

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2022021001

田婧宜, 杨方星. 尘螨过敏原硝基化的位点选择性分析[J]. 环境化学, 2023, 42(7): 2273-2281.

TIAN Jingyi, YANG Fangxing. Analysis of site-selective nitration in house dust mite allergens[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(7): 2273-2281.

尘螨过敏原硝基化的位点选择性分析*

田婧宜^{1,2} 杨方星^{1,2}**

(1. 浙江大学环境与资源学院环境健康研究所, 污染环境修复与生态健康教育部重点实验室, 杭州, 310058; 2. 浙江大学空气污染与健康研究中心, 杭州, 310058)

摘要 过敏原的硝基化会引起其致敏潜能的增强, 进而带来更大的致敏性健康风险. 过敏原蛋白质通常含有多个酪氨酸硝基化位点, 分析过敏原硝基化的位点选择性是探究硝基化对过敏原致敏性影响的重要基础. 本文以尘螨过敏原为研究对象, 建立了基于超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)同时定量分析3种尘螨过敏原(Der f 1、Der p 1和Der p 2)的13个酪氨酸位点硝基化程度的方法, 并应用于分析3种尘螨过敏原在过氧亚硝酸盐硝基化作用下的位点选择性. 结果表明, 3种尘螨过敏原均发生了位点特异性的硝基化, Y₁₉₅、Y₃₇和Y₉₂分别为Der f 1、Der p 1和Der p 2中反应活性最高的硝基化位点. 尘螨过敏原位点选择性的硝基化表明, 在评价硝基化尘螨过敏原的致敏性变化时应当考虑其位点特异性的硝基化状况.

关键词 尘螨过敏原, 酪氨酸, 硝基化, 位点选择性, 液相色谱-串联质谱.

Analysis of site-selective nitration in house dust mite allergens

TIAN Jingyi^{1,2} YANG Fangxing^{1,2}**

(1. Key Laboratory of Environment Remediation and Ecological Health, Ministry of Education, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China; 2. Research Center for Air Pollution and Health, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China)

Abstract Nitration of allergens can enhance their allergenic potential, consequently contributing to higher allergenic health risks. Allergen proteins usually contain more than one tyrosine which could be nitrated. Analysis of site-selective nitration is critical for exploring the effect of nitration on allergenicity of allergen. In this study, a method was developed for the quantitative analysis of the nitration degrees of total 13 tyrosine sites of three house dust mite (HDM) allergens (Der f 1, Der p 1 and Der p 2) by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The method was then applied to analyze the site-specific nitration of tyrosine in the three HDM allergens under nitration of peroxynitrite (ONOO⁻). The results showed that HDM allergens were nitrated by ONOO⁻ and the reactions were site-selectivity. Y₁₉₅, Y₃₇ and Y₉₂ were the most reactive nitration sites of Der f 1, Der p 1 and Der p 2, respectively. The site-selective nitration of HDM allergens indicated that site-specific nitration should be considered and included when assessment of the changes of their allergenicity caused by nitration.

2022年2月10日收稿(Received: February 10, 2022).

* 浙江省自然科学基金公益项目(LGF21B070007)和浙江大学空气污染与健康研究中心项目(I21405-11)资助.

Supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LGF21B070007) and Research Center for Air Pollution and Health, Zhejiang University (I21405-11).

** 通信联系人 **Corresponding author**, Tel: 0571-88982392, E-mail: fxyang@zju.edu.cn

Keywords house dust mite allergen, tyrosine, nitration, site-selective, liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

据估计,全球有超过 25%—30% 的人口患有过敏性疾病^[1].近年来,世界范围内过敏性疾病的发病率仍在急剧上升,已成为世界上患病率增长速度最快的慢性疾病之一^[2].尽管发病率增加的原因尚未完全被揭示,许多研究已经发现,空气污染会加剧过敏性哮喘等疾病^[3-5].Franze 等^[6]发现暴露于空气污染物中的桦树花粉过敏原发生了有效的硝基化反应,并提出了过敏原的硝基化在空气污染对过敏性疾病的促进作用中发挥了关键作用.

过敏原的硝基化通常是指过敏原蛋白质酪氨酸在硝化剂的作用下反应形成 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine)^[7].过敏原的硝基化会对其免疫原性产生影响^[8],硝基化可能导致本是过敏原的蛋白质的致敏性增强,或者导致细胞表位的暴露或新表位的产生^[9-10],从而增加其人体健康风险.Gruijthuijsen^[11]以及 Karle 等^[12]通过动物实验和体外实验证实了硝基化反应会增强桦树花粉过敏原 Bet v 1 的致敏潜力.然而,蛋白质的硝基化具有位点选择性,并非过敏原上所有酪氨酸都能发生硝基化反应^[8].对过敏原硝基化过程中酪氨酸位点发生特异性反应的研究对于阐明硝基化影响过敏原致敏性的机制以及控制硝基化所带来的致敏性健康风险具有重要的意义.

目前,环境中已经检测到了硝基化的花粉过敏原^[6],对过敏原硝基化的分子机制以及敏化机制(对致敏性影响)的研究也多集中于花粉过敏原.而环境中其它过敏原的硝基化状况鲜有报道.尘螨(house dust mites, HDM)是人类生活和工作的各类室内环境中最为常见的过敏来源,其产生的过敏原可引起哮喘、特应性皮炎等多种过敏性疾病^[13-14].高达 50% 的过敏患者对尘螨过敏原过敏^[15].在至今已鉴定出的 38 组尘螨过敏原中,来自粉尘螨(*Dermatophagoides farina*, Der f)和屋尘螨(*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p)的组分 I (Der f 1 和 Der p 1)和组分 II (Der f 2 和 Der p 2)为最主要的尘螨致敏原^[16-18].Der p 1 和 Der p 2 的 IgE 抗体结合频率分别超过了 80%^[19]与 90%^[17],长期以来,Der p 1 和 Der p 2 被认为是诊断和治疗尘螨过敏疾病所必须关注的两种过敏原^[16].在本课题组最近的研究中,已经检测出了环境灰尘样本中 Der f 1 和 Der p 1 的硝基化产物^[20].然而,由于尘螨过敏原含有多个酪氨酸位点,其在硝基化过程中的位点选择性还有待进一步的研究.

以往的研究,通常使用基于免疫化学的酶联免疫吸附或蛋白质印迹法、紫外分光光度法、以及液相色谱与紫外-可见光吸收二极管阵列等方法,通过定量蛋白质中酪氨酸与硝基酪氨酸来测定蛋白质的平均硝基化程度(nitration degree, ND)^[6,21-23].然而,这些方法均无法分析单个酪氨酸位点发生硝基化反应的情况.虽然传统蛋白组学的方法可用于定性分析某些酪氨酸位点是否发生硝基化,但很难精确定量单个酪氨酸位点的硝基化程度^[24-26].近年来,定向蛋白组学的发展为精确地定量分析过敏原中单个酪氨酸位点的硝基化程度提供了技术手段^[27].该方法可通过将过敏原蛋白质进行酶解后,利用液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)技术,测定过敏原酶解产物中各条含有酪氨酸或硝基化酪氨酸的多肽,从而对酪氨酸位点的硝基化程度(nitration degree of tyrosine, ND_Y)进行定量分析^[28-29].

本文选择 I 类和 II 类尘螨过敏原为研究对象,建立基于超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用技术,同时检测含酪氨酸的酶解多肽及其对应的硝基化多肽的方法,以此准确地定量分析两类尘螨过敏原在硝基化反应中各酪氨酸的 ND_Y,并将该方法应用于经硝化试剂过氧亚硝酸盐(ONOO-)硝基化的尘螨过敏原,探究各过敏原发生硝基化反应的位点选择性.

1 实验部分(Experimental section)

1.1 实验材料

超高效液相色谱-电喷雾电离-三重四极杆串联质谱仪(UPLC/ESI-MS/MS, Xevo TQ-S; Waters, 美国);色谱柱 Waters BEH C18 柱(2.1 mm × 50 mm × 1.7 μm),前端串联保护柱 VanGuard™(C18 柱, 2.1 mm × 5 mm × 1.7 μm);分析天平(220 g / 0.1 mg, ME204, Mettler Toledo, 瑞士);QL-901 涡旋振荡器(Waters, 美国);高速冷冻离心机(Sorvall Legend Micro 17R, Thermo Fisher Scientific, 德国);金属恒温孵

育仪(D1200-230V, Labnet, 美国); 真空离心浓缩仪(RVC 2-18, Christ, 德国); 超滤离心管(Amicon® Ultra 3K/10K 超滤管, Millipore, 爱尔兰); 无菌注射器(1 mL, 华福, 浙江); 聚四氟乙烯针式过滤器(滤膜)(ϕ 13 mm \times 0.22 μ m, 津腾, 天津)。

I 类尘螨过敏原 Der f 1 重组蛋白(Uniprot Accession: P16311, 纯度>95%)与 Der p 1 重组蛋白(Uniprot Accession: P08176, 纯度>95%)购自 MyBioSource; II 类尘螨过敏原 Der p 2 重组蛋白(Uniprot Accession: Q1H8P8, 纯度>95%)购自 Raybiotech. 尘螨过敏原蛋白的理论胰酶酶解多肽及其相应的硝基化多肽委托吉尔生化(上海)有限公司合成(纯度均 \geq 98%). 过氧亚硝酸盐溶液(peroxynitrite, 纯度 \geq 90%)购自上海脉铂医药科技有限公司. 乙腈(LC-MS 级)和 Tween-20 购买自美国 Sigma-Aldrich 公司. 质谱级胰蛋白酶购自北京生夏蛋白技术有限公司. 二硫苏糖醇(DL-1, 4-Dithiothreitol, DTT, \geq 98%), 碘乙酰胺(Iodoacetamide, IAA, 纯度 \geq 98%)和甲酸(纯度 \geq 98%)均购买自北京百灵威科技公司。

1.2 I、II 类尘螨过敏原目标多肽的选择

同一组类的粉尘螨和屋尘螨过敏原通常具有较高的序列同源性(80%—85%)和交叉反应性^[30]. 比较 II 类尘螨过敏原的结构, 可以发现 Der f 2 和 Der p 2 的一级结构和二级结构极为相似, 全序列均由 146 个氨基酸构成, 蛋白质相对分子质量均约为 16 kDa. 至于酪氨酸位点, Der f 2 仅有两条胰酶酶解肽 GQQYDIK(GK-7)和 YTNVVPK(YK-7)含有酪氨酸残基 Y₁₀₃ 和 Y₁₀₇, 而 Der p 2 除了拥有这两个相同的酪氨酸位点(Y₁₀₃ 和 Y₁₀₇)外, 主链(氨基酸序列 18-146)上还有一个位于胰酶酶解肽 ASIDGLEVD VPGIDPNACHYMK(AK-22)上的酪氨酸残基 Y₉₂. 因此在定量 II 类尘螨过敏原各酪氨酸位点的硝基化程度时, 只需对 Der p 2 进行分析. 尽管 I 类过敏原 Der f 1 和 Der p 1 也有较高的同源性, 但未发现完全相同的含酪氨酸位点的酶解肽, 因此对于 I 类尘螨过敏原, 需要分别对 Der f 1 和 Der p 1 进行分析与讨论。

I 类和 II 类尘螨过敏原蛋白 Der f 1、Der p 1 以及 Der p 2 的氨基酸序列见表 1. I 类尘螨过敏原 Der f 1 和 Der p 1 的全序列分别由 321 和 320 个氨基酸构成, 蛋白质相对分子质量均约为 36kDa, 且主链上(氨基酸序列 19-321/320)均含有 20 个酪氨酸残基. 但是, 由于质谱检测范围的有限性、目标多肽需要具备特异性、以及酶解过程中存在难以避免的化学诱导修饰, 目前无法检测所有酪氨酸的硝基化程度. 为了尽可能多地监测酪氨酸位点的硝基化状况, 本实验计算了所有含酪氨酸的理论胰酶酶解多肽, 并利用蛋白数据库(www.uniprot.org/peptidesearch 和 www.peptideatlas.org) 的搜索功能检查其特异性, 选择具备特异性并且能被仪器检测($m/z < 2048$)的理论酶解肽作为待测过敏原的目标肽段. 最终, 12 条含有酪氨酸的多肽(氨基酸序列信息见表 1)及其对应的 14 条硝基化多肽被选作目标多肽并委托合成, 这些目标多肽包含了 Der f 1 的 7 个硝基化位点, Der p 1 的 3 个硝基化位点, 以及 Der p 2 的 3 个硝基化位点。

表 1 尘螨过敏原 Der f 1、Der p 1 和 Der p 2 的氨基酸序列

Table 1 Amino acid sequences of HDM allergens Der f 1, Der p 1 and Der p 2

蛋白质 Protein	氨基酸序列 Amino acid sequences	非硝基化的目标多肽 Non-nitrated target peptides
粉尘螨 I 类 过敏原 Der f 1	MKFVLAIASLLVLSTVY ₁₇ ARPASIKTFEEFKKAFNKNY ₃₇ ATVEEEVARKNFLES ₅₆ LKY ₅₆ VE QNSGGAINHLS ₅₆ DLDEFK ₅₆ NR ₅₆ Y ₅₆ LMSAEAFEQLKTQFDLNAETSACRINSVNPSEL ₁₀₃ DLRSL RTVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAY ₁₄₆ LAY ₁₄₉ RNTSLDLSEQELVDCASQHGCHGDTI PRGIEY ₁₈₁ IQQNGVVEERSY ₁₉₃ PY ₁₉₅ VAREQRCRRPNSQHY ₂₁₀ GISNY ₂₁₅ CQIY ₂₁₉ PPDVKQIR EALQTHTAIAV ₁₈₁ IIKDLRA ₁₈₁ FQHY ₂₅₂ DGR ₁₈₁ TIIQHDNGY ₂₆₄ QPNY ₂₆₈ HAVNIVGY ₂₇₆ GSTQGD DY ₂₈₄ WIVRNSWD ₁₈₁ TWGD ₁₈₁ SGY ₃₀₀ GY ₃₀₂ FQGNLMMIEY ₃₁₅ PY ₃₁₇ VVIM	NY ₃₇ ATVEEEVARK(NR-12) Y ₅₆ VEANK(YK-6) Y ₇₉ LMSAEAFEQLK(YK-12) GIEY ₁₈₁ IQQNGVVEER(GR-14) SY ₁₉₃ PY ₁₉₅ VAR(SR-7) AFQHY ₂₅₂ DGR(AR-8)
屋尘螨 I 类 过敏原 Der p 1	MKIVLAIASLLALS ₁₇ AVY ₁₇ ARPSIKTFEEY ₂₉ AKAFNKSY ₃₇ ATFEDEEAARKNFLES ₅₆ VKY ₅₆ V QNSGGAINHLS ₅₆ DLDEFK ₅₆ NR ₅₆ FLMSAEAFEHLKTQFDLNAETNACRSINGNAPAEIDL ₁₀₃ RMR TVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAY ₁₄₅ LAY ₁₄₈ RNQLDLAEQELVDCAQHGCHGDTIP RGIEY ₁₈₀ IQHNGVVQESY ₁₉₁ Y ₁₉₂ RY ₁₉₄ SVAREQSCRRPNAQRFGISNY ₂₁₄ CQIY ₂₁₈ PPNVNKIR EALAQTHTAIAV ₁₈₀ IIKDLDA ₁₈₀ FRHY ₂₅₁ DGR ₁₈₀ TIIQRDNGY ₂₆₃ QPNY ₂₆₇ HAVNIVGY ₂₇₅ SNAQGV DY ₂₈₃ WIVRNSWD ₁₈₀ TNWGD ₁₈₀ NGY ₂₉₉ GY ₃₀₁ FAANIDLMMIEY ₃₁₄ PY ₃₁₆ VVIL	TFEEY ₂₉ AK(TK-7) SY ₃₇ ATFEDEEAAR(SR-12) HY ₂₅₁ DGR(HR-5)
屋尘螨 II 类 过敏原 Der p 2	MMY ₃ KILCLSL ₃ LVAAVARDQVDVKDCANHEIKKV LVPGCHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEVDVPGIDPNAGHY ₉₂ MK CPLVKGQQ	ASIDGLEVDVPGIDPNAGHY, ₂ MK(AK-22) GQQY ₁₀₃ DIK(GK-7) Y ₁₀₇ TWNVPK(YK-7)

1.3 目标多肽检测方法的建立

使用合成的目标多肽标准物质,建立同时测定含3种主要尘螨过敏原13个酪氨酸位点的硝基化和非硝基化的26条目标多肽的超高效液相色谱-电喷雾电离-三重四极杆串联质谱(UPLC/ESI-MS/MS, Xevo TQ-S; Waters, 美国)检测方法.通过自动调谐和参数优化,筛选出各目标多肽的定量以及定性离子对,并对其所对应的锥孔电压、碰撞压力等参数进行优化.各目标多肽的仪器检测参数见表2.其它仪器参数包括:离子源为正离子(ESI+)模式;毛细管电压设置为3.5 kV;碰撞气体为氩气;脱溶剂气为氮气,流速为 $800 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$,温度为 $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$.待测溶液的进样量为 $30 \mu\text{L}$.二元洗脱流动相为含0.1%甲酸的乙腈(A相)和含0.1%甲酸的水(B相),色谱柱的温度为 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$,设置流速为 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的连续梯度洗脱:0 min: 5% A; 4 min: 25% A; 7min: 95% A; 7.5min: 95% A; 8min: 5% A; 8.5 min: 5% A.

表2 目标多肽的仪器检测参数

Table 2 Instrumental parameters of targeted peptides in UPLC/ESI-MS/MS

多肽 Peptides	硝基酪氨酸 Nitrotyrosine	保留时间/min RT	反应离子对(锥孔电压/V, 碰撞能量/eV) Transition (Cone, Collision energy)	检测限*/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) LOD
NR-12		4.28	705.4 > 861.4** (64, 25); 705.4 > 1061.6 (64, 28)	0.035
NO ₂ -NR-12	Y ₃₇	4.83	727.7 > 861.4** (32, 25); 727.7 > 960.5 (32, 28)	0.077
YK-6		2.35	362.1 > 461.3** (4, 10); 362.1 > 560.4 (4, 15)	0.002
NO ₂ -YK-6	Y ₅₆	3.11	384.5 > 461.2** (4, 10); 384.5 > 332.2 (4, 10)	0.003
YK-12		6.10	715.5 > 1154.0** (22, 20); 715.5 > 1022.6 (22, 25)	0.010
NO ₂ -YK-12	Y ₇₉	6.21	737.9 > 147.1** (22, 15); 737.9 > 1022.5 (22, 20)	0.021
GR-14		4.81	817.6 > 143.1** (24, 52); 817.6 > 802.7 (24, 25)	0.022
NO ₂ -GR-14	Y ₁₈₁	5.34	839.8 > 433.2** (70, 30); 839.8 > 802.4 (70, 25)	0.015
SR-7		4.09	428.2 > 605.5** (6, 15); 428.2 > 303.3 (6, 10)	0.004
NO ₂ -SR-7(1)	Y ₁₉₃	4.36	450.6 > 605.5** (10, 10); 450.6 > 508.3 (10, 20)	0.010
NO ₂ -SR-7(2)	Y ₁₉₅	4.74	450.6 > 650.3** (10, 10); 450.6 > 553.3 (10, 20)	0.015
NO ₂ -SR-7(3)	Y ₁₉₃ , Y ₁₉₅	4.76	473.1 > 695.3** (10, 10); 473.1 > 175.1 (10, 10)	0.013
AR-8		3.24	497.3 > 647.3** (60, 20); 497.3 > 232.1 (60, 30)	0.011
NO ₂ -AR-8	Y ₂₅₂	3.91	519.8 > 692.3** (60, 20); 519.8 > 820.3 (60, 20)	0.012
TK-7		3.26	472.7 > 696.5** (34, 18); 472.7 > 275.2 (34, 25)	0.025
NO ₂ -TK-7	Y ₂₉	3.94	495.0 > 471.4** (14, 15); 495.0 > 147.1 (14, 25)	0.020
SR-12		4.44	695.1 > 819.3** (16, 20); 695.1 > 966.4 (16, 20)	0.010
NO ₂ -SR-12	Y ₃₇	5.06	717.6 > 819.3** (70, 25); 717.6 > 268.1 (70, 25)	0.014
HR-5		1.30	324.0 > 232.1** (16, 15); 324.0 > 510.2 (16, 15)	0.001
NO ₂ -HR-5	Y ₂₅₂	2.42	346.4 > 232.1** (8, 15); 346.4 > 347.2 (8, 6)	0.007
AK-22		6.10	771.4 > 931.5** (25, 35); 771.4 > 86.0 (25, 30)	0.025
NO ₂ -AK-22	Y ₉₂	6.14	786.4 > 976.5** (8, 30); 786.4 > 86.0 (8, 60)	0.025
GK-7		3.57	426.4 > 260.2** (25, 15); 426.4 > 147.1 (25, 20)	0.025
NO ₂ -GK-7	Y ₁₀₃	4.36	448.5 > 260.1** (8, 16); 448.5 > 147.1 (8, 25)	0.020
YK-7		5.01	454.4 > 244.2** (25, 20); 454.4 > 643.5 (25, 15)	0.015
NO ₂ -YK-7	Y ₁₀₇	5.65	476.5 > 244.0** (16, 20); 476.5 > 643.4 (16, 15)	0.006

*由EPA^[31]推荐的方法测定. *Determined based on the methods recommended by EPA.

1.4 尘螨过敏原的硝基化及ND_Y的检测

根据 REINMUTH-SELZLE 等^[32]的方法用过氧亚硝酸盐硝化尘螨过敏原蛋白 Der f 1, Der p 1 和 Der p 2. 首先,将 ONOO 溶液在冰上缓慢解冻,将不同体积浓度为 $3.42 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ONOO 溶液分别加

入到含有 10 μg 的 3 种过敏原的低蛋白吸附管中(其中 Der f 1 与 Der p 1 的浓度为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, Der p 2 的浓度为 0.34 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 配制成 ONOO \cdot 与各蛋白质中酪氨酸摩尔浓度比值(ONOO \cdot /Y)为 0:1、1:1、3:1、5:1、10:1、15:1 和 30:1 的混合溶液. 3 组混合溶液混匀后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 100 min. 最后通过超滤离心将蛋白质与硝化剂分离从而终止反应, Der f 1 与 Der p 1 使用截留分子量为 10 kDa 的超滤管, Der p 2 使用截留分子量为 3 kDa 的超滤管, 并用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NH_4HCO_3 缓冲溶液(pH 7.5—8.5)清洗 2 次, 最终使蛋白质反应产物溶于 20 μL 的 NH_4HCO_3 缓冲液.

将同一反应条件下(ONOO \cdot /Y 相等)的 3 种尘螨过敏原反应产物各取 10 μL 混合之后在低蛋白吸附管中进行酶解. 首先, 在混合蛋白溶液中加入 40 μL 乙腈, 20 μL NH_4HCO_3 缓冲溶液以及 10 μL 浓度为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DTT, 充分混匀后, 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 45 min; 随后加入 20 μL 浓度为 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IAA, 将还原后的蛋白质烷基化, 涡旋混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温避光孵育 45 min; 孵育结束后, 用 280 μL 的 NH_4HCO_3 缓冲液将乙腈的终浓度稀释至 10%(V/V), 并加入 7.5 μL 浓度为 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的胰蛋白酶, 使蛋白质在酶/底物为 1:50(W/W)的条件下进行酶解, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 15 h 后, 加入 5 μL 50% 的甲酸终止酶解反应. 将酶解后的混合溶液在真空离心浓缩仪中浓缩至近干, 最后用 200 μL 5% 乙腈复溶并过 0.22 μm 滤膜除杂, 待进行仪器分析. 使用 1.2 节中建立的 UPLC-MS/MS 检测方法定量目标多肽, 对某酪氨酸而言, 通过公式(1)可计算得到该酪氨酸的硝基化程度(ND_Y).

$$\text{ND}_Y = \frac{\frac{C_b}{\text{Mr}_b}}{\frac{C_b}{\text{Mr}_b} + \frac{C_a}{\text{Mr}_a}} \quad (1)$$

其中, C_a 和 C_b 分别表示含有某酪氨酸的非硝基化多肽和硝基化多肽的浓度($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); Mr_a 和 Mr_b 表示非硝基化多肽和硝基化多肽的相对分子质量.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 I、II 类尘螨过敏原 ND_Y 检测方法的建立及评价

使用目标多肽的标准物质建立了包含 I、II 类尘螨过敏原蛋白 Der f 1、Der p 1 和 Der p 2 共 13 个酪氨酸硝基化位点的 26 条目标多肽的 HPLC-MS/MS 检测方法. 图 1 为该条件下 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 目标多肽标准溶液的总离子流出色谱图. 结果显示, 该方法能够用于检测 Der f 1 的 7 个酪氨酸位点, Der p 1 的 3 个酪氨酸位点, 和 Der p 2 的 3 个酪氨酸位点的硝基化程度.

为了评价检测方法的可靠性, 本文对 26 种目标多肽的仪器日内偏差、方法精密度以及加标回收率进行了测定, 测定结果见表 3. 结果显示, 在标准多肽浓度为 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 仪器日内偏差 $\leq 7.6\%$ ($n=5$), 方法精密度 $\leq 15.2\%$ ($n=3$), 相对回收率在 64.8%—95.3% 之间 ($n=3$), 表明该方法使用 UPLC-MS/MS 定量分析尘螨过敏原的目标多肽, 有良好的准确度和精密度, 能有效地用于分析尘螨过敏原的硝基化状况.

2.2 尘螨过敏原硝基化的位点选择性

应用建立的检测方法, 监测重组尘螨过敏原 Der f 1、Der p 1 和 Der p 2 在不同浓度的 ONOO \cdot 溶液中各酪氨酸的硝基化反应状况, 图 2 总结了各酪氨酸在不同硝化剂浓度下的 ND_Y 值. 随着 ONOO \cdot /Y 物质的量比的增加, 各尘螨过敏原的硝基化程度也在增加. 但由于硝基化反应的位点选择性, 各酪氨酸有不同的硝基化反应性^[8,25,32], 因此同一过敏原上的不同酪氨酸在相同 ONOO \cdot 反应条件下会有不同的 ND_Y , 且 ND_Y 的增长速率也各不相同. 具体而言, 对于 Der f 1 能检测到的 7 个酪氨酸位点, Y_{195} 的硝基化反应活性最高, 在任何 ONOO \cdot /Y 的物质的量比浓度下均有最大的 ND_Y 值. 当 ONOO \cdot /Y 为 30:1 时, ND_Y 能达到 43.61%. 而酪氨酸 Y_{37} 、 Y_{79} 和 Y_{181} 在 ONOO \cdot 溶液中几乎不发生硝基化. 其余 3 个酪氨酸 Y_{56} 、 Y_{193} 和 Y_{252} 在 ONOO \cdot 溶液中的硝基化程度相似, 当 ONOO \cdot /Y 为 30:1 时, 3 种酪氨酸的 ND_Y 分别为 19.42%、16.19% 以及 17.61%. 对于 Der p 1 能检测到的 3 个酪氨酸硝基化位点 Y_{29} 、 Y_{37} 和 Y_{251} , 随着 ONOO \cdot 浓度的增加, 3 个酪氨酸的 ND_Y 分别能增加到 25.19%、13.97% 以及

9.82% (ONOO⁻/Y 为 30:1)。Y₂₉ 是 3 个酪氨酸中硝基化反应活性相对较高的酪氨酸硝基化位点。对于 Der p 2 的 3 个酪氨酸, 仅 Y₉₂ 在 ONOO⁻ 溶液中发生了明显的硝基化反应, ND_Y 为 0—25.46%。

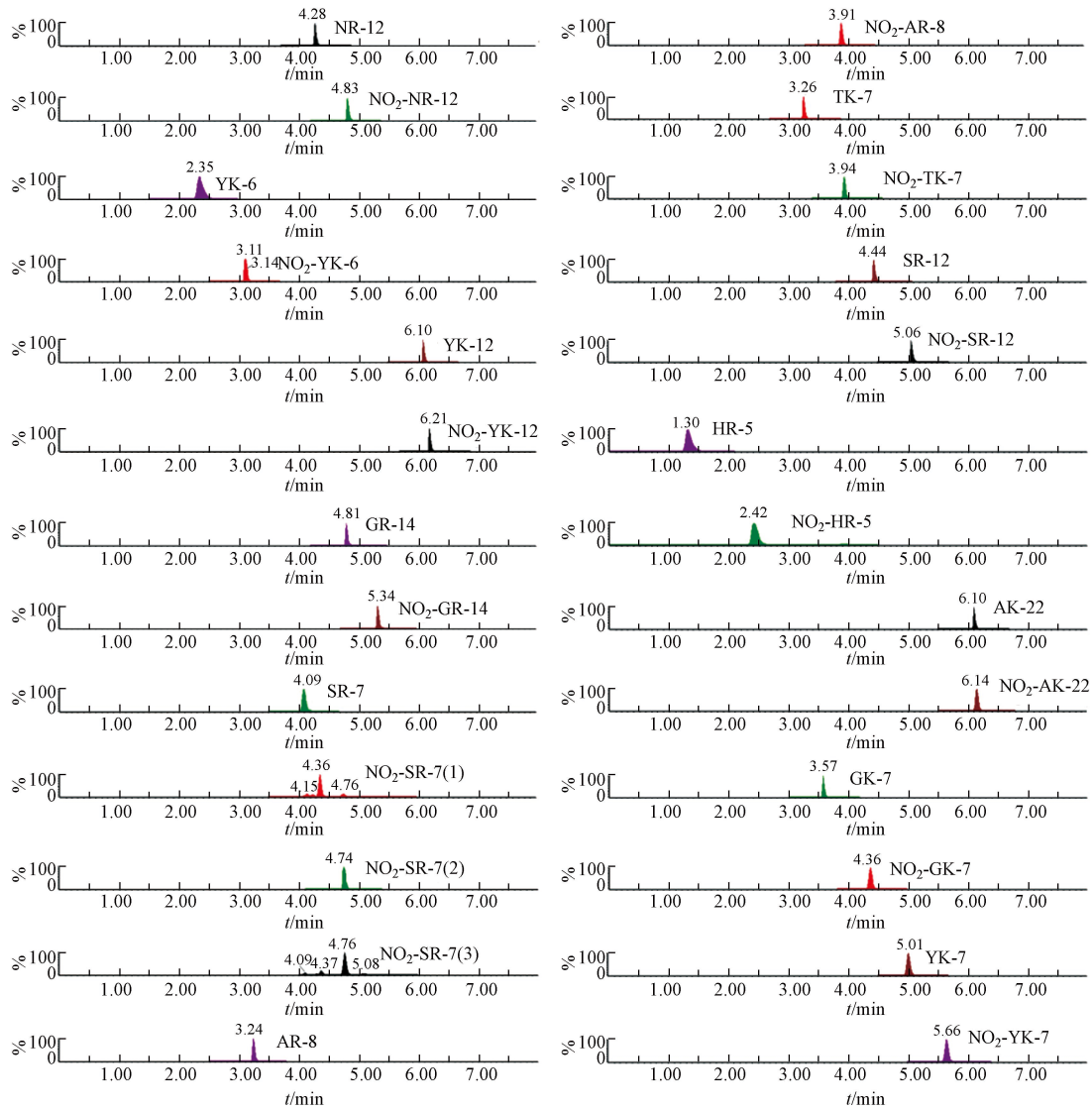


图 1 目标多肽标准品总离子流色谱图 (100 ng·mL⁻¹)

Fig.1 TIC Chromatograms of standard solution of targeted peptides (100 ng·mL⁻¹)

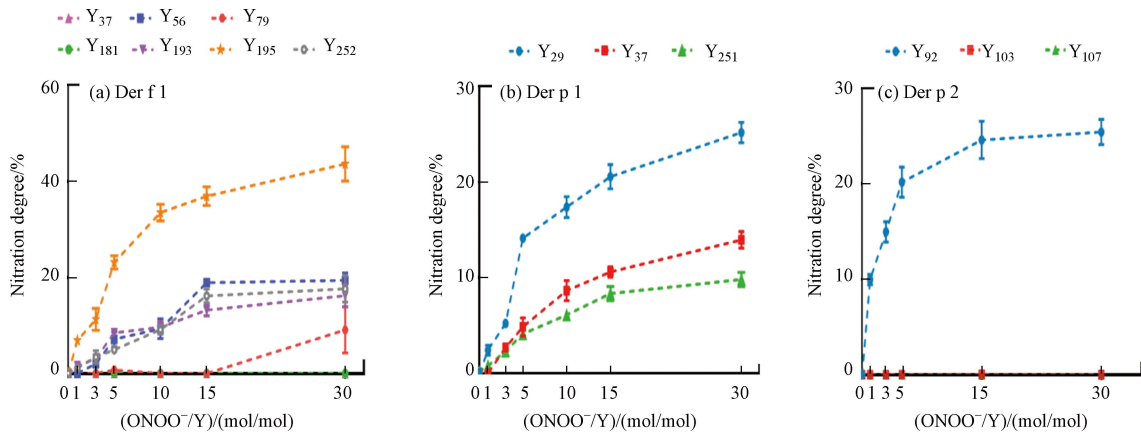
表 3 目标多肽方法学参数

Table 3 Methodology parameters of targeted peptides

多肽 Peptides	仪器日内偏差/% Instrument intraday deviation (RSD)/%		方法精密度/% Method precision (RSD)/%		相对回收率(平均值±SD)/% Relative recovery (Mean±SD)	
	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹
NR-12	5.3	5.1	6.1	3.9	75.1±4.5	78.9±3.1
NO ₂ -NR-12	6.1	3.5	6.1	6.5	77.6±4.7	79.1±5.1
YK-6	0.4	0.6	2.2	4.8	91.4±2.0	91.9±4.4
NO ₂ -YK-6	4.7	2.4	5.3	4.3	95.3±5.0	93.1±4.0
YK-12	1.0	1.3	9.1	12.8	79.0±7.2	79.4±10.1
NO ₂ -YK-12	2.6	3.3	4.9	6.9	78.8±3.9	85.5±5.9
GR-14	1.8	4.9	5.1	1.0	86.4±4.4	81.7±0.8
NO ₂ -GR-14	2.3	3.1	4.7	1.6	85.1±4.0	86.1±1.4

续表 3

多肽 Peptides	仪器日内偏差/%		方法精密度/%		相对回收率(平均值±SD)/%	
	Instrument intraday deviation (RSD)/%		Method precision (RSD)/%		Relative recovery (Mean±SD)	
	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹	5 ng·mL ⁻¹	50 ng·mL ⁻¹
SR-7	2.0	2.8	4.3	3.1	94.1±4.1	85.2±2.6
NO ₂ -SR-7(1)	5.6	1.3	7.1	7.7	81.0±5.7	87.6±6.8
NO ₂ -SR-7(2)	2.0	1.5	4.1	5.2	90.7±3.7	88.0±6.8
NO ₂ -SR-7(3)	1.8	2.8	3.3	5.8	94.4±3.2	90.4±5.3
AR-8	2.0	3.5	3.0	2.4	87.0±2.6	88.5±2.1
NO ₂ -AR-8	2.0	4.1	2.4	3.0	86.9±2.1	87.3±2.6
TK-7	3.1	3.9	5.8	4.2	86.5±5.0	90.2±3.8
NO ₂ -TK-7	3.1	5.2	1.4	3.6	88.3±1.2	89.3±3.2
SR-12	5.7	3.2	14.2	2.8	79.9±11.3	92.2±2.6
NO ₂ -SR-12	7.6	1.2	4.3	3.8	84.4±3.6	90.3±3.4
HR-5	4.4	3.7	3.0	1.5	88.6±2.6	87.5±1.3
NO ₂ -HR-5	1.6	2.8	1.5	9.1	89.1±1.3	85.8±7.8
AK-22	4.3	6.2	14.4	6.6	64.8±9.3	75.6±5.0
NO ₂ -AK-22	2.5	4.9	15.2	9.5	74.5±11.3	79.1±7.5
GK-7	5.4	2.6	14.6	2.8	74.4±10.8	82.0±2.3
NO ₂ -GK-7	2.7	2.8	4.1	2.4	83.7±3.5	94.1±2.3
YK-7	3.7	1.4	9.0	4.3	78.3±7.1	88.8±3.8
NO ₂ -YK-7	4.0	1.9	5.1	3.0	85.8±4.3	89.3±2.7

图 2 尘螨过敏原 Der f 1 (a)、Der p 1 (b) 和 Der p 2 (c) 各酪氨酸的硝基化程度(ND_Y)

注: 误差棒表示 3 组平行试验测量值的标准误差(SEM)

Fig.2 Site-specific nitration degrees (ND_Y) of house dust mite allergens Der f 1 (a), Der p 1 (b) and Der p 2 (c).

Note: The error bars represent the standard errors of the mean (SEM, n=3).

蛋白质上不同的酪氨酸残基具有不同的硝基化反应性. 蛋白质的初级序列、二级结构以及酪氨酸的溶剂可及性均可影响酪氨酸的反应活性^[8]. 在对尘螨过敏原的硝基化研究中, 发现 3 种尘螨过敏原在 ONOO⁻溶液中均发生了位点选择性的硝基化. Y₁₉₅、Y₉₂ 和 Y₂₉ 分别是 Der f 1、Der p 2 和 Der p 1 硝基化过程中的优势位点. 通过蛋白质结构预测网站 (www.predictprotein.org) 对 3 种尘螨过敏原的蛋白质结构进行预测, 各酪氨酸的结构信息见表 4. Der f 1 的 Y₁₉₅ 以及 Der p 2 的 Y₉₂ 均处于溶剂可及的蛋白质暴露表面, 并且处于结构较为灵活的环状 (Loop) 区域, 这可能是 Y₁₉₅ 和 Y₉₂ 能成为硝基化优势位点的主要原因^[8,25]. 此外, 有研究发现, 酪氨酸附近存在带负电荷的氨基酸, 如天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E), 也会促进酪氨酸的硝基化^[33,34]. 因此, 在一级结构紧邻 (-1 与 -2) 的两个谷氨酸的促进作用下, Y₂₉ 成为了 Der p 1 中硝基化反应活性相对较高的酪氨酸位点.

表 4 Der f 1、Der p 1 和 Der p 2 的酪氨酸的结构预测
Table 4 Predicted structure of tyrosines in Der f 1, Der p 1 and Der p 2

蛋白质 Protein	酪氨酸 Tyrosine	酶解肽的氨基酸序列 Amino acid sequence of tryptic peptide	二级结构 Secondary structure	溶剂可及性 Solvent Accessibility
Der f 1	Y ₃₇	NYATV EEEE VAR	Loop	Buried
	Y ₅₆	Y VEANK	Helix	Exposed
	Y ₇₉	YLMSA EAFE QLK	Helix	Buried
	Y ₁₈₁	GLE Y IQQNGV VEER	Helix	Buried
	Y ₁₉₃	SYP Y VAR	Loop	Buried
	Y ₁₉₅	SYP Y VAR	Loop	Exposed
	Y ₂₅₂	AFQH Y DGR	Strand	Buried
Der p 1	Y ₂₉	TF E EYKK	Helix	Helix
	Y ₃₇	SYAT F ED E E A AR	Loop	Buried
	Y ₂₅₁	H YDGR	Strand	Buried
Der p 2	Y ₉₂	ASID G LEVDVPGID P NACH Y VK	Loop	Exposed
	Y ₁₀₃	G Q Q Y DIK	Strand	Buried
	Y ₁₀₇	Y T W N V P K	Strand	Exposed

注: 加粗字母“Y”代表酪氨酸, 倾斜的字体代表带负电荷的氨基酸: 天冬氨酸(D)和谷氨酸(E).

Note: The bold character is the tyrosine residue and the slanted characters are the negatively charged amino acids (aspartate D and glutamate E).

3 种尘螨过敏原在硝基化条件下均发生了位点选择性的硝基化, 而一些能/易发生硝基化的酪氨酸已经被证实是这些尘螨过敏原抗原决定簇(细胞表位)的组成部分, 例如, 酪氨酸 Y₉₂、Y₁₀₃ 和 Y₁₀₇ 均是 Der p 2 的线性表位的组成部分^[35,36], 而 Y₉₂ 极易发生硝基化, 因此 Y₉₂ 可能在硝基化导致 Der p 2 致敏性变化的过程中发挥着重要作用. 此外, 酪氨酸的硝基化可能改变蛋白质结构, 导致细胞表位的暴露或新表位的产生, 从而引过敏原的致敏性增强^[9-11]. 因此尘螨过敏原硝基化所带来的致敏性健康风险不可忽视, 而探究位点特异性的硝基化对尘螨过敏原致敏性的影响也将是进一步的研究重点.

3 结论(Conclusion)

本文建立了定量尘螨过敏原各酪氨酸硝基化程度的分析方法, 该方法可同时检测 I、II 类 3 种尘螨过敏原(Der f 1、Der p 1 和 Der p 2)共 13 个酪氨酸位点的硝基化程度, 并成功运用于分析 3 种尘螨过敏原在 ONOO⁻硝基化作用下各酪氨酸的硝基化状况以及各过敏原硝基化的位点选择性. 结果发现, 在 ONOO⁻作用下, 3 种尘螨过敏原均发生了位点特异性的硝基化, 其中, Y₁₉₅、Y₂₉ 分别是 Der f 1 和 Der p 1 硝基化反应性较高的酪氨酸位点, Y₉₂ 是 Der p 2 最容易发生硝基化的酪氨酸位点.

参考文献 (References)

- [1] WEINBERG E G. The WAO white book on allergy 2011-2012 [J]. *Current Allergy & Clinical Immunology*, 2011, 24(3): 156-161.
- [2] PAWANKAR R. Allergic diseases and asthma: A global public health concern and a call to action [J]. *The World Allergy Organization Journal*, 2014, 7(1): 12.
- [3] SVARTENGREN M, STRAND V, BYLIN G, et al. Short-term exposure to air pollution in a road tunnel enhances the asthmatic response to allergen [J]. *European Respiratory Journal*, 2000, 15(4): 716-724.
- [4] RING J, EBERLEIN-KOENIG B, BEHRENDT H. Environmental pollution and allergy [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 2001, 87(6 Suppl 3): 2-6.
- [5] BRUNEKREEF B, SUNYER J. Asthma, rhinitis and air pollution: Is traffic to blame? [J]. *European Respiratory Journal*, 2003, 21(6): 913-915.
- [6] FRANZE T, WELLER M G, NIESSNER R, et al. Protein nitration by polluted air [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(6): 1673-1678.
- [7] SELZLE K, ACKAERT C, KAMPF C J, et al. Determination of nitration degrees for the birch pollen allergen Bet v 1 [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(27): 8945-8949.

- [8] ABELLO N, KERSTJENS H A M, POSTMA D S, et al. Protein tyrosine nitration: Selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins [J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(7): 3222-3238.
- [9] OHMORI H, KANAYAMA N. Immunogenicity of an inflammation-associated product, tyrosine nitrated self-proteins [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2005, 4(4): 224-229.
- [10] HARDY L L, WICK D A, WEBB J R. Conversion of tyrosine to the inflammation-associated analog 3'-nitrotyrosine at either TCR- or MHC-contact positions can profoundly affect recognition of the MHC class I-restricted epitope of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein 33 by CD8 T cells [J]. *Journal of Immunology*, 2008, 180(9): 5956-5962.
- [11] GRUIJTHUIJSEN Y K, GRIESHUBER I, STÖCKLINGER A, et al. Nitration enhances the allergenic potential of proteins [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2006, 141(3): 265-275.
- [12] KARLE A C, OOSTINGH G J, MUTSCHLECHNER S, et al. Nitration of the pollen allergen Bet v 1.0101 enhances the presentation of bet v 1-derived peptides by HLA-DR on human dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31483.
- [13] MARKS G B. House dust mite exposure as a risk factor for asthma: Benefits of avoidance [J]. *Allergy*, 2008, 53: 108-114.
- [14] TUPKER R A, de MONCHY J G R, COENRAADS P J, et al. Induction of atopic dermatitis by inhalation of house dust mite [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1996, 97(5): 1064-1070.
- [15] BOULET L P, TURCOTTE H, LAPRISE C, et al. Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 1997, 27(1): 52-59.
- [16] CARABALLO L, VALENTA R, PUERTA L, et al. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE-antibody binding molecules from indoor allergen sources [J]. *World Allergy Organization Journal*, 2020, 13(5): 100118.
- [17] PITTMER G, VRTALA S, THOMAS W R, et al. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2004, 34(4): 597-603.
- [18] RESCH Y, MICHEL S, KABESCH M, et al. Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and nonasthmatic children [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 136(4): 1083-1091.
- [19] CHAPMAN M, PLATTS-MILLS T. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1 [J]. *Journal of Immunology*, 1980, 125(2): 587-592.
- [20] 徐帆, 杨方星. 尘螨过敏原蛋白及其硝化产物的鉴别 [J]. *环境化学*, 2021, 40(7): 1969-1977.
- XU F, YANG F X. Identification of house dust mite allergens and their nitrated products [J]. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(7): 1969-1977(in Chinese).
- [21] GREENACRE S A B, ISCHIROPOULOS H. Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction [J]. *Free Radical Research*, 2001, 34(6): 541-581.
- [22] GHIANI A, BRUSCHI M, CITTERIO S, et al. Nitration of pollen aeroallergens by nitrate ion in conditions simulating the liquid water phase of atmospheric particles [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 573: 1589-1597.
- [23] YANG H, ZHANG Y Y, PÖSCHL U. Quantification of nitrotyrosine in nitrated proteins [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(2): 879-886.
- [24] WALCHER W, FRANZE T, WELLER M G, et al. Liquid- and gas-phase nitration of bovine serum albumin studied by LC-MS and LC-MS/MS using monolithic columns [J]. *Journal of Proteome Research*, 2003, 2(5): 534-542.
- [25] ZHANG Y Y, YANG H, PÖSCHL U. Analysis of nitrated proteins and tryptic peptides by HPLC-chip-MS/MS: Site-specific quantification, nitration degree, and reactivity of tyrosine residues [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(1): 459-471.
- [26] WILLARD B B, RUSE C I, KEIGHTLEY J A, et al. Site-specific quantitation of protein nitration using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(10): 2370-2376.
- [27] MARX V. Targeted proteomics [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 19-22.
- [28] PICOTTI P, AEBERSOLD R. Selected reaction monitoring-based proteomics: Workflows, potential, pitfalls and future directions [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(6): 555-566.
- [29] 刘永福, 贾小芳, 腾珍林, 等. 液质联用多反应监测法定量目标多肽或蛋白质 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(1): 86-92.
- LIU Y F, JIA X F, TENG Z L, et al. Quantification of target peptides or proteins by liquid chromatography-mass spectrometry with multiple reaction monitoring [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 28(1): 86-92(in Chinese).
- [30] YASUEDA H, MITA H, YUI Y, et al. Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and the corresponding allergens from *Dermatophagoides farinae* [J]. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 1989, 88(4): 402-407.
- [31] USEPA. Revised assessment of detection and quantification approaches[R]. EPA-821-B-04-005, 2004.
- [32] REINMUTH-SELZLE K, ACKAERT C, KAMPF C J, et al. Nitration of the birch pollen allergen Bet v 1.0101: Efficiency and site-selectivity of liquid and gaseous nitrating agents [J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(3): 1570-1577.
- [33] SOUZA J M, DAIKHIN E, YUDKOFF M, et al. Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 371(2): 169-178.
- [34] ISCHIROPOULOS H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305(3): 776-783.
- [35] CRACK L R, CHAN H W, MCPHERSON T, et al. Identification of an immunodominant region of the major house dust mite allergen Der p 2 presented by common human leucocyte antigen alleles [J]. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2012, 37(3): 266-276.
- [36] VERHOEF A, HIGGINS J A, THORPE C J, et al. Clonal analysis of the atopic immune response to the group 2 allergen of *Dermatophagoides* spp. : Identification of HLA-DR and-DQ restricted T cell epitopes [J]. *International Immunology*, 1993, 5(12): 1589-1597.