出了牛乳 β -乳球蛋白的人血清 IgG 的 6 个结合表位^[5],它们分别是肽片段 AA1-16,

AA51-64, AA67-78, AA85-96, AA129-144 和 AA139-156。其中 AA1-16 和 AA58-96 为次要识别表位,其余为主要识别表位。另外,笔者课题组通过对噬菌体随机七肽库进行亲和淘选和采用肽扫描定位的方法,寻找到了水牛乳 β -乳球蛋白的 8 个兔 IgG 结合线性表位,与已报道的牛乳 β -乳球蛋白的 IgG 结合表位相比,发现了 2 个兔 IgG 结合的新表位,分别为 AA134-143 和 AA150-159^[6];在此基础上,确定了主要表位中有 14 个为关键氨基酸^[7]。同时也获得了 7 个水牛乳 β -乳球蛋白的 IgG 结合的构象性表位以及 3 个牛乳 β -乳球蛋白的 IgG 结合构象性表位,尤其是定位出了 3 个人血清的 IgE 结合表位^[8,9]。

在牛乳 β -乳球蛋白的 T 细胞表位定位研究方面,比较突出的研究结果有一组人源性 T 细胞表位和一组鼠源 T 细胞表位。Totsuka 用三种品系的小鼠开展了牛乳 β -乳球蛋白的 T 细胞表位定位工作^[10],用 BALB/c 小鼠确定了 3 个主要 T 细胞表位 AA67-75, AA71-79 和 AA80-88, 4 个亚主要 T 细胞表位 AA8-16, AA30-38, AA39-47 和 AA107-117 以及 4 个次要 T 细胞表位 AA12-26, AA44-56, AA49-63 和 AA110-124;用 C57BL/6 小鼠定位的 T 细胞主要、亚主要和次要表位分别是 AA115-136, AA11-30 和 AA107-122;用 C3H/He 小鼠定位了 2 个主要 T 细胞表位 AA131-154 和 AA86-105, 1 个亚主要 T 细胞表位 AA73-93 以及 2 个次要 T 细胞表位 AA98-113 和 AA127-143。Inoue 则通过对牛乳过敏患者的研究,筛选到了 7 个牛乳 β -乳球蛋白的人源 T 细胞结合表位 AA1-21, AA14-29, AA36-47, AA47-67, AA77-97, AA97-117 和 AA142-162^[11]。其中 AA77-97 在 BALB/c 小鼠和 C3H/He 小鼠中均能找到相应的片段,说明存在免疫应答的相似性。

在牛乳 β -乳球蛋白过敏原表位研究方面,还有一些关于表位与牛乳过敏免疫耐受,终生过敏与过敏患者表位差异以及表位与肥大细胞关系的研究结果^[12-14]。目前这些研究还有一些局限性,有待深入探索。

3 过敏原表位的潜在应用

3.1 预测食物过敏原的致敏性

为食物过敏患者提供安全的食品激发了科学家浓厚的兴趣,也是亟待解决的关键问题,其中食物致敏性的预测与评估则是待突破的关键技术之一。迄今

为止,基于基因组学和蛋白质组学水平的过敏原信息推动了一些计算工具在致敏性预测中的应用。尽管评估蛋白质致敏性的标准还在形成阶段,甚至只是在讨论阶段,但世界卫生组织(WHO)和国际粮农组织(FAO)提出了评估转基因食品潜在致敏性的指导方针,其评估方法主要是基于筛查与已知过敏原蛋白 IgE 线性结合表位至少有 6 个连续的氨基酸序列相似性。另外,根据食品法典委员会,与已知过敏原相比,待鉴定蛋白若含有 6 个或以上的连续氨基酸,或在 80 个氨基酸中有 $\geq 35\%$ 序列相似性,则该蛋白为潜在的过敏原^[15]。

3.2 食物过敏的交叉反应

通过比较食物蛋白与已知过敏原蛋白结构的相似性是评估蛋白质存在潜在交叉反应的有效途径。这种策略不仅考虑了线性表位,还考虑了构象性表位,因而可以克服简单的比较线性表位的缺点。以 Bet v 1 为例,该蛋白是导致花粉关联的食物过敏的主要过敏原,它的三级结构与其它多种食物,如樱桃,苹果,榛子,桃,胡萝卜,芹菜和大豆等,有三个相同的曲面片^[16]。另外,为了确定临床相关的 IgE 交叉反应,可以通过各过敏原蛋白的三维结构来比较它们构象性表位的相似性。但是,在过敏蛋白质结构数据库(SDAP)中只有 5%(45/829)的实验数据可以使用^[17]。由于上述方法的局限性,最近又出现了一种新技术,即综合考虑过敏原蛋白模拟的 3 维结构、已知过敏原的 3 维结构以及过敏原表位氨基酸的特性,可以用于提高预测交叉过敏反应的准确性^[17]。

3.3 食物过敏的诊断

现代生物技术推动着免疫化学朝着食物过敏原表位定位和合成多种过敏原 IgE 结合表位的方向发展。这些进步使得通过定量检测 IgE 抗体与过敏原蛋白线性表位的结合可以实现基于单一组分的食物过敏诊断。这种诊断可以获得新的致敏信息:(1)一种过敏食物含有多种致敏蛋白;(2)不同食物中含有同系的致敏蛋白;(3)同一过敏原蛋白含有不同表位^[18]。另外, IgE 结合的过敏原表位可以作为临床过敏的标志。比如,过敏原表位与患者血清结合的程度与众多食物过敏反应的程度相关^[19]。以牛奶过敏为例, Järvinen 等对比了老年和年轻牛奶过敏患者的过敏原线性表位,发现今后可能对牛奶产生耐受的年轻牛奶过敏患者的血清具有不同的识别表位,他们

能识别 α -乳清蛋白上的 3 个 IgE 结合表位而不能识别 β -乳球蛋白上的 IgE 结合表位,该结果表明,识别乳过敏原多个 IgE 表位可能是终生牛乳过敏的标志^[5,13,20]。

3.4 免疫治疗

尽管过敏原特异性免疫治疗已被广泛应用了近 100 年,但这种治疗方式仍在发展。目前,一种有前途的治疗方法是 T 细胞表位的使用,该 T 细胞仅作用于目标过敏原特异性 T 细胞,不会造成不良的 IgE 介导的过敏反应。到目前为止,基于 T 细胞表位肽的免疫治疗在蜂毒过敏和猫皮屑过敏中得到了成功应用,而类似的食物过敏策略尚未达到临床试验水平^[21]。然而,含有 T 细胞表位而不含 IgE 结合表位的花生过敏原片段却已显示了潜在免疫治疗花生过敏的可能性^[22]。

3.5 过敏原的检测

食物过敏原的抗原性与食品过敏原的免疫学检测息息相关,食物过敏原与其激发的抗体的特异性结合奠定了灵敏、特异的免疫学检测体系。在乳蛋白过敏原免疫学检测研究中,开展了酶吸附实验、放射免疫测定、酶联免疫吸附测定、斑点免疫印迹等研究^[23],并针对部分乳过敏原开发出了基于夹心 ELISA 和竞争 ELISA 原理的免疫检测试剂盒。已有的信息显示,不同的研究者和开发商得到的过敏原检测限差别较大,这种差别既存在于同种乳过敏原之间,也存在于不同乳过敏原之间。如 Karawova 采用夹心 ELISA 检测 α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白(A、B 两个变异体)的检测限分别是 13 $\mu\text{g/L}$ 、27 $\mu\text{g/L}$ (A)以及 20 $\mu\text{g/L}$ (B)^[24]。虽然在实际工作中,免疫学检测是公认的食物过敏原检测的最有效的方法,但已有的商业化免疫学检测试剂盒并没有得到联合论证许可,而且已有的过敏原免疫学检测体系均局限于过敏原完整分子的检测,不能检测到加工食品中所有的过敏原片段^[25]。而针对于过敏原表位单抗的制备则为实现检测过敏原致敏性片段提供了关键支撑,但由于多个致敏性表位的存在,如何实现基于表位检测过敏原的工作值得进一步研究开发。

参考文献

- [1] El-Agamy EI. The challenge of cow milk protein allergy [J]. Small Ruminant Res, 2007, 68(1-2): 64-72.
- [2] Aoki T, Iskandar S, Yoshida T, et al. Reduced immunogenicity of

- beta-lactoglobulin by conjugating with chitosan [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(10): 2349–2356.
- [3] Belloque J, Chicón R, López-Fandiño R. Unfolding and refolding of beta-lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different pH values and temperatures and its influence on proteolysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(13): 5282–5288.
- [4] Sêlo I, Clément G, Bernard H, *et al.* Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides [J]. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29(8):1055–1063.
- [5] Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, *et al.* IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 126(2): 111–118.
- [6] Xin Li, Hongbing Chen, Tong Ping, *et al.* Epitope mapping of buffalo beta-lactoglobulin against rabbit polyclonal antibody following phage display technique [J]. *J Food Biochem*, 2012, 36 (1): 56–65.
- [7] Xin Li, Hongbing Chen, Jinyan Gao, *et al.* Epitope mapping and identification of amino acids critical for rabbits IgG-binding to linear epitopes on buffalo beta-lactoglobulin [J]. *Protein Pept Lett*(Epub ahead of print, PPL-EPUB-20120601-4)
- [8] 李欣. 水牛乳 β -乳球蛋白的 IgG 结合表位的定位研究(博士学位论文), 2008, 南昌大学: 南昌.
- [9] 武涌. 牛乳 β -乳球蛋白构象性表位定位及结构特征研究(硕士学位论文), 2012, 南昌大学: 南昌.
- [10] Totsuka M, Ametani A, Kaminogawa S. Fine mapping of T-cell determinants of bovine beta-lactoglobulin [J]. *Cytotechnology*, 1997, 25(1–3):101–113.
- [11] Inoue R, Matsushita S, Kaneko H, *et al.* Identification of beta-lactoglobulin-derived peptides and class II HLA molecules recognized by T cells from patients with milk allergy [J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(7): 1126–1134.
- [12] Mizumachi K, Kurisaki J. Induction of oral tolerance in mice by continuous feeding with beta-lactoglobulin and milk [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(6): 1287–1294.
- [13] Järvinen KM, Beyer K, Vila L, *et al.* B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110(2): 293–297.
- [14] Fritsché R, Adel-Patient K, Bernard H, *et al.* IgE-mediated rat mast cell triggering with tryptic and synthetic peptides of bovine beta-lactoglobulin [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 138(4): 291–297.
- [15] Taylor SL. Review of the development of methodology for evaluating the human allergenic potential of novel proteins [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(7): 604–609.
- [16] Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 964: 47–68.
- [17] Oezguen N, Zhou B, Negi SS. Comprehensive 3D-modeling of allergenic proteins and amino acid composition of potential conformational IgE epitopes [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(14): 3740–3747.
- [18] Steckelbroeck S, Ballmer-Weber BK, Vieths S. Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(6): 1323–1330.
- [19] Albrecht M, Kühne Y, Ballmer-Weber BK, *et al.* Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(2): 328–336.
- [20] Beyer K, Jarvinen KM, Bardina L, *et al.* IgE-binding peptides coupled to a commercial matrix as a diagnostic instrument for persistent cow's milk allergy [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(3): 704–705.
- [21] Bohle B. T-cell epitopes of food allergens [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2006, 30 (2): 97–108.
- [22] Burks W, Kulis M, Pons L. Food allergies and hypersensitivity: A review of pharmacotherapy and therapeutic strategies [J]. *Expert OpinPharmacother*, 2008, 9 (7): 1145–1152.
- [23] Van Hengel AJ. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(1): 111–118.
- [24] Karamanova L, Fukal L, Kodicek M, *et al.* Immunoprobes for thermally-induced alternation in whey protein structure and their application to the analysis of thermally-treated milks [J]. *Food Agric Immunol*, 2003,15: 77–91.
- [25] Linda Monaci, Virginie Tregoat, Arjon J *et al.* Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review [J]. *Eur Food Res Technol*, 2006, 223(2): 149–179.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



陈红兵, 男, 博士, 教授, 研究领域: 食品科学。

E-mail: chbgjy@hotmail.com