



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110531060 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201910825809.0

(22)申请日 2019.09.03

(71)申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区长
江路600号(72)发明人 张英华 于鑫欣 赵钧晗 张钋
徐晓娟 殷佳艺

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

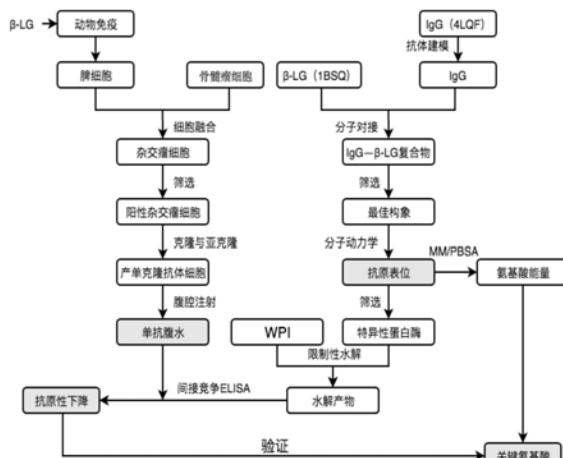
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54)发明名称

一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法

(57)摘要

本发明涉及一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法，属于乳制品加工技术领域。本申请利用分子模拟结合酶水解的方法靶向定位修饰 β -乳球蛋白，以降低其致敏性。采用分子对接将 β -乳球蛋白与IgG抗体进行对接，之后采用分子动力学优化对接复合物的结构，得到 β -乳球蛋白分子的关键抗原表位，采用地衣芽孢杆菌蛋白酶对G1n155关键氨基酸进行靶向修饰，有效降低 β -乳球蛋白的抗原活性，实现靶向修饰降低 β -乳球蛋白致敏性这一目标。



1. 一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法，其特征在于，该方法包括以下步骤：(1) 分子对接，使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模，实现抗体互补决定簇优化；(2) 分子动力学，对复合物进行分子动力学优化；(3) 能量分析，对复合物进行能量分解分析，确定 β -乳球蛋白的关键抗原位点；(4) 特异性酶水解，选取五种特异性蛋白酶：地衣芽孢杆菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、葡萄球菌蛋白酶、胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶，别对 β -乳球蛋白进行水解修饰，采用间接竞争酶联免疫法测定水解产物中抗原含量，根据 β -乳球蛋白的抗原活性降低程度选择水解酶。

2. 根据权利要求1所述的一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法，其特征在于，所述的优化后的IgG抗体模型的抗体互补决定簇为A26-A37、A55-A57、A95-A102、B250-B254、B270-B275、B317-B324。

3. 根据权利要求1所述的一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法，其特征在于，所述的 β -乳球蛋白的模拟抗原表位为Tyr20、Gln35、Arg40、Pro126、Glu127、Asp130、Phe151、Asn152、Pro153、Thr154、Gln155、Glu157、Hie161和Ile162。

4. 根据权利要求1所述的一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法，其特征在于，所述的 β -乳球蛋白的关键抗原位点为Phe151～Glu157。

5. 根据权利要求1所述的一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法，其特征在于，所述的 β -乳球蛋白抗原表位的关键氨基酸为Gln155，使用地衣芽孢杆菌蛋白酶对Gln155关键氨基酸进行靶向修饰，有效降低 β -乳球蛋白的抗原活性，实现靶向修饰降低 β -乳球蛋白致敏性这一目标。

一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法

技术领域

[0001] 本发明属于乳制品加工技术领域,主要涉及一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法。

背景技术

[0002] 牛乳的营养价值丰富,乳脂肪中的短链脂肪酸易于人体吸收,同时乳蛋白是一种优质蛋白质,富含人体所需的一切必需氨基酸。然而,一些婴幼儿在食用牛乳及乳制品之后会出现牛乳蛋白过敏反应。全世界大约2%的新生儿在出生后第一年表现出对牛乳的过敏反应,且有21%的患者在16岁之后仍会对牛乳表现出过敏反应,虽然过敏现象会随着年龄的增长而减少,但是婴幼儿不可避免的会在缺乏母乳的情况下选择进食牛乳,因此对于低致敏性乳品的开发受到了广泛的关注。而牛乳与人乳中的乳蛋白组成具有显著差异,人乳蛋白中几乎不含 β -乳球蛋白(β -LG),牛乳中 β -乳球蛋白却是牛乳清蛋白的主要成分,约占乳清蛋白的50%,且 β -乳球蛋白是引起牛乳过敏的主要过敏原,为保证婴幼儿食品安全,降低 β -乳球蛋白的致敏性尤为重要。

[0003] 抗原表位是过敏原致敏性的关键位点,分析表位可以揭示抗原与抗体结合反应的本质,有助于更深入地了解过敏原在食物过敏反应中的作用。以此为基础,确定可作为 β -乳球蛋白分子脱敏修饰的靶点。本申请利用分子对接技术,根据晶体结构信息,将 β -乳球蛋白与IgG抗体进行对接,利用分子动力学对复合物构象进行结构优化,以确定 β -乳球蛋白的抗原表位及相互作用力,借助分析复合物主要的能量组成以及活性位点的关键氨基酸。选取具有固定酶切位点的蛋白酶对 β -乳球蛋白进行水解修饰,制备 β -乳球蛋白单克隆抗体,以间接竞争酶联免疫法检测相同水解度下不同蛋白酶处理对产物抗原性的影响,用以验证 β -乳球蛋白活性位点的关键氨基酸。

发明内容

[0004] 本发明的目的是,为了有效降低乳清蛋白的致敏性,采用计算机模拟的方法,将 β -乳球蛋白分子与抗体分子进行对接后,从分子水平模拟确定 β -乳球蛋白的抗原表位以及关键氨基酸,并以此为基础,确定可作为 β -乳球蛋白分子脱敏修饰的靶点,选择合适的水解酶作用 β -乳球蛋白,最终达到有效降低 β -乳球蛋白抗原性目,研究成果对揭示致敏性本质具有重要的理论意义,对指导开发低致敏型乳蛋白配料,具有重要的社会意义和实用价值,研究成果服务于提升行业科技水平,为食品行业发展提供技术支撑。

[0005] 本发明的产品及制备方法如下:

[0006] 一种利用靶向定位结合酶水解降低 β -乳球蛋白致敏性的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:(1)分子对接,使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模,实现抗体互补决定簇优化;(2)分子动力学,对复合物进行分子动力学优化;(3)能量分析,对复合物进行能量分解分析,确定 β -乳球蛋白的关键抗原位点;(4)特异性酶水解,选取五种特异性蛋白酶:地衣芽孢杆菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、葡萄球菌蛋白酶、胰蛋白酶和嗜热菌蛋白

酶分,别对β-乳球蛋白进行水解修饰,采用间接竞争酶联免疫法测定水解产物中抗原含量,根据β-乳球蛋白的抗原活性降低程度选择水解酶。

[0007] 所述的优化后的IgG抗体模型的抗体互补决定簇为A26-A37、A55-A57、A95-A102、B250-B254、B270-B275、B317-B324。

[0008] 所述的β-乳球蛋白的模拟抗原表位为Tyr20、Gln35、Arg40、Pro126、Glu127、Asp130、Phe151、Asn152、Pro153、Thr154、Gln155、Glu157、Ile161和Ile162。

[0009] 所述的β-乳球蛋白的关键抗原位点为Phe151～Glu157。

[0010] 所述的β-乳球蛋白抗原表位的关键氨基酸为Gln155,使用地衣芽孢杆菌蛋白酶对Gln155关键氨基酸进行靶向修饰,有效降低β-乳球蛋白的抗原活性,实现靶向修饰降低β-乳球蛋白致敏性这一目标。

[0011] 本发明最终产品内容物特点:获得将乳蛋白的β-乳球蛋白抗原活性降低90%以上的修饰产物。

附图说明

[0012] 图1是本发明的工艺流程图;

[0013] 图2是β-乳球蛋白氨基酸残基自由能分解直方图;

[0014] 图3是不同蛋白酶水解产物的抗原活性图。

具体实施方式

[0015] 下面结合附图来对具体实施例来进一步描述。

[0016] 一种利用靶向定位结合酶水解降低β-乳球蛋白致敏性的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:(1)分子对接,使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模,实现抗体互补决定簇优化;(2)分子动力学,对复合物进行分子动力学优化;(3)能量分析,对复合物进行能量分解分析,确定β-乳球蛋白的关键抗原位点;(4)特异性酶水解,选取五种特异性蛋白酶:地衣芽孢杆菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、葡萄球菌蛋白酶、胰蛋白酶和嗜热菌蛋白酶分,别对β-乳球蛋白进行水解修饰,采用间接竞争酶联免疫法测定水解产物中抗原含量,根据β-乳球蛋白的抗原活性降低程度选择水解酶。

[0017] 所述的优化后的IgG抗体模型的抗体互补决定簇为A26-A37、A55-A57、A95-A102、B250-B254、B270-B275、B317-B324。

[0018] 所述的β-乳球蛋白的模拟抗原表位为Tyr20、Gln35、Arg40、Pro126、Glu127、Asp130、Phe151、Asn152、Pro153、Thr154、Gln155、Glu157、Ile161和Ile162。

[0019] 所述的β-乳球蛋白的关键抗原位点为Phe151～Glu157。

[0020] 所述的β-乳球蛋白抗原表位的关键氨基酸为Gln155,使用地衣芽孢杆菌蛋白酶对Gln155关键氨基酸进行靶向修饰,有效降低β-乳球蛋白的抗原活性,实现靶向修饰降低β-乳球蛋白致敏性这一目标。

[0021] 实施例1

[0022] (1)分子对接,使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模,实现抗体互补决定簇优化。

[0023] (2)分子动力学,对复合物进行分子动力学优化。

- [0024] (3) 能量分析,对复合物进行能量分解分析,确定β-乳球蛋白的关键抗原位点。
- [0025] (4) 特异性酶水解,选取地衣芽孢杆菌蛋白酶对β-乳球蛋白进行水解修饰,采用间接竞争ELISA法测定水解产物中抗原含量。
- [0026] 实施例2
- [0027] (1) 分子对接,使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模,实现抗体互补决定簇优化。
- [0028] (2) 分子动力学,对复合物进行分子动力学优化。
- [0029] (3) 能量分析,对复合物进行能量分解分析,确定β-乳球蛋白的关键抗原位点。
- [0030] (4) 特异性酶水解,选取胰凝乳蛋白酶对β-乳球蛋白进行水解修饰,采用间接竞争ELISA法测定水解产物中抗原含量。
- [0031] 实施例3
- [0032] (1) 分子对接,使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模,实现抗体互补决定簇优化。
- [0033] (2) 分子动力学,对复合物进行分子动力学优化。
- [0034] (3) 能量分析,对复合物进行能量分解分析,确定β-乳球蛋白的关键抗原位点。
- [0035] (4) 特异性酶水解,选取葡萄球菌蛋白酶对β-乳球蛋白进行水解修饰,采用间接竞争ELISA法测定水解产物中抗原含量。
- [0036] 实施例4
- [0037] (1) 分子对接,使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模,实现抗体互补决定簇优化。
- [0038] (2) 分子动力学,对复合物进行分子动力学优化。
- [0039] (3) 能量分析,对复合物进行能量分解分析,确定β-乳球蛋白的关键抗原位点。
- [0040] (4) 特异性酶水解,选取胰蛋白酶对β-乳球蛋白进行水解修饰,采用间接竞争ELISA法测定水解产物中抗原含量。
- [0041] 实施例5
- [0042] (1) 分子对接,使用抗体建模模块进行免疫球蛋白IgG抗体建模,实现抗体互补决定簇优化。
- [0043] (2) 分子动力学,对复合物进行分子动力学优化。
- [0044] (3) 能量分析,对复合物进行能量分解分析,确定β-乳球蛋白的关键抗原位点。
- [0045] (4) 特异性酶水解,选取嗜热菌蛋白酶对β-乳球蛋白进行水解修饰,采用间接竞争ELISA法测定水解产物中抗原含量。

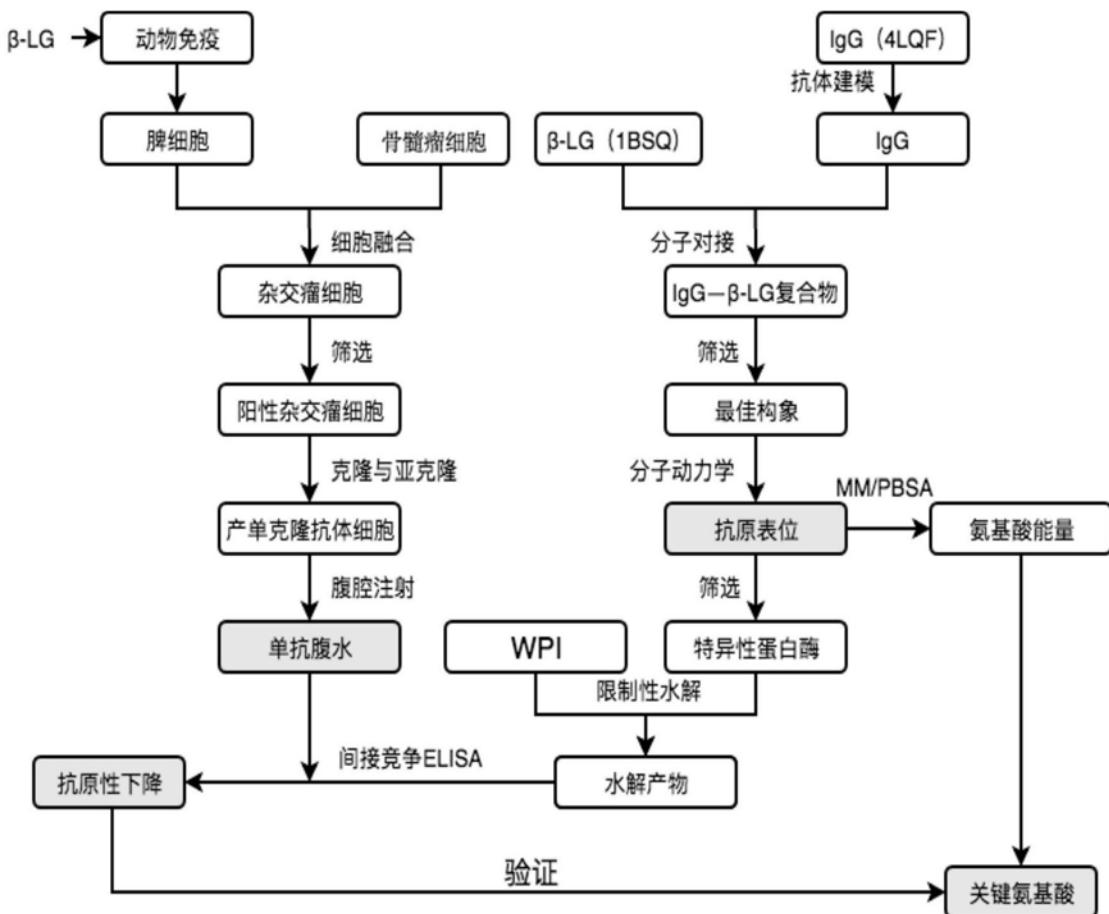


图1

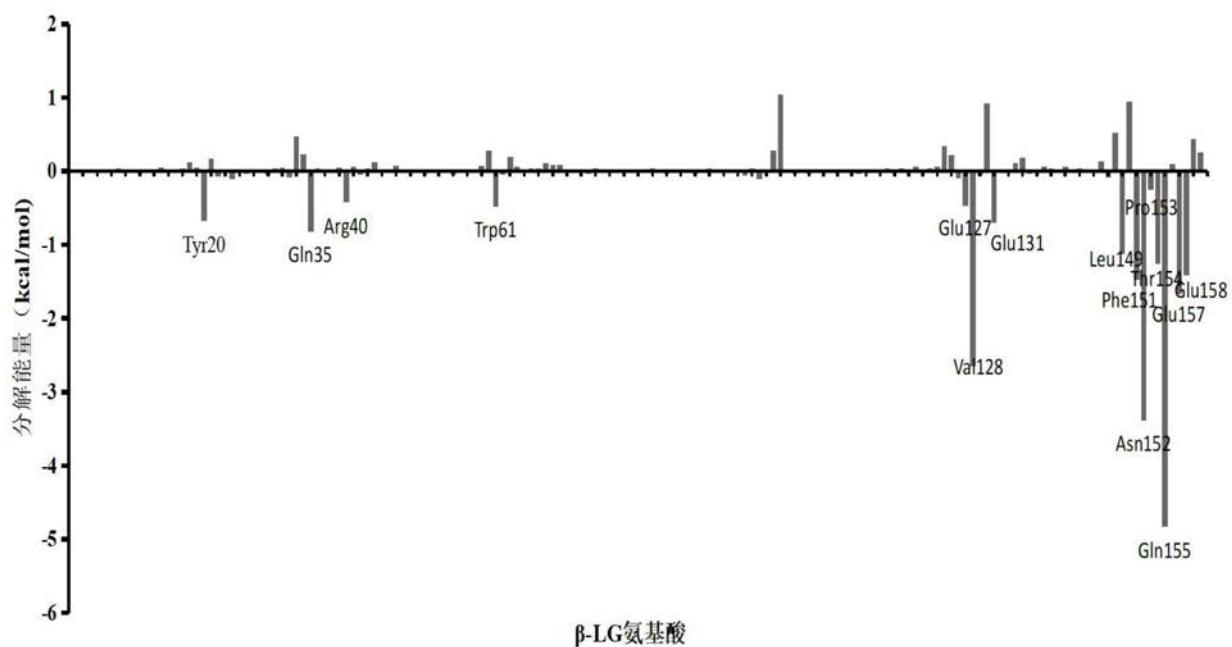


图2

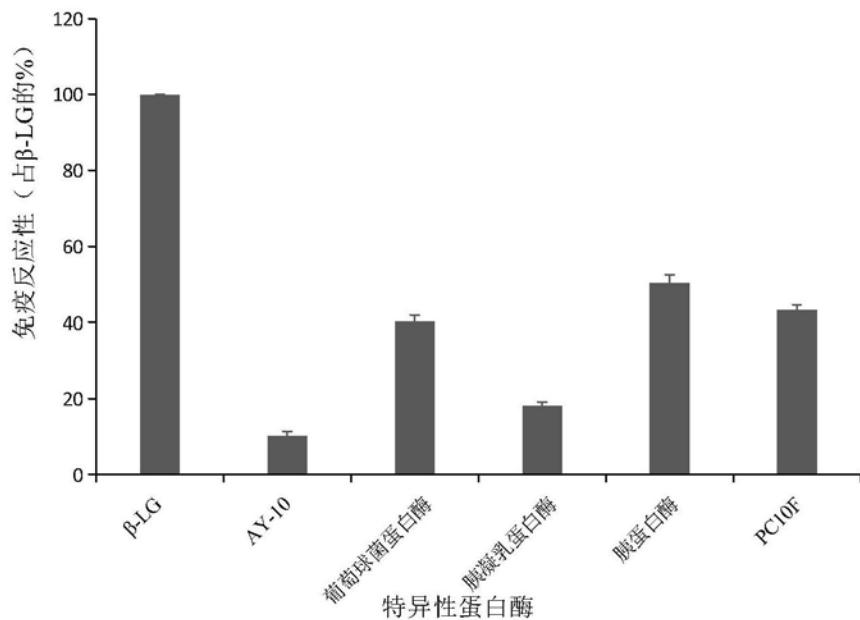


图3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种利用靶向定位结合酶水解降低β-乳球蛋白致敏性的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN110531060A | 公开(公告)日 | 2019-12-03 |
| 申请号 | CN201910825809.0 | 申请日 | 2019-09-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 东北农业大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 东北农业大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 东北农业大学 | | |
| [标]发明人 | 张英华 于鑫欣 张钋 徐晓娟 殷佳艺 | | |
| 发明人 | 张英华 于鑫欣 赵钧晗 张钋 徐晓娟 殷佳艺 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N33/53 | | |
| 外部链接 | Espacenet Sipo | | |

摘要(译)

本发明涉及一种利用靶向定位结合酶水解降低β-乳球蛋白致敏性的方法，属于乳制品加工技术领域。本申请利用分子模拟结合酶水解的方法靶向定位修饰β-乳球蛋白，以降低其致敏性。采用分子对接将β-乳球蛋白与IgG抗体进行对接，之后采用分子动力学优化对接复合物的结构，得到β-乳球蛋白分子的关键抗原表位，采用地衣芽孢杆菌蛋白酶对Gln155关键氨基酸进行靶向修饰，有效降低β-乳球蛋白的抗原活性，实现靶向修饰降低β-乳球蛋白致敏性这一目标。

