

甘露糖—小清蛋白美拉德反应产物的免疫活性

杨汝晴¹, 赵勇娟¹, 张凌晶^{1,2}, 谢泽伟¹, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2*}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2. 集美大学水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探讨以甘露糖为还原糖进行美拉德反应对小清蛋白免疫活性的影响, 通过将鲢重组小清蛋白(rPV)和甘露糖混合物在干热条件下(100 °C)反应100 min制得糖化的rPV (M-rPV), 采用Tricine-SDS-PAGE和斑点杂交(Dot-blotting)分析糖化前后rPV的聚合特性、免疫活性及消化稳定性的变化; 采用圆二色谱仪和扫描电子显微镜分析糖化对rPV的二级结构及微观结构的影响。结果显示, rPV糖化后形成大分子量的片状聚集体; 甘露糖糖化修饰的rPV免疫活性及消化稳定性均显著下降; 美拉德反应导致rPV二级结构中的 α -螺旋和无规则卷曲的含量有一定程度的减少, 而 β -折叠的含量显著增加。研究表明, 以甘露糖为还原糖进行美拉德反应可有效降低rPV的免疫活性及消化稳定性, 这可能与糖化后rPV聚集体的形成及二级结构的改变有关。

关键词: 鲢; 小清蛋白; 甘露糖; 美拉德反应; 免疫活性

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

近年来, 随着鱼类产量和消费量逐年增加, 鱼类过敏事件时有发生。世界过敏组织报告称, 在2008年, 5%的儿童和2%的成年人受到水产品过敏问题的困扰^[1]。鱼类作为八大过敏食物之一, 其主要过敏原为小清蛋白(parvalbumin, PV)。PV是一种分子量约为12 ku的水溶性钙结合蛋白, 性质稳定, 对热、酸、碱、化学试剂及蛋白酶水解等均具有较强的耐受性, 导致其不易在加工和烹饪过程中被破坏。因此, 寻找一种能有效降低鱼类制品致敏性的加工方法显得尤为重要。美拉德反应是一种非酶褐变反应, 广泛应用于食品加工工艺中。之前研究报道指出, 美拉德反应可在一定程度上改变花生^[2]、榛子^[3]、鸡蛋^[4]、荞麦^[5]等过敏原的免疫活性, 但其作用效果与参加反应的还原糖的类型、反应条件及过敏原本身密切相关。

本研究拟以甘露糖为还原糖, 通过分析美拉德反应前后重组鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)小清蛋白(rPV)聚合特性、免疫活性及消化稳定

性的变化, 探索美拉德反应对PV免疫活性的影响及可能的影响方式, 以期在美拉德反应在低致敏性鱼类产品开发中的应用提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

rPV的表达菌种(BL21/pET-28a-PV)^[6]及抗鲢PV单克隆抗体^[7]为本实验室制备。

异丙基硫代半乳糖苷膜(IPTG, Thermo公司); ECL底物(Thermo Scientific公司); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 青岛福林生物化学公司); 二硫苏糖醇(DTT, Solarbio公司); 牛血清蛋白、十二烷基硫酸钠、丙烯酰胺(Bio-Rad公司); 兔抗鼠IgG(Dako公司); 胃蛋白酶(本实验室制备)^[8]、胰酶(Sigma公司)。其他试剂如无特殊说明均为分析纯。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机(Avanti J-26SXP, Beckman

收稿日期: 2016-07-30 修回日期: 2016-09-27

资助项目: 国家自然科学基金(31301440); 福建省自然科学基金(2016J01709); 福建省教育厅专项(JA14170)

通信作者: 曹敏杰, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

公司);紫外全波长光谱仪(Lambda35, Perkin Elmer公司);冷冻干燥机(FD-1C-80, 北京博医康实验仪器有限公司);凝胶成像仪(G:BOX, SynGene公司);化学发光荧光成像仪(Fluor Chem Q, Alpha Innotech公司);圆二色谱仪(Chirascan, Applied Photophysics公司);扫描电子显微镜(Phenom-WorldBV, Phenom公司);超声波破碎仪(VCX130, Sonics公司)。

1.3 实验方法

rPV的制备 将rPV的表达菌株(BL21/pET-28a-PV)按1:1000比例接种于500 mL的LB培养基(含终浓度为25 mg/L的卡那霉素)中, 37 °C培养。当OD₆₀₀值为0.4~0.6时, 加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导表达4 h。将菌体重悬于20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 超声波破菌, 8000 r/min离心20 min, 收集上清液。采用镍离子亲和层析柱纯化重组蛋白。

rPV的美拉德反应 用含有1 mmol/L NaHCO₃的PBS (20 mmol/L, pH 7.0)将甘露糖配制成8 mg/mL的糖溶液, 与1 mg/mL的rPV等体积混合, -80 °C预冻8 h后, 在真空度为30 Pa条件下冷冻干燥48 h。冻干的混合物粉末于100 °C反应100 min后, 复溶, 并用PBS (20 mmol/L, pH 7.0)透析, -30 °C保存备用。含糖量的测定方法: 取40 μL样品与200 μL蒽酮试剂在95 °C反应10 min后置于冰上冷却, 然后测量620 nm处的吸光值。用甘露糖作标准曲线, 计算样品的含糖量。

Tricine-SDS-PAGE参考Schägger^[9]的方法: 浓缩胶浓度为4%, 夹层胶浓度为10%, 分离胶浓度为16%。电泳结束后, 考马斯亮蓝染色, 经脱色液脱色后, 用凝胶成像系统记录结果。

免疫印迹 Western-blotting是通过半干转膜方式将蛋白从SDS-PAGE胶转移到NC膜, 以5%的脱脂奶室温封闭1.5 h, TBS-T清洗5次后, 以抗鲑PV单克隆抗体为一抗室温孵育1.5 h。TBS-T清洗5次后, 以辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG为二抗室温孵育1.5 h。TBS-T清洗5次后, 加入ECL底物孵育2 min, 在化学发光荧光成像系统中记录结果。斑点杂交分析(Dot-blotting)是取美拉德反应前后样品各1.5 μL点样于NC膜上。封闭液为5%的脱脂奶, 室温封闭1.5 h。之后一抗、二抗的操作同Western-blotting的操作。TBS-T清洗5次后, 加入ECL底物孵育2 min, 在化学发光荧光成像系统中记录结果。

圆二色谱分析 采用圆二色谱法(circular dichroism, CD)分析rPV美拉德反应前后的二级结构变化^[10]。操作温度为室温, 扫描波长范围为185~260 nm, 扫描速率为50 nm/min, 带宽为1 nm, 响应时间为2 s, 以PBS做为空白对照。

扫描电子显微镜观察 将美拉德反应前后样品均匀固定铺在电镜样品台上, 快速冷冻后, 放入载物台调节最佳视野和放大倍数进行观察、拍照。

消化稳定性分析 ①模拟胃液消化, 参照Huang等^[8]方法, 将美拉德反应前后的样品(预热)与模拟胃液混匀, 胃蛋白酶与样品的比例为1:20(W/W), 胃蛋白酶的酶活为20 U/mg, 37 °C振荡反应60 min后, 迅速与Na₂CO₃(200 mmol/L)混匀, 使其达到碱性终止反应, 并置于冰上。对照中加灭活的酶。②模拟肠液消化, 参照Huang等^[8]方法, 取经模拟胃液消化后的样品与模拟肠液混匀, 胰酶与样品的比例为1:200(W/W), 胰酶的酶活为30 U/mg, 37 °C振荡反应120 min后取出, 95 °C加热10 min, 以终止反应。对照组加灭活的酶。

蛋白浓度测定 蛋白浓度采用Bio-Rad蛋白检测试剂盒测定, 将样品与染料室温孵育5 min, 测定在595 nm处的吸光值。以牛血清蛋白为标准蛋白制备标准曲线。每个样品重复测定3次。

2 结果

2.1 美拉德反应对rPV聚合特性的影响

以本实验室已构建的表达菌株对rPV进行大量表达。表达的产物经Ni-NTA亲和柱层析纯化后, 所得蛋白呈现单一条带, 表明rPV得到高度纯化, 分子量为14 ku左右(图1-a)。采用抗rPV单克隆抗体作为一抗, 进行Western-blotting分析, 结果发现纯化的蛋白与抗体发生特异性的结合反应, 证实纯化的蛋白为rPV(图1-b)。

以甘露糖为还原糖, 在100 °C下反应100 min对纯化的rPV进行糖化修饰, 采用蒽酮—硫酸法对美拉德反应产物进行含糖量测定, 发现该条件对rPV有较高度度的糖化修饰作用, 糖化rPV的含糖量为150 μg/mg。与对照组相比, 美拉德反应产物中14 ku的目标条带基本消失, 蛋白条带迁移率明显降低, 条带出现扩散, 有大量的二聚体和多聚体形成(图2-a, 泳道3)。当样品

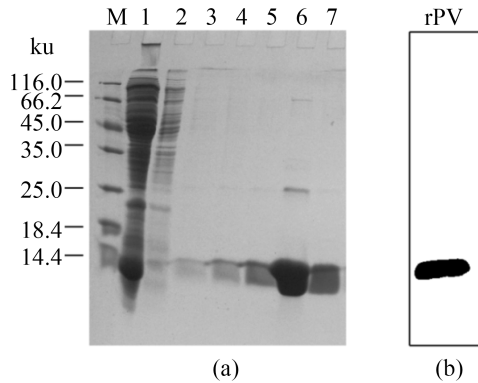


图1 rPV纯化过程的SDS-PAGE分析(a)及rPV的Western-blotting鉴定(b)

M. 标准蛋白; 1. pET28a-PV 菌体蛋白; 2. 未吸附部分; 3-7. 吸附部分纯化的rPV

Fig. 1 SDS-PAGE analysis (a) and Western-blotting identification of purified rPV (b)

M. protein marker; 1. pET28a-PV induced by IPTG; 2. unadsorbed proteins; 3-7. eluted proteins

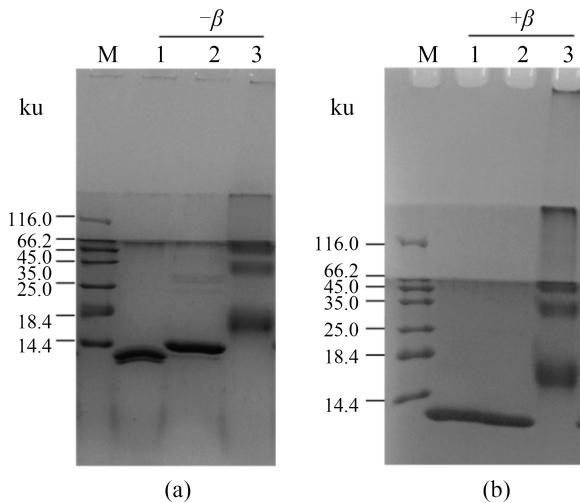


图2 美拉德反应产物的Tricine-SDS-PAGE分析

(a)非还原型Tricine-SDS-PAGE; (b)还原型Tricine-SDS-PAGE; M. 标准蛋白; 1. rPV; 2. 对照(加热处理rPV); 3. M-rPV; -β. 未添加β-巯基乙醇; +β. 添加β-巯基乙醇

Fig. 2 Analysis of rPV Maillard reaction products

(a) non-reducing Tricine-SDS-PAGE; (b) reducing Tricine-SDS-PAGE; M. protein marker; 1. rPV; 2. control (heated rPV); 3. mannose-rPV; -β. without β-mercaptoethanol; +β. with β-mercaptoethanol

中加入β-巯基乙醇后, 美拉德反应产物的聚合情况基本没有发生变化(图2-b, 泳道3)。

进一步采用扫描电镜观察rPV在美拉德反应前后聚合情况的改变。结果显示, rPV经过甘露糖糖化修饰后微观结构变化显著, 样品从松散的分布状态(图3-a)变为较规则的片状聚集体(图3-b)。

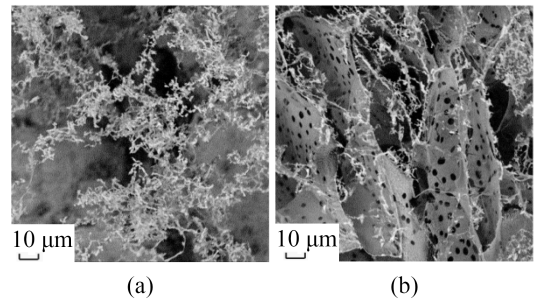


图3 美拉德反应产物的扫描电镜分析

(a)对照(加热处理rPV, H-rPV); (b) M-rPV

Fig. 3 Scanning electron microscope analysis of rPV Maillard reaction products

(a) control (heat treated rPV, H-rPV); (b) mannose-rPV (M-rPV)

2.2 美拉德反应对rPV免疫活性的影响

利用单克隆抗体对rPV的免疫活性进行斑点杂交检测, 结果显示, 美拉德反应前后的样品以相同起始浓度进行点样, 仅热处理的rPV (H-rPV)稀释8倍时仍具有较强的IgG结合活性, 而与甘露糖进行美拉德反应后的产物(M-rPV)稀释2倍后, 其IgG结合活性显著降低(图4)。

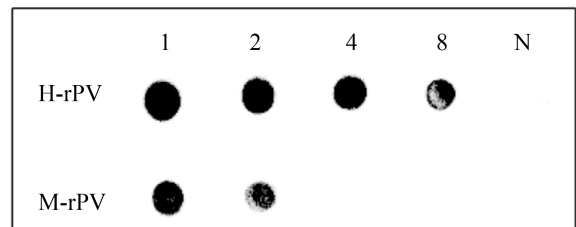


图4 斑点杂交法测定美拉德反应对rPV免疫活性的影响

1、2、4、8. 稀释倍数; N. 阴性对照(牛血清白蛋白)

Fig. 4 Dot-blotting analysis of the influence of Maillard reaction on the rPV immunoreactivity

1, 2, 4, 8. step dilution folds; N. negative control (bovine serum albumin, BSA)

2.3 美拉德反应对rPV的胃肠液消化稳定性的影响

仅热处理的rPV在模拟胃液作用60 min后, 蛋白发生了小部分降解, 再经过胰酶消化, 约12ku的降解条带仍比较稳定, 作用120 min后依然稳定存在(图5-a)。为了进一步确定美拉德反应对rPV胃肠液消化稳定性的影响, 采用斑点杂交对消化产物的免疫活性进行分析。结果显示, 加热处理的rPV经过模拟胃液消化后, IgG结合活

性并未明显减弱, 仍具有一定的IgG结合活性, 而M-rPV经模拟胃液消化后IgG结合能力几乎完全丧失(图5-b)。

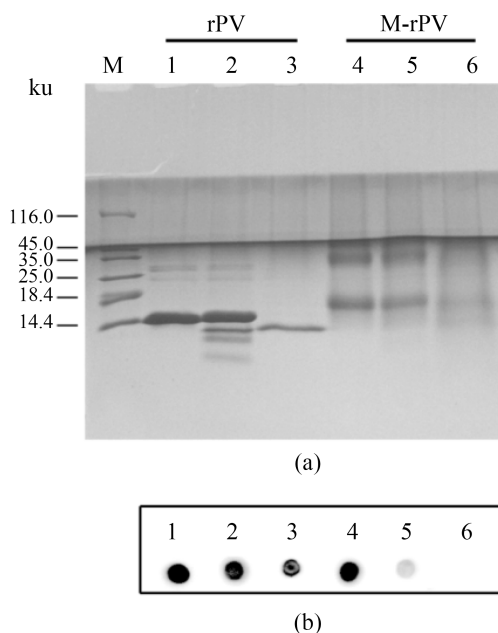


图5 美拉德反应产物的胃肠液消化稳定性

(a) Tricine-SDS-PAGE分析; (b) 斑点杂交分析; M. 标准蛋白; 1、4. 对照组; 2、5. 模拟胃液消化; 3、6. 模拟肠液消化

Fig. 5 Simulated gastric and intestinal digestibility of rPV Maillard reaction products

(a) Tricine-SDS-PAGE analysis; (b) Dot-blotting analysis; M. protein marker; 1, 4. control; 2, 5. simulated gastric digestion; 3, 6. simulated intestinal digestion

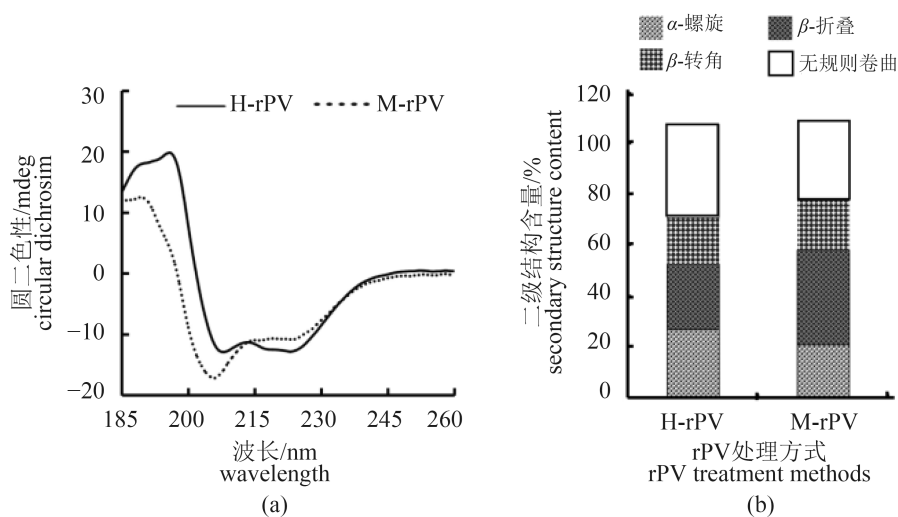


图6 美拉德反应对rPV二级结构的影响

(a) H-rPV和M-rPV的CD光谱图; (b) H-rPV和M-rPV反应产物中的二级结构含量

Fig. 6 The influence of Maillard reaction products on the secondary structure of rPV

(a) far-UV CD spectra of H-rPV and M-rPV; (b) proportion of secondary structures of H-rPV and M-rPV

2.4 美拉德反应对rPV二级结构的影响

采用圆二色谱分析美拉德反应前后rPV二级结构的变化(图6-a)。所得数据采用CDNN软件对二级结构中的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的百分含量进行拟合。与美拉德反应前的rPV相比, 美拉德反应导致rPV的 α -螺旋、无规则卷曲的含量都有一定程度的减少, 而 β -折叠显著增加, β -转角的含量基本不变(图6-b)。

3 讨论

小清蛋白是鱼类的主要过敏原, 且具有良好的热稳定性与消化稳定性^[11]。根据对产物聚合情况的Tricine-SDS-PAGE分析(图2), 结果显示rPV与甘露糖发生美拉德反应过程中, rPV结合糖链、蛋白并发生交联, 这与Teodorowicz等^[12]报道的花生7S球蛋白与葡萄糖发生美拉德反应后的聚合特性改变情况类似。

以甘露糖为还原糖进行美拉德反应可显著降低rPV的免疫活性。Kroghsbo等^[13]报道花生过敏原Ara h1和葡萄糖的糖化反应能降低其致敏性。Seo等^[14]发现马铃薯蛋白与多聚半乳糖发生美拉德反应后, IgE结合活性降低, 而与半乳糖及寡聚半乳糖反应后IgE结合活性升高, 表明美拉德反应对过敏原免疫活性的影响不仅取决于过敏原本身的性质, 也与反应条件有关。

关于还原糖影响rPV免疫活性的原因,一方面可能是由于美拉德反应过程中糖链的引入掩盖了过敏原的抗原表位,如Mueller等^[15]鉴定花生过敏原Ara h1的糖化位点位于抗原表位,从而影响其IgE结合活性。另一方面,可能是由于美拉德反应使rPV的二级或三级结构发生改变,影响了抗体对抗原表位的识别。Zhao等^[16]的研究表明,以葡萄糖为还原糖,在60 °C对rPV进行美拉德反应,可将糖链连接到3个IgE结合位点,并降低rPV的免疫活性。本研究的Tricine-SDS-PAGE和电镜结果显示, rPV与甘露糖发生美拉德反应后,蛋白之间形成了较为致密的聚集体,这可能对抗体与抗原表位的识别造成了一定的空间位阻,从而影响rPV的免疫活性。

从rPV的一级结构分析, PV含有多个胰酶酶切位点^[6],但在经模拟胃肠液消化后,蛋白并未被完全降解,这可能是由于未经加工的rPV中部分胰酶的作用位点被包裹于分子内部而无法与胰酶发生作用。rPV的美拉德反应产物在经过模拟胃肠液消化后,主条带基本降解完全,推测经过甘露糖改性之后的rPV结构发生了变化,使得原先包裹在分子内的胰酶作用位点暴露出来。通过Dot-blotting对消化产物的免疫活性进行分析,发现M-rPV经模拟胃液消化后,其IgG结合能力几乎完全丧失,这一结果表明以甘露糖为还原糖进行美拉德反应可降低rPV的胃肠液消化稳定性。Yu等^[17]也报道了拟穴青蟹(*Scylla Paramamosain*)过敏原经过适当的加工处理后,通过模拟胃肠液消化, IgG/IgE结合活性显著降低。

美拉德反应是蛋白质的氨基或羧基与还原糖之间的反应。蛋白质中的 α -螺旋是通过NH-及-CO之间的氢键保持稳定的^[18]。对rPV美拉德反应产物的二级结构进行分析,发现其 α -螺旋含量及无规则卷曲含量都有所降低,表明在与甘露糖反应的过程中, rPV发生解螺旋,蛋白质结构发生变化。据Ma等^[19]报道,美拉德反应可以改变鸡蛋过敏原卵清蛋白的结构,从而破坏其抗原表位或暴露隐藏的抗原表位。蔺海鑫等^[20]的研究指出,糖化反应可有效改变菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)原肌球蛋白的结构,降低其免疫活性。Liu等^[21]的研究也表明,乳清蛋白与乳糖之间的糖化反应,会使巯基基团暴露、共价交联和游离赖氨酸含量降低,从而使蛋白结构发生改变,进而降低乳清蛋白的IgG结合能力。本研

究中美拉德反应改变了rPV的二级结构,可能因此影响了其对抗原表位的识别。

本研究以甘露糖为还原糖,在100 °C反应100 min条件下进行美拉德反应,使rPV结合糖链形成大分子量的片状聚集体。该条件下的美拉德反应可降低rPV的IgG结合活性和胃肠液消化稳定性,并导致rPV二级结构中 α -螺旋和无规则卷曲的含量减少, β -折叠的含量显著增加。以甘露糖为还原糖进行美拉德反应导致蛋白二级结构改变和聚集体的生成可能是影响rPV免疫活性及消化稳定性的重要原因。

参考文献:

- [1] Sharp M F, Lopata A L. Fish allergy: in review[J]. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2014, 46(3): 258-271.
- [2] Blanc F, Vissers Y M, Adel-Patient K, *et al.* Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2011, 55(12): 1887-1894.
- [3] Iwan M, Vissers Y M, Fiedorowicz E, *et al.* Impact of Maillard reaction on immunoreactivity and allergenicity of the hazelnut allergen Cor a 11[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7163-7171.
- [4] Rupa P, Nakamura S, Katayama S, *et al.* Effects of ovalbumin glycoconjugates on alleviation of orally induced egg allergy in mice via dendritic-cell maturation and T-cell activation[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(2): 405-417.
- [5] Nakamura S, Suzuki Y, Ishikawa E, *et al.* Reduction of *in vitro* allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(3): 538-545.
- [6] 王慈, 曹敏杰, 郑晓江, 等. 鲢小清蛋白的cDNA克隆及在大肠杆菌中的原核表达[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 669-675.
Wang C, Cao M J, Zheng X J, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of parvalbumin from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skeletal muscle[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 669-675(in Chinese).
- [7] Cai Q F, Wang X C, Liu G M, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked-immunosorbent assay (c-ELISA) for quantification of

- silver carp parvalbumin[J]. *Food Control*, 2013, 29(1): 241-247.
- [8] Huang Y Y, Liu G M, Cai Q F, *et al.* Stability of major allergen tropomyosin and other food proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(5): 1196-1201.
- [9] Schägger H. Tricine-SDS-PAGE[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(1): 16-22.
- [10] Kelly S M, Jess T J, Price N C. How to study proteins by circular dichroism[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2005, 1751(2): 119-139.
- [11] 蔡秋凤, 王锡昌, 郭城, 等. 加工处理对鲢小清蛋白免疫活性的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(2): 297-302.
Cai Q F, Wang X C, Guo C, *et al.* Effects of processing methods on the immunoreactivity of silver carp parvalbumin[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(2): 297-302(in Chinese).
- [12] Teodorowicz M, Fiedorowicz E, Kostyra H, *et al.* Effect of Maillard reaction on biochemical properties of peanut 7S globulin (Ara h 1) and its interaction with a human colon cancer cell line (Caco-2)[J]. *European Journal of Nutrition*, 2013, 52(8): 1927-1938.
- [13] Kroghsbo S, Rigby N M, Johnson P E, *et al.* Assessment of the sensitizing potential of processed peanut proteins in brown Norway rats: roasting does not enhance allergenicity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96475.
- [14] Seo S, L'Hocine L, Karboune S. Allergenicity of potato proteins and of their conjugates with galactose, galacto oligosaccharides, and galactan in native, heated, and digested forms[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(16): 3591-3598.
- [15] Mueller G A, Maleki S J, Johnson K, *et al.* Identification of Maillard reaction products on peanut allergens that influence binding to the receptor for advanced glycation end products[J]. *Allergy*, 2013, 68(12): 1546-1554.
- [16] Zhao Y J, Cai Q F, Jin T C, *et al.* Effect of Maillard reaction on the structural and immunological properties of recombinant silver carp parvalbumin[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 75: 25-33.
- [17] Yu H L, Cao M J, Cai Q F, *et al.* Effects of different processing methods on digestibility of *Scylla paramamosain* allergen (tropomyosin)[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(4): 791-798.
- [18] Liu R, Zhao S M, Liu Y M, *et al.* Effect of pH on the gel properties and secondary structure of fish myosin[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 196-202.
- [19] Ma X J, Chen H B, Gao J Y, *et al.* Conformation affects the potential allergenicity of ovalbumin after heating and glycation[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013, 30(10): 1684-1692.
- [20] 蔺海鑫, 林洪, 王晓斐, 等. 美拉德反应对菲律宾蛤仔原肌球蛋白结构及免疫活性的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(3): 22-26.
Lin H X, Lin H, Wang X F, *et al.* Effect of Maillard reaction on IgE binding capacity and conformational structure of tropomyosin from short-neck clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. *Food Science*, 2016, 37(3): 22-26(in Chinese).
- [21] Liu F H, Teodorowicz M, van Boekel M A J S, *et al.* The decrease in the IgG-binding capacity of intensively dry heated whey proteins is associated with intense Maillard reaction, structural changes of the proteins and formation of RAGE-ligands[J]. *Food & Function*, 2016, 7(1): 239-249.

Study on the immunoreactivity of mannose-parvalbumin conjugate

YANG Ruqing¹, ZHAO Yongjuan¹, ZHANG Lingjing^{1,2}, XIE Zewei¹,
LIU Guangming^{1,2}, CAO Minjie^{1,2*}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;
2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products,
Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to determine the influence of Maillard reaction on the structural and immunological properties of parvalbumin, the major allergen of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), recombinant silver carp PV (rPV) was used and incubated with mannose at 100 °C for 100 min, and glycated PV (M-rPV) was then obtained after dialysis. Tricine-SDS-PAGE and Dot-blotting was performed to elucidate the change of mobility and immunoreactivity of rPV after glycation. Simulated gastrointestinal digestion experiment was carried out to compare the digestibility of rPV and M-rPV. Circular dichroism spectroscopy (CD) and scanning electron microscopy (SEM) were used to determine the change of the secondary structure and the microstructure of rPV after Maillard reaction. The results showed that M-rPV had significantly high amounts of protein-bound mannose of approximately 150 µg per microgram M-rPV as measured by the anthrone sulfuric acid method. Dimers and polymers formed in the glycated sample, which might be attributed to the covalent bonds formed during Maillard reaction as analyzed by reducing Tricine-SDS-PAGE. Formation of compact aggregates after Maillard reaction was further confirmed by SEM, which might block the access of immunoglobulins to the epitopes, and therefore decrease the immunoreactivity of M-rPV, as demonstrated by dot-blotting using mouse anti-silver carp parvalbumin monoclonal antibody. M-rPV exhibited less resistance against gastrointestinal digestion *in vitro* as revealed by Tricine-SDS-PAGE and dot-blotting. Maillard reaction also showed a minor effect on the secondary structures of rPV with a decrease of α -helix and an increase of β -strand content. The aggregation formation and change in the secondary structure of M-rPV might explain the decrease of rPV immunoreactivity and digestibility after Maillard reaction. Our work might be useful for understanding the effects of Maillard reaction on the decrease of immunoreactivity of food allergens in general.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; parvalbumin; mannose; Maillard reaction; immunoreactivity

Corresponding author: CAO Minjie. E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Scientific Foundation of China (31301440); National Scientific Foundations of Fujian Province (2016J01709); Fujian Education Department Fund (JA14170)