

筛查黑水虻昆虫蛋白中潜在过敏原的工作流程

Li Yan Chan, Lee A. Gethings, Sarah Lennon, Cameron S. Richards

Waters Corporation, AgriProtein

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

随着人类不断寻找可持续的食物源，替代蛋白(alternative protein)作为一个新兴主题应运而生。然而，这些新型食品及其相关成分的安全性，以及食用它们后引发过敏反应而带来的潜在健康风险，仍然是备受人们关注的问题。本应用简报介绍了一种结合LC-MS系统（ACQUITY UPLC M-Class和 SYNAPT XS质谱仪）与Progenesis QI信息学软件筛查黑水虻昆虫蛋白中潜在过敏的简单工作流程。在检测到的47种蛋白质中，21种具有强致敏证据，9种具有弱致敏证据，还有17种没有致敏证据并被特别标注。该工作流程简单直观，对其他类型需要接受致敏风险评估的新型食品同样适用。

优势

- 一种简单易操作的工作流程，可用于筛查昆虫蛋白中的过敏原
- ProteinWorks提供了一种使用试剂盒酶解蛋白质的简单方法
- 蛋白质组学数据分析软件Progenesis QI中的引导式菜单可协助用户无缝完成数据处理各个阶段的工作

简介

随着全球人口增加和人们对可持续食物源的需求增大，昆虫成为了一种很有前景的蛋白质替代来源。全球大量生产动物性食品，不仅向空气、水和土壤中排放废弃物，而且占用大量自然资源，给环境造成了巨大压力。预计到2050年，主流蛋白的生产需求将增加50%，然而，目前85%的耕地都已投入使用。昆虫养殖所需的土地远少于主流动物源食品。此外，昆虫还可以从人类不能食用或不愿食用的生物质中回收营养物质，将它们带回食品价值链，从而为循环经济做出贡献¹。诸如黑水虻(BSF)的昆虫物种非常适合大规模养殖，也是废物增值的理想选择之一。此外，已知BSF蛋白含有高水平的必需氨基酸，而且铁、钙和锌等微量营养素的生物利用度较高，与牛肉相当²。尽管如此，这种新型食品的安全性以及潜在的健康风险（包括与食用它们相关的过敏反应）仍然是备受人们关注的问题。食物过敏原主要是蛋白质。作为密切相关的两个物种，昆虫与其他无脊椎动物（如甲壳类动物和软体动物）之间可能存在交叉反应性。已发现原肌球蛋白、肌球蛋白和精氨酸激酶是甲壳类动物和昆虫之间具有交叉反应性的主要过敏原³。因此，对贝类过敏的消费者很可能也对昆虫过敏。所以解决这些问题，建立消费者对替代蛋白的消费信心十分重要⁴。评估含有蛋白质的新型食品时，应默认假设它们具有潜在致敏性。应考虑新型食品的成分（尤其是其蛋白质）、来源（包括分类关系）、生产工艺以及现有实验数据和人类数据（包括交叉反应性信息），研究它们的潜在致敏性。这就需要开展全面的文献回顾，检索有关致敏性的可用信息以及过敏反应的病例报告，并辅以分析化学手段来表征新型蛋白的过敏成分。

本应用简报使用BSF蛋白开展案例研究，展示了一种以非靶向方式筛查新型蛋白中潜在过敏原的分析工作流程。

结果与讨论

使用图1总结的示意工作流程分析两个不同的BSF蛋白批次，每个样品重复进样三次。

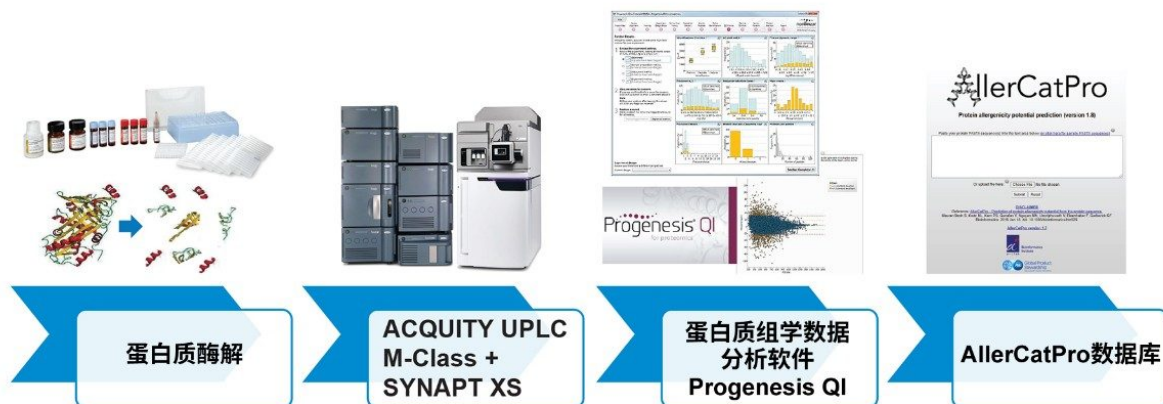


图1.BSF过敏原筛查工作流程示意图。

BSF蛋白溶液的提取遵循ProteinWorks Auto-eXpress Low快速酶解试剂盒（部件号：[176004078 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/176004078-proteinworks-auto-express-low-5-digest-kit.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/application-kits/176004078-proteinworks-auto-express-low-5-digest-kit.html)）5步方案，胰蛋白酶酶解在37 °C下过夜进行，而非ProteinWorks方案建议的45 °C下酶解2 h。接下来，用97/3/0.1的水/乙腈/甲酸将上清液稀释10倍，供UDMS^E采集使用。

使用配备nanoEase M/Z HSS T3色谱柱, 100 Å, 1.8 μm, 75 μm x 250 mm（部件号：[186008818 < https://www.waters.com/nextgen/global/search.html?keyword=186008818&sort=most-relevant>](https://www.waters.com/nextgen/global/search.html?keyword=186008818&sort=most-relevant)）和SYNAPT XS质谱仪的ACQUITY UPLC M-Class系统进行分析。在UDMS^E采集模式下，以正离子模式采集数据。代表性的提取离子流色谱图如图2所示。

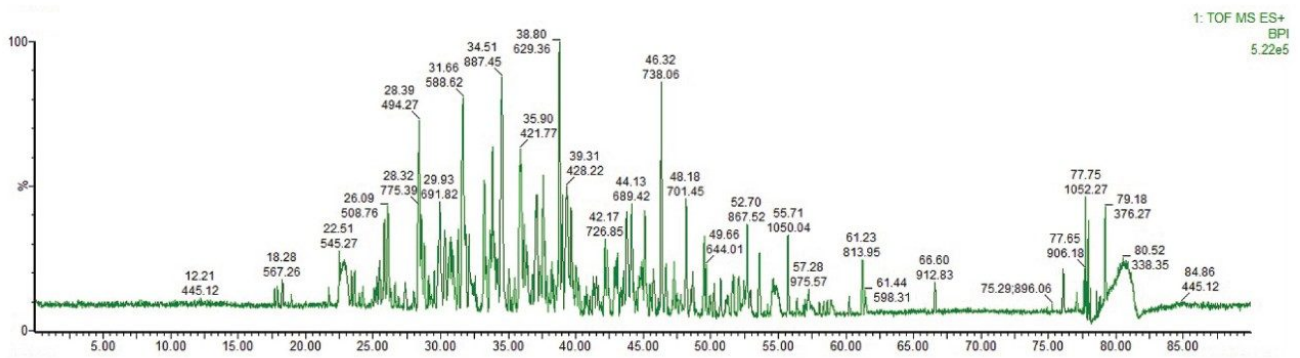


图2. *BSF*蛋白酶解物的代表性BPI色谱图。

将原始数据导入蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1，自动执行色谱对齐、数据归一化和峰提取。使用Ion Accounting鉴定工作流程总共鉴定出2,473种肽，工作流程的设置如下：FDR小于1%、固定修饰（半胱氨酸脲甲基化）和可变修饰（甲硫氨酸氧化）、使用经过审查的*Insecta*和*Hermetia illucens* UniProt数据库。

在蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1中，用户可基于已识别的肽，直观且方便地审查选定蛋白质。例如，肌钙蛋白各个肽离子的特性如图3所示，用户可通过标记任意异常值来进一步细化鉴定结果。经审查，共筛查出47种蛋白质。

Accession: [P47949](#)

Description: Troponin C_ isoform 3 OS=Drosophila melanogaster OX=7227 GN=TpnC73F PE=2 SV=2

No filter applied

Abundance	m/z	Charge	Retention Time (mins)	Mass error (ppm)	Drift time (ms)	Peptide Sequence	Modifications
372.9	705.3345	2	39.865	-0.04	6.39	FIVEEDAEMQK	
1395	937.4725	2	51.096	-0.66	8.18	ILEELIEVDEDKSGR	
5330	676.3671	2	55.782	0.94	6.48	LEFGFVQLAAK	
3504	787.3967	2	54.531	1.13	7.16	ILEELIEVDEDK	
3067	713.3338	2	39.162	2.58	6.56	FIVEEDAEMQK	[10] Oxidation M
2669	468.2381	2	36.321	3.77	4.77	LMGQPFDK	
3052	625.3208	3	51.096	4.80	5.80	ILEELIEVDEDKSGR	

图3.基于肽测定结果审查蛋白质（以肌钙蛋白为例）。

AllerCatPro⁵是一款可以在线免费使用的综合模型，它联合五大数据库（IUIS、UniProtKB、Allergome、COMPARE和FARRP）来预测蛋白质的潜在致敏性。以FASTA格式提交筛查出的47种蛋白质后，得到一张结果输

出表，表中按强、弱或无致敏证据的顺序对每种蛋白质排序。在检测到的47种蛋白质中，21种具有强致敏证据，9种具有弱致敏证据，还有17种没有致敏证据并被特别标注。

A

B

AllerCatPro Results

Protein	Sequence Length	Gluten allergens (# of G-repeats)	# of 3x6-mar overlaps	Known allergenic proteins				Result	Comment	% identity of closest human hit
				# hits	Dest hit protein name	Species	% identity, linear (E-value threshold 0.001)			
NP60197.UBI-Q_C25CA Ubiquitin C5=Ceratitis copitata OS=2112 PE=1.5941	76	0	0	0	No significant hit (E-value threshold 0.001)	-	-	-	no hits	-
YP044119.2GSASAI192209_HICDE VATTIPAE SUBUNT A OS=Hemelia ilicovae CX=343691 PE=2-SV-1	615	0	-	0	No significant hit (E-value threshold 0.001)	-	-	-	no hits	-
NP61957.NAS_VE5MA Vexom allergen 5 OS=Vespa manducaria OS=1489 PE=1.5917	202	0	-	01	Vexp m 5	Vespa manducaria	100.0	100.0	3309-23 3309-23	33sep >90%
NP84294.ZOPAT_DROSI Zinc finger COCH type with G patch domain-containing protein OS=Drosophila sim	513	0	-	0	No significant hit (E-value threshold 0.001)	-	-	-	no hits	-

Quantified result as counts separated table (can also be opened in Excel)

Summary result (Model 1.0 vs 1.1)	
strong evidence	14 (25.0%)
weak evidence	0 (0.0%)
no evidence	34 (75.0%)
no hits	3
3Dsep >90%	1

图4.A.以FASTA格式提交目标蛋白质的AllerCatPro界面；B.结果输出表。

表1汇总了强、弱或无致敏证据的蛋白质。BSF蛋白中检出的原肌球蛋白、肌球蛋白和精氨酸激酶是已知在甲壳类动物和昆虫之间具有交叉反应性的主要过敏原⁵。如果发现潜在致敏危害，应针对新型食品和/或其来源开展体外致敏性研究，以做进一步调查。

S/N	蛋白质登录号	蛋白质标识符	结果
1	P92177	I433E_DROME	没有致敏证据
2	Q9W334	RS28_DROME	没有致敏证据
3	Q11212	ACT_SPOLI	强致敏证据
4	P45891	ACTY_DROME	强致敏证据
5	Q7PQV7	ADT2_ANOGA	没有致敏证据
6	P39674	MAG29_DERFA	强致敏证据
7	O61367	KARG_APIIME	强致敏证据
8	P14296	ARYA_MANSE	弱致敏证据
9	P35381	ATPA_DROME	没有致敏证据
10	A0A411NQA0	A0A411NQA0_HERIL	强致敏证据
11	P62154	CALM_LOCFMI	弱致敏证据
12	P45594	CADF_DROME	强致敏证据
13	Q9V4N3	CYB5_DROME	没有致敏证据
14	W5U4X3	W5U4X3_HERIL	没有致敏证据
15	Q9W1C9	PEB3_DROME	弱致敏证据
16	P84315	EF1A_HELVI	没有致敏证据
17	P29844	BIP_DROME	强致敏证据
18	P07764	ALF_DROME	强致敏证据
19	K7YXZ5	K7YXZ5_HERIL	没有致敏证据
20	O18598	GST1_BLAGE	强致敏证据
21	A0A411NQF0	A0A411NQF0_HERIL	弱致敏证据
22	A0A1Z2RU94	A0A1Z2RU94_HERIL	强致敏证据
23	P21896	H2A_CHITH	没有致敏证据
24	B4HSL3	LIS1_DROSE	弱致敏证据
25	P02825	HSP71_DROME	强致敏证据
26	Q24400	MLP2_DROME	没有致敏证据
27	P14318	MP20_DROME	没有致敏证据
28	P05661	MYSA_DROME	强致敏证据
29	B4NSP6	PYM_DROSI	强致敏证据
30	P54399	PDI_DROME	弱致敏证据
31	Q9W141	ATPK_DROME	没有致敏证据
32	A0A5Q0TX36	A0A5Q0TX36_HERIL	没有致敏证据
33	P51123	TAF1_DROME	强致敏证据
34	Q06DK3	TMA7_ANOFN	没有致敏证据
35	K7Z7M5	K7Z7M5_HERIL	弱致敏证据
36	P31816	TPM_LOCFMI	强致敏证据
37	C5J049	TPM03_PERAM	强致敏证据
38	Q1HPU0	TPM1_BOMMO	强致敏证据
39	Q1HPQ0	TPM2_BOMMO	强致敏证据
40	P47949	TNNC3_DROME	强致敏证据
41	E5LCR8	E5LCR8_HERIL	弱致敏证据
42	Q8WQ47	TBA_LEPDS	强致敏证据
43	A0A411NQC2	A0A411NQC2_HERIL	弱致敏证据
44	P68197	UBIQ_CERCA	没有致敏证据
45	A0A411NQB8	A0A411NQB8_HERIL	没有致敏证据
46	P81657	VA5_VESMA	强致敏证据
47	B4Q8A7	ZGPAT_DROSI	没有致敏证据

表1.提交至AllerCatPro的47种蛋白质的结果概览。

结论

综上，本研究展示了一种筛查BSF蛋白中潜在过敏原的工作流程。新型食品及其成分的食品安全风险评估不仅是许多地区的监管要求，也是解决消费者担忧，建立消费者对替代蛋白的消费信心的一个重要步骤。该工作流程十分直观，对其他类型的新型替代蛋白同样适用。

致谢

本研究是沃特世国际食品与饮用水研究中心（IFWRC，新加坡）与AgriProtein Singapore合作项目的一部分。作者在此感谢昆虫技术团队提供BSF样品和昆虫蛋白领域的专业知识。

参考资料

1. Parodi A, Leip A, De Boer I J M, Slegers P M, Ziegler F, Temme E H M, Herrero M, Tuomisto H, Valin H, Van Middelaar C E, Van Loon J J A, Van Zanten H H E. The Potential of Future Foods for Sustainable and Healthy Diets. *Nat Sustain*, 2018, 1, 782–789.
2. Wang Y-S, Shelomi M. Review of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) As Animal Feed and Human Food. *Foods*, 2017, 6, 91.
3. Romero M R, Claydon A J, Fitches E C, Wakefield M E, Charlton A J. Sequence Homology of the Fly Proteins Tropomyosin, Arginine Kinase and Myosin Light Chain with Known Allergens in Invertebrates. *J Insects as Food Feed*, 2016, 2, 69–81.
4. Pali-Schöell I, Verhoeckx K, Mafra I, Bavaro S L Mills E N C, Monaci L. Allergenic and Novel Food Proteins: State of the Art and Challenges in the Allergenicity Assessment. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 84, 45–48.
5. Maurer-Stroh S, Krutz N L, Kern P S, Gunalan V, Nguyen M N, Limviphuvadh V, Eisenhaber F, Gerberick G F. Allercatpro-Prediction of Protein Allergenicity Potential from the Protein Sequence. *Bioinformatics*, 2019, 35, 3020–3027.

特色产品

ACQUITY UPLC M-Class系统 <<https://www.waters.com/134776759>>

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>>

蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134790665>>

720007491ZH, 2022年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号