

食物过敏原构象性表位鉴别的研究进展

李欣^{1,2}, 陈红兵^{1,3,*}

(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.南昌大学生命科学与食品工程学院食品系, 江西 南昌 330047; 3.南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 构象性表位是表位的重要组成部分之一, 在过敏反应中起重要作用。表位定位工作是过敏原研究的重要领域。目前应用于构象性表位研究的方法主要有3类: 基于线性表位的氨基酸组成和特性预测构象性表位; 利用噬菌体筛选得到模拟肽, 通过生物信息学定位构象性表位以及利用光谱学等方法测定构象性表位与抗体结合的相关参数确定构象型表位。前两种方法比较常用, 而光谱学方法是近年来发展的一种新方法, 准确性更高。这3类定位方法可为过敏原的研究提供认识和了解构象性表位的途径, 并为构象性表位在过敏中的作用机制提供部分理论依据。

关键词: 食物过敏原; 构象性表位; 定位

Research Progress in Conformational Epitope Mapping Approaches for Food Allergens

LI Xin^{1,2}, CHEN Hong-bing^{1,3,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. Department of Food Science, School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
3. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Conformational epitope is an important type of epitope and plays a critical role in allergy. Epitope mapping is the core of allergen research. Today, there are three main conformational epitope mapping approaches, including conformational epitope prediction based on the amino acid composition and characteristics of linear epitopes, epitope mapping by phage display technique and bioinformatics, and conformational epitope mapping by spectroscopic analysis and parameters related to coupling with antibodies. The first two approaches are commonly used in conformational epitope mapping. As a more accurate approach, spectroscopy has not been used in this field until recently. These approaches allow for a better knowledge and understanding of conformational epitopes in allergen research and also provide theoretical evidence for the mechanisms of action of conformational epitopes in allergy.

Key words: food allergen; conformational epitope; mapping

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)17-0279-05

表位是过敏反应的物质基础。表位根据结构的不同, 可分为线性表位(连续性表位)和构象性表位(不连续表位)。线性表位是指过敏原中能与抗体结合的连续氨基酸序列, 一般由5~7个氨基酸组成; 构象性表位可由分布于肽链不同部位或不同肽链的15~22个氨基酸构成。有研究报道^[1]表明, 在天然状态下, 过敏原蛋白有90%以上的表位为构象性表位, 而且有些线性表位是构象性表位的组成部分, 这说明构象性表位在过敏原表位中占绝对优势。表位定位工作是过敏原研究的基础, 其中构象性表位定位涉及到氨基酸序列在空间的排布,

收稿日期: 2011-08-30

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0704); 国家自然科学基金项目(30860220);

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室目标导向项目(SKLF-MB-201002);

南昌大学食品科学与技术重点实验室青年骨干基金项目(SKLF-QN-201112)

作者简介: 李欣(1980—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: zhizilixin@hotmail.com

* 通信作者: 陈红兵(1967—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: chbgjy@hotmail.com

研究构象性表位的方法必须能够分析蛋白结构或相互作用。对3类构象性定位方法及应用进行详细阐述, 期望为食物过敏原的构象性表位研究提供理论指导。

1 基于线性表位预测的构象性表位定位

在合成肽技术发展的基础上, 将线性表位对应的氨基酸序列进行构象性模拟, 再通过氨基酸突变, 可以预测构象性表位的结合位点, 达到构象性表位定位的目的。据Barre等^[2]研究报道, 将花生主要过敏原Ara h 2的线性表位通过计算机模拟, 可得到它的构象性表位,

但发现获得的表位与其他 2S 蛋白过敏原的相应结构没有同源性,推测定位到的构象性表位不是它们之间发生交叉反应的共有表位。2009 年, Rougé 等^[3]则对花生另一过敏原 Ara h 3 的 8 个线性结合表位进行空间模拟转换,并确定它们均为构象性表位,其中 2 个表位 AA49~63 和 AA37~357 与坚果和豆类过敏原同源性较高,推测这 2 个表位是发生交叉反应的物质基础。Midoro-Horiuti 等^[4]将雪松过敏原 Jun a 1 的合成肽,分别与抗日本雪松过敏原 Cry j 1 的人血清和单抗进行免疫学反应,确定了来源不同的 2 个过敏原的共有和独特型的构象性表位,可为独特异型疫苗的开发提供设计思路。另外, López-Torrejón 等^[5]研究表明,通过斑点印迹定位出甜瓜过敏原 Cuc m 2 的 2 个主要线性表位和 2 个次要线性表位,以溶剂的排斥表面(solvent-exclude surface, SES)和静电势(possion-blottzmann, PB)为参数,确定 2 个主要线性表位也是构成构象性表位组成成分。通过以上报道我们发现基于线性表位得到的构象性表位均是通过生物信息学预测出来,其有效性还需进一步的验证。

2 噬菌体随机肽模拟构象性表位

1985 年 Smith^[6]首次将外源基因插入丝状噬菌体 f1 的基因 III 中,发展了噬菌体展示技术。该方法通过特异性的靶分子从噬菌体环肽库中筛选出模拟构象性表位的阳性克隆子,将其所展示的氨基酸序列为模板,结合目标过敏原蛋白的三维结构,利用生物信息学方法定位过敏原构象性表位。利用该方法定位构象性表位已有一些研究成果。早在 1998 年 Leitner 等^[7]研究花粉的交叉反应时,将环九肽库和九肽库混合,依次用抗艾蒿、桦树花粉、芹菜和艾蒿作为抗体对混合抗体库进行亲和淘选,获得 8 个阳性克隆子,其中 5 个为同源序列,确定为构象性表位,并发现许多花粉过敏原均含有该结构域。2000 年,该课题组^[8]又利用对桦树花粉过敏的人 IgE 抗体淘选九肽库和环九肽库,获得 7 个阳性克隆子,选择 C_β 间距离小于 6 Å 的模拟表位,定位出 1 个 IgG 和 1 个 IgE 构象性表位。Hantusch 等^[9]在研究中通过噬菌体十肽库筛选,得到牧草花粉 Phl p 5 的 15 个模拟肽,并发现这些模拟肽对应的表位都位于蛋白的三维结构表面,认定是构象性表位的组成成分。马的虫螨有 2 个过敏原 Der p 1 和 Der p 2,通过噬菌体随机九肽库筛选,分别得到 5 和 4 个特异的阳性克隆子,通过计算机拟合对其进行相似性和表面可及性参数筛选,描绘出它们的空间位点^[10]。MPT64 蛋白是结核分枝杆菌的一种主要抗原,通过随机七肽库得到 2 个模拟表位,经序列比对,确定为 1 个线性表位,推测另 1 个为构象性表位^[11]。

在食物过敏原方面也有相关研究。Untersmayr 等^[12]

采用噬菌体环十肽库获得了鲤鱼主要过敏原小清蛋白 5 个模拟肽,它们与鲤鱼小清蛋白的 IgE 和 IgG 都能够特异性结合,进一步通过计算机模拟表位配对方法,发现这 5 个模拟肽为构象性表位,并且主要集中在 3 个结构域中,其中 1 个构象性表位的氨基酸序列与前期报道的鲑鱼小清蛋白的线性表位(AA33~44)结果一致。而针对桃子的 2 种过敏类型(口腔过敏综合征和系统症状),Pacios 等^[13]从十二肽库中淘选出桃子过敏原 Pru p 3 的构象性模拟肽,并以静电和溶剂可及性为参数依据,确定了 2 个构象性表位;在此基础上,2009 年该课题组^[14]又在研究 Pru p 3 和 Tri a 14(小麦同源蛋白中)交叉反应时,发现前两者有 1 个共同的构象性表位。Tordesillas 等^[15]则以人 IgE 为靶分子,从 12 肽库中筛选到 1 个 Profilins 家族过敏原 Cuc m 2 构象性模拟肽,并确认此模拟肽对应的构象性表位是与过敏原 Phl p 12、Bet v 2 存在交叉反应的基础。

利用噬菌体展示技术定位构象性表位需要有相应的生物信息学软件 and 与空间距离相关的算法进行构象模拟,目前已开发出以噬菌体展示技术筛选的数据定位构象性表位的软件。3DEX 软件(3D-Epitope-Explorer)就是为噬菌体展示技术的数据开发的一种软件,用该软件 HIV-1 的糖蛋白 gp120 采用噬菌体技术筛选的模拟表位进行定位,并通过 2 个已得到的构象性表位验证其有效性^[16]。网络服务器 MIMOX 是开发出的第一个以模拟表位信息为基础的免费软件^[17];而软件 Pepitope 是从一组模拟表位优化出最佳的构象性表^[18]。笔者分别通过这两种服务器对水牛乳和牛乳 β-乳球蛋白构象性表位进行定位,得到特异性较高的构象性表位。

3 光谱学方法表征构象性表位

前两种方法是基于表位序列对构象性表位进行定位,而光谱学方法是基于过敏原蛋白的三维结构中构象性表位位点及附近谱图的变化来定位构象性表位,获得的数据更准确。圆二色谱(circular dichroism, CD)、荧光光谱(fluorescence spectrum)、红外光谱(infrared spectrum)等已开始逐渐用于表位定位研究,尤其是应用于构象性表位研究更具优势。

3.1 圆二色谱

圆二色谱是研究蛋白质二级结构和蛋白构象变化的重要工具,也是研究手性分子的重要手段。圆二色谱技术目前有很广泛的应用范围,如研究有机分子的结构与相互作用、蛋白表面带电氨基酸残基对蛋白的稳定性的影响、不同条件下蛋白二级结构折叠状态的变化以及蛋白构象变化与生物活性关系等研究。如王静云等^[19]曾用赖氨酸取代肌红蛋白中第 44 位天冬氨酸残基,通过圆

二色谱研究发现其耐热变性能力增强;有研究^[20]表明,在不同 pH 值和温度条件下,采用圆二色谱测定小麦多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(PGIP)的构象变化时,发现 β -折叠与其生物活性相关;Zsila 等^[21]采用圆二色谱研究了 β -乳球蛋白与胡椒碱的相互作用;该方法还被应用于分析尘螨过敏原二级结构的分布特点^[22]。因此可知,圆二色谱可用于蛋白质表位的特征分析研究,二级结构组成的不同关系是否构成构象性表位。因此,通过圆二色谱分析过敏原蛋白质的二级结构,可为食物过敏原构象性表位确定提供参数。

3.2 荧光光谱方法

运用荧光光谱方法可以分析蛋白质的一级结构和高级结构以及分析蛋白质折叠/解折叠的过程。通过荧光光谱,不但可以做一般的定量分析,而且还可以推断蛋白质分子在各种环境下的构象变化,从而阐明蛋白质结构与功能之间的关系。在食物过敏研究中开展了一些工作,如 Koppelman 等^[23]研究不同温度条件下土豆过敏原 Sol t 1 与 IgE 结合位点的变化,结果表明 Sol t 1 与 IgE 结合的不稳定是由于过敏原与其他蛋白质形成聚合物,而不是本身变性造成的。荧光探针技术还用于研究蛋白质在水溶液中构象,可以测定蛋白质分子的疏水微区内两基团的距离以及酶与底物结合过程中蛋白质构象的变化等。此外,8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)是所用疏水探针中应用最广泛的一种,本实验室曾采用该荧光探针标记花生过敏原 Ara h 2,发现加工后的 Ara h 2 疏水性增强^[24]。疏水性的强弱影响到构象性表位的组成和亲和力变化,因此掌握过敏原表位疏水性有助于对过敏原构象性表位的解析。

3.3 傅里叶变换红外光谱

傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)以其高分辨率、高灵敏度、高信噪比等优点已用于蛋白质的热变性和化学变性后二级结构的分析。如 Yong 等^[25]曾用傅里叶变换红外光谱分析发现过敏原小麦谷蛋白的二级结构的改变可导致聚集能力的降低;Navarra 等^[26]研究了不同二价金属对 β -乳球蛋白的二级结构的影响;Rigby 等^[27]采用红外光谱结合圆二色谱研究了榛子中 3 个主要过敏原的折叠特点。以上研究工作表明,红外光谱在食物过敏原表位研究中具有潜在的应用价值。

3.4 核磁共振技术

传统的核磁共振技术仅是对蛋白质三维结构进行研究。它根据已确定的蛋白质分子的一级结构,通过对各种二维核磁共振图谱的比较和解析,在图谱上找到各个序列号氨基酸上的各种氢原子所对应的峰,从而确定蛋白质的三维结构。目前核磁共振技术用于表位定位是基于如下原理:由于抗原在结合抗体与不结合抗体时,其位点的氨基酸残基的动力学值不同,由此可以区分抗

原结合表位以及肽表位识别抗体的边界残基。如动力过滤法,利用同核 Hartmann-Hahn 谱(Homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy, HOHAHA)和旋转坐标系 NOE 谱(ROESY)的交叉峰,结合了抗体的残基有更宽的峰,表位外的残基与自由基团一样显示较窄的响应线;另外,测定表位及其周围残基的横向弛豫时间 T_2 , ^1H - ^{15}N NOE 和同核光谱 $T_{1\rho}$ 值,都可以根据绝对值的变化来区别是否是构成表位^[28]。橄榄树花粉的主要过敏原 Ole e 6 的三维结构采用核磁共振技术解析,并结合圆二色谱分析蛋白质的二级结构,推测出该蛋白表面可能有 5 个 IgE 结合表位^[29],Chan 等^[30]采用此技术得到尘螨过敏原 Der 13 的三维结构,再定点突变定位出 IgE 结合的构象性表位,可为低过敏原的开发提供指导。尘螨另一主要过敏原 Blot 5 中 IgE 结合表位 AA76~91 (ELKRTDLNILERFNIE)通过核磁共振技术确定了其中 4 个带电荷残基(Glu76、Asp81、Glu86 和 Glu91)为构象性表位的核心组成部分^[31]。同年,Naik 等^[32]研究热带无爪螨主要过敏原 Blo t 5 时,通过 TROSY-NMR 实验,确定了位于两个蛋白表面的 4 个结合残基 Asn46、Lys47、Lys54 和 Arg57。Padavattan 等^[33]在 2009 年确定了 Phl p 2 的 21 个残基中 9 个与 2 个 CDR 区结合,认为这 9 个氨基酸残基构成是构象性表位。以上研究表明,核磁共振技术在构象性表位定位方面更为准确,但是如何解析核磁共振图谱是构象性表位定位的一个难点。

3.5 表面等离子共振技术

表面等离子共振技术(SPR)是基于表面等离子共振原理的生物传感分析检测技术,实时传感图谱的变化是缘于靠近传感芯片表面介质折射率的变化。它包括光检测单位、流动系统和传感芯片 3 个部分。Biacore 系统是用于监控实验并分析数据。SPR 监测的结果实际上是芯片表面物质质量的变化特点。该技术具有无需标记、高通量实时分析的优点,无需纯化而直接使用杂交瘤上清液。该方法已能够在 12h 内筛选出 384 个抗体,通过改进有望在 24h 内检测 10 个 96 孔板。目前已被广泛地用于研究蛋白质-蛋白质、核酸-蛋白质、核酸-核酸以及药物-蛋白质之间相互作用的结合模式、反应动力学及亲和分析等^[34]。 β -乳球蛋白的 5 个单抗通过表面等离子技术研究其乳化前后构象性表位的变化,发现乳化后的 β -乳球蛋白与单抗的结合能力下降,即构象性表位结合能力下降,说明乳化后 β -乳球蛋白的构象有变化^[35]。

3.6 质谱

质谱是针对抗原-抗体间的特异性结合进行分析,已得到广泛应用。质谱技术需与其他技术相结合来定位构象性表位,其中差异化学修饰相结合是一种新的表位定位方法。化学修饰基本原则是保护抗原抗体复合物表

面氨基酸的空间结构,其修饰的程度与抗原单体或复合物的表面可及性和溶剂可及性相关,通过对化学修饰的动力学分析研究氨基酸活性区的表面可及性,从而确定表位区。该方法首先对抗原和抗原抗体复合物进行差异化学修饰,然后进行还原,再酶解或消化,最后用基质辅助激光解吸电离质谱(MALDI-MS)和液相色谱电离串联质谱(LC/ESI-MS)分析抗原抗体复合物从而确定构象性表位。这种定位方法主要是针对有特殊基团的氨基酸,最早使用放射性元素标记。H/D 交换法是差异化学修饰的一种特殊方法,它易于操作,无特异性的标记。采用该方法已对 HIV 核心蛋白(p24)和鸡蛋溶菌酶中的赖氨酸、精氨酸和酪氨酸的修饰,经过质谱分析定位出它们的构象性表位。质谱灵敏度高,小到一个原子的单位都可以解析^[36]。

4 结 语

构象性表位作为表位的重要类型之一,是食物过敏原中直接与抗体发生免疫反应的物质基础。蛋白质的空间结构不稳定,易随外界环境的变化而发生空间分布的改变。文中介绍了基于线性表位特征预测构象性表位,模拟肽和生物信息学定位构象性表位以及光谱学方法表征结合参数确定构象型表位。这3种方法均可有效地对构象性表位进行定位,从而为食物过敏原研究工作提供数据基础。

参考文献:

- [1] van REGENMORTEL M. What is a B-cell epitope?[J]. *Methods Mol Bio*, 2009, 524: 3-20.
- [2] BARRE A, BORGES J P, CULERRIER R, et al. Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes[J]. *Immunol Lett*, 2005, 100(2): 153-158.
- [3] ROUGÉ P, CULERRIER R, SABATIER V, et al. Mapping and conformational analysis of IgE-binding epitopic regions on the molecular surface of the major Ara h 3 legumin allergen of peanut (*Arachis hypogaea*)[J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(6): 1067-1075.
- [4] MIDORO-HORIUTI T, SCHEIN C H, MATHURA V, et al. Structural basis for epitope sharing between group 1 allergens of cedar pollen[J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(6): 509-518.
- [5] LÓPEZ-TORREJÓN G, DÍAZ-PERALES A, RODRÍGUEZ J, et al. An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(6): 1481-1488.
- [6] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228: 1315-1317.
- [7] LEITNER A, VOGEL M, RADAUER C, et al. A mimotope defined by phage display inhibits IgE binding to the plant panallergen profilin[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(9): 2921-2927.
- [8] GANGLBERGER E, GRUNBERGER K, SPONER B, et al. Allergen mimotopes for 3-dimensional epitope search and induction of antibodies inhibiting human IgE[J]. *Faseb J*, 2000, 14(14): 2177-2184.
- [9] HANTUSCH B, KRIEGER S, UNTERSMAIR E, et al. Mapping of conformational IgE epitopes on Phl p 5a by using mimotopes from a phage display library[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(6): 1294-1300.
- [10] SZALAI K, FUHRMANN J, PAVKOV T, et al. Mimotopes identify conformational B-cell epitopes on the two major house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(5): 1308-1317.
- [11] YANG Hua, LIU Zhonghua, ZHANG Liting, et al. Selection and application of peptide mimotopes of MPT64 protein in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(Pt 1): 69-74.
- [12] UNTERSMAIR E, SZALAI K, RIEMER A B, et al. Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen [J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(9): 1454-1461.
- [13] PACIOS L F, TORDESILLAS L, CUESTA-HERRANZ J, et al. Mimotope mapping as a complementary strategy to define allergen IgE-epitopes: peach Pru p 3 allergen as a model[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(8): 2269-2276.
- [14] TORDESILLAS L, PACIOS L F, PALACIN A, et al. Molecular basis of allergen cross-reactivity: non-specific lipid transfer proteins from wheat flour and peach fruit as models[J]. *Mol Immunol*, 2009, 47(2/3): 534-540.
- [15] TORDESILLAS L, PACIOS L, PALACÍN A, et al. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen[J]. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(1): 174-181.
- [16] SCHREIBER A, HUMBERT M, BENZ A, et al. 3D-Epitope-Explorer (3DEX): localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins[J]. *J Comput Chem*, 2005, 26(9): 879-887.
- [17] HUANG Jian, GUTTERIDGE A, HONDA W, et al. MIMOX: a web tool for phage display based epitope mapping [J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 451-460.
- [18] MAYROSE I, PENN O, EREZ E, et al. Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23: 3244-3246.
- [19] 王静云, 刘丹, 唐乾, 等. 圆二色谱研究 Asp44 在稳定肌红蛋白结构中的作用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(2): 426-429.
- [20] 万琳, 周立. 小麦 PGIP 圆二色性与生物活性关系[J]. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(5): 434-437.
- [21] ZSILA F, HAZAI E, SAWYER L. Binding of the pepper alkaloid piperine to bovine beta-lactoglobulin: circular dichroism spectroscopy and molecular modeling study[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(26): 10179-10185.
- [22] 刘志刚, 朱健琦, 黄海珍, 等. 真核表达与原核表达的德国小蠊变应原 Bla g 2 蛋白结构的光谱学研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2006, 26(5): 879-883.
- [23] KOPPELMAN S J, van KONINGSVELD G A, KNULST A C, et al. Effect of heat-induced aggregation on the IgE binding of patatin (Sol t 1) is dominated by other potato proteins[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(6): 1562-1568.
- [24] HU Chunqiu, GAO Jinyan, CHEN Hongbing, et al. Effect of heat treatment on the antigenicity and conformation of peanut allergen Ara h 2[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(9): 2550-2554.
- [25] YONG Yiehui, YAMAGUCHI S, MATSUMURA Y. Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(16): 6034-6040.
- [26] NAVARRA G, LEONE M, MILITELLO V. Thermal aggregation of beta-lactoglobulin in presence of metal ions[J]. *Biophys Chem*, 2007, 131(1/3): 52-61.
- [27] RIGBY N M, MARSH J, SANCHEZ A I, et al. The purification and characterisation of allergenic hazelnut seed proteins[J]. *Mol Nutr Food*

- Res, 2008, 52(Suppl 2): 251-261.
- [28] ROSEN O, ANGLISTER J. Epitope mapping of antibody-antigen complexes by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 524: 37-57.
- [29] TREVIÑO M A, GARCÍA-MAYORAL M F, BARRAL P, et al. NMR solution structure of Ole e 6, a major allergen from olive tree pollen[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 39035-39041.
- [30] CHAN S L, ONG S T, ONG S Y, et al. Nuclear magnetic resonance structure-based epitope mapping and modulation of dust mite group 13 allergen as a hypoallergen[J]. *J Immunol*, 2006, 176(8): 4852-4860.
- [31] CHAN S L, ONG T C, GAO Yunfeng, et al. Nuclear magnetic resonance structure and IgE epitopes of Blo t 5, a major dust mite allergen[J]. *J Immunol*, 2008, 181(4): 2586-2596.
- [32] NAIK M T, CHANG CHI F, KUO I C, et al. Roles of structure and structural dynamics in the antibody recognition of the allergen proteins: an NMR study on Blomia tropicalis major allergen[J]. *Structure*, 2008, 16(1): 125-136.
- [33] PADAVATTAN S, FLICKER S, SCHIRMER T, et al. High-affinity IgE recognition of a conformational epitope of the major respiratory allergen Phl p 2 as revealed by X-ray crystallography[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 2141-2151.
- [34] CHAVANE N, JACQUEMART R, HOEMANN C D, et al. At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection[J]. *Anal Biochem*, 2008, 378(2): 158-165.
- [35] VENIEN A, LEVIEUX D, DUFOUR E. Oil/alkanethiol layers for the study of emulsified protein conformation by surface plasmon resonance using monoclonal antibodies[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2000, 223(2): 215-222.
- [36] DHUNGANA S, FESSLER M B, TOMER K B. Epitope mapping by differential chemical modification of antigens[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 524: 119-134.