

榛子主要过敏原 Cor h 1 单克隆抗体识别抗原表位区域的确定

赵郭存, 张 强, 杨 波, 吉琼梅, 刘志刚*

(深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060)

摘要: **目的** 确定已获得的四株榛子主要过敏原 Cor h 1 单克隆抗体识别的抗原表位区域。**方法** 构建谷胱甘肽巯基转移酶 (GST)与 Cor h 1 不同截短体的表达载体并表达 GST-Cor h 1 融合蛋白, 采用 ELISA 和 Western blot 检测单抗与不同融合蛋白的反应, 并结合 DNASTAR 表位分析软件推知不同单抗的抗原识别表位区域。**结果** 确定了四株 Cor h 1 单抗的抗原识别表位区域, 分别是 4G7 和 2H3 抗体的抗原表位位于 Cor h 1 第 120~126 位氨基酸, 5F2 和 1G4 抗体的抗原表位位于 Cor h 1 第 43~52 位氨基酸。**结论** 四株 Cor h 1 单抗的抗原识别表位区域的确定, 为 Cor h 1 的进一步研究和食品安全检测奠定了基础。

关键词: 榛子过敏; Cor h 1; 单克隆抗体; 抗原表位

Identification of hazelnut antigenic epitope regions recognized by anti-Cor h 1 monoclonal antibodies

ZHAO Guo-Cun, ZHANG Qiang, YANG Bo, JI Qiong-Mei, LIU Zhi-Gang*

(Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

ABSTRACT: Objective To identify the antigenic epitope regions recognized by anti-Cor h 1 monoclonal antibodies. **Methods** Five expression vectors of truncated Cor h 1 were constructed and the truncated Cor h 1-GST fusion proteins were expressed in *E. coli*. The binding activities of anti-Cor h 1 monoclonal antibodies (mAbs) with truncated Cor h 1 were analyzed by ELISA and Western blot. According to the speculative epitope regions, expression vectors of potential epitopes were constructed and the GST-epitope fusion proteins were expressed in *E. coli*. The fusion proteins were analyzed by ELISA and Western blot with mAbs to confirm the epitope regions, with the DNASTAR epitope analysis software. **Results** Epitope regions recognized by four anti-Cor h 1 mAbs were identified. The epitopes recognized by 4G7 and 2H3 were located in the region from 120th to 126th amino acids of Cor h 1, 5F2 and 1G4 in the region from 43th to 54th amino acids. **Conclusion** The identification of epitope regions recognized by four anti-Cor h 1 mAbs will benefit the research on Cor h 1 and the food safe examination.

KEY WORDS: hazelnut allergy; Cor h 1; monoclonal antibody; antigenic epitope

榛子(*Corylus avellana*)是常见的坚果类过敏性食物^[1]。在欧洲, 榛子过敏发病率大约在 0.1%~0.5% 之间^[2]。榛子过敏原产生的 IgE 反应能引起“口腔过敏综合症”, 临床症状表现为口腔发痒、口腔黏膜

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101280、81271950)、深圳市重点实验室组建项目(SW201110010)、深圳大学基础研究科研项目(201101)

*通讯作者: 刘志刚, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事变态反应学研究。E-mail: lzg@szu.edu.cn

激发和血管肿胀等^[3-4]。目前发现能够与人类血清中 IgE 结合而引起过敏反应的榛子过敏原组分主要是 Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 11 等^[5-6]。其中, Cor a 1.04 是榛子主要过敏原, 属于疾病相关家族 10 蛋白(PR-10)^[7-8]。Cor a 1.04 与 Bet v 1 氨基酸同源性达到 67%, 并具有相同的 T 细胞抗原表位^[9-10]。本课题组国内首次克隆、表达、纯化的平榛主要变应原 Cor h 1, 与欧洲榛子主要变应原基因 Cor a 1.04 仅 4 个核苷酸差异, 同源性高达 99%, 根据计算出的氨基酸序列仅有两个残基差异^[11]。

微量榛子蛋白即能引起易感人群全身过敏反应。榛子广泛应用于各种包装食品中, 食品标签的不准确甚至错误, 给榛子过敏患者带来生命危险^[12-13]。目前检测食品中过敏原含量的方法很多, 其中双抗夹心 ELISA 方法最灵敏最常用^[14]。但双抗夹心 ELISA 方法要求所用的包被抗体和酶标检测抗体能够识别同一抗原的不同表位, 并且识别的抗原表位能够在空间构象上有一定距离而不会造成抗体结合位阻, 这就需要备选抗体的抗原识别表位进行鉴定。

本课题组前期工作应用杂交瘤技术制备获得了多株高特异性、高亲和力的抗 Cor h 1 单克隆抗体, 但所获得的这些抗 Cor h 1 单抗识别的抗原表位不清楚, 因此本研究旨在对前期获得的 4 株 Cor h 1 单抗识别的抗原表位进行较为系统的鉴定, 确定各株单抗的表位分布, 为更好利用 Cor h 1 单抗进行进一步相关研究和食品安全检测奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

pGEX-5X-1 载体由深圳大学生命科学院刘士德老师惠赠, PET28a-Cor h 1 纯化蛋白(分子量 17 ku)、

PET32a-Ch0 纯化蛋白(分子量 26 ku)、PET28a-Cor h 1 质粒和 BL21 菌种以及待测 Cor h 1 单抗由本室保存, 4G7、2H3、5F2 和 1G4 均为纯化抗体。

Taq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶和 T4DNA 连接酶为 NewEngland Biolab 公司产品; 凝胶 DNA 回收纯化试剂盒为 QIAGEN 产品; 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 Cor h 1 截短体 PCR 引物的设计及合成

根据 Cor h 1 序列共设计了 5 个 Cor h 1 截短体(图 1A), 每个截短体有 40 个氨基酸残基, 相邻截短体重复 10 个氨基酸。根据设计的截短体分别设计引物扩增截短体 DNA 片段(表 1), 其中 Ch2 和 Ch3 上游引物设计添加 BamH^I, Ch1、Ch4 和 Ch5 上游引物设计添加 EcoR^I 位点, 下游引物设计均添加 Xho^I 位点。PCR 引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 Cor h 1 截短体表达质粒的构建

以 pET-28a-Cor h 1 质粒为模板, 通过 PCR 扩增 5 个 Cor h 1 截短体 DNA 片段。PCR 产物经凝胶电泳 PGEX-5X-1 质粒同时分别用 BamH^I、EcoR^I/Xho^I 双酶切, 片段和载体经 DNA 凝胶回收后进行连接并转化 BL2 感受态细菌, 挑取克隆扩增培养后提取质粒, 质粒 DNA 用 BamH^I、EcoR^I/Xho^I 进行酶切鉴定, 并送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.3 GST 融合蛋白的表达

将测序正确的质粒转化 BL21, 挑取单克隆于 LB(含 Amp⁺)培养基中 37 °C 振荡培养至 D600 约 110, 加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L, 37 °C 诱导表达 4 h, 4 °C、12000 r/min 离心 10 min 收菌。每 1 mL 细菌加入 100 μL 细菌裂解液

表 1 Cor h 1 截短体 PCR 引物
Table 1 PCR primers of truncated Cor h 1 DNA sequence

Primer sequences (5' 3')		
Ch1	forward primer	CGGAATTCATGGGTGTTTTCTGCTACGAG
Ch1	reverse primer	CCGCTCGAGCTAGGTGAAGTGCTGAGGAGCAAC
Ch2	forward primer	CGGGATCCATCCCAAGGTTGCTCCTCAG
Ch2	reverse primer	CCGCTCGAGCTAGTGCTTCATGTAATTGCG
Ch3	forward primer	CGGGATCCGAAGGCAACGAATTC AAGTAC
Ch3	reverse primer	CCGCTCGAGCTAAGAGATCTTCTCCAGTGTGTGC
Ch4	forward primer	CGGAATTCATGGGGC CACACTGG
Ch4	reverse primer	CCGCTCGAGCTAGATTGAAGCGTTGCCCTTGG
Ch5	forward primer	CGGAATTC AAGTACCACACCAAGGGCAAC
Ch5	reverse primer	CCGCTCGAGCTAACAGTAGGCATCAGGGTGTGC

Triton X2 100, 临用前用 PBS 配制, 将细菌悬浮后冰上放置 20 min, 然后置冰上间歇超声裂解, 20 kHz 超声 5 s, 暂停 10 s, 至菌液透亮不黏稠。然后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清对其中融合蛋白定量后进行后续实验。

1.2.4 Cor h 1 单抗表位区域的 ELISA 检测

取含待测蛋白的细菌裂解上清用 ELISA 包被缓冲液(0.1 mol/L pH 8.9 的碳酸缓冲液)稀释至 10 μg/mL,同时分别以 PBS、GST、Cor h 1 融合蛋白作为空白、阴性、阳性对照, 包被 96 孔板, 100 μL/孔, 4 °C 包被过夜。弃去蛋白包被液后, 0.05% (体积分数) Tween 20/PBS 洗 3 次。加入 2% (质量分数) BSA 200 μL/孔, 37 °C 封闭 2 h。0.05% (体积分数) Tween 20/PBS 洗 3 次后, 分别加入浓度大致为 1 μg/mL 的不同 Cor h 1 单抗, 100 μL/孔 37 °C 孵育 1 h。四株抗体分别用含 1% (质量分数) BSA 体积的 PBST 洗液按 1:2000 稀释。每个反应分别设 3 个平行孔。0.05% (体积分数) Tween 20/PBS 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗小鼠 IgG, 100 μL/孔 37 °C 孵育 50 min。0.05% (体积分数) Tween 20/PBS 洗 3 次后, 加入 TMB 显色液 100 μL/孔, 37 °C 避光显色 10 min, 显色充分后加入 12.5% H₂SO₄ 50 μL/孔终止反应, 酶标仪测定 D450 nm。

1.2.5 Cor h 1 单抗表位区域的 Western blot 检测

取待测蛋白约 0.05 μg 进行 12% (质量分数) SDS-PAGE, 同时分别以 GST、Cor h 1 融合蛋白作为阴、阳性对照。电泳结束后 300 mA 恒流转膜 50 min 至硝酸纤维素膜, 用 2% (质量分数) BSA 4 °C 包被过夜, 分别与(质量)浓度约为 1 μg/mL 的 Cor h 1 单抗在 37 °C 孵育 2 h, 抗体均用 1% (质量分数) BSA 稀释 0.05% (体积分数) Tween 20/PBS 洗 3 次, TBST 洗 2 次后, 加 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 37 °C 孵育 45 min。0.05% (体积分数) Tween 20/PBS 洗 3 次, TBST 洗 2 次后, 使用化学试剂 DAB 进行显色检测。

1.2.6 Cor h 1 蛋白质二级结构、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(Gamier-Robson 方法)对蛋白质二级结构进行预测。采用 Jameson-Wolf 法、Kyte-Doolittle 法、Emini 法和 Karplus-Schulz 法对 Cor h 1 蛋白的抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性进行预测。

1.2.7 将 Cor h 1 蛋白的二级结构、抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性预测结

果与分子生物学实验结果相结合, 进行综合分析得出各株单克隆抗体的抗原表位区域。

2 结果与分析

2.1 不同 GST-Cor h 1 截短体融合蛋白表达质粒的鉴定及表达

构建的 PGEX-5X-1-Cor h 1 截短体质粒分别用 BamH I/EcoR 和 Xho I 双酶切进行鉴定, 可见释放出的相应截短体 120 bp 大小的 DNA 片段(图 1A, 图 1B, 图 1C), 测序结果正确(图略), 说明截短体融合蛋白表达质粒构建成功。质粒转化 BL21 细菌后用 IPTG 诱导表达 GST 融合蛋白, 并进行 SDS-PAGE 检测, 蛋白分子量 26 ku 附近可见有大量的融合蛋白的表达。

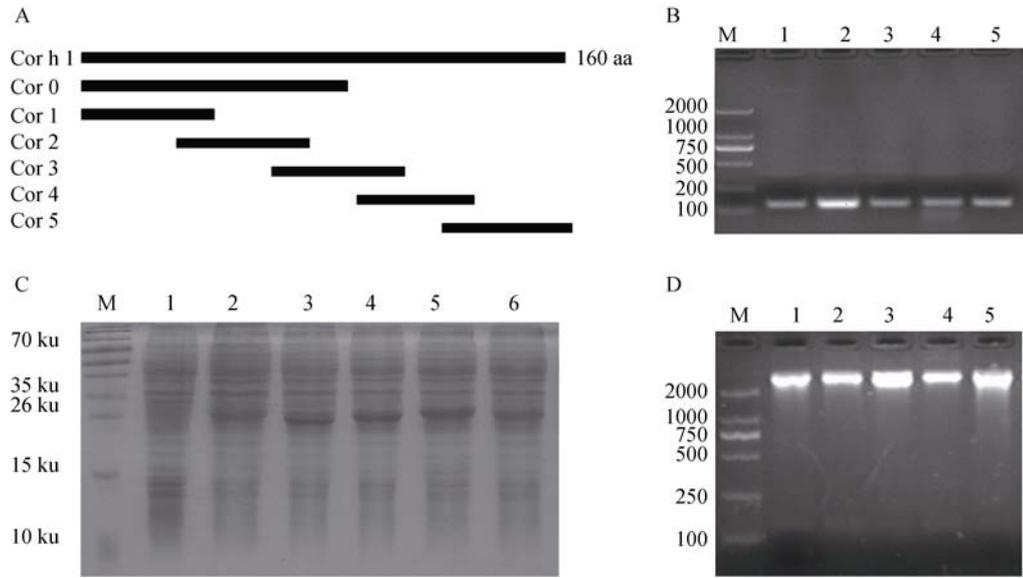
2.2 Cor h 1 单抗与 GST-Cor h 1 截短体融合蛋白的反应检测

用 ELISA 检测不同 Cor h 1 单抗(4G7、2H3、5F2 和 1G4)与不同 GST-Cor h 1 截短体融合蛋白(图 2A), 单抗 4G7 和 2H3 与 Ch5 有反应, 单抗 5F2 和 1G4 同 Cor h 1 前半段融合蛋白 Ch0 有反应, 而与 Ch1、Ch2 和 Ch3 不反应。四株单抗均与 Cor h 1 全长蛋白反应, 均不与 GST 空载体蛋白反应。用 Western blot 检测不同 Cor h 1 单抗与不同 GST-Cor h 1 截短体融合蛋白的反应(图 2B), 可见四株单抗与 ELISA 结果一致。由 ELISA 和 Western blot 的结果可推出各单抗识别 Cor h 1 的大致表位, 4G7 和 2H3 抗体的抗原表位位于 Cor h 1 第 120~160 位氨基酸, 5F2 和 1G4 抗体的抗原表位位于 Cor h 1 第 1~80 位氨基酸。

2.3 Cor h 1 蛋白质二级结构、抗原指数、亲水性、蛋白表面可及性及柔韧性预测

利用 DNASTar 软件分别预测 Cor h 1 蛋白质二级结构、抗原指数、亲水性、表面可及性及柔韧性等参数。结果如图 3、图 4 所示。

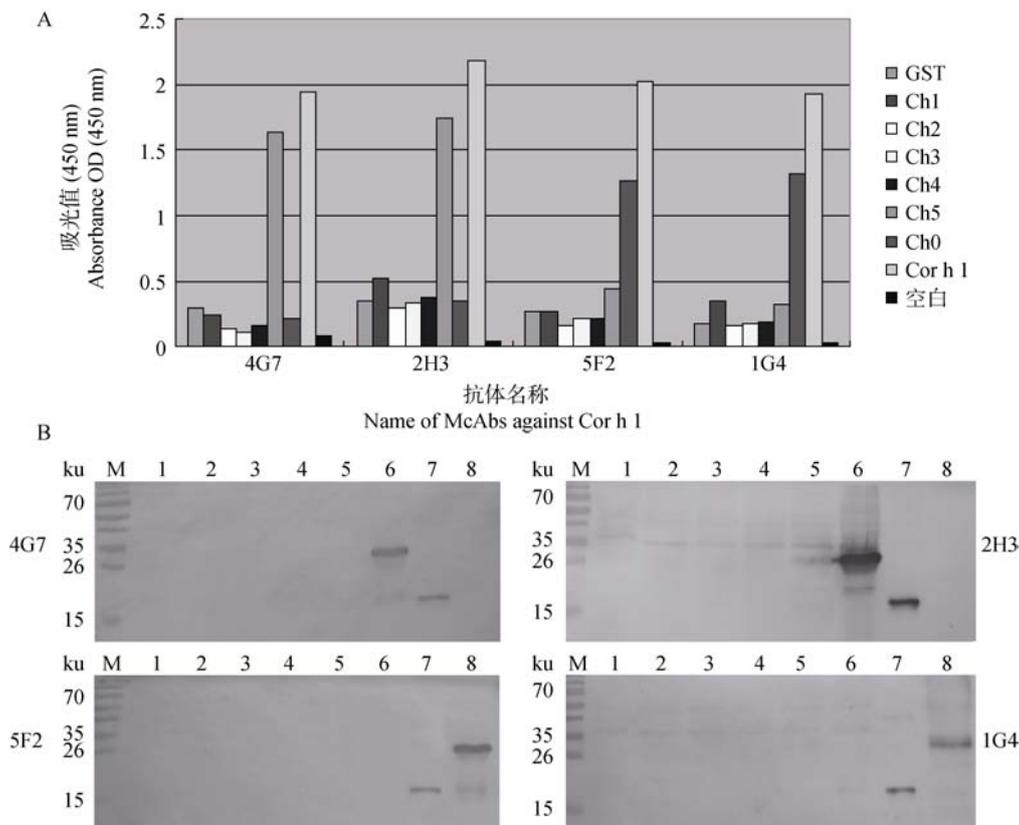
蛋白质二级结构中的转角区域和无规则卷曲区域多位于球蛋白分子表面, 成为抗原表位的可能性较大。而蛋白质的亲水性、表面可及性、柔韧性等在抗原的形成方面发挥着重要的作用, 当亲水性 > 0, 抗原指数 > 0, 表面可及性 > 1 时, 形成表位的可能性大, 综合其上各参数可推导出该蛋白的抗原区为氨基酸的 43~52, 120~126。



A: Diagram of truncated Cor h 1 named Ch1, Ch2, Ch3, Ch4, Ch5; B: The result of RT-PCR amplification truncated Cor h 1; C: Identification of vectors expressing truncated Cor h 1 fusion protein with BamH I /EcoR I and Xho I enzyme digestion; D: Expression of truncated SNCG fusion proteins were identified by SDS-PAGE. M, marker; 1, control uninduced; 2, Ch1; 3, Ch2; 4, Ch3; 5, Ch4; 6, Ch5

图 1 不同 GST-Cor h 1 截短体融合蛋白表达载体的构建与表达

Fig. 1 Construction of different vectors expressing truncated Cor h 1 fusion proteins and their expression in *E.coli*



A: ELISA analysis of potential epitope regions with anti-Cor h 1 mAbs; B: Western blot analysis of potential epitope regions with anti-Cor h 1 mAbs. M, marker; 1, control GST; 2, Ch1; 3, Ch2; 4, Ch3; 5, Ch4; 6, Ch5; 7, Cor h 1; 8, Ch0

图 2 不同单抗识别 Cor h 1 抗原表位区域的确定

Fig. 2 Confirmation of epitope regions recognized by anti-Cor h 1 monoclonal antibodies

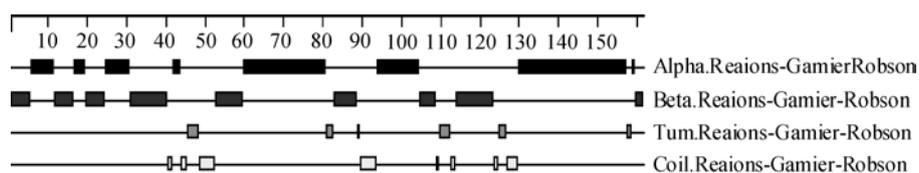


图 3 DNASTar 预测 Cor h 1 二级结构结果

Fig. 3 Prediction of secondary structure of Cor h 1 using DNASTar

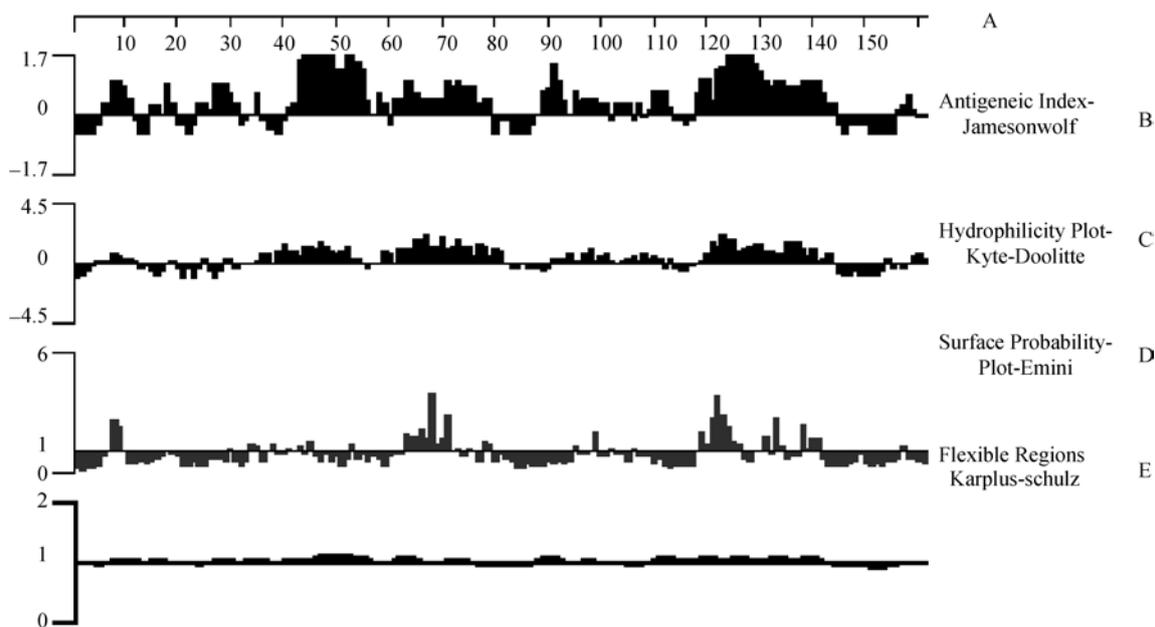


图 4 Cor h 1 蛋白抗原指数、亲水性、表面可及性及柔韧性分析

Fig. 4 Analysis of antigenicity, hydrophilicity, surface probability and flexibility of Cor h 1

A: 序列; B: 抗原指数(Jameson-Wolf 法); C: 亲水性(Kyte-Doolittle 法); D: 表面可及性(Emini 法); E: 柔韧性(Karplus-Schulz 法)

2.4 Cor h 1 单克隆抗体抗原表位区域的确定

据此, 将上述利用分子生物学实验得到的抗体抗原表位区与生物信息学方法预测的 Cor h 1 可能抗原表位区相结合, 预测四株单克隆抗体抗原表位区域为: 4G7 和 2H3 抗体的抗原表位位于 Cor h 1 第 120~126 位氨基酸, 5F2 和 1G4 抗体的抗原表位位于 Cor h 1 第 43~52 位氨基酸。

3 讨论

随着食品工业的发展, 食物过敏患者发病率呈逐年上升的趋势。发达国家儿童食物过敏患病率高达 6%, 成人患病率则为 3%~4%^[15]。榛子是常见的坚果类过敏性食物, 微量榛子蛋白即能够引起易感人群全身过敏反应。榛子广泛存在包装食品中, 食品标签可能不准确甚至错误, 导致患者误食过敏原, 严重

的患者有生命危险^[12-13]。目前, 双抗夹心 ELISA 则是最常用的检测食品过敏原含量的方法之一^[14]。

本研究设计构建了 5 个 Cor h 1 截短体, 采用 ELISA 和 Western blot 检测前期已获得的 4 株 Cor h 1 单克隆抗体与 Cor h 1 截短体的反应, 并结合生物信息学方法预测结果, 从而推知单抗识别 Cor h 1 的大致表位。实验结果中 4G7 和 2H3 单抗在 ELISA 和 Western blot 检测中均能与相应的 Ch5 截短体反应, 从而可以明确地推知两个单抗识别表位的区域。同时结合生物信息学对 Cor h 1 抗原表位的预测分析, 能够推知这两株单抗识别的位点位于 Cor h 1 的 N 端第 120~126 位氨基酸。Western blot 清楚检测到 5F2 和 1G4 单抗与 Ch0 有反应而不与 Ch1、Ch2、Ch3 反应, 出现此结果的原因可能是 Ch1、Ch2、Ch3 三个截短体破坏了抗原表位, 也有可能某个融合蛋白并未表达所致。因此为了进一步明确抗体的抗原表位区域,

本研究结合 DNASTar 软件对 Cor h 1 抗原表位的预测分析, 从而确定这两株单抗识别的 Cor h 1 抗原表位区域为第 43~52 位氨基酸。

平榛主要过敏原 Cor h 1 单克隆抗体抗原识别表位区域的确定, 可以为榛子食品检测所用双抗夹心 ELISA 选择配对抗体, 后续实验中可以尝试用 4G7 和 2H3 单抗与 5F2 和 1G4 单抗配对组合进行双抗夹心 ELISA 检测 Cor h 1, 建立食品中榛子过敏原水平的检测方法。同时本研究也为研究过敏原 Cor h 1 的结构与功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Skamstrup Hansen K, *et al.* Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105: 577–581.
- [2] Tariq SM, Stevens, M, Matthews S, *et al.* Cohort study of peanut and tree nut sensitisation by age of 4 years [J]. *BMJ*, 1996, 313: 514–517.
- [3] Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WA, *et al.* IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 110: 435–442.
- [4] Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, *et al.* Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109: 563–570.
- [5] Crespoa JF, James JM, Fernandez-Rodriguez C, *et al.* Food allergy: nuts and tree nuts [J]. *Brit J Nutr*, 2006, 96(2): 95–102.
- [6] Lauer I, Alessandri S, Pokoj S, *et al.* Expression and characterization of three important panallergens from hazelnut [J]. *Mol Nutr. Food Res*, 2008, 52, S262–S271.
- [7] Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106: 27–36.
- [8] Hirschwehr R, Valenta R, Ebner C, *et al.* Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, 90: 927–936.
- [9] Jahn-Schmid B, Radakovics A, Lüttkopf D, *et al.* Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆ is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food Allergens [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116: 213–219.
- [10] Bohle B, Radakovics A, Lüttkopf D, *et al.* Characterization of the T cell response to the major hazelnut allergen, Cor a1.04: evidence for a relevant T cell epitope not cross-reactive with homologous pollen allergens [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35: 1392–1399.
- [11] 莫绪成, 吴序栋, 刘志刚. 平榛主要过敏原 Cor h 1 的克隆表达、纯化及免疫学鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2009, 25(2): 187–190.
- [12] Cornelisse-Vermaat JR, Voordouw J, Yiakoumaki V, *et al.* Food-allergic consumers labelling preferences: a cross-cultural comparison [J]. *Eur J Public Health*, 2008, 18(2): 115–120.
- [13] Taylor SL, Hefle SL. Food allergen labeling in the USA and Europe [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006, 6: 186–190.
- [14] Niemann L, Taylor SL, Hefle SL. Detection of Walnut Residues in Foods Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [J]. *Inst Food Technol*, 2009, 74(6): 51–57.
- [15] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment [J]. *Annu Rev Med*, 2009, 60: 261–277.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



赵郭存, 男, 硕士生, 主要从事食物过敏反应与免疫学方面研究。

E-mail: zhaoguocun8564@163.com



刘志刚, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事变态反应学研究。

E-mail: lzg@szu.edu.cn