UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI w OLSZTYNIE

WYDZIAŁ NAUKI O ŻYWNOŚCI



KATEDRA BIOCHEMII ŻYWNOŚCI

Identyfikacja markerów peptydowych wspólnych dla sekwencji aminokwasowych tropomiozyn wybranych gatunków owoców morza

Rozprawa doktorska

mgr inż. Marta Magdalena Turło

Promotor
prof. dr hab. Piotr Minkiewicz

Olsztyn 2022

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN

FACULTY OF FOOD SCIENCES

CHAIR OF FOOD BIOCHEMISTRY

Identification of peptide markers common to tropomyosin amino acid sequences of selected seafood species

Doctoral dissertation

mgr inż. Marta Magdalena Turło

Supervisor
prof. dr hab. Piotr Minkiewicz

Olsztyn 2022

„Nauka jest jak niezmierne morze. Im więcej jej pijesz, tym bardziej jesteś spragniony.”

Stefan Żeromski

Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi dr hab. Piotrowi Minkiewiczowi
za nieocenioną pomoc i wsparcie merytoryczne przy powstaniu niniejszej rozprawy doktorskiej, a także za życzliwość i dobre słowo. Praca pod promotorstwem Pana Profesora była dla mnie zaszczytem.

Swoje podziękowania kieruję również do
Pani Profesor dr hab. inż. Małgorzaty Darewicz,
dzięki której miałam możliwość realizowania pracy doktorskiej w Katedrze Biochemii Żywności. Dziękuję za zaufanie, wsparcie naukowe i możliwość rozwijania się.

Dziękuję Agnieszce, Renacie, Monice P. i Monice H. oraz wszystkim pracownikom Katedry Biochemii Żywności za wsparcie, życzliwość i wspólną pracę.

Dziękuję mojej Rodzinie i Narzeczonemu,
za wiarę we mnie i wsparcie na każdym kroku mojej drogi do ukończenia doktoratu.

Badania wykonano dzięki wsparciu ze środków:

Katedry Biochemii Żywności, Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie – dotacja MEiN na działania statutowe (nr tematu 17.610.014-110).

Zintegrowanego programu rozwoju badań naukowych i innowacji w zakresie nauk rolniczych i nauk weterynaryjnych na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie, pt.: „Innowacyjna żywność wysokiej jakości dla zdrowia społeczeństwa i zrównoważonego rozwoju".
Projekt finansowany w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą "Regionalna Inicjatywa Doskonałości" w latach 2019-2022, nr projektu 010/RID/2018/19, kwota finansowania 12.000.000 złotych.

Środków z dotacji celowej przyznanej na rok 2017 i 2018, celem finansowania działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, na Wydziale Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE 7
SUMMARY 9
1. ZAGADNIENIE W ŚWIETLE LITERATURY 11
1.1 Wstęp 11
1.2 Alergia pokarmowa 12
1.3 Krzyżowe reakcje alergiczne 14
1.4 Owoce morza jako żywność 15
1.5 Owoce morza jako źródło alergenów 17
1.6 Tropomiozyny jako alergeny 18
1.7 Zastosowanie markerów peptydowych w proteomice 25
1.8 Tropomiozyny jako prekursory markerów 31
2. CEL PRACY 32
3. PLAN BADAŃ 33
4. MATERIAŁY I METODYKA 34
4.1 Materiały 34
4.1.1. Sekwencje tropomiozyn 34
4.1.2. Próbki owoców morza 34
4.2 Metodyka 35
4.2.1. Analiza bioinformatyczna 35
4.2.2. Analiza laboratoryjna 35
- Ekstrakcja 36
- Hydroliza 36
- Kontrola stopnia hydrolizy (SDS-PAGE) 37
- Analiza LC-MS i LC-MS/MS 38
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW 43
5.1 Analiza bioinformatyczna 43
5.2 Analiza laboratoryjna 46
5.2.1. Kontrola postępu hydrolizy 46
5.2.2. Określenie przybliżonych mas cząsteczkowych tropomiozyn metodą spektrometrii mas 50
5.2.3. Analiza peptydów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (RP-HPLC-MS i RP-HPC-MS/MS) 52
- Rozdzielenie próbek hydrolizatów metodą chromatograficzną 54
- Identyfikacja peptydów za pomocą spektrometrii mas 56

- Możliwość uwalniania peptydów z białek różnych organizmów 63
- Określenie stopnia pokrycia sekwencji (SCC) peptydów i epitopów 65
- Określenie stopnia pokrycia sekwencji aminokwasowych badanych tropomiozyn z tropomiozynami znanych alergenów 67

5.2.4. Wybór uniwersalnego markera peptydowego tropomiozyn 71

6. DYSKUSJA WYNIKÓW 80

WNIOSKI I STWIERDZENIA KOŃCOWE 88

LITERATURA 90

KOMPUTEROWE BAZY DANYCH I PROGRAMY WYKORZYSTANE W PRACY 108

SPIS ILUSTRACJI 109

SPIS TABEL 112

SPIS ZAŁĄCZNIKÓW 113

WYKAZ SKRÓTÓW 114

ZAŁĄCZNIKI 117

STRESZCZENIE

Alergeny w żywności można wykrywać, identyfikując peptydy będące markerami ich obecności. Markery charakterystyczne dla danej rodziny białek mogą służyć do wykrywania obecności alergenów o nieznanych sekwencjach aminokwasowych, w oparciu o podobieństwo ich sekwencji do sekwencji białek z gatunków pokrewnych filogenetycznie. Identyfikacja peptydów pochodzących z białek o nieznanych sekwencjach jest wykonywana głównie za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (RP-LC-MS/MS).

Celem badań było zidentyfikowanie peptydów pochodzących z tropomiozyn z tropomiozyn w przetworzonych produktach z owoców morza. W pierwszym etapie przeprowadzono analizę bioinformatyczną wybranych sekwencji aminokwasowych tropomiozyn. W ramach eksperymentu laboratoryjnego, wyekstrahowano białka z 4 produktów poddanych rozmrożeniu, ugotowaniu lub usmażeniu bez tłuszczu, a także z dwóch produktów gotowych do spożycia. Białka hydrolizowano trypsyną, zliofilizowano, a hydrolizaty poddano analizie RP-LC-MS/MS. Wybrane surowce zawierały gatunki zarówno o znanych, jak i nieznanych sekwencjach tropomiozyn.

Na drodze analizy *in silico* wyodrębniono 72 sekwencje aminokwasowe peptydów (o długości od 7 do 15 aminokwasów), które występowały jako produkty symulowanej proteolizy trypsyną co najmniej dwóch sekwencji tropomiozyn. Następnie poddano je analizie pod kątem ich występowania w ogólnej liczbie sekwencji tropomiozyn z bazy UniProtKB. Uzyskany wynik przeliczono na procent, jaki stanowi ta liczba w ogólnej liczbie tropomiozyn w bazach rodzin białek Interpro i Pfam.

Po analizie RP-LC-MS/MS, wybrano 40 peptydów o zbliżonych czasach retencji, obecnych w co najmniej dwóch próbkach. Następnie wyodrębniono te, których nie było wśród produktów symulowanej proteolizy trypsyną (takie, w których pozostały niezhydrolizowane wiązania peptydowe). Te peptydy (23) przeanalizowano pod kątem obecności w nich fragmentów epitopów alergennych tropomiozyn z bazy Immune Epitope Database. Pozostałe 17 peptydów, stanowiących produkty symulowanej proteolizy trypsyną, również poddano analizie, aby stwierdzić, czy są fragmentami epitopów. W obu przypadkach obliczono stopień pokrycia sekwencji epitopu i peptydu (SCC). Aby sprawdzić do jakich rodzin należą białka, z których może zostać uwolniony dany peptyd (po trawieniu trypsyną), zastosowano narzędzie Unipept, przy pomocy którego wygenerowano drzewa filogenetyczne, ilustrujące taksonomiczne podobieństwo pomiędzy organizmami, będącymi źródłami białek prekursorowych badanych peptydów. Przeanalizowano także rozpowszechnienie tych peptydów w sekwencjach białek z rodziny tropomiozyn (na podstawie wyników z analizy *in*

silico). Następnie oceniono przydatność analizowanych peptydów jako potencjalne markery tropomiozyn.

Za pomocą oprogramowania PEAKS określono stopień pokrycia sekwencji aminokwasowych tropomiozyn obecnych w próbce z sekwencjami aminokwasowymi tropomiozyn dostępnych w bazie UniProtKB. Oprogramowanie zidentyfikowało analizowane peptydy jako fragmenty znanych alergennych tropomiozyn. Gotowanie surowca pozwoliło na uzyskanie dłuższych fragmentów po trawieniu trypsyną, co umożliwiło uzyskanie wyższego stopnia pokrycia sekwencji. Smażenie zaś, ze względu na zmiany zachodzące w strukturze białka, znacznie obniżyło możliwość pokrycia sekwencji aminokwasowej, przy pomocy algorytmów komputerowych. W tym przypadku konieczne było wykorzystanie sekwencjonowania *de novo*.

Zastosowanie uniwersalnego markera peptydowego, charakterystycznego dla rodziny białek, umożliwia wykrycie alergenu bez konieczności znajomości jego dokładnej sekwencji aminokwasowej. Takie podejście, proponowane w niniejszej pracy, można uznać za odwrócenie tradycyjnego paradygmatu dotyczącego wykrywania alergenów, zakładającego wyszukiwanie peptydów unikalnych dla danej sekwencji aminokwasowej białka.

SUMMARY

Allergens in food can be identified using peptides that are markers of their presence. Markers specific to a given family of proteins can be used to detect the presence of allergens of unknown amino acid sequences based on similarity of their sequences to the sequences of proteins from phylogenetically related species. Identification of peptides derived from proteins with unknown sequences is performed using reversed phase high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS / MS) technique.

The aim of this research was to identify peptides from tropomyosin in processed seafood products. In the first stage, a bioinformatic analysis of selected tropomyosin amino acid sequences was performed. In a laboratory experiment, proteins were extracted from 4 products that had been defrosted, cooked or fried without fat, as well as from two ready-to-eat products. Proteins were hydrolyzed with trypsin, freeze-dried and the hydrolysates were analyzed by RP-HPLC-MS / MS technique. The selected raw materials contained species both with known and unknown tropomyosin sequences.

By in silico analysis, 72 amino acid sequences of the peptides (7 to 15 amino acids long) were chosen. They were products of simulated trypsin proteolysis of at least two tropomyosin sequences. Then, they were analyzed for their presence in the total number of tropomyosin sequences from the UniProtKB database. The obtained result was converted into the percentage of this number in the total number of tropomyosins in the Interpro and Pfam databases of protein families.

After RP-HPLC-MS / MS analysis, 40 peptides present in at least two samples were selected. Then, those that were not among the products of simulated trypsin proteolysis (contained missed cleveages) were separated. These peptides (23) were analyzed for the presence of fragments of allergenic tropomyosin epitopes from the Immune Epitope Database. The remaining 17 peptides, products of simulated trypsin proteolysis, were also analyzed to see if they were epitope fragments. In both cases the sequence cross coverage (SCC) was calculated. To check which families of proteins from which a given peptide can be released (after digestion with trypsin), the Unipept tool was used, and then phylogenetic trees were generated, which illustrate the taxonomic similarity between the organisms being the sources of precursor proteins of the analyzed peptides. The distribution of these peptides in the sequences of proteins from the tropomyosin family was also analyzed (based on the results of the in silico analysis).

Using the PEAKS software, the degree of coverage of the tropomyosin amino acid sequences present in the sample with the tropomyosin amino acid sequences available in the UniProtKB database was determined. The software identified the analyzed peptides as

fragments of known allergenic tropomyosins. Cooking the raw material made it possible to obtain longer fragments after digestion with trypsin, which made it possible to obtain a higher degree of sequence coverage. Frying, on the other hand, due to changes in the protein structure, significantly reduced the possibility of covering the amino acid sequence with the use of computer algorithms. In this case it was necessary to use de novo sequencing.

The use of a universal peptide marker, characteristic of the protein family, enables the detection of an allergen without the need to know its amino acid sequence. This approach, proposed in this paper, can be considered a reversal of the traditional allergen detection paradigm, which involves searching for peptides unique to a given protein amino acid sequence.

1. ZAGADNIENIE W ŚWIETLE LITERATURY

1.1 Wstęp

Rozwój rolnictwa i branż pokrewnych związany jest z koniecznością zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego (ang. food security) oraz gwarancją bezpieczeństwa żywności (ang. food safety), której spożywanie nie powinno zagrozić życiu i zdrowiu człowieka. Zapewnienie bezpieczeństwa uwzględnia ochronę przed zagrożeniami mikrobiologicznymi, chemicznymi oraz immunologicznymi. Każdy produkt spożywczy trafiający na rynek musi być bezpieczny dla konsumenta. Jednym z podstawowych działań zapewniających bezpieczeństwo żywności jest stała kontrola obecności w niej patogenów oraz szkodliwych substancji, w tym alergenów. Konieczne jest ciągłe monitorowanie, poszerzanie zakresu analiz oraz wprowadzanie nowych metod i strategii badawczych [Gasilova i Girault 2015].

Problem alergii pokarmowej nabiera obecnie coraz większego znaczenia i dotyczy coraz szerszego grona osób. Alergia ta wywoływana jest przez wiele składników żywności i produktów, wśród których są coraz bardziej popularne w naszym kraju owoce morza. Ich działanie alergenne poznano w większym lub mniejszym stopniu, a wiele z nich, zwłaszcza z grupy mięczaków, nie zostało jeszcze scharakteryzowanych [Ruethers i in. 2018].

Marker to mierzalny wskaźnik określający stan biologiczny pacjenta. Stosowany jest z powodzeniem w medycynie, gdzie służy do pomiaru postępu choroby i skuteczności leczenia. Odkrycie markerów zawsze budziło duże zainteresowanie naukowców prowadzących badania kliniczne [Meng i Veenstra 2011]. W przypadku alergenów, obecność alergizującego białka wnioskuje się na podstawie wykrycia określonego markera peptydowego. Peptydowe markery obecności alergennych białek, będące fragmentami ich łańcucha polipeptydowego, można identyfikować za pomocą narzędzi proteomicznych, takich jak np. LC-MS/MS czy MALDI-MS [Johnson i in. 2011].

Różnorodność gatunków organizmów należących do owoców morza utrudnia zidentyfikowanie przyczyny alergii [Lopata i Kamath 2012]. Producenci żywności, mogącej wykazywać obecność alergenów owoców morza, zazwyczaj umieszczają na etykiecie sformułowania „mięczaki” i „skorupiaki”, bez podania dokładnych nazw gatunków. Dlatego ważne jest, aby znaleźć uniwersalne markery pozwalające na zidentyfikowanie białek owoców morza ogółem, zamiast wykrywania ich za pomocą markerów unikalnych dla danego gatunku, gdyż byłoby to czasochłonne.

Identyfikacja markerów peptydowych jest obecnie jednym z najważniejszych etapów wykrywania alergenów i odgrywa dużą rolę w rozwoju metod opartych na spektrometrii mas [Pilloli i in. 2020].

1.2 Alergia pokarmowa

Alergia to nieprawidłowa reakcja organizmu na zazwyczaj niegroźny czynnik [definicja według Polskiego Towarzystwa Alergologicznego]. Alergenność to zdolność substancji do wywołania powyższej reakcji immunologicznej ze strony układu odpornościowego [Wal i Løvik 2007]. Antygenowość to zdolność obcej substancji (antygenu) do wiązania się z produktami końcowej odpowiedzi komórkowej, takimi jak komórki B lub receptory komórek T [Fishman i in. 2015].

Alergia pokarmowa to niepożądana reakcja na antygen występujący w żywności. Spowodowana jest czynnikami fizjologicznymi organizmu gospodarza, np. zaburzeniami metabolicznymi [Gaur 2009]. Szacunkowe dane dotyczące alergii pokarmowej wskazują, że ponad 2%, ale mniej niż 10% całej populacji ma alergię pokarmową. Wśród dzieci alergicy stanowią 3- 4%, a wśród dorosłych 1 - 2%. Wskaźniki te prawdopodobnie wzrosły w ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci [Willits i in. 2018]. Według danych Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej (ang. European Academy of Allergy and Clinical Immunology, EAACI) 60% przypadków alergii pokarmowej u osób dorosłych i dzieci związanych jest z współwystępowaniem alergii wziewnej [Werfel i in. 2015]. Późniejsze badania wskazują, że ten odsetek wynosi aż 80% w przypadku grupy samych dorosłych. Odpowiedzialne są za to alergeny krzyżowe, czyli strukturalnie podobne białka, często o odmiennym pochodzeniu, które są głównym czynnikiem determinującym występowanie reakcji krzyżowych [Wawrzeńczyk i Bartuzi 2018].

Reakcja krzyżowa występuje, gdy adaptacyjna odpowiedź immunologiczna na konkretny antygen zostaje wywołana przez inny, strukturalnie podobny antygen. Zjawisko to jest korzystne przy infekcjach, ale niepożądane przy zaburzeniach immunologicznych, takich jak alergia. Za odpowiedź immunologiczną organizmu na dany alergen odpowiedzialne są komórki limfocytów B i T, które rozpoznają określone miejsca w strukturze alergenu, tzw. epitopy [Garcia i Lizaso 2011].

Alergeny pokarmowe są zwykle obecne w pokarmie w dużej ilości, która zwiększa ich szansę na rozpoznanie przez układ odpornościowy [Bannon 2004]. Są to w większości białka, o masie cząsteczkowej poniżej 70 kDa [Vickery i in. 2011]. Wiązania disiarczkowe stabilizują trójwymiarową strukturę białek i mogą przyczyniać się do zwiększenia odporności alergenów na trawienie w przewodzie pokarmowym [Sen i in. 2002].

Zdolność białka do wywołania uczulenia po procesie trawienia w przewodzie pokarmowym może zależeć z jednej strony od odporności alergenu na proteolizę, a z drugiej strony od obfitości występowania epitopów, szczególnie liniowych. Epitopy konformacyjne

zazwyczaj ulegają degradacji, wraz ze strukturą trzeciorzędową białka, gdy zostaje ono poddane trawieniu w układzie pokarmowym [Bannon 2004; Pekar i in. 2018].

Od 1995 roku obowiązuje nazewnictwo uporządkowane przez EAACI, według której niepożądane reakcje na pokarmy dzieli się na toksyczne i nietoksyczne, a te drugie dzielą się na reakcje o podłożu immunologicznym i nieimmunologicznym [Johansson i in. 2001]. Reakcje immunologiczne mogą przebiegać przy udziale immunoglobuliny E (IgE-zależne) lub bez niej (IgE-niezależne) [Pałgan i Bartuzi 2012]. Za odpowiedź immunologiczną organizmu na dany alergen odpowiedzialne są komórki limfocytów B i T, które rozpoznają określone miejsca w strukturze alergenu, tzw. epitopy. W kontekście immunologicznym termin "epitop" i jego synonim "determinanta antygenowa" są używane do określenia miejsca rozpoznawania antygenu - czyli dowolnej części egzogennej cząsteczki rozpoznawanej przez komórki układu odpornościowego, takie jak przeciwciała oraz limfocyty B lub limfocyty T. Miejsce w strukturze przeciwciała, które wiąże się z pokrewnym epitopem nazywane jest „paratopem" lub „miejscem łączenia przeciwciała". Epitopy rozpoznawane przez limfocyty T stanowią krótkie segmenty liniowe lub elementy struktury trzeciorzędowej białka. Epitopy te są rozpoznawane po degradacji białka i prezentowane komórkom T jako kompleks peptydu z cząsteczką MHC (ang. major histocompatibility complex - zespół białek odpowiedzialny za prezentację antygenu limfocytom T). Epitopy rozpoznawane przez limfocyty B zaś są początkowo zlokalizowane na powierzchni nienaruszonego antygenu i rozpoznawane przez związane z błoną receptory immunoglobulinowe limfocytów [Dall'Antonia i in 2014].

Podczas zwykłej odpowiedzi immunologicznej, antygen (potencjalny alergen) wyzwala w organizmie ludzkim produkcję przeciwciał IgG na niskim poziomie przez limfocyty B, które zostały aktywowane przez cytokiny uwalniane z komórek limfocytów T typu 1. Pierwszy nieprawidłowy kontakt układu odpornościowego z antygenem (przyszłym alergenem), który często występuje w niskiej dawce i przenika do organizmu przez błony śluzowe, prowadzi do aktywacji limfocytów T typu 2 zamiast typu 1. W związku z tym limfocyty T2 uwalniają cytokinę IL-4, która wyzwala produkcję specyficznych przeciwciał IgE zamiast IgG przez limfocyty B. W przeciwieństwie do innych, przeciwciała IgE są zlokalizowane głównie w ściśle przylegających tkankach związany z powierzchniami komórek tucznych poprzez receptor IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI). Dlatego, gdy alergen ma kontakt z układem immunologicznym organizmu po raz drugi, wiąże się z przeciwciałem IgE poprzez rozpoznawanie epitopów, prowadząc do sieciowania receptorów FcεRI, a następnie aktywacji mastocytów. Aktywowane komórki tuczne ulegają degranulacji i uwalniają różne mediatory chemiczne, które rozpoczynają kaskadę wydarzeń powodujących rozwój nadwrażliwości typu I, czyli reakcje alergiczne [Gasilova i Girault 2015].

Alergia pokarmowa jest uciążliwą dolegliwością utrudniającą codzienne życie. Nie można jej wyleczyć, więc terapia polega na unikaniu przez osoby uczulone żywności zawierającej alergeny [Gomez-Gomez i in. 2010].

W obecnych czasach, gdy wiele osób cierpi z powodu alergii pokarmowych, producenci żywności muszą zapewnić konsumentów o bezpieczeństwie produktów. Od 13 grudnia 2014 roku, we wszystkich krajach Unii Europejskiej, obowiązuje Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r., które reguluje kwestie związane z oznakowaniem żywności, m.in. sposób deklarowania obecności w niej składników alergennych. Na liście z Załącznika II do Rozporządzenia znalazło się 14 składników alergennych, których obecność w produkcie musi być zaznaczona w wyraźny sposób (pogrubienie, podkreślenie czcionki) na opakowaniu. Są to następujące produkty i ich pochodne: zboża zawierające gluten, skorupiaki, ryby, orzeszki ziemne (arachidowe), soja, mleko (łącznie z laktozą), orzechy, seler, gorczyca, nasiona sezamu, tlenek siarki IV i siarczany IV, łubin, mięczaki. Taki sposób wyróżniania na etykietach składników alergennych ma na celu ułatwienie konsumentom wyboru żywności, która będzie dla nich bezpieczna. Błędne oznaczenie lub jego brak może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumenta cierpiącego na alergię pokarmową. Obecny sposób oznaczania żywności nieuwzględnienia jednak ryzyka wystąpienia reakcji krzyżowych. Wiele spośród alergenów wymienionych na liście może wywołać krzyżowe reakcje alergenne i spowodować poważne dolegliwości zagrażające zdrowiu i życiu konsumenta, mimo iż wybrał on produkt nie zawierający składnika, na który jest uczulony.

1.3 Krzyżowe reakcje alergiczne

Reaktywność krzyżowa wynika z podobieństwa fragmentów sekwencji różnych białek (zwłaszcza epitopów), które najczęściej mają wspólne pochodzenie i funkcje [Garcia i Lizaso 2011]. Epitopy mogą być liniowe lub konformacyjne. Liniowe są fragmentami sekwencji alergenu, te drugie zaś można wykryć tylko w strukturze trzeciorzędowej białka. Uważa się, że epitopy liniowe odgrywają ważną rolę w alergii pokarmowej, ponieważ epitopy konformacyjne są niszczone podczas przejścia przez przewód pokarmowy [Bannon 2004]. O ryzyku wystąpienia reakcji krzyżowej decyduje kilka czynników. Jednym z nich jest obecność wspólnych epitopów. Obecność wspólnych epitopów nie jest jednak warunkiem koniecznym do wystąpienia tego typu reakcji. Mogą one wystąpić także w przypadku podobieństwa strukturalnego epitopów [Nesbit i in. 2020]. Badania nad strukturą alergenów wykazały jednak, że białka wykazujące mniej niż 50% podobieństwa sekwencji rzadko są krzyżowymi alergenami - zazwyczaj musi to być podobieństwo powyżej 70%. Mechanizm reakcji krzyżowej jest złożony i zależy nie tylko od stopnia podobieństwa sekwencji białka,

ale także od jego konformacji. Białka reagujące krzyżowo mają podobną strukturę trzeciorzędową, ale z drugiej strony - nie zawsze białka o podobnej strukturze trzeciorzędowej reagują krzyżowo [Aalberse 2000]. W przypadku alergii krzyżowej odpowiedź immunologiczna zostaje wywołana przez inny alergen niż ten, który pierwotnie uczulił organizm. Co ważne, objawy alergii krzyżowej mogą pojawić się już po pierwszym kontakcie z alergenem - inaczej niż w przypadku alergii właściwej [Bartuzi i in. 2017]. Dla wybranych alergenów istnieją również kliniczne zespoły alergii, np. zespół lateksowo-owocowy czy też alergia na roztocza w połączeniu z alergią na skorupiaki [Wawrzeńczyk i Bartuzi 2018].

1.4 Owoce morza jako żywność

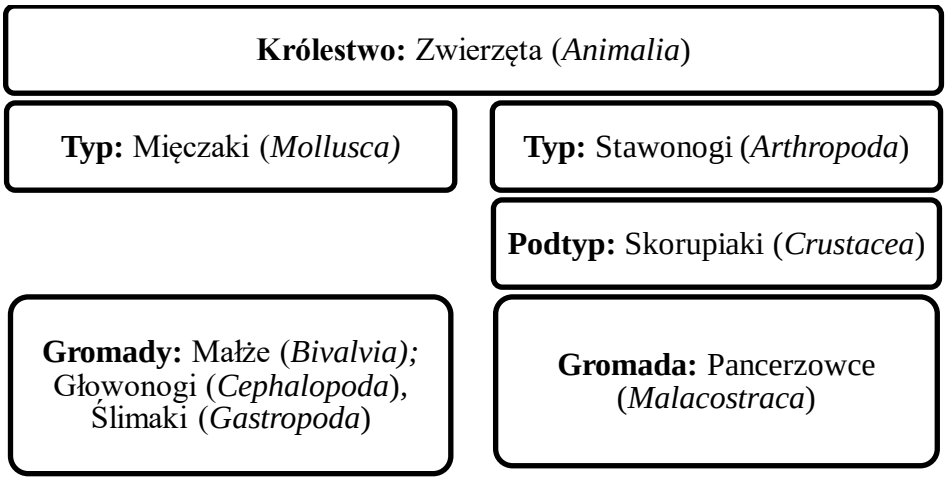
Owoce morza są obecne w tradycyjnej kuchni azjatyckiej, amerykańskiej, francuskiej i śródziemnomorskiej. Coraz częściej pojawiają się także na polskich stołach. Pojęcie „owoce morza" jest szerokie i obejmuje wiele gatunków. Zazwyczaj dzieli się je na dwie podstawowe grupy: skorupiaki i mięczaki, chociaż w literaturze często stosuje się ten termin także w odniesieniu do ryb [Rodríguez i Ortea 2017, Mazorra-Manzano i in. 2018]. Do skorupiaków należą krewetki, homary, langusty, kraby i raki. Do mięczaków zaś małże (mule, ostrygi, przegrzebki), ślimaki i głowonogi (ośmiornice, kalmary, mątwy). Pod względem kulinarnym, w Polsce najpopularniejsze są krewetki, m.in. koktajlowe, tygrysie, białe. Ich zaletą jest łatwe przyrządzenie. Inne rodzaje owoców morza zazwyczaj spożywa się w restauracjach.

Skorupiaki to jadalne stawonogi należące do typu *Arthropoda,* podtypu *Crustacea* i głównie rzędu *Decapoda* (kryl, również będący jadalnym skorupiakiem, należy do rzędu szczętków - *Euphausiacea*). Ta grupa obejmuje krewetki, kraby i homary. Typ *Arthropoda* obejmuje również podtypy *Hexapoda* (owady) i *Chelicerates* (pajęczaki) [Wong i in. 2019]. Większość skorupiaków ma pięć par nóg w części piersiowej i pięć par odnóży do pływania na brzuchu lub ogonie. Skorupiaki są blisko spokrewnione z pajęczakami (roztocza kurzu domowego, pająki itp.) i owadami, takimi jak karaluchy. Znanych jest ponad 30000 różnych gatunków skorupiaków, wśród nich wiele jadalnych. Największą część stanowią krewetki - ponad 40 gatunków, ale tylko kilka z nich zostało opisanych jako alergenne [Lopata i Kamath 2012]. Do celów kulinarnych najczęściej odławia się gatunki garnela (*Crangon crangon*), krewetka północna (*Pandalus borealis*) oraz znacznie większe gatunki, np. krewetka tygrysia (*Penaeus monodon*). W terminologii anglojęzycznej istnieją dwa terminy określające krewetki - ”prawn” oraz ”shrimp”. Należą one do dwóch różnych rodzin. ”Prawns” odnosi się do krewetek z rodziny *Penaeidae*, zaś terminem ”shrimp” określa się te należące do rodziny *Caridae*. Ich główną różnicą anatomiczną jest różne nakładanie się wzorów segmentów w pancerzu. *Penaeidae* są ponadto większe niż *Caridea*, dlatego są szczególnie ważne z handlowego punktu widzenia. Większość gatunków charakteryzujących się obecnością

znanych alergenów należy do tej rodziny. Krewetki określane jako ”shrimps” są mniejsze i używane głównie jako dodatki smakowe. Jednak termin ”prawns” i ”shrimps” jest często używany zamiennie w sektorze komercyjnym, a także w wielu publikacjach badawczych. Termin” prawn” jest używany m.in. W Wielkiej Brytanii i Australii, podczas gdy w Stanach Zjednoczonych i Europie najczęściej używany jest termin ”shrimp” [Ruethers i in. 2018].

Mięczaki to drugi co do wielkości typ królestwa zwierząt, do którego należy ponad 100000 gatunków, z czego 104 są gatunkami jadalnymi odnotowanymi przez Organizację Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO). Trzy spośród 10 gromad zawierają gatunki jadalne. Są to *Cephalopoda*, *Bivalvia* i *Gastropoda*. Najważniejszą gromadę pod względem handlowym stanowi *Bivalvia*, do której zalicza się ostrygi, małże i przegrzebki. Około 80% wszystkich gatunków mięczaków należy zaś do gromady *Gastropoda* – ślimaki, z bardzo zróżnicowanymi cechami anatomicznymi. Do gromady *Cephalopoda* (głowonogi) zalicza się ośmiornice, kalmary i mątwy [Ruethers i in. 2018].

Na rysunku 1 przedstawiono schemat, przedstawiający uproszczoną systematykę organizmów zaliczanych do owoców morza:



Rys. 1. Uproszczona systematyka organizmów stanowiących owoce morza. Na podst. NCBI Taxonomy [Schoch i in. 2020], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy, dostęp: lipiec 2020.

Owoce morza są chętnie spożywane ze względu na walory kulinarne. Stanowią także wartościowe źródło wielu składników odżywczych. Podobnie jak ryby, są bogatym źródłem kwasów omega-3. Oprócz nich zawierają inne niezbędne składniki, takie jak: witamina D, witamina B12, selen, jod, cholina i tauryna, a także zbilansowany skład aminokwasowy. Wysokie spożycie owoców morza wpływa na obniżenie ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej, nadciśnienia, niektórych nowotworów i chorób zapalnych [Lund 2013]. Wykazano także, że owoce morza, takie jak krewetki, kalmary, ostrygi, są bogatym źródłem związków bioaktywnych (w tym peptydów) o dużym potencjale nutraceutycznym

i farmaceutycznym. Peptydy te wykazują różne aktywności biologiczne, m. in. przeciwutleniającą, przeciwnadciśnieniową, antywirusową, antyproliferacyjną, przeciwzakrzepową, zapobiegającą otyłości i przeciwcukrzycową [Ngo i in. 2012].

Ze względu na to, że owoce morza należą do jednych z najszybciej psujących się surowców, poddaje się je obróbce termicznej w celu dalszego ich przechowywania lub bezpośredniego spożycia. Przetwarzanie powoduje różne zmiany fizykochemiczne przechowywanej żywności. Najczęściej świeżo złowione owoce morza przechowuje się przez krótki czas w lodzie [Mazorra-Manzano i in. 2018]. W celu dłuższego przechowywania, owoce morza mrozi się w temperaturach z zakresu -18°C do -30°C. Nieodpowiednie przeprowadzenie procesu zamrażania i rozmrażania surowca może skutkować zmianami w strukturze mięśniowej, spowodowanymi uszkodzeniem białek [Lu i in. 2017]. W celu przygotowania owoców morza do spożycia najczęściej się je smaży. Badania ryb poddanych smażeniu w oleju palmowym dowiodły jednak, że zastosowanie tej techniki obróbki żywności ma najgorszy wpływ na o jakość białka (w porównaniu z gotowaniem i pieczeniem). Proces smażenia skutkuje utratą wielu aminokwasów, zwłaszcza egzogennych, zawierających siarkę i aromatycznych [Oluwaniyi i in. 2017]. Hu i in. [2017] zbadali wpływ zastosowanych metod obróbki na białka mięśni jesiotra (*Acipenser gueldenstaedtii*). Wykazali, że pieczenie i smażenie w tłuszczu znacznie zwiększa zawartość grup karbonylowych i zasad Schiffa oraz zmniejsza liczbę wolnych grup tiolowych w białkach produktu. We wszystkich gotowanych próbkach nastąpiło utlenienie aminokwasów aromatycznych aktyny (w szczególności tryptofanu i tyrozyny) oraz intensywne utlenianie lizyny, histydyny i argininy do związków zawierających grupy karbonylowe. Zaobserwowano również powstawanie produktów zaawansowanej glikacji. Najwięcej modyfikacji wykryto w próbkach z produktu poddanego smażeniu lub prażeniu.

Niewystarczająco zbadaną, ale coraz popularniejszą techniką przyrządzania potraw, jest smażenie produktów spożywczych gorącym powietrzem, bez użycia oleju. Zastosowanie takiego sposobu obróbki żywności pozwala na uzyskanie porównywalnych walorów smakowych potraw, w porównaniu z przyrządzonymi na drodze konwencjonalnego smażenia w głębokim tłuszczu. Ponadto, podczas procesu smażenia gorącym powietrzem powstaje mniej toksycznych substancji, np. produktów utleniania tłuszczów niż podczas konwencjonalnego smażenia w głębokim tłuszczu [Zaghi i in. 2019].

1.5 Owoce morza jako źródło alergenów

Skorupiaki i mięczaki, należące do owoców morza, znajdują na liście 14 składników alergennych wymienionych w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. W sprawie przekazywania konsumentom informacji

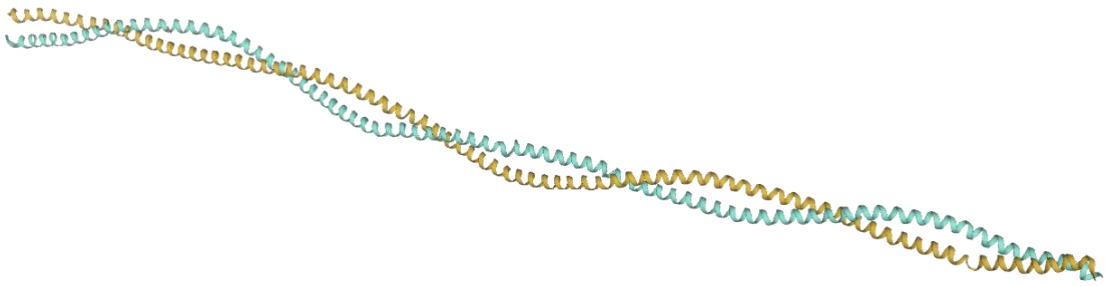
na temat żywności. Rozpowszechnienie alergii na skorupiaki zależy m.in. od strefy klimatycznej i innych czynników geograficznych, np. dostępności danego kraju do morza [Winterova i in. 2021]. Przyjmuje się, że około 0,5-2,5% populacji ogółem jest uczulona na krewetki. Alergia na skorupiaki częściej występuje w krajach azjatyckich niż w krajach zachodnich co związane jest z dietą [Gawrońska-Ukleja i in. 2018, Wong i in. 2019]. Różnorodność gatunków organizmów należących do owoców morza utrudnia zidentyfikowanie przyczyny alergii [Lopata i Kamath 2012]. W Polsce brakuje badań epidemiologicznych, które oceniałyby rozpowszechnienie alergii na owoce morza u dużych populacji pacjentów [Gawrońska-Ukleja i in. 2018, Gugała i in. 2021].

Wśród alergennych białek owoców morza wyróżnia się głównie: tropomiozynę, kinazę argininową (EC 2.7.3.3), lekki łańcuch miozyny (MLC), ciężki łańcuch miozyny (MHC), α-aktynę, paramiozynę, białko sarkoplazmatyczne wiążące wapń, hemocyjaninę, troponinę C oraz izomerazę triozofosforanową (EC 5.3.1.1) [Faber i in. 2017].

1.6 Tropomiozyny jako alergeny

Najważniejszymi (najczęściej wywołującymi niepożądaną reakcję ze strony układu immunologicznego) i najlepiej zbadanymi alergenami owoców morza, zarówno skorupiaków, jak i mięczaków, są tropomiozyny [Gamez i in. 2011; Cheng i in. 2022]. Białka te zostały również opisane jako główne alergeny z owadów [Leni i in. 2020]. Są to białka miofibrylarne, składające się z dwóch podjednostek o masach cząsteczkowych pomiędzy 34 a 39 kDa [Faber i in. 2016], a według UniProtKB – pomiędzy 31 a 35 kDa. Tropomiozyna występuje w postaci wielu izoform, które są produktami ekspresji różnych genów. W wyniku ekspresji jednego genu mogą powstać zarówno mięśniowe, jak i niemięśniowe izoformy tego białka. Im bardziej złożony organizm, tym więcej izoform tropomiozyny może powstać w jego komórkach [Barua 2016]. Forma występująca w mięśniach składa się zazwyczaj z 284 reszt aminokwasowych (wyjątkiem jest np. tropomiozyna krewetki *Metapenaeus ensis*, której długość sekwencji to 274 aminokwasy, według UniProtKB, ID: Q25456). Ponadto, tropomiozyny mają zachowaną sygnaturę L-K-[EAD]-A-E-x-R-A-[ET] [Smillie, 1979], według bazy PROSITE [Sigrist i in. 2012], ID PS00326. W zapisie sygnatury poszczególne aminokwasy są oddzielone znakiem „-”. Symbole aminokwasów zapisane w nawiasie kwadratowym („[ ]”) oznaczają, że w danym miejscu sekwencji występuje jeden z wymienionych w nawiasie aminokwasów. Symbol „x” zastępuje dowolny aminokwas. Na rysunku 2 na szaro zaznaczono sekwencję sygnaturową w sekwencji aminokwasowej tropomiozyny krewetki *Penaeus aztecus (Farfantepenaeus aztecus)*.

Tropomiozyna występuje w postaci homodimeru, złożonego z dwóch równolegle położonych względem siebie helis alfa, tworzących formę zwiniętej cewki (ang. coiled-coil) (Rys. 2):



MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEANNRAEKSEEEVHNLQKRMQQLENDLDQVQESLLKANIQLVEK
DKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRSLSDEERMDALENQL
KEARFLAEEADRKYDEVARKLAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGNNLKSLEVSEEKANQREEAYK
EQIKTLTNKLKAAEARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDELDQTFSELSGY

Rys. 2. Teoretyczna struktura trójwymiarowa homodimeru tropomiozyny *Penaeus aztecus* (UniProtKB ID: Q3Y8M6) i sekwencja białka, z zaznaczonym odcinkiem zgodnym z sygnaturą L-K-[EAD]-A-E-x-R-A-[ET]. Model białka pobrano z bazy SWISS-MODEL (ID: 1c1g.2) [Waterhouse i in. 2018], https://swissmodel.expasy.org/, dostęp: kwiecień 2020.

Struktura zawiera powtórzenie heptad, według schematu *abcdefg* (poszczególne litery oznaczają różne położenia aminokwasów w strukturze). Reszty niepolarne hydrofobowe, znajdujące się w pozycjach *a* i *d*, są odpowiedzialne za interakcję pomiędzy helisami alfa. Położenie reszt kwasowych w pozycjach *e* i zasadowych w *g* umożliwia stabilizację struktury, ze względu na występujące między powyższymi resztami oddziaływania elektrostatyczne. Pozostałe reszty aminokwasowe (pozycje *b, c* i *f*) są skierowane na zewnątrz struktury i biorą udział w odziaływaniu z innymi białkami (aktyną i troponiną). Taki schemat budowy opisuje zarówno tropomiozyny kręgowców, jak i bezkręgowców [González-Fernández i in. 2014; James i in. 2018]. Tropomiozyny skorupiaków są odporne na trawienie pepsyną (EC 3.4.23.1), zaś podatne na działanie trypsyny (EC 3.4.21.4) i chymotrypsyny (EC 3.4.21.1) [Huang i in. 2010, Liu i in. 2019].

Tropomiozyny kręgowców (w odróżnieniu od tropomiozyn bezkręgowców) zazwyczaj nie powodują alergii u ludzi [Santiago i in. 2011]. Mikita i Padlan [2007] jako prawdopodobną przyczynę alergenności tropomiozyn skorupiaków podali powstawanie, po trawieniu pepsyną A (EC 3.4.23.1) w układzie pokarmowym, dłuższych fragmentów (niż w przypadku trawienia tropomiozyn kręgowców), które, wnikając do krwioobiegu, przyjmują następnie strukturę trzeciorzędową, której stabilność jest zbliżona do stabilności wyjściowej cząsteczki. Badania przeprowadzone przez Khulal i wsp. [2019] dowiodły zaś, że w symulowanych warunkach

trawienia żołądkowego (pepsyną) próbek żywności (surowych i poddanych obróbce termicznej), wiązania peptydowe obecne w tropomiozynach kręgowców ulegają całkowitej hydrolizie, w przeciwieństwie do tropomiozyn bezkręgowców, które są odporne na trawienie pepsyną. Do tej pory opisano tylko dwie alergenne tropomiozyny pochodzące z kręgowców (ryb): tilapii mozambijskiej (*Oreochromis mossambicus*) [Liu i in. 2013] i suma rekiniego, nazywanego pangą (*Pangasianodon hypophthalmus*) [Ruethers i in. 2021].

James i in. [2018] wykazali, że na podstawie struktury wtórnej tropomiozyn kręgowców (które są uznane za niealergenne, jak np. świńskiej, *Sus scrofa*) i bezkręgowców nie da się wyjaśnić różnic w ich immunogenności. Dopiero analiza dynamiki molekularnej białka prowadziła do wyjaśnienia tego zjawiska. Badacze stwierdzili, że większa niż w przypadku tropomiozyny krewetki elastyczność struktury tropomiozyny świńskiej (określona poprzez symulację komputerową) jest przyczyną jej podatności na symulowaną proteolizę enzymami trawiennymi *in vitro*, ze względu na możliwość częściowego rozwinięcia się struktury.

W jadalnej części skorupiaków tropomiozyna może stanowić nawet 20% masy, co prowadzi do wysokiej ekspozycji na alergen po jej spożyciu [Shanti i in. 1993]. Sekwencje tropomiozyn wykazują wysoki stopień podobieństwa wśród różnych gatunków skorupiaków (kształtujący się na poziomie od 88 aż do 100%, np. W przypadku tropomiozyn krewetek gatunków *Penaeus aztecus i Litopenaeus vannamei)*, w przedziale od 70 do 97% wśród różnych gatunków mięczaków, zaś niższy pomiędzy skorupiakami a mięczakami (między 56 a 65%) [Faber i in. 2017, Ruethers i in. 2018]. Mimo tych różnic istnieje ryzyko reakcji krzyżowej pomiędzy tropomiozynami mięczaków i skorupiaków, a także pomiędzy białkami z tej rodziny, pochodzącymi z różnych gatunków mięczaków, co wykazali w swoich badaniach m.in. Motoyama i wsp. [2006] i Emoto i wsp. [2009]. Nugraha i in. [2019] wykazali, że sekwencje epitopów wiążących IgE tropomiozyn trzech gromad mięczaków (głowonogów, ślimaków i małży) różnią się od siebie. W związku z tym, że najwięcej wspólnych epitopów (w porównaniu do pozostałych gromad) z tropomiozynami skorupiaków mają tropomiozyny mięczaków z gromady głowonogów (ośmiornice, kałamarnice), gdy pacjent uczulony na skorupiaki spożyje produkt zawierający białka pochodzące z mięczaka tej gromady, ryzyko wystąpienia u niego alergii krzyżowej będzie wyższe niż w przypadku spożywania produktów zawierających białka mięczaków z pozostałych gromad. Li i in. [2020] potwierdzili w swoich badaniach, że przeciwciała IgE i IgG przeciwko tropomiozynom mięczaków i skorupiaków nie wiążą się z tropomiozyną ryby (*Larimichthys crocea*), co może wskazywać, że ryzyko reakcji krzyżowych pomiędzy białkami skorupiaków/mięczaków a białkami ryb jest niskie. Ishikawa i in. [2001] udowodnili, że sekwencje epitopów tropomiozyny ośmiornicy (*Octopus vulgaris*) częściowo pokrywają się z sekwencjami

epitopów tropomiozyn krewetek (*P. indicus i P. aztecus*), zaś Fang i in. [2019] zidentyfikowali w sekwencji tropomiozyny ostrzyżycy japońskiej (*Crassostrea gigas*), która jest jednym z gatunków małży, trzy regiony wiążące IgE, które częściowo pokrywają się z sekwencjami epitopów IgE *P. aztecus*. Tropomiozyny są także odpowiedzialne za reakcje krzyżowe pomiędzy owocami morza a roztoczami kurzu domowego i owadami [Lopata i Kamath 2012, Leni i in. 2020]. Z tego względu tropomiozynę uznaje się za panalergen międzygatunkowy. Dowiedziono jednak, że reakcje krzyżowe pomiędzy roztoczami kurzu domowego a skorupiakami mogą być wywołane również przez białka inne niż tropomiozyna, tj. hemocyjaninę, ubikwitynę czy kinazę argininową [Gawrońska-Ukleja i in. 2018]. Wykazano, że alergenne tropomiozyny owadów, pod względem podobieństwa sekwencji aminokwasowych, można podzielić na dwie grupy, z których jedna jest blisko powiązana z tropomiozynami roztoczy, druga zaś z tropomiozynami skorupiaków, podczas gdy sekwencje tropomiozyn mięczaków wyraźnie różnią się od sekwencji tropomiozyn innych bezkręgowców [Barre i in. 2018]. Zarówno krewetki, jak i owady są cennym źródłem składników odżywczych, a hydrolizaty ich białek mogą być dodatkiem funkcjonalnym do żywności [Mishyna i Glumac 2021]. Przed spożyciem produktu zawierającego owady trzeba jednak brać pod uwagę ryzyko wystąpienia alergii krzyżowej u osób uczulonych na skorupiaki [Kamemura i in. 2019; Leni i in. 2020]. Palmer i in. [2020] wykazali ponadto, że tropomiozyny owadów mogą w różnym stopniu wiązać się z przeciwciałami IgE z surowicy osób uczulonych na krewetki. Może to wynikać ze zróżnicowanej zawartości tropomiozyny w białkach owadzich różnych gatunków. W swojej publikacji stwierdzili także, że spożywanie owadów tj. mącznika młynarka (*Tenebrio molitor*), motylicy (*Galleria mellonella*) i drewnojada (*Zophobas morio*) jest bezpieczniejsze dla osób uczulonych na krewetki niż spożywanie innych gatunków owadów.

Niepożądana reakcja po spożyciu skorupiaków i mięczaków może wystąpić po kilku minutach lub kilku godzinach. Obejmuje ona objawy, takie jak: pokrzywka, obrzęk gardła, katar, astma, a nawet szok anafilaktyczny - stan bezpośrednio zagrażający życiu [Lopata i Kamath 2012].

Epitopy wiążące IgE po raz pierwszy zidentyfikowano dla tropomiozyny indyjskiej krewetki białej *Penaeus indicus* (Pen i 1) [Shanti i in. 1993]. Białko poddano trawieniu trypsyną, a powstałe peptydy sprawdzono pod kątem ich zdolności do wiązania się z przeciwciałami IgE z surowic pacjentów uczulonych na krewetki. Zidentyfikowano dwa epitopy wiążące IgE: FLAEEADRK i MQQLENDLDQVQESLLK. Ayuso i in. [2002] zsyntetyzowali 46 peptydów o długości 15 aminokwasów, o nakładających się sekwencjach, obejmujących całą sekwencję aminokwasową tropomiozyny *P. aztecus*. Następnie, peptydy

przetestowano pod kątem ich reaktywności z przeciwciałami IgE, obecnymi w surowicach osób uczulonych na krewetki, co pozwoliło w konsekwencji na identyfikację 5 regionów w sekwencji aminokwasowej tropomiozyny, o zdolności wiązania przeciwciał IgE: region 1 (43–57), region 2 (85–105), region 3 (133–153), region 4 (187–201) i region 5 (247–284). Wszystkie opisane w literaturze epitopy krewetki *P. aztecus* (ich sekwencje nakładają się) zaznaczono na rysunku 3:

```
        10         20         30         40         50
MDAIKKKMQA MKLEKDNAMD RADTLEQQNK EANNRAEKSE EEVHNLQKRM
        60         70         80         90        100
QQLENDLDQV QESLLKANIQ LVEKDKALSN AEGEVAALNR RIQLLEEDLE
       110        120        130        140        150
RSEERLNTAT TKLAEASQAA DESERMRKVL ENRSLSDEER MDALENQLKE
       160        170        180        190        200
ARFLAEEADR KYDEVARKLA MVEADLERAE ERAETGESKI VELEEELRVV
       210        220        230        240        250
GNNLKSLEVS EEKANQREEA YKEQIKTLTN KLKAAEARAE FAERSVQKLQ
       260        270        280
KEVDRLEDEL VNEKEKYKSI TDELDQTFSE LSGY
```

Rys. 3. Regiony wiążące przeciwciała IgE (nakładające się epitopy liniowe) w sekwencji aminokwasowej tropomiozyny *Penaeus aztecus* (UniProtKB ID: Q3Y8M6), według Ayuso i in. 2002 (kolor szary), Ravkov i in. 2013 (kolor żółty), Albrecht i in. 2009 (kolor zielony) i Reese i in. 2005 (kolor niebieski). Sekwencje epitopów pobrano z Immune Epitope Database [Vita i in. 2019], https://www.iedb.org/, dostęp: sierpień 2020.

Asturias i in. [2000] stwierdzili, że ludzka tropomiozyna zawiera w swojej sekwencji aminokwasowej niektóre z tych regionów wiążących IgE. Zasugerowali zatem, że białko to może działać jako dawka przypominająca u osób uczulonych na tropomiozynę, przy braku dalszych kontaktów z alergenem odpowiedzialnym za uczulenie. Analogiczne badania epitopów tropomiozyny wiążących IgE przeprowadzono stosując białko z białej krewetki *Litopenaeus vannamei* (Lit v 1) [Ayuso i in. 2010, Ayuso i in. 2012]. Alergeny Pen a 1 i Lit v 1 mają identyczne sekwencje.

Faisal i in. [2019] wykazali, że antygenowość tropomiozyny krewetki zależy od sposobu obróbki surowca. Podwyższanie temperatury podczas smażenia lub gotowania zwiększa ją, odpowiednio, 6–8-krotnie lub 2,5–4-krotnie, w porównaniu z surowcem niepoddanym obróbce termicznej. Wzrost antygenowości zaobserwowano również w przypadku oczyszczonych białek ostryg *Crassostrea gigas,* ugotowanych w 100°C i prażonych w 180°C [Fang i in 2018]. Wymagane jest więc opracowanie innej metody obróbki cieplnej krewetek, która nie spowoduje wzrostu antygenowości. Długotrwałe przechowywanie krewetek w -20°C (3 miesiące lub dłużej) także znacznie zwiększa antygenowość. Obniżenie antygenowości tropomiozyny o około 90% (w porównaniu z surowcem niepoddanym działaniu kwasu) osiągnięto poprzez zanurzanie surowca w kwasie octowym i kwasie solnym o pH 2,5 przez 15, 30 i 45 minut. Liu i in. [2019 i 2021] w swoich badaniach udowodnili zaś,

że zdolność wiązania przeciwciał IgG i IgE przez tropomiozynę zmniejsza się po obróbce ciśnieniowej.

Wzrost antygenowości tropomiozyn podczas gotowania może wynikać z samych właściwości fizykochemicznych tych białek. Według Usui i wsp. [2013] tropomiozyny wykazują zdolność ponownego zwijania się po ochłodzeniu roztworu tropomiozyny, poddanego procesowi denaturacji cieplnej. Z tego względu owoce morza są żywnością stwarzającą zagrożenie osobom uczulonym, gdyż obróbka cieplna nie zawsze powoduje dezaktywację antygenu. Gonzales-Fernandez i wsp. [2016] uważają także, że epitopy tropomiozyn oddziałujące z IgE mogą być maskowane przez inne składniki ekstraktu, bądź też mogą powstawać nowe epitopy konformacyjne. Ponadto, Shibahara i wsp. [2009] wykazali w swoich badaniach, że wykrywalność alergennych tropomiozyn w podgrzanym surowcu w teście ELISA była wyższa, w porównaniu z surowcem niepoddanym obróbce termicznej. Z drugiej strony jednak gotowanie krewetek na parze przez 3 minuty obniża zawartość tropomiozyn w surowcu [Lin i in. 2018]. Procesy przetwórcze, w tym termiczne, prowadzą do zmian w strukturze białek alergennych, co wpływa bezpośrednio nie tylko na właściwości alergenne, ale także interakcje pomiędzy składnikami produktu [Liu i in. 2019]. Na właściwości alergenne białka ma też wpływ wybór metody ekstrakcji – z ugotowanego ekstraktu lub z ugotowanego surowca [Li i in. 2020].

Reakcja Maillarda, nazywana również brązowieniem (brunatnieniem) nieenzymatycznym, jest jednym z kluczowych procesów wpływających na alergenność żywności. Jest to szereg złożonych reakcji chemicznych, które zachodzą między wolnymi grupami aminowymi aminokwasów w białkach (głównie argininy i lizyny) i grupą karbonylową cukrów redukujących podczas obróbki termicznej. Ta nieenzymatyczna glikacja może prowadzić do modyfikacji struktury alergenów, powodując zarówno zmianę alergenności białek, jak i tworzenie nowych epitopów. Krewetki, jako produkt spożywczy, są bogate w białka i cukry redukujące, więc obróbka termiczna sprawia, że aminokwasy stają się podatne na reakcje Maillarda [Liu i in. 2019]. Nakamura i in. [2005] wykazali, że reakcja Maillarda tropomiozyny przegrzebka, przebiegająca z udziałem glukozy, powoduje zwiększenie zdolności wiązania się przeciwciał IgE do tropomiozyny. Reakcja z udziałem arabionozy doprowadziła zaś do modyfikacji niektórych aminokwasów (reszt lizyny i argininy), obecnych w sekwencjach epitopów wiążących IgE i obniżenia immunoreaktywności tropomiozyny kraba błotnego (*Scylla paramamosain*) u myszy [Han i in. 2018]. Najczęściej spotykane modyfikacje alergenów obejmują: zmianę konformacji białka, denaturację, agregację, przegrupowania wewnątrzcząsteczkowe i reakcje z innymi składnikami produktu spożywczego [Marzano i in. 2020]. Ponadto, glikacja reszt lizyny

i argininy skutkuje zmniejszeniem podatności na hydrolizę trypsyną i chymotrypsyną wiązań peptydowych w białkach, a co za tym idzie, zwiększeniem prawdopodobieństwa zachowania całego epitopu [Teodorowicz i in. 2017, Liu i in. 2021]. Chemiczna natura wielu końcowych produktów zaawansowanej glikacji (ang. advanced glycation end products - AGEs) jest nieznana ze względu na ich niejednorodny i niestabilny charakter w literaturze opisano ponad 40 AGEs, wśród nich takie jak: karboksymetylolizyna i karboksyetylolizyna [Zhang i in. 2020]. Do wykrywania modyfikacji aminokwasów w wyniku reakcji Maillarda stosuje się m.in. proteomikę typu „shotgun" [Han i in. 2018].

Baza rodzin alergenów AllFam [Radauer i in. 2008] (kwiecień 2019) zawierała 64 sekwencje tropomiozyn (ID rodziny: AF054), podczas gdy w bazie Allergome [Mari i in. 2009] było ich 448 (lipiec 2020). Biorąc pod uwagę fakt, że w bazie sekwencji UniProtKB [UniProt Consortium 2020] było aż 17353 sekwencji tropomiozyn o statusie "Unrewieved" (niezweryfikowane) (lipiec 2020), liczba znanych białek należących do tej rodziny prawdopodobnie wzrośnie, podczas gdy wiele z nich nie zostało wystarczająco zbadanych. W bazie InterPro [Blum i in. 2021] opisanych zostało jak dotąd 7502 białek należących do rodziny tropomiozyn (ID rodziny: IPR000533), a w Pfam [Mistry i in. 2021] 4673 (ID rodziny: PF00261 – „Tropomyosin" i PF12718 – „Tropomyosin_1") (lipiec 2020).

W tabeli 1 przedstawiono niektóre spośród gatunków jadalnych owoców morza oraz ich alergenne tropomiozyny, według baz Allergome (kwiecień 2019):

Tabela 1. Przykładowe alergenne tropomiozyny jadalnych gatunków owoców morza (według baz Allergome [Mari i in. 2009], http://www.allergome.org/index.php, dostęp: kwiecień 2019 i SDAP - Structural Database of Allergenic Proteins [Ivanciuc i in. 2003], https://fermi.utmb.edu/, dostęp: kwiecień 2019).

L.p.	Nazwa alergenu	Gatunek	Nazwa zwyczajowa	Literatura
1.	Cha f 1	*Charybdis feriata*	ang. crucifix crab	Leung i in. 1998a
2.	Chio o 1	*Chionoecetes opilio*	krab śnieżny	Motoyama i in. 2007, Abdel Rahman i in. 2010
3.	Cra c 1	*Crangon crangon*	krewetka garnela	Beuermeister i in. 2011
4.	Cras g 1	*Crassostrea gigas*	ostrzyżyca japońska	Ishikawa i in. 1998b, Leung i Chu 2001, Emoto i in. 2009)
5.	Eup p 1	*Euphausia pacifica*	kryl pacyficzny	Nakano i in. 2007, Motoyama i in. 2008
6.	Hom a 1	*Homarus americanus*	homar amerykański	Leung i in. 1996, Leung i in. 1998
7.	Lit v 1	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	Ayuso i in. 2009, Liu i in. 2011, Ayuso i in. 2012
8.	Mac r 1	*Macrobrachium rosenbergii*	gigantyczna krewetka słodkowodna	Jirapongsananuruk i in. 2008, Jadzir i in. 2012
9.	Mel l 1	*Melicertus latisulcatus*	krewetka królewska	Fuller i in. 2006

L.p.	Nazwa alergenu	Gatunek	Nazwa zwyczajowa	Literatura
10.	Met e 1	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	Leung i in. 1994
11.	Myt e 1	*Mytilus edulis*	omułek jadalny	Marknel DeWitt i in. 2004
12.	Oct v 1	*Octopus vulgaris*	ośmiornica zwyczajna	Motoyama i in. 2006
13.	Pan b 1	*Pandalus borealis*	krewetka północna	Motoyama i in. 2007, Giuffrida i in. 2014
14.	Pan s 1	*Panulirus stimpsoni*	langusta	Leung i in. 1998b, Barletta i in. 2005, Reese i in. 2005
15.	Para c 1	*Paralithodes camtschaticus*	krab królewski	Motoyama i in. 2007
16.	Pen a 1	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	Daul i in. 1994, Reese i in. 2005, Reese i in. 2006,
17.	Pen i 1	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	Naqpal i in. 1989, Shanti i in. 1993
18.	Pen j 1	*Penaeus japonicus*	krewetka kuruma	Motoyama i in. 2007, Kunimoto i in. 2009, Usui i in. 2013
19.	Pen m 1	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	Motoyama i in. 2007, Abdel i in. 2010, Zheng i in. 2011
20.	Tod p 1	*Todarodes pacificus*	strzalik japoński	Miyazawa i in. 1996, Motoyama i in. 2006

1.7 Zastosowanie markerów peptydowych w proteomice

Procedura analizy jakościowej alergenów pokarmowych za pomocą spektrometrii mas składa się z czterech głównych etapów: wybór źródła peptydu, weryfikacja specyficzności/uniwersalności peptydu, wybór metody identyfikacji, oznaczanie jakościowe peptydu [Fu i in. 2019].

Do bezpośredniego wykrywania i oznaczania alergenów często jest stosowana chromatografia cieczowa (ang. liquid chromatography - LC), połączona z detekcją za pomocą spektrometrii mas (ang. mass spectrometry – MS). Analiza alergenów techniką LC-MS/MS, opiera się na wykrywaniu charakterystycznego peptydu pochodzącego z białka alergennego, a nie całego alergenu. Aby wybrać taki docelowy peptyd (marker alergenu) należy ekstrakt białkowy z produktu spożywczego poddać trawieniu enzymatycznemu. Trypsyna jest najczęściej używanym enzymem do fragmentacji białek i otrzymywania peptydów, przeznaczonych do analizy za pomocą LC-MS. Katalizuje reakcję hydrolizy wiązań peptydowych w miejscach, w których grupy karbonylowe należą do argininy albo lizyny. Po hydrolizie, ze względu na obecność dodatkowych grup zasadowych w resztach argininy i lizyny, peptyd zyskuje za tymi aminokwasami dwa miejsca do przyłączenia protonu, a w widmie mogą być analizowane powstałe z niego jony dodatnie [Kamińska i Podbielska 2011]. Hydrolizat jest następnie analizowany metodą LC-MS/MS. Takie podejście analityczne jest nazywane proteomiką typu „shotgun” [Fu i in. 2019].

Podobne podejście stosuje się podczas identyfikowania pojedynczych białek, pochodzących z mieszanin rozdzielanych metodą elektroforezy dwukierunkowej. Są one poddawane trawieniu trypsyną, a otrzymane peptydy analizowane np. za pomocą spektrometru masowego z jonizacją MALDI (ang. matrix-assisted laser desorption ionization – desorpcja/jonizacja laserowa wspomagana matrycą). Uzyskane wyniki są porównywane z masami peptydów otrzymanych podczas analizy *in silico* i dostępnych w bazach danych. W ten sposób białko zostaje zidentyfikowane. Technika ta nosi nazwę „peptide mass fingerprint" – PMF [Kamińska i Podbielska 2011]. Najlepszą jakość analizy otrzymuje się, gdy próbka przed analizą zostaje odsolona i zatężona [Thiede i in. 2005]. Za pomocą tej techniki można identyfikować nie tylko peptydy, ale także analizować całe białka, bez wcześniejszego trawienia enzymatycznego. MALDI-TOF MS zastosowano między innymi do odróżnienia od siebie sześciu gatunków krewetek, na podstawie analizy ekstraktów białkowych [Salla i Murray 2013].

MALDI-MS (ang. matrix-assisted laser desorption ionization – mass spectrometry) jest techniką, której zastosowanie niesie za sobą wiele korzyści, dlatego jest często wykorzystywana w proteomice. Procedura analizy jest szybka, łatwa do przeprowadzenia, a sama metoda - czuła (wykrywalność na poziomie fmol) i dokładna [Thiede i in. 2005]. Jonizacja desorpcyjna (DI) jest zaliczana do „miękkich" technik jonizacji. Źródłem energii do wytworzenia jonów są fotony z lasera. Pomiędzy cząsteczkami matrycy a cząsteczkami próbki tworzy się struktura kokrystaliczna. Energia fotonów, absorbowana przez cząsteczki matrycy, jest następnie przekazywana do cząsteczek próbki, dzięki czemu ulegają one termicznej desorpcji i jonizacji. Standardowymi matrycami stosowanymi do analizy białek i peptydów techniką MALDI-MS są m.in. kwas α-cyjano-4-hydroksycynamonowy (CHCA) i kwas synapinowy (SA). Spektrometr MALDI-MS zwykle jest połączony z analizatorem czasu przelotu (TOF) [Deepaisarn 2019].

Drugą, obok MALDI, najpopularniejszą techniką jonizacji jest ESI, czyli źródło jonów elektrosprej (ang. electrospray ionization). Do podstawowych zalet tej techniki należą: możliwość jonizacji próbki w warunkach ciśnienia atmosferycznego, powstawanie jonów wielokrotnie naładowanych i „miękka" jonizacja, która nie prowadzi do fragmentacji analizowanych cząsteczek. Próbkę roztworu, zawierającą analizowane cząsteczki, wprowadza się do komory jonizacyjnej przez kapilarę. Gaz otaczający kapilarę (azot), umożliwia rozpylenie cząstek i osuszenie kropel aerozolu. Do kapilary przyłożone jest wysokie napięcie (1-6 kV). W wyniku podgrzewania (od 100 do 350°C) oraz suszenia gazem nebulizującym, naładowane krople aerozolu zmniejszają swoją objętość. Rozpuszczalnik odparowuje, co powoduje wzrost gradientu potencjału przy powierzchni kropel. W rezultacie następuje ich

rozpad i desorpcja jonów. Powstające w ten sposób jony zostają zogniskowane i wprowadzone do tzw. gorącej kapilary (temperatura od 120 do 350°C). Tam ulegają całkowitemu osuszeniu i są następnie kierowane do analizatora mas. W zewnętrznej części źródła jonów panuje ciśnienie atmosferyczne, zaś we wnętrzu spektrometru mas – próżnia. Różnica ciśnień umożliwia przyspieszenie jonów i wprowadzenie ich do wnętrza aparatu. Wydajność elektrorozpylania jest tym większa, im związek jest bardziej polarny [Skowron i in. 2016, Suder i Bodzoń-Kułakowska 2016]. Rahman i in. [2010] zastosowali technikę ESI w swoich badaniach nad peptydami z tropomiozyny kraba śnieżnego.

Kwadrupol jest jednym z typów analizatora mas. Umożliwia on filtrowanie i wysyłanie do detektora tylko jonów o określonych wartościach m/z (stosunku masy jonu do jego ładunku). Składa się z czterech równolegle ułożonych prętów, o przekroju kołowym lub hiperbolicznym. Rozpędzone wcześniej jony ze źródła jonów są wprowadzane pomiędzy pręty, do których przyłożone jest stałe napięcie (DC) i zmienne napięcie o częstotliwości radiowej (RF). Zastosowanie potencjałów o określonej częstotliwości powoduje ruch naładowanych cząstek pomiędzy prętami. Taka budowa analizatora kwadrupolowego umożliwia dotarcie do detektora tylko jonom o określonej wartości m/z [Bodzoń-Kułakowska 2016]. Innym typem analizatora jest analizator czasu przelotu (ang. time of flight - TOF). Jony skupione w wiązkę są przekazywane do obojętnego elektrycznie obszaru analizatora. Czas, w jakim jony docierają do detektora, nazywany jest „czasem przelotu". Zależy on od wartości m/z jonu. Ponadto, dla jonów o większej masie ten czas będzie dłuższy niż jonów o mniejszej masie. Połączenie kwadrupola (Q-TOF) ze stałym źródłem jonów (np. elektrosprejem) umożliwia impulsowe dostarczanie jonów do analizatora czasu przelotu, co jest niezbędne, aby dokładnie określić moment przejścia jonu do obszaru analizatora [Bodzoń-Kułakowska i Bierczyńska-Krzysik 2016].

W analizie jakościowej alergenów pokarmowych stosuje się różne typy spektrometrii masowej. Do detekcji specyficznych jonów, które stanowią produkty selektywnej fragmentacji jonów prekursorowych, najczęściej wykorzystuje się potrójny kwadrupol (ang. triple quadrupole - QQQ) w połączeniu z trybem monitorowania reakcji następczych (ang. multiple reaction monitoring – MRM). Często stosuje się także kwadrupol z analizatorem czasu przelotu (Q-TOF) i kwadrupol z pułapką jonową (Q-IT) [Fu i in. 2019].

Tandemowa spektrometria mas (MS/MS lub MS^2) jest techniką, w której możliwa jest fragmentacja jonów prekursorowych. W tym celu wykorzystuje się połączenie kilku analizatorów, pomiędzy którymi znajduje się komora kolizyjna. W procedurze identyfikacji peptydów, do fragmentacji najczęściej wykorzystuje się metodę CID (ang. collision induced dissociation), w której jon o określonej energii kinetycznej zderza się (ulega kolizji) z gazem

obojętnym, którym zazwyczaj jest argon. Wzrost energii oscylacyjnej zjonizowanego peptydu skutkuje jego rozpadem na jony potomne. W spektrometrach masowych z analizatorami Q-TOF, rozpędzone jony opuszczające kwadrupol ulegają fragmentacji w komorze kolizyjnej, a jony potomne są następnie przekazywane do analizatora TOF, gdzie mierzony jest ich czas przelotu. Natomiast, w spektrometrze masowym z analizatorami typu QQQ fragmentacja zachodzi w drugim kwadrupolu, który w tym przypadku pełni rolę komory kolizyjnej. Na skutek fragmentacji peptydów powstaje kilka charakterystycznych serii jonów. Ich nazewnictwo zostało zaproponowane przez Roepstorff i Fohlman [1984]. Jony zawierające N-koniec peptydu to serie a, b i c, natomiast zawierające C-koniec to odpowiednio x, y oraz z. Cyfra przy odpowiedniej literze oznacza liczbę reszt aminokwasowych zawartych wewnątrz danego fragmentu [Suder i Noga 2016]. Na to, jakie serie jonów powstaną, ma wpływ sekwencja peptydu oraz zastosowana metoda fragmentacji. Zastosowanie umiarkowanej energii kolizyjnej (kilkadziesiąt eV) prowadzi do utworzenia głównie serii jonów b i y, które są efektem rozpadu wiązań peptydowych. Informacje na temat sekwencji zidentyfikowanego peptydu można zatem uzyskać na podstawie wartości m/z otrzymanych jonów serii b i y. Zwiększenie energii kolizyjnej do kilku tysięcy elektronowoltów sprawia, że na widmie pojawiają się serie jonów a, c, z oraz x [Bąchor i in. 2018].

We współczesnej proteomice, w zależności od celu badań, mogą być stosowane różne tryby akwizycji danych. Najczęściej wykorzystywanym trybem, w przypadku, gdy analizowana jest próbka zawierająca wiele różnych białek/peptydów, jest DDA (ang. data-dependent aquisition) [Ortea i in. 2016]. W trybie DDA instrument działa w powtarzających się cyklach zbierania nienaruszonych widm na poziomie prekursorów (MS lub MS^1) i widm fragmentacyjnych (MS/MS lub MS^2). O tym, które jony prekursorowe zostaną poddane fragmentacji, decyduje w czasie rzeczywistym oprogramowanie przyrządu, zgodnie z wcześniej zdefiniowanymi kryteriami [Gillet i in. 2016]. Po wytypowaniu peptydu, który może być markerem obecności białka alergennego w żywności, można go szybko wykrywać w badanych próbkach, stosując metodę SIM (ang. selected ion monitoring), w której tylko jon o określonej wartości m/z jest rejestrowany (w tym przypadku jon odpowiadający zjonizowanej cząsteczce peptydu) lub metodę SRM (ang. selected reaction monitoring), gdzie jon o określonej wartości m/z jest rejestrowany i fragmentowany. Takie postępowanie analityczne nazywane jest proteomiką ukierunkowaną (ang. targeted proteomics) [Rodríguez i Ortea 2017; Carrera i in. 2020]. Masy peptydów, a także białek obecnych w próbce, można wyznaczać na drodze dekonwolucji widm masowych. Dekonwolucja to operacja matematyczna, polegająca na przetworzeniu widma masowego wielokrotnie zjonizowanej cząsteczki w pochodną widma masowego, na którym wszystkie obserwowane jony posiadają

ładunek jednostkowy. Uzyskane w tej sposób widmo średnie (przedstawione w postaci jonu pseudomolekularnego $[M+H]^+$, gdzie M – masa molekularna cząsteczki, a H – masa protonu, ok. 1 Da) pozwala na odczytanie masy cząsteczki.

Wykorzystanie markerów peptydowych w proteomice stanowi obiecująca alternatywę dla tradycyjnych metod badania autentyczności żywności i wykrywania alergenów, takich jak analiza w oparciu o DNA (PCR) oraz testów immunologicznych (ELISA). Techniki te są z powodzeniem wykorzystywane w wielu badaniach nad alergenami pokarmowymi [Zielińska-Dawidziak i in. 2015, Siekierzyńska i in. 2021,], także z owoców morza [Lin i in. 2018, Eischeid i Stadig 2018, Eischeid i in. 2021]. Metoda wykrywania alergenów za pomocą testu ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – test immunoenzymatyczny) bazuje na powinowactwie specyficznych przeciwciał do miejsc w sekwencji białka alergennego, tzw. epitopów. Technika PCR (ang. polymerase chain reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy) pozwala zaś na wykrycie obecności materiału genetycznego alergennego surowca (a nie białka powodującego alergię), co w konsekwencji może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Ponadto, materiał genetyczny często ulega degradacji w przetworzonych produktach, a wyizolowanie go z surowca, w ilości wystarczającej do przeprowadzenia analizy, może sprawić trudność [Lo i Shaw 2018]. Markery peptydowe natomiast zwykle pozostają stabilne w procesie obróbki żywności (stabilność jest jednym z kryteriów doboru markera peptydowego). Oprócz tego, w metodzie ELISA nie jest możliwe odróżnienie np. białka kraba od krewetek ani rozpoznanie obecności w żywności białek z gatunków nieobjętych obowiązkiem oznakowania na etykiecie, takich jak kryl i jadalne owady. Może to wprowadzać w błąd konsumentów żywności i organy zajmujące się określaniem prawa żywnościowego [Nagai i in. 2015]. Chen i in. [2017] zastosowali do wykrywania krewetek w produktach spożywczych peptydy, który nie są obecne w sekwencjach aminokwasowych większości tropomiozyn i kinaz argininowych z krabów, zaś obecne w tych białkach z większości różnych gatunków krewetek. Zastosowanie metod opartych na proteomice pozwala także na monitorowanie potranslacyjnych modyfikacji białek, zachodzących podczas przetwarzania żywności [Rodríguez i Ortea 2017].

Staranny dobór peptydów do analizy z uzyskanych danych powinien opierać się na kilku kryteriach: peptydy te muszą być reprezentatywne i stanowić obfity produkt trawienia docelowego alergenu oraz być stabilne podczas różnych procesów przemysłowych (m.in. ogrzewania) [Gasilova i Girault 2015].

Markery peptydowe są wykorzystywane nie tylko do wykrywania alergenów w żywności, ale także do ich analizy ilościowej. W tym celu stosuje się często markery znakowane

izotopowo, tzw. peptydy AQUA (akronim od ang. absolute quantification – bezwzględne oznaczanie ilościowe). Stanowią one wzorce wewnętrzne. Są wybierane na drodze analizy bioinformatycznej, a następnie syntetyzowane. Próbkę peptydu AQUA o znanym stężeniu i fragmenty białka alergennego, powstałe po trawieniu enzymatycznym, poddaje się analizie za pomocą spektrometru mas z analizatorem kwadrupolowym. Na podstawie stężenia natywnego peptydu w stosunku do peptydu AQUA szacuje się zawartość alergenu w próbce [Ahsan i in. 2016].

Specyficzność peptydu można zweryfikować, porównując jego sekwencję z sekwencjami białek dostępnych w bazach danych. Sekwencję aminokwasową peptydu wprowadza się jako zapytanie w BLAST, aby potwierdzić, że peptyd jest unikalny dla tego konkretnego białka (alergenu) [Carrera i in. 2020]. Markery peptydowe są z powodzeniem stosowane do wykrywania i analizy ilościowej kilku alergenów jednocześnie, m.in. W produktach spożywczych zanieczyszczonych śladowymi ilościami obcych alergenów. Peptydy z tropomiozyn, IVELEEELR i LAEASQAADESER, zostały zastosowane jako markery do wykrywania obecności tego alergenu w produktach z ryb i wieprzowiny, z jednoczesną identyfikacją alergennych białek mleka, jaj i soi [Stella i in. 2020].

Jednakże, jeśli nie istnieje jakikolwiek unikalny peptyd dla konkretnego białka bądź grupy białek, wtedy dla tej grupy może być użyty wspólny peptyd. Niespecyficzność peptydu ujawnia się poprzez dopasowanie go do sekwencji białek z gatunków innych niż gatunek białka wyjściowego – taka sytuacja występuje dla niektórych wysoce homologicznych białek alergennych (np. tropomiozyn). Wtedy peptyd jest uważany za uniwersalny dla danej rodziny białek alergennych i może służyć do wykrywania ich w żywności [Ahsan i in. 2016].

Markery peptydowe mogą być stosowane także do wykrywania obecności białek, których sekwencje nie są znane. Metodologia taka opiera się na podobieństwie sekwencji między peptydami otrzymanymi po fragmentacji i sekwencjami z gatunków pokrewnych filogenetycznie z baz danych. Identyfikacji peptydów z nieznanych białek dokonuje się głównie za pomocą techniki LC-MS/MS [Shevchenko i in. 2009]. Bucholska i Minkiewicz [2016] zidentyfikowali wybrane peptydy miozyny zarówno w hydrolizatach miozyny karpia o znanej sekwencji, jak i w hydrolizatach białka śledzia o nieznanej sekwencji.

Nauką, która integruje różne podejścia do zagadnień związanych z bezpieczeństwem żywności jest foodomika. Opiera się na stosowaniu metod biologii systemów w nauce o żywności, poprzez wykorzystanie i integrację różnych narzędzi omicznych (np. proteomiki, genomiki, metabolomiki, transkryptomiki, lipidomiki, mikrobiomiki) [Cifuentes 2009], co służy poszerzaniu wiedzy na temat jakości żywności, poprzez identyfikację markerów różnych cech żywności, takich jak pochodzenie i autentyczność produktów spożywczych, a

także obecność zanieczyszczeń [Zheng i Chen 2014]. Proteomika funkcjonalna i biologia systemów pozwalają na wybór markera, dostosowanego do określonego typu analiz. Na przykład fragmenty białek, stanowiące liniowe epitopy alergenów, mogą służyć do wykrywania białek alergennych, zarówno przy pomocy testów immunochemicznych, jak i spektrometrii mas. Do wykrywania tego samego rodzaju białek z różnych gatunków można wykorzystać peptydy, stanowiące fragmenty wspólne dla sekwencji tych białek (np. marker peptydowy tropomiozyny kraba może być użyty do wykrywania tropomiozyn krewetek) [Ortea i in. 2016].

1.8 Tropomiozyny jako prekursory markerów

Wykrywanie białek odpowiedzialnych za wywołanie reakcji alergennych można przeprowadzać poprzez identyfikację peptydów będących markerami ich obecności. Wyszukiwanie markerów białek odpowiedzialnych za wywołanie reakcji alergicznej stanowi ważny etap w badaniach dotyczących alergii [Johnson i in. 2011, Gasilova i Girault 2015, Minkiewicz i in. 2015a, Bucholska i Minkiewicz 2016, Ahsan i in. 2016]. Tradycyjna strategia wyszukiwania markerów wymaga znajomości sekwencji danego białka i wyboru peptydów unikalnych dla danej sekwencji aminokwasowej. Ta strategia zawodzi w przypadku rodzin białek zawierających dużo wspólnych fragmentów. Przykładem takiej rodziny są tropomiozyny [Minkiewicz i in. 2015a], opisane w bazach danych zawierających informacje o białkach, np. W InterPro (IPR000533), Pfam (PF00261 i PF12718) i AllFam (AF054). Ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej, trudno jest znaleźć fragmenty (peptydy) unikalne. Szybki wzrost liczby sekwencji aminokwasowych odnotowanych w bazach takich jak UniProtKB [UniProt Consortium 2021] przyczynia się do zwiększenia powyższych trudności. Istnieje jednak możliwość wytypowania markerów wspólnych dla alergennych tropomiozyn różnych grup organizmów, m. in. skorupiaków i mięczaków. Ponadto, sekwencje aminokwasowe uznane za wspólne dla tropomiozyn owoców morza, występują również w tropomiozynach innych bezkręgowców, np. owadów. W związku z tym prawdopodobne jest, że wybrane markery tropomiozyn mogą być stosowane do wykrywania alergenów owadów, a także alergenów z innych źródeł.

2. CEL PRACY

Celem badań, przeprowadzonych w ramach pracy, było wytypowanie peptydów z tropomiozyn, uwalnianych po hydrolizie tych białek trypsyną, które mogą stanowić uniwersalne markery obecności alergennych tropomiozyn w przetworzonych produktach spożywczych.

W oparciu o cel badań sformułowano następujące hipotezy badawcze:

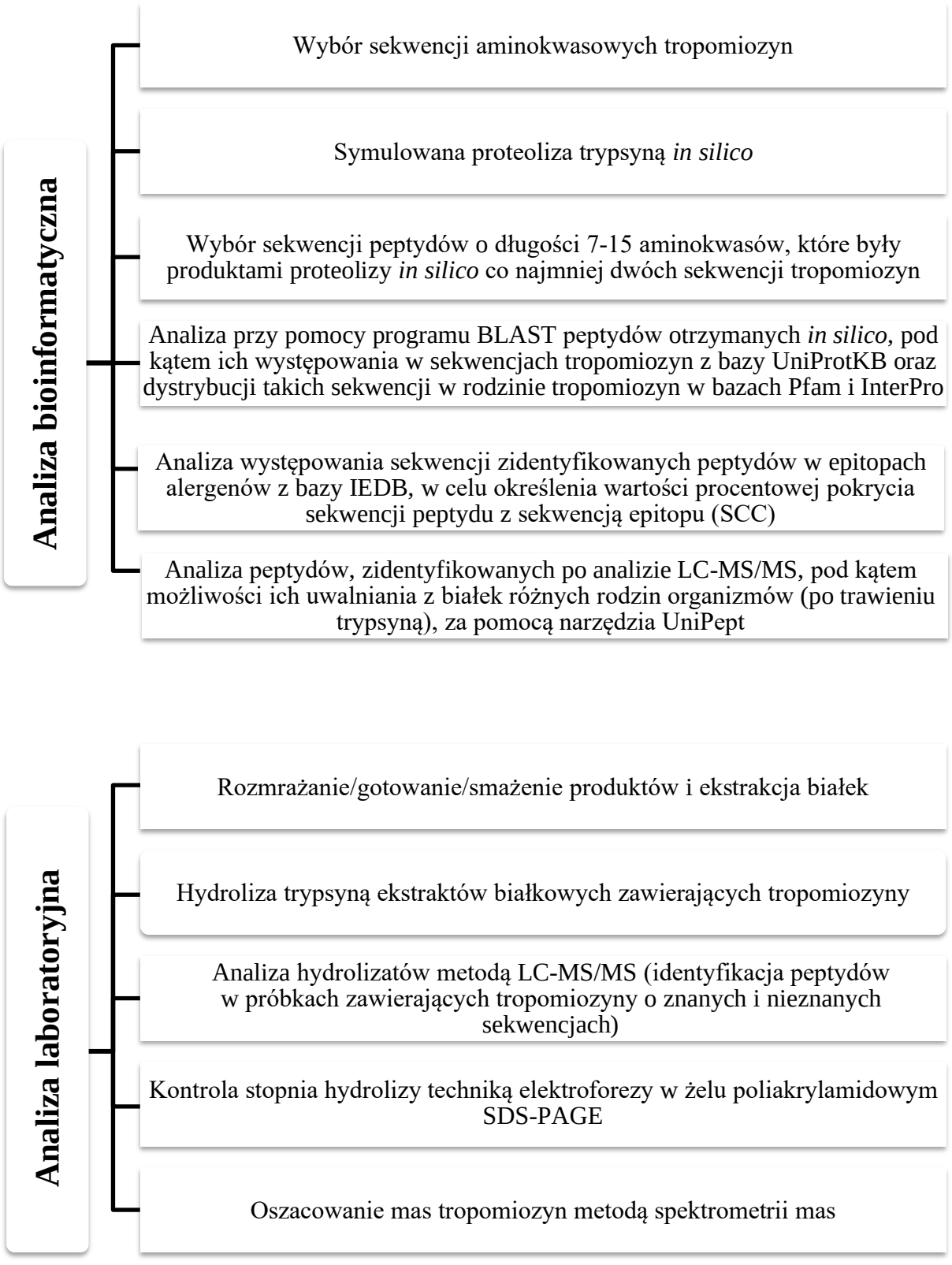
1. W sekwencjach aminokwasowych tropomiozyn, głównych alergenach pokarmowych owoców morza (skorupiaków i mięczaków), występują fragmenty, wspólne dla wielu białek, które mogą stanowić markery peptydowe obecności alergennych tropomiozyn w produktach spożywczych.
2. Odwrócenie dotychczasowego paradygmatu wyboru markerów alergennych białek - poszukiwania peptydów unikalnych dla jednego białka i zastąpienie ich peptydami wspólnymi dla jak największej liczby sekwencji, może być korzystną strategią w analizie alergennych tropomiozyn.
3. Peptydowe markery alergennych tropomiozyn można wykryć w produktach z owoców morza, poddanych różnym procesom obróbki (mrożeniu, gotowaniu, smażeniu).
4. Peptydowe markery alergennych tropomiozyn są możliwe do zidentyfikowania w produktach z różnych gatunków organizmów należących do owoców morza – także tych, dla których sekwencje tropomiozyn nie zostały opisane.

Realizacja celu badań obejmowała:

- symulowaną proteolizę trypsyną w warunkach *in silico* wybranych sekwencji tropomiozyn mięczaków i skorupiaków;
- hydrolizę białek, wyekstrahowanych z produktów spożywczych z owoców morza (poddanych mrożeniu, gotowaniu i smażeniu oraz gotowych do spożycia) w warunkach laboratoryjnych;
- identyfikację peptydów, mogących stanowić markery obecności alergennych tropomiozyn.

Ponadto, zidentyfikowane peptydy przeanalizowano pod kątem ich obecności w sekwencjach epitopów alergennych tropomiozyn oraz możliwości uwalniania po symulowanej hydrolizie trypsyną białek różnych organizmów.

3. PLAN BADAŃ



Rys. 4. Plan badań.

4. MATERIAŁY I METODYKA

4.1 Materiały

4.1.1. Sekwencje tropomiozyn

Do badań *in silico* wykorzystano pięćdziesiąt jeden sekwencji tropomiozyn jadalnych gatunków owoców morza (Załącznik 1), w tym 28 sekwencji białek skorupiaków i 23 sekwencje białek mięczaków, dostępnych w bazie danych UniProtKB [The UniProt Consortium 2021] (dostęp: luty 2019).

4.1.2. Próbki owoców morza

W eksperymencie laboratoryjnym wykorzystano mrożone (surowe, blanszowane lub gotowane) oraz gotowe produkty z owoców morza (sałatki, dania gotowe), dostępne w sklepach na terenie Olsztyna. Mrożone produkty poddano także gotowaniu oraz smażeniu i oddzielnie analizowano. Wybrane surowce zawierały gatunki, dla których sekwencje tropomiozyn zostały opisane i zamieszczone w bazie UniProtKB (krewetka - *Litopenaeus vannamei*, rak luizjański - *Procambarus clarkii*), a także takie, dla których sekwencje tropomiozyny nie zostały dotychczas opublikowane (krewetki - *Papapenaeopsis stylifera*, *Metapenaeus dobsoni*, *Metapenaeus affinis*, kałamarnica - *Loligo duvaucelli*, *Illex argentinus*, omułek - *Mytilus chilensis*). Opis poszczególnych produktów przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Produkty wykorzystane jako surowce do eksperymentów laboratoryjnych.

Numer produktu	Nazwa produktu	Wyjściowy stopień przetworzenia	Skład	Identyfikator próbki
1.	Sałatka z surowych owoców morza przyprawiona, z 1,4% oliwą z oliwek i bazylią	surowy, głęboko mrożony	● kalmar indyjski (*Loligo duvaucelli*)[1] ● kalmar krótkopłetwy argentyński (*Illex argentinus*)[1] ● omułek chilijski (*Mytilus chilensis*)[1] ● krewetka kadal (*Metapenaeus dobsoni*)[1] ● krewetka kidi (*Parapenaeopsis stylifera*)[1] ● krewetka dżing (*Metapenaeus affinis*)[1]	1a – produkt mrożony 1b – produkt ugotowany 1c – produkt usmażony
2.	Krewetki kidi bez ogonka, obrane	blanszowany, głęboko mrożony	krewetka kidi (*Parapenaeopsis stylifera*)[1]	2a – produkt mrożony 2b – produkt ugotowany 2c – produkt usmażony
3.	Krewetki białe, z ogonkiem, obrane	blanszowany, głęboko mrożony	krewetka biała (*Litopenaeus vannamei*)[2]	3a – produkt mrożony 3b – produkt ugotowany 3c – produkt usmażony

Numer produktu	Nazwa produktu	Wyjściowy stopień przetworzenia	Skład	Identyfikator próbki
4.	Omułki chilijskie bez muszli	gotowany, głęboko mrożony	omułek chilijski (*Mytilus chilensis*)[1]	4a – produkt mrożony 4b – produkt ugotowany 4c – produkt usmażony
5.	„Krewetka na raz" Lisner – obrane krewetki w sosie koktajlowym	gotowane	krewetki (nie wskazano gatunku)[1]	brak identyfikatorów
6.	„Ogonki raków z czosnkiem i pietruszką" – obrane ogonki raków z solanki, z suszoną pietruszką i suszonym czosnkiem w oleju rzepakowym	gotowane	rak luizjański (*Procambarus clarkii*)[2]	brak identyfikatorów

[1]Sekwencja tropomiozyny nieopisana w bazie UniProt
[2]Sekwencja tropomiozyny opisana w bazie UniProtKB

4.2 Metodyka

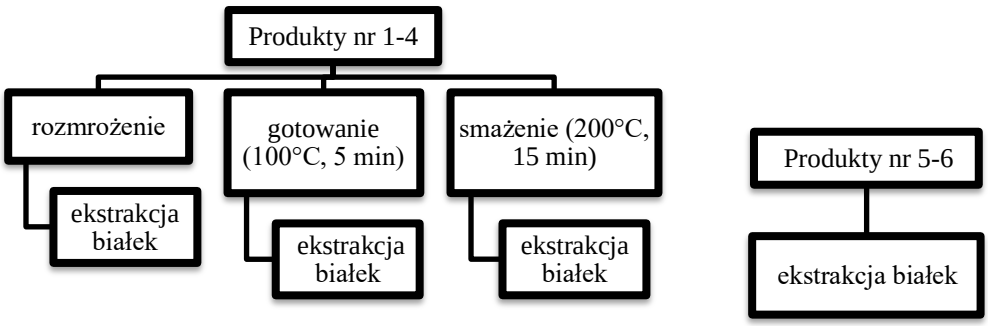
4.2.1. Analiza bioinformatyczna

Symulowaną proteolizę trypsyną (EC 3.4.21.4) przeprowadzono za pomocą narzędzi dostępnych w bazie danych BIOPEP-UWM [Dziuba i in. 2013, Minkiewicz i in. 2019] (dostęp: luty 2019). Następnie obliczono, ile sekwencji tropomiozyn spośród analizowanego zbioru było prekursorami otrzymanych peptydów. Brano pod uwagę cały zbiór (51 sekwencji) oraz osobno zbiór sekwencji tropomiozyn skorupiaków (28) i mięczaków (23).

Sekwencje peptydów powstałych po proteolizie *in silico* przeanalizowano także za pomocą narzędzia BLAST [Altschul i in. 1997] (dostęp: lipiec 2020) pod kątem ich występowania w całym zbiorze sekwencji tropomiozyn (dostępnych w bazie UniProtKB), modyfikując parametry wyszukiwania podobieństwa, zgodnie z metodologią zaadaptowaną z pracy Minkiewicza i in. [2012] (macierz PAM30, oczekiwana liczba dopasowań: 1000). Uwzględnione zostały tylko 100% dopasowania sekwencji peptydu. Liczbę dopasowań dla każdego peptydu przeliczono na procent ich udziału w całkowitej liczbie tropomiozyn, dostępnych w bazach danych InterPro (ID rodziny: IPR000533) (dostęp: lipiec 2020) i Pfam (ID rodziny: PF00261 – „Tropomyosin" i PF12718 – „Tropomyosin_1") (dostęp: lipiec 2020).

4.2.2. Analiza laboratoryjna

Sposób przygotowania produktów spożywczych przed ekstrakcją przedstawiono na schemacie (Rys. 5):



Rys. 5. Przygotowanie produktów przed ekstrakcją.

Produkty ugotowano w wodzie dejonizowanej, a usmażono bez tłuszczu, gorącym powietrzem we frytkownicy FTL1001-KALORIK (Kalorik Group, Sint-Genesius-Rode, Belgia).

- **Ekstrakcja**

Białka wyekstrahowano, stosując roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS) o pH 7,2 (0,8% NaCl (w/v), 0,14% Na_2HPO_4 (w/v), 0,02% KH_2PO_4 (w/v), 0,02% KCl (w/v)) [Kamath i in. 2014].

5 g każdego produktu homogenizowano w 15 ml PBS przez 10 minut, przy użyciu miksera laboratoryjnego (IKA, Staufen, Niemcy). Zawiesiny wytrząsano przez 3 godziny w 4°C, a następnie odwirowywano (14000 obr/min, 15 min).

Po odwirowaniu, supernatanty przeniesiono do nowych probówek, a następnie zliofilizowano i przechowywano przed dalszymi analizami w temperaturze -86°C. W ekstraktach oznaczono stężenie białka [Bradford 1976].

- **Hydroliza**

Hydrolizę białek w warunkach laboratoryjnych przeprowadzono w oparciu o metodologię, którą zaproponowali Kinter i in. [2000]. Ekstrakty białkowe rozpuszczono w 6M roztworze mocznika w 100 mM buforze Tris-HCl o pH 7,8. Końcowe stężenie białka w otrzymanych roztworach wynosiło 10 mg/ml. Roztwory wytrząsano (600 obrotów/min, 30 min, 4°C), a następnie odwirowano (2683 x g, 30 min, 4°C). Do 100 µl supernatantu dodano 5 µl roztworu do redukcji (200 mM roztwór ditiotreitolu w 100 mM buforze Tris-HCl). Roztwory wytrząsano (600 obrotów/min, 60 min, 57°C), a następnie dodano po 20 µl roztworu alkilującego (200 mM roztwór jodoacetamidu w 100 mM buforze Tris-HCl). Roztwory ponownie wytrząsano (600 obrotów/min, 60 min, 21°C). Po tym czasie ponownie dodano 20 µl roztworu do redukcji i wytrząsano (600 obrotów/min, 60 min, 21°C). Następnie do roztworów dodano 775 µl wody destylowanej i 100 µl roztworu trypsyny (Sigma-Aldrich, nr kat. T1426) o stężeniu 0,5 mg/ml w 100mM buforze Tris-HCl (aktywność enzymu: 10000 U/mg białka). Hydrolizę przeprowadzono, wytrząsając roztwory przez 17 h w temperaturze

37°C, 300 obrotów/minutę. Reakcję enzymatyczną zatrzymano, ogrzewając mieszaniny w 100°C przez 5 minut. Następnie próbki oczyszczono, zgodnie z metodą zaproponowaną przez Nagai i in. [2015], stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) przy pomocy kolumny z wypełnieniem C18 (żel krzemionkowy, wielkość ziaren: 45 μm, wielkość porów: 60 Å, objętość kolumny: 3 ml) Supelclean LC-18 SPE Tube firmy Supelco (Bellefonte, Pensylwania, Stany Zjednoczone). Próbki zakwaszono, dodając kwasu trifluorooctowego (końcowe stężenie kwasu w roztworze próbki: 0,1%). Kolumnę kondycjonowano 6 ml 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v) a następnie zrównoważono 6 ml 0,5% roztworu kwasu trifluorooctowego w wodzie (v/v). Na kolumnę naniesiono próbki i ustalono szybkość przepływu na 1-2 krople/s. Następnie kolumnę przemyto kilkukrotnie 0,5% roztworem kwasu trifluorooctowego w wodzie (v/v). Próbki z kolumn wymyto 5 ml acetonitrylu. W ten sam sposób oczyszczono próbki białek niepoddane hydrolizie (jako próbki kontrolne przy monitorowaniu przebiegu hydrolizy). Białka i ich hydrolizaty wysuszono w koncentratorze próżniowym (Martin Christ, Osterode am Harz, Niemcy), rozpuszczono w wodzie, zliofilizowano i przechowano w -86°C przed dalszymi analizami.

- **Kontrola stopnia hydrolizy (SDS-PAGE)**

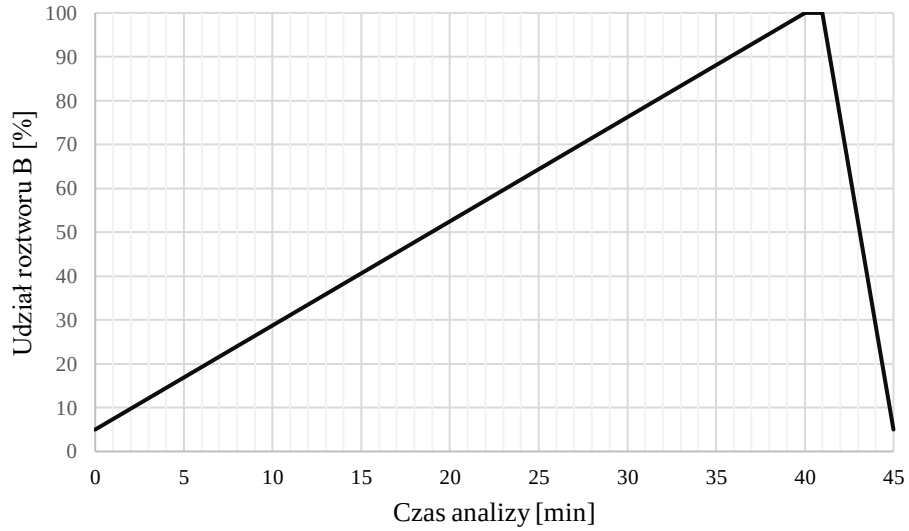
Próbki białek i peptydów o stężeniu 1mg/ml rozcieńczono w stosunku 1:1 buforem do redukcji (0,5M bufor Tris-HCl, pH 6,8, 10% roztwór siarczanu dodecylu sodu (w/v), 20% roztwór glicerolu (v/v), 2% roztwór 2-merkaptoetanolu (v/v), 0,03mM roztwór błękitu bromofenolowego) [Laemmli, 1970], podgrzano w temperaturze 95°C przez 5 min i naniesiono po 12 μl na 12% żele poliakrylamidowe (żel rozdzielający: 1,5M bufor Tris-HCl, pH 8,8, 10% roztwór siarczanu dodecylu sodu (w/v), 30% roztwór akrylamidu (w/v), 0,8% roztwór bisakrylamidu (w/v), 10% roztwór nadsiarczanu amonu, N,N,N′,N′-tetrametyloetylenodiamina; żel zagęszczający: 0,5M bufor Tris-HCl, pH 6,8, 10% roztwór siarczanu dodecylu sodu (w/v), 30% roztwór akrylamidu (w/v), 0,8% roztwór bisakrylamidu (w/v), N,N,N′,N′-tetrametyloetylenodiamina), zgodnie ze schematem (M – marker masy cząsteczkowej; 1 2, 3, 4, 5, 6 – numery próbek; a, b, c – identyfikatory próbek):

a) ekstrakty białek z produktów mrożonych: M|1a|2a|3a|4a|M;
b) ekstrakty białek z produktów ugotowanych i gotowych do spożycia: M|1b|2b|3b|4b|5|6|M;
c) ekstrakty białek z produktów usmażonych: M|1c|2c|3c|4c|M;
d) hydrolizaty białek z próbek rozmrożonych: M|1a|2a|3a|4a|M;
e) hydrolizaty białek z produktów ugotowanych i gotowych do spożycia: M|1b|2b|3b|4b|5|6|M;
f) hydrolizaty białek z produktów usmażonych: M|1c|2c|3c|4c|M.

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w aparacie Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone) przy 50 V przez 10 min, a następnie przy 150 V przez 1,5 h, stosując bufor elektrodowy o składzie: 0,03M tris(hydroksymetylo)aminometan, 0,20M roztwór glicyny, 0,1% roztwór siarczanu dodecylu sodu (w/v). Jako marker masy cząsteczkowej zastosowano standard Precision Plus Protein™ Unstained (Bio-Rad). Żele barwiono błękitem Commasie. Analizę przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

- **Analiza LC-MS i LC-MS/MS**

Przeprowadzono analizę RP-LC-MS próbek zawierających białka (przed hydrolizą), aby oszacować masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widm. Odważono po 1 mg liofilizatów białek owoców morza i rozpuszczono w 1 ml 5% wodnego roztworu acetonitrylu (v/v) z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego (v/v). Analizę przeprowadzono za pomocą spektrometru masowego LCMS-9030 z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu (Q-TOF) firmy Shimadzu (Tokio, Japonia) z jonizacją ESI (elektrosprej). Zestaw składał się z dwóch pomp LC-30AD, degazera DGU-20A5R, autosamplera SIL30ACMP, termostatu CTO-20AC, kontrolera CBM-20A, generatora azotu NGM-11 i kompresora SF2FF. Zastosowano kolumnę Jupiter Proteo® firmy Phenomenex (Torrance, Kalifornia, Stany Zjednoczone) (150 mm × 1 mm z fazą stacjonarną C18, średnicą ziaren 5 µm, średnicą porów 110 Å). Jako faz ruchomych użyto roztworu A (0,1% roztwór kwasu mrówkowego w wodzie (v/v)) oraz roztworu B (0,1% roztwór kwasu mrówkowego w acetonitrylu (v/v)). Czas zbierania danych wynosił 45 minut, szybkość przepływu: 0,05 ml/min, objętość nastrzyku: 15 µl, temperatura kolumny 40ºC. Pozostałe parametry pracy spektrometru masowego były następujące: szybkość przepływu gazu ogrzewającego: 10 l/min, szybkość przepływu gazu rozpylającego: 3 l/min, temperatura wewnętrzna aparatu: 300°C, temperatura linii desolwatacyjnej: 250°C, szybkość przepływu gazu suszącego: 10 l/min. Zastosowano następujące parametry metody: polaryzacja dodatnia, napięcie: 4 kV, czas pętli: 0,2 s. Widma MS (bez fragmentacji jonów) rejestrowano w zakresie m/z 300 do 2000 Da. Gradient stężenia roztworu B, zastosowany podczas analizy RP-LC-MS, przedstawiono na wykresie:



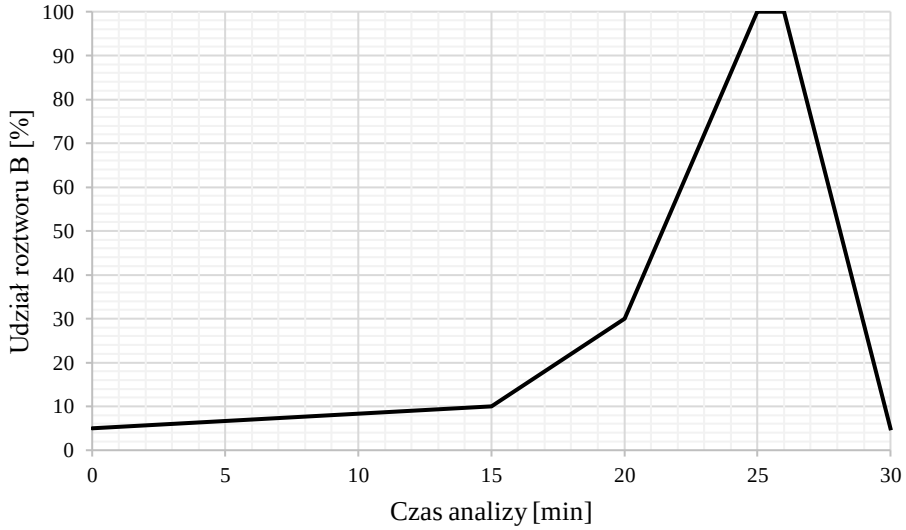
Rys. 6. Gradient stężenia roztworu B, zastosowany podczas analizy RP-LC-MS.

Widma po analizie RP-LC-MS poddano dekonwolucji, za pomocą narzędzia „Deconvolute" w programie LabSolutions Insight wersja 3.5 (Shimadzu, Tokio, Japonia), stosując algorytm ReSpect, który jest zalecany do analiz widm masowych dużych biomolekuł, takich jak białka [Millán-Martín i in. 2021]. Wprowadzono następujące parametry dekonwolucji: wejściowy zakres wartości m/z - od 600 do 2000; wyjściowy zakres mas - od 31000 do 35000 Da (na podstawie mas tropomiozyn według bazy UniProtKB); zakres ładunków - od 20 do 100; zakres ładunków sąsiadujących - od 3 do 5; tolerancja masy – 5 ppm.

Następnie, przeprowadzono analizę RP-LC-MS/MS hydrolizatów białek z owoców morza. Czas zbierania danych wynosił 30 min, szybkość przepływu: 0,05 ml/min, objętość nastrzyku: 15 µl, temperatura kolumny 40ºC, ciśnienie gazu kolizyjnego: 230 kPa, czas pętli: 0,7 s, napięcie przyspieszające w komorze kolizyjnej: 35±10 V, tryb akumulacji jonów: włączony. Pozostałe parametry były takie same jak podczas analizy próbek przed hydrolizą. Widma MS rejestrowano w zakresie m/z 300 do 1500 Da, zaś widma po fragmentacji jonów prekursorowych w zakresie m/z od 50 do 1500. Do wyboru jonów prekursorowych peptydów do fragmentacji zastosowano tryb akwizycji zależnej od danych (ang. data-dependent acquisition - DDA), który obejmował cztery niezależne skanowania z fragmentacją MS/MS wybranych jonów prekursorowych, poprzedzonych pełnym skanowaniem MS. Jony prekursorowe o intensywności co najmniej 300 zliczeń zostały poddane automatycznej fragmentacji. Czas retencji peptydów określono po wygładzeniu chromatogramu zgodnie z algorytmem opisanym przez Savitzky'ego i Golaya [1964]. Otrzymane wyniki zostały poddane obróbce w oprogramowaniu LabSolutions wersja 5 (Shimadzu, Tokio, Japonia). Analizy RP-LC-MS oraz RP-LC-MS/MS zostały przeprowadzone w trzech powtórzeniach.

Pomiędzy analizami właściwych próbek, cały program gradientu był przeprowadzany ponownie przez wstrzyknięcie roztworu B zamiast próbki, w celu przepłukania układu, w tym igły autosamplera.

Gradient stężenia roztworu B, zastosowany podczas analizy RP-LC-MS/MS, przedstawiono na wykresie:



Rys. 7. Gradient stężenia roztworu B, zastosowany podczas analizy RP-LC-MS/MS.

Identyfikacji peptydów dokonano za pomocą oprogramowania PEAKS [Zhang i in. 2012] wersja 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc, Waterloo, Ontario, Kanada). Jako bazę danych wykorzystano zbiór sekwencji tropomiozyn (w formacie FASTA), pobranych z UniProtKB (pobrano 9.07.2020). Baza zawierała 13298 sekwencji. Aby zmniejszyć prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie pozytywnych zastosowano parametry zaproponowane przez Leni i in. [2020]: -10logP≥50 (dla białek) oraz -10logP≥20 dla peptydów z produktów rozmrożonych i gotowanych, a -10logP≥15 dla peptydów z produktów po smażeniu (ze względu na liczne modyfikacje aminokwasów). Wartość P jest definiowana jako prawdopodobieństwo, że przypadkowa identyfikacja w bieżącym wyszukiwaniu daje taki sam lub lepszy wynik dopasowania [Zhang i in. 2012]. Wartość P wynosząca 1% odpowiada -10logP równej 20 (log to logarytm dziesiętny). Im wyższa wartość -10logP tym większe prawdopodobieństwo, że dopasowanie jest prawidłowe. Jako modyfikacje stałe ustawiono karbamidometylację, a jako zmienne oksydację metioniny i deamidację glutaminy i asparaginy [Chen i in 2017; Johnston i in. 2019; Palmer i in. 2020].

Dla każdego ze zidentyfikowanych peptydów obliczono błąd w ppm (ang. parts per milion - liczba części na milion) według równania (4.1):

$$\delta[ppm] = \frac{m/z_t - m/z_e}{m/z_t} \cdot 10^6$$

(4.1)

gdzie:

m/z_e – eksperymentalna masa jonu;

m/z_t – teoretyczna masa jonu.

Powtarzalność czasów retencji określono, obliczając odchylenie standardowe czasów retencji według równania (4.2):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - x^-)^2}{n-1}}[min]$$

(4.2)

gdzie:

x_i - kolejne wartości czasów retencji;

$\bar{x}$ - średnia arytmetyczna czasów retencji;

n – liczba zarejestrowanych czasów retencji dla danego peptydu.

Średnią arytmetyczną obliczono według równania (4.3):

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \cdots + x_n}{n}[min]$$

(4.3)

gdzie:

x_i - kolejne wartości czasów retencji;

n – liczba zarejestrowanych czasów retencji dla danego peptydu.

Za pomocą oprogramowania PEAKS określono także stopień pokrycia sekwencji aminokwasowej tropomiozyn obecnych w próbkach, z sekwencjami aminokwasowymi tropomiozyn dostępnymi w bazie UniProtKB.

Sekwencje peptydów z tropomiozyn, zidentyfikowane po analizie metodą spektrometrii mas i będące produktami hydrolizy trypsyną (według analizy *in silico*), poddano analizie za pomocą narzędzia Unipept [Gurdeep Singh i in. 2019] dostępnego w sieci internetowej (dostęp: lipiec 2021). Program ten przypisuje peptydy, będące produktami hydrolizy trypsyną, do sekwencji białek pochodzących z różnych organizmów, tworząc drzewa filogenetyczne. W ten sposób określono dla jakich grup organizmów dany peptyd jest charakterystyczny (na podstawie sekwencji z bazy UniProtKB).

Sekwencje zidentyfikowanych peptydów (teoretycznych produktów proteolizy trypsyną) przeanalizowano pod kątem ich występowania w sekwencjach epitopów alergennych tropomiozyn z bazy Immune Epitope Database [Vita i in. 2019] (dostęp: sierpień 2020). Zastosowano następujące opcje wyszukiwania: ”Linear peptide”, ”Substring” i domyślne wybory pozostałych parametrów. W ten sam sposób przeanalizowano dłuższe peptydy, które zostały zidentyfikowane w hydrolizatach, ale nie odpowiadały produktom symulowanej proteolizy trypsyną (zawierały niezhydrolizowane przez trypsynę wiązania peptydowe).

Dla peptydów, będących fragmentami epitopów, obliczono parametr SCC (ang. sequence cross-coverage), określający stopień pokrycia sekwencji peptydu z sekwencją epitopu, według równania (4.4) [Dziuba i in. 2013]:

$$SCC = \left(\frac{n_c}{n_e}\right) \cdot \left(\frac{n_c}{n_p}\right) \cdot 100\% \tag{4.4}$$

gdzie:

n_c – liczba aminokwasów wspólnych dla sekwencji epitopu i produktu hydrolizy;

n_e – liczba aminokwasów w sekwencji epitopu;

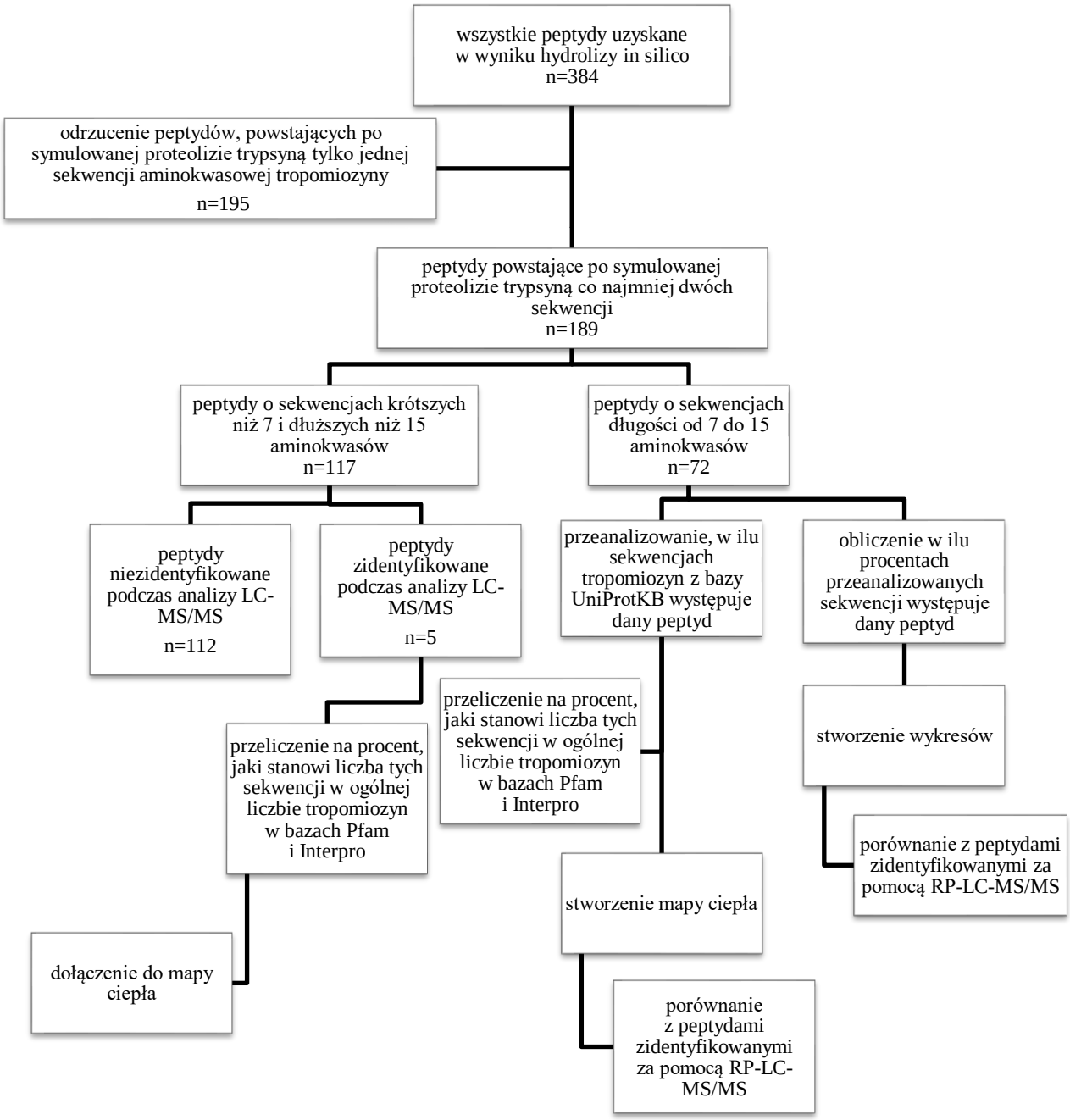
n_p – liczba aminokwasów w sekwencji peptydu będącego produktem hydrolizy.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

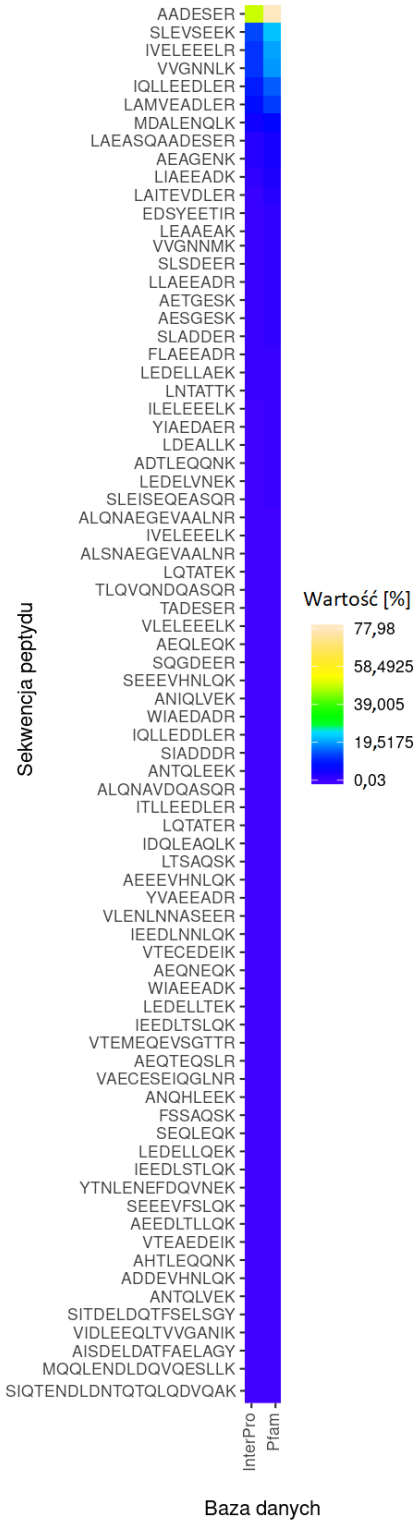
5.1 Analiza bioinformatyczna

Na rysunku 8 przedstawiono schemat postępowania przy wyborze peptydów jako potencjalnych uniwersalnych markerów alergennych tropomiozyn, na podstawie wyników otrzymanych w wyniku hydrolizy trypsyną *in silico.*

Po symulowanej proteolizie trypsyną wybranych sekwencji tropomiozyn otrzymano 384 peptydy. Ze względu na cel prowadzonych badań, jakim jest znalezienie peptydu uniwersalnego, a nie unikalnego, odrzucono wszystkie sekwencje peptydów, które powstały po proteolizie tylko jednej sekwencji. Pozostałe peptydy podzielono na dwie grupy. Do pierwszej z nich włączono peptydy o długości od 7 do 15 aminokwasów (72). Peptydy o tej długości Bucholska i Minkiewicz [2016] rekomendowali jako markery do wykrywania obecności białek. Pozostałe 117 peptydów (o długości łańcucha poza tym przedziałem) zostało wziętych pod uwagę na etapie analiz laboratoryjnych, po identyfikacji peptydów w próbkach hydrolizatów białek, wyekstrahowanych z wybranych produktów z owoców morza. Obliczono, w ilu procentach wszystkich przeanalizowanych sekwencji aminokwasowych tropomiozyn występuje dany peptyd (w całym zbiorze sekwencji tropomiozyn, analizowanych w niniejszej pracy oraz oddzielnie dla sekwencji tropomiozyn mięczaków i skorupiaków z tego zbioru). Wyniki przedstawiono w formie wykresów (Załącznik 2, Rys Z1-Z3). Sekwencje 72 wybranych peptydów (o długości od 7 do 15 aminokwasów) poddano analizie pod kątem ich występowania w ogólnej liczbie sekwencji tropomiozyn z bazy UniProtKB. Uzyskany wynik przeliczono na procent, jaki stanowi ta liczba w ogólnej liczbie tropomiozyn w bazach Interpro i Pfam. Dodatkowo, podczas obliczeń uwzględniono pięć peptydów, które były produktami proteolizy trypsyną i zostały zidentyfikowane podczas analizy RP-LC-MS/MS, ale mają długość powyżej 15 aminokwasów. Ich przydatność w charakterze potencjalnych markerów peptydowych omówiono w dalszej części pracy. Na podstawie obliczeń utworzono mapę ciepła (Rys. 9), która ilustruje rozpowszechnienie danego peptydu w rodzinie tropomiozyn.



Rys. 8. Schemat wyboru peptydów podczas analizy *in silico* oraz wizualizacji jej wyników.



Rys. 9. Mapa ciepła obrazująca częstość występowania sekwencji danego peptydu w ogólnej liczbie tropomiozyn w bazie UniProtKB, wyrażoną jako procent udziału tej liczby w ogólnej liczbie sekwencji w bazach InterPro (100%=7502) i Pfam (100%=4673) (wartości uszeregowano malejąco). Rysunek wygenerowano w programie Heatmapper [Babicki i in. 2016], http://www.heatmapper.ca/, dostęp: lipiec 2020.

Sekwencje tropomiozyn wykazują wysoki stopień podobieństwa wśród różnych gatunków skorupiaków (kształtujący się na poziomie między 88 a 100%), w przedziale od 70 do 97% wśród różnych gatunków mięczaków, zaś niższy pomiędzy skorupiakami a mięczakami (między 56 a 65%) [Faber i in. 2017, Ruethers i in. 2018]. Z tego względu trudniej jest znaleźć peptydy, będące produktami hydrolizy trypsyną, które będą wspólne dla tropomiozyn mięczaków i skorupiaków, niż dla każdej z tych grup osobno. Przeprowadzona analiza *in silico* dowiodła, że można jednak wyodrębnić peptydy, które są charakterystyczne dla skorupiaków, dla mięczaków oraz takie, które występują w obu tych grupach.

5.2 Analiza laboratoryjna

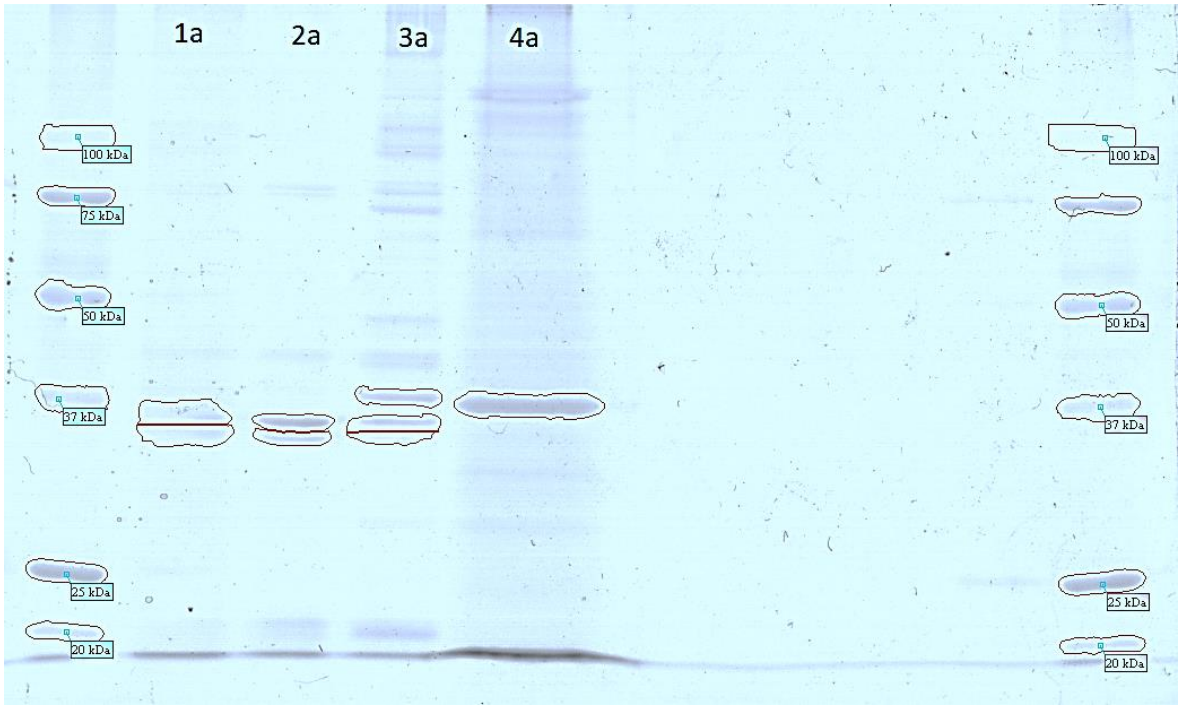
5.2.1. Kontrola postępu hydrolizy

Poniżej przedstawiono obrazy żeli, otrzymanych po rozdzieleniu białek z próbek przed i po hydrolizie, metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) (Rys. 10-12). Na wszystkich żelach z analizy białek, w obszarze pomiędzy 37 a 25 kDa widoczne są prążki, pochodzące prawdopodobnie od tropomiozyn. Taki przebieg analizy potwierdza, że tropomiozyny są odporne na obróbkę termiczną.

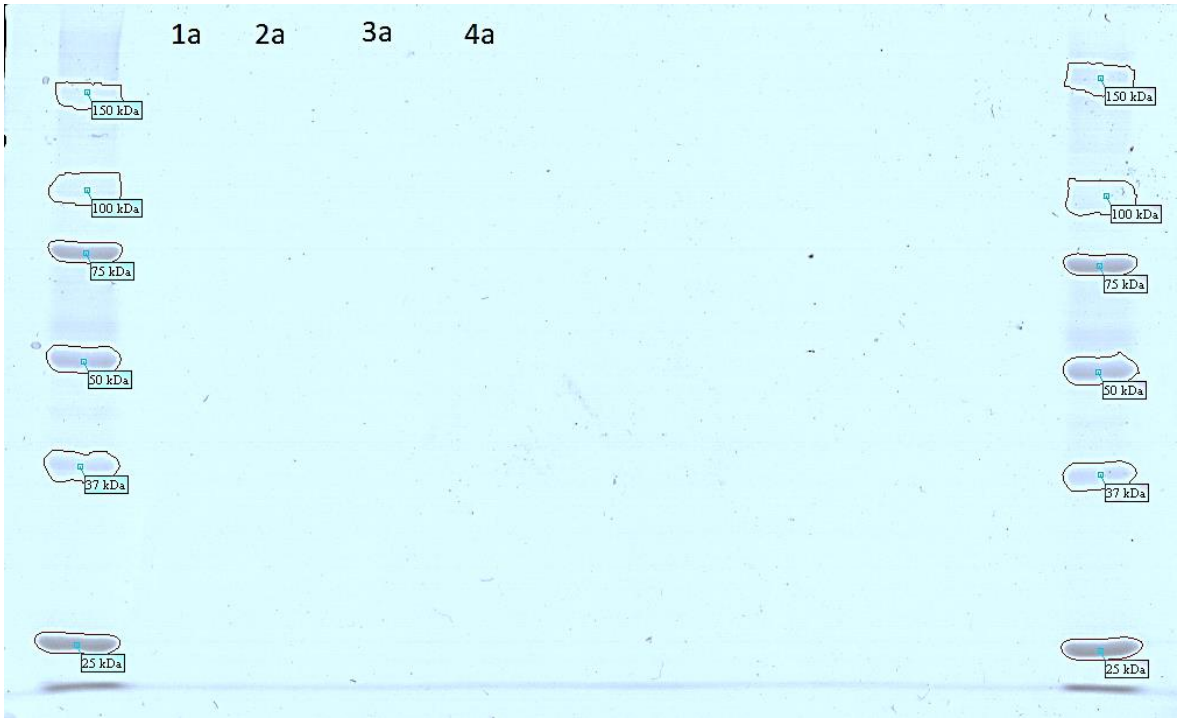
Na podstawie wyników analizy SDS-PAGE stwierdzono, że białka (wśród nich te o masach zbliżonych do mas tropomiozyn, ok. 37 kDa), które były widoczne w postaci prążków na żelach z rozdzielania próbek przed hydrolizą, uległy całkowitej hydrolizie trypsyną.

Obserwowane masy cząsteczkowe tropomiozyn mieszczą się w zakresie od ok. 34 do 39 kDa [Faber i in. 2016], co potwierdzają wyniki analiz tych białek techniką SDS-PAGE, opisane w literaturze [Lv i in. 2017; Lin i in. 2018; Fang i in. 2019; Liu i i in. 2019; Faisal i in. 2019; Liu i in. 2021]. Wartości te są jednak wyższe niż masy tropomiozyn, obliczone na podstawie sekwencji aminokwasowych, zapisanych w bazie UniProtKB (zakres od ok. 31 do 35 kDa). Masy cząsteczkowe określane techniką SDS-PAGE mogą być zawyżone, w stosunku do mas, wyznaczonych np. za pomocą spektrometru masowego [Dziuba i in. 2002]. Zjawisko to występuje szczególnie wśród białek o przewadze grup kwasowych [Guan i in. 2015].

a)

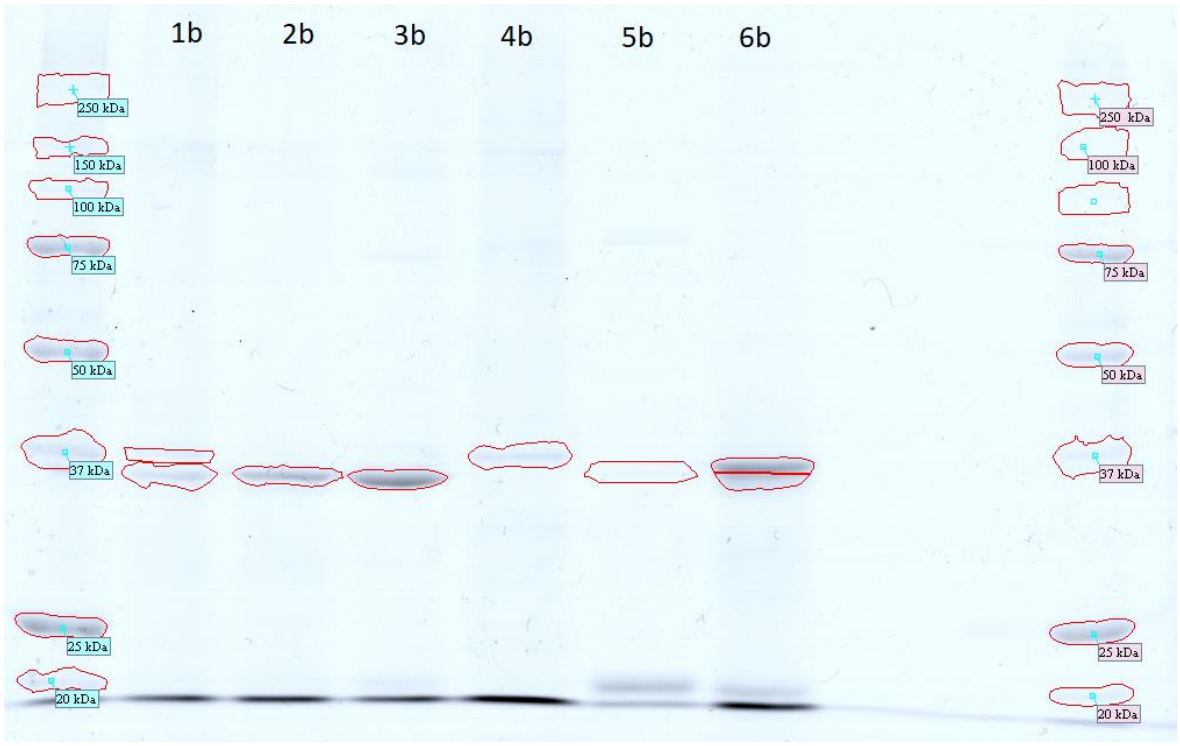


b)

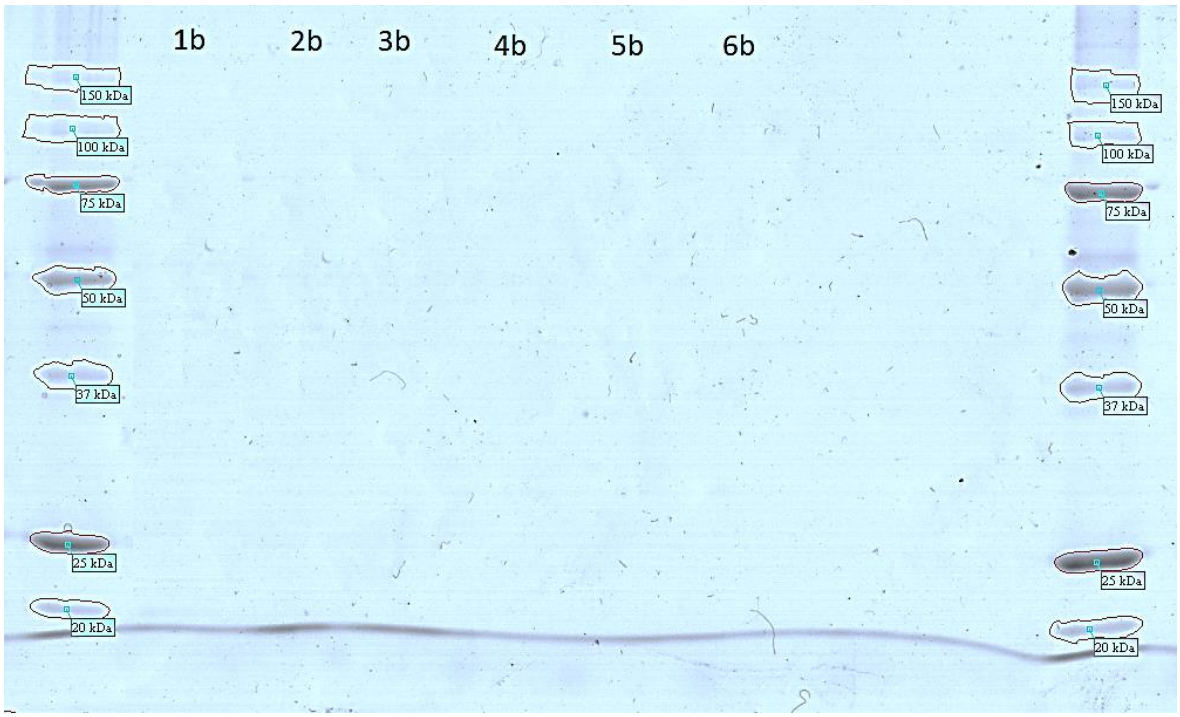


Rys. 10. Żele po rozdzielaniu elektroforetycznym białek z surowców rozmrożonych, przed (a) i po hydrolizie (b). Spośród prążków wykrytych automatycznie przez oprogramowanie Image Master 2D Platinum 2.0. (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone) zaznaczono te pochodzące od białek o masach zbliżonych do mas tropomiozyn (Rys. a). Dwie skrajne linie zawierają wzorce mas cząsteczkowych.

a)

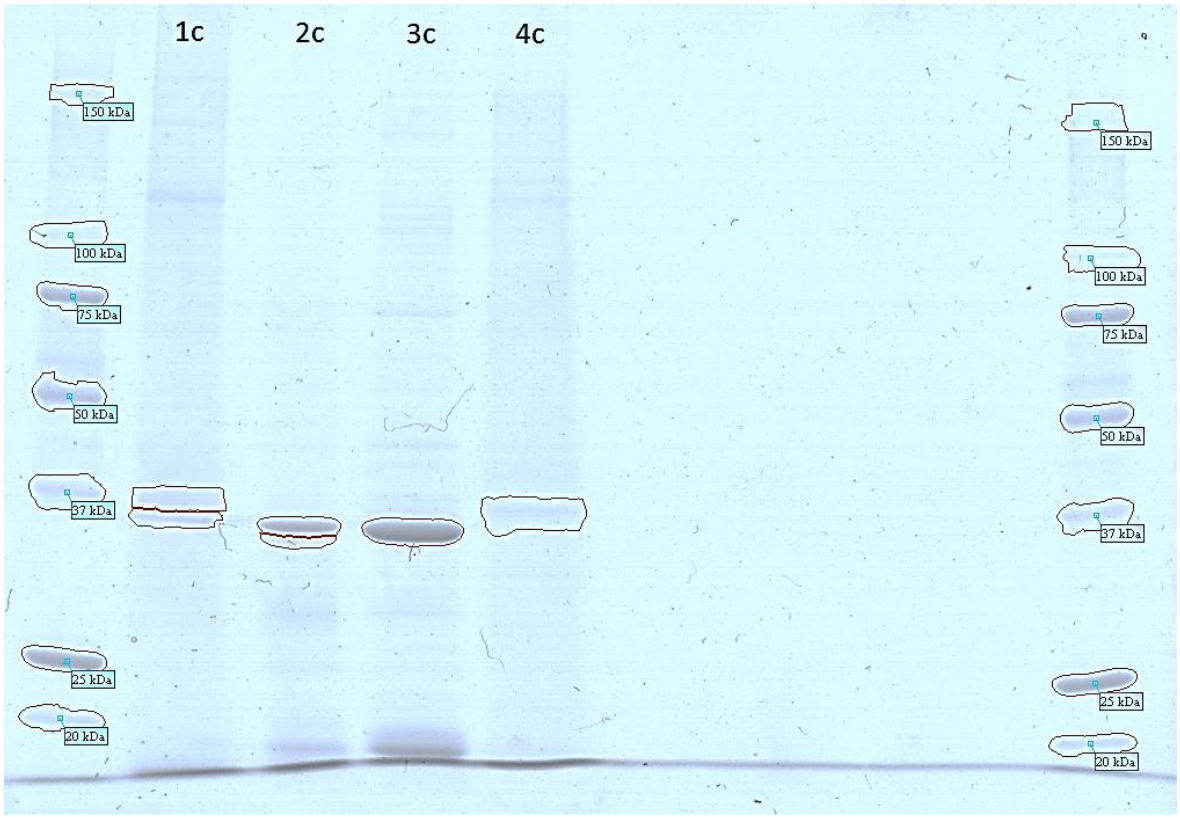


b)

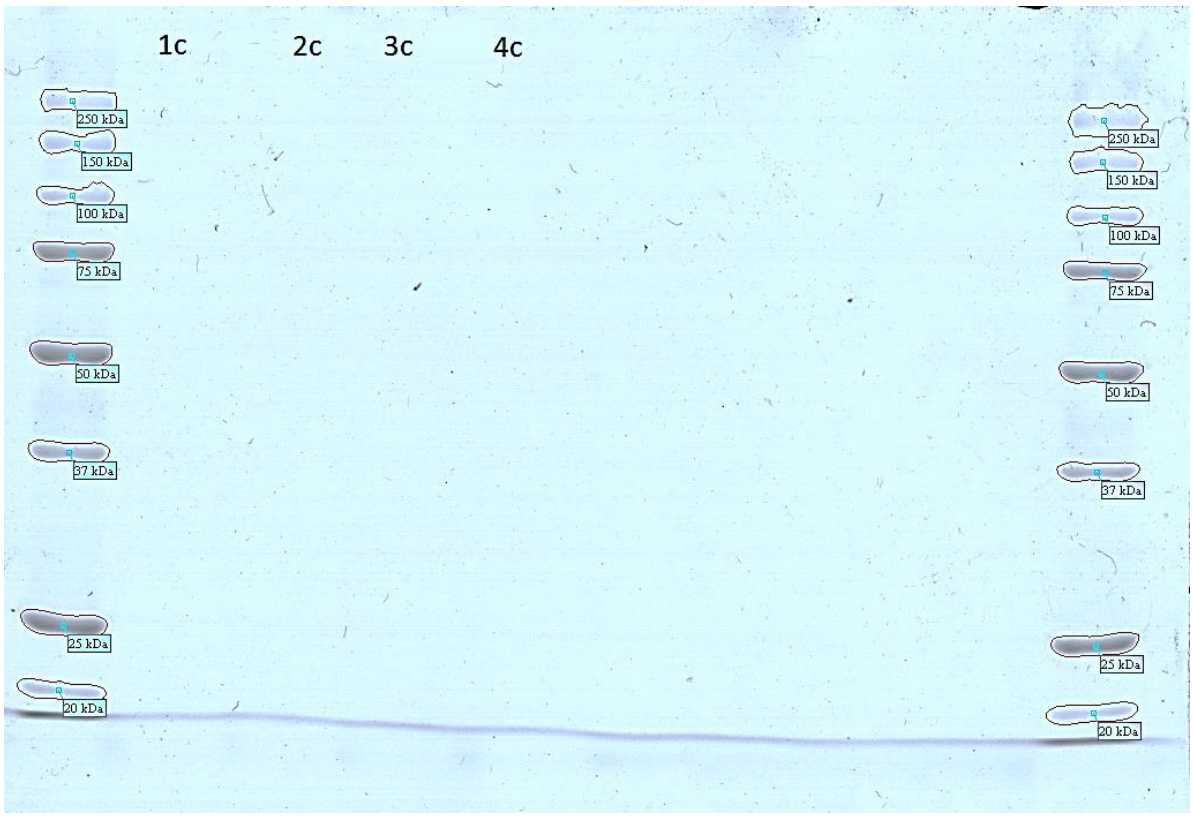


Rys. 11. Żele po rozdzielaniu elektroforetycznym białek z produktów ugotowanych i gotowych do spożycia, przed (a) i po hydrolizie (b). Spośród prążków wykrytych automatycznie przez oprogramowanie Image Master 2D Platinum 2.0. (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone) zaznaczono te pochodzące od białek o masach zbliżonych do mas tropomiozyn (Rys. a). Dwie skrajne linie zawierają wzorce mas cząsteczkowych.

a)



b)



Rys. 12. Żele po rozdzielaniu elektroforetycznym białek z produktów smażonych, przed (a) i po hydrolizie (b). Spośród prążków wykrytych automatycznie przez oprogramowanie Image Master 2D Platinum 2.0. (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone) zaznaczono te pochodzące od białek o masach zbliżonych do mas tropomiozyn (Rys. a). Dwie skrajne linie zawierają wzorce mas cząsteczkowych.

5.2.2. Określenie przybliżonych mas cząsteczkowych tropomiozyn metodą spektrometrii mas

Metodą spektrometrii mas (MS) z wykorzystaniem dekonwolucji widm, ustalono przybliżone masy jonów pseudomolekularnych tropomiozyn ($[M+1]^+$, gdzie: M – masa molekularna białka, 1 – przybliżona masa protonu, 1,00728 Da), obecnych w próbkach. Dekonwolucji poddawano widma jonów tworzących piki na chromatogramie. Wybrano te piki, które powtarzały się w próbkach poddanych różnym procesom obróbki (Załącznik 3).

W poniższej tabeli przedstawiono przykładowe masy cząsteczkowe tropomiozyn wybranych gatunków zaliczanych do owoców morza, według bazy UniProtKB:

Tabela 3. Masy cząsteczkowe tropomiozyn wybranych gatunków owoców morza. Na podst. UniProtKB [UniProt Consortium 2020], https://www.uniprot.org/ dostęp: czerwiec 2021.

L.p.	UniProtKB ID	Nazwa łacińska	Nazwa zwyczajowa	M [Da]
1.	B4YAH6	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	32849
2.	C0LU07	*Procambarus clarkii*	rak luizjański	32813
3.	Q3Y8M6	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	32849
4.	Q25456	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	31705
5.	Q25457	*Mytilus edulis*	omułek jadalny	32798
6.	P91958	*Mytilus galloprovincialis*	omułek śródziemnomorski	32770
7.	Q2V0V4	*Sepia esculenta*	mątwa	32661
8.	Q2V0V2	*Todarodes pacificus*	strzalik japoński	32673
9.	Q2V0V1	*Ommastrephes bartramii*	latająca kałamarnica neonowa	32679

W tabeli 4 przedstawiono masy tropomiozyn, wyznaczone na podstawie mas jonów pseudomolekularnych, obliczonych przy wykorzystaniu dekonwolucji widm:

Tabela 4. Masy przykładowych (najintensywniejszych) jonów pseudomolekularnych białek o masach zbliżonych do tropomiozyn, obecnych w badanych próbkach.

Nr produktu	Identyfikator	t_R[1][min]	Liczba pików w widmie masowym	$[M+H]^+$ [Da]	s[2]	M [Da]	Intensywność
1	a	14,90	5	31351,8867	0,1701	31350,8794	81,20
			3	31359,7559	0,0838	31358,7486	105,66
			8	32580,9668	0,3959	32579,9595	113,64
			5	32443,0234	0,4864	32442,0162	132,69
			11	31358,0039	0,3277	31356,9966	174,75
	b	15,06	3	31983,6250	0,0932	31982,6177	189,70
			4	32004,7402	0,3698	32003,7330	43,52
			3	32322,5273	0,4588	32321,5201	198,04
	c	15,06	6	34415,6016	0,4984	34414,5943	480,06
			12	34316,8320	0,3570	34315,8248	485,30
			5	32776,1875	0,3267	32775,1802	511,94
			7	34330,3828	0,4689	34329,3755	646,13
			3	31898,2910	0,2681	31897,2837	1004,05
2	a	14,17	3	31035,8848	0,1928	31034,8775	1109,35
			7	33479,8555	0,3552	33478,8482	1747,70
			6	33488,0156	0,3122	33487,0084	1997,25
			8	34334,1758	0,4715	34333,1685	2378,85
			3	31836,1543	0,4698	31835,1470	2517,08
	b	14,35	3	32179,7012	0,3935	32178,6939	47,06
			4	31626,5195	0,2289	31625,5122	175,36
			3	31321,2754	0,4438	31320,2681	596,91
			3	31317,6973	0,4330	31316,6900	2254,16
			3	31306,4102	0,4415	31305,4029	2852,44
	c	13,97	6	32528,2285	0,4386	32527,2212	1989,92
			5	31098,8457	0,3043	31097,8384	2107,60
			3	31555,1406	0,3402	31554,1334	2274,10
			3	31561,4981	0,3237	31560,4908	2566,04
			3	31201,6797	0,4570	31200,6724	4206,89
3	a	14,22	3	31300,6641	0,3523	31299,6568	314,74
			7	31812,9180	0,3313	31811,9107	383,98
			4	31822,3711	0,3320	31821,3638	443,41
			4	32659,1914	0,2656	32658,1841	482,31
			6	34328,0195	0,4506	34327,0123	577,51
	b	14,11	3	31439,6758	0,3356	31438,6685	157,74
			3	31172,9707	0,4334	31171,9634	164,96
			3	31293,7344	0,2033	31292,7271	229,76
			3	31359,3086	0,0450	31358,3013	385,42
			3	32226,8535	0,3182	32225,8462	680,33
	c	14,38	5	34357,0000	0,3667	34355,9927	769,91
			11	34350,9102	0,4579	34349,9029	807,53
			3	31799,6055	0,4000	31798,5982	845,86
			9	33402,9570	0,5022	33401,9498	1014,59
			5	32496,6680	0,1960	32495,6607	1044,37
4	a	14,88	10	33138,8633	0,3976	33137,8560	320,10
			14	33414,6484	0,4519	33413,6412	320,80
			13	33119,0156	0,3757	33118,0084	328,31
			17	33699,3203	0,4602	33698,3130	339,91
			15	33691,2266	0,4408	33690,2193	442,92
	b	14,12	4	32378,3594	0,3348	32377,3521	167,88
			4	33454,1094	0,5738	33453,1021	232,89
	c	13,85	8	33457,5313	0,3393	33456,5240	318,30
			5	33280,3164	0,2157	33279,3091	481,96
			4	31813,0469	0,4618	31812,0396	615,72
			3	31695,7324	0,5721	31694,7251	840,84

Nr produktu	Identyfikator	t_R[1] [min]	Liczba pików w widmie masowym	$[M+H]^+$ [Da]	s[2]	M [Da]	Intensywność
			3	31800,5469	0,2462	31799,5396	859,29
5		14,70	3	32192,4883	0,1753	32191,4810	469,67
6		14,25	5	33329,2148	0,5458	33328,2076	1458,04
			5	34915,9844	0,2969	34914,9771	1614,83
			5	32271,9941	0,4717	32270,9869	1726,23
			4	33470,7227	0,4091	33469,7154	2315,71
			4	31356,3516	0,2402	31355,3443	3686,66

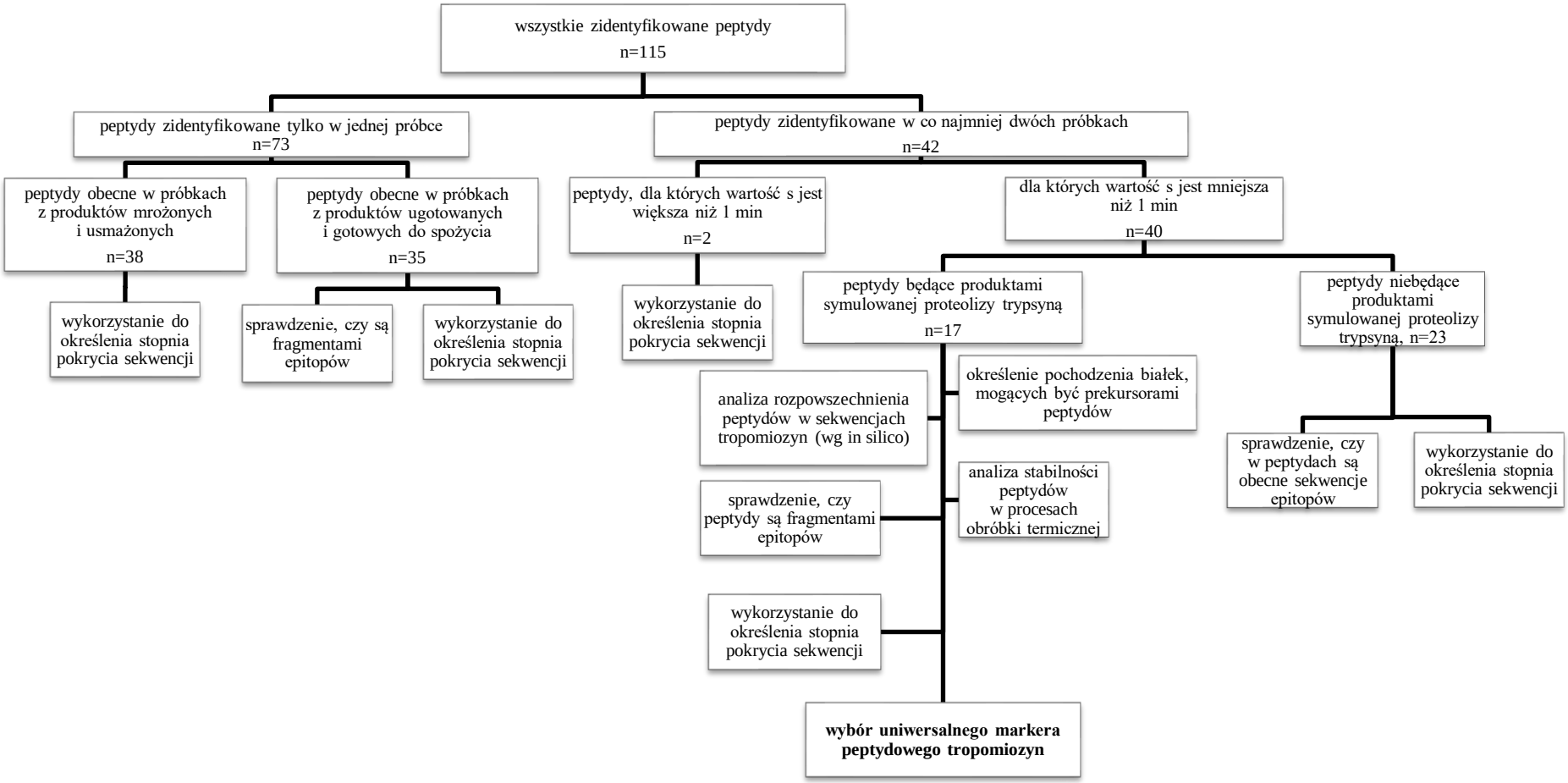
[1]czas retencji piku na chromatogramie, zastosowany gradient – Rys. 6
[2]odchylenie standardowe czasów retencji, obliczone według równania (4.2)

Masy cząsteczkowe tropomiozyn, uzyskane na drodze dekonwolucji, różnią się (mają niższe wartości) od mas otrzymanych podczas analizy białek metodą SDS-PAGE. Są zbliżone do mas cząsteczkowych tropomiozyn według bazy UniProtKB (Tabela 3). Myrset i in. [2013] określili masę cząsteczkową tropomiozyny krewetki tygrysiej (*P. borealis*) metodą MALDI-MS. Wyznaczona masa wynosiła 32756 Da, podczas gdy według bazy UniProtKB masa tego białka to 32753 Da. Przyczyną różnicy w masach może być to, że masy cząsteczkowe białek w UniProtKB są obliczane teoretycznie, na podstawie składu aminokwasowego. Nie uwzględnia się w nich modyfikacji potranslacyjnych i odłączenia peptydu sygnalnego.

Analiza złożonych kompleksów białkowych metodą dekonwolucji widm jest utrudnione, m.in. ze względu na nakładające się sygnały na widmie. Proces dekonwolucji widm MS jest procesem skomplikowanym, co jest spowodowane złożonością i zmiennością stosowanych danych. Obecnie parametry w większości algorytmów dekonwolucji są wprowadzane ręcznie. Osiągnięcie w pełni zautomatyzowanej interpretacji danych z dekonwolucji wymaga jeszcze wielu udoskonaleń [Xu i in. 2018].

5.2.3. Analiza peptydów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas (RP-HPLC-MS i RP-HPC-MS/MS)

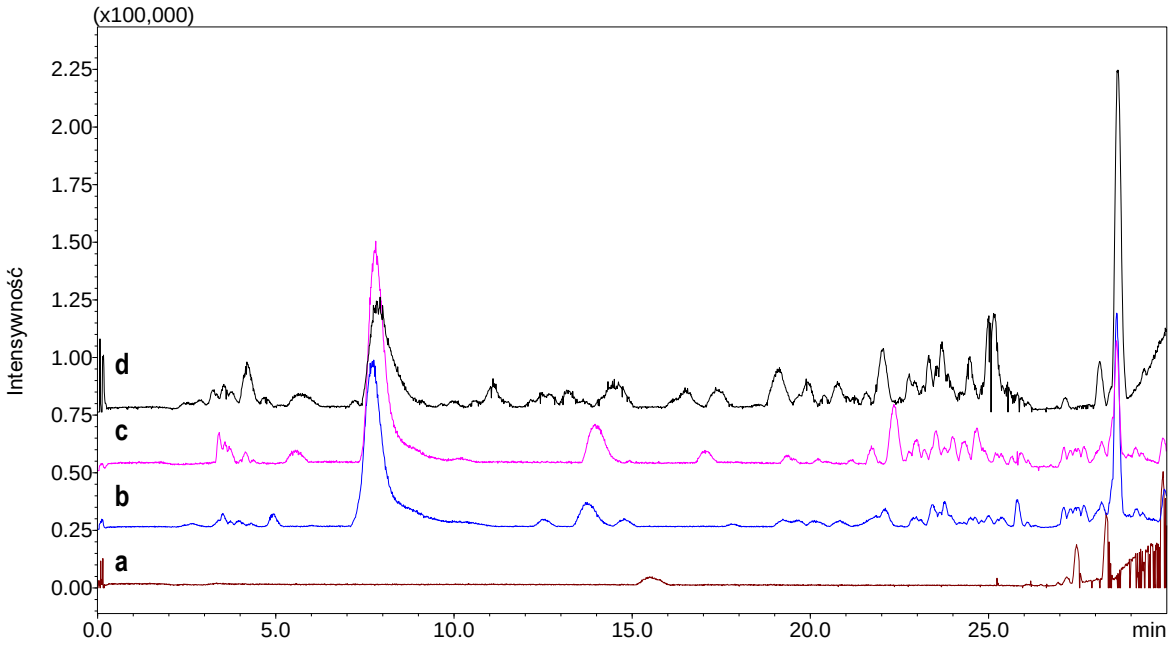
Na rysunku 13 przedstawiono schemat korekty wyboru peptydów, po analizie chromatograficzno-spektralnej:



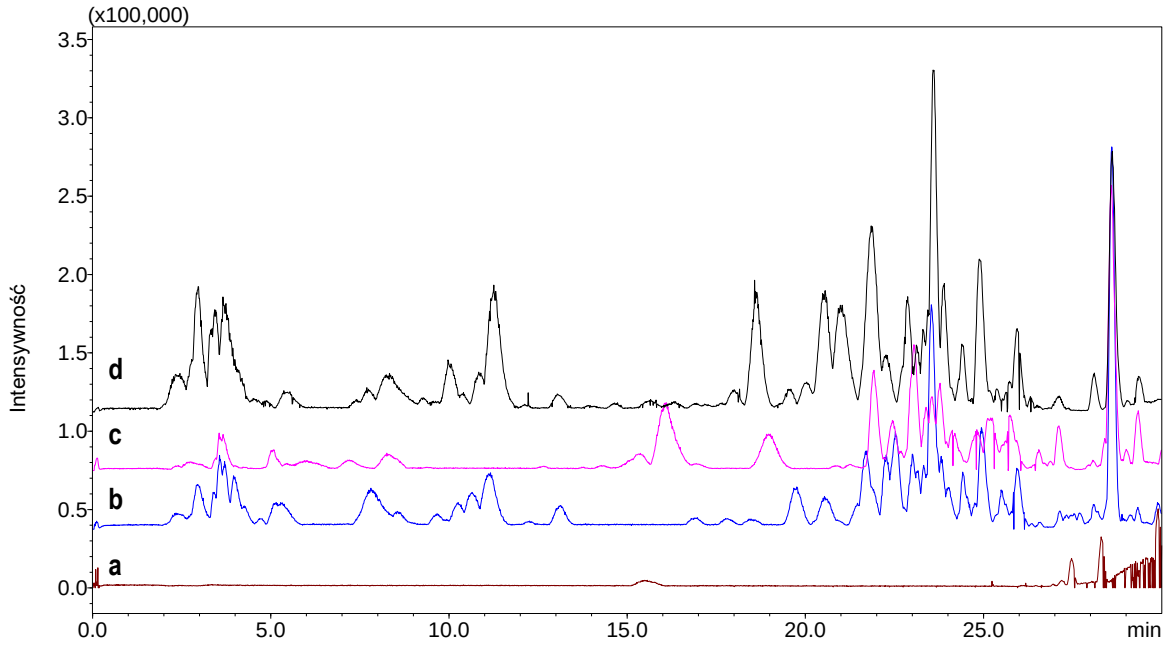
Rys. 13. Schemat korekty wyboru peptydów podczas analizy laboratoryjnej.

- **Rozdzielenie próbek hydrolizatów metodą chromatograficzną**

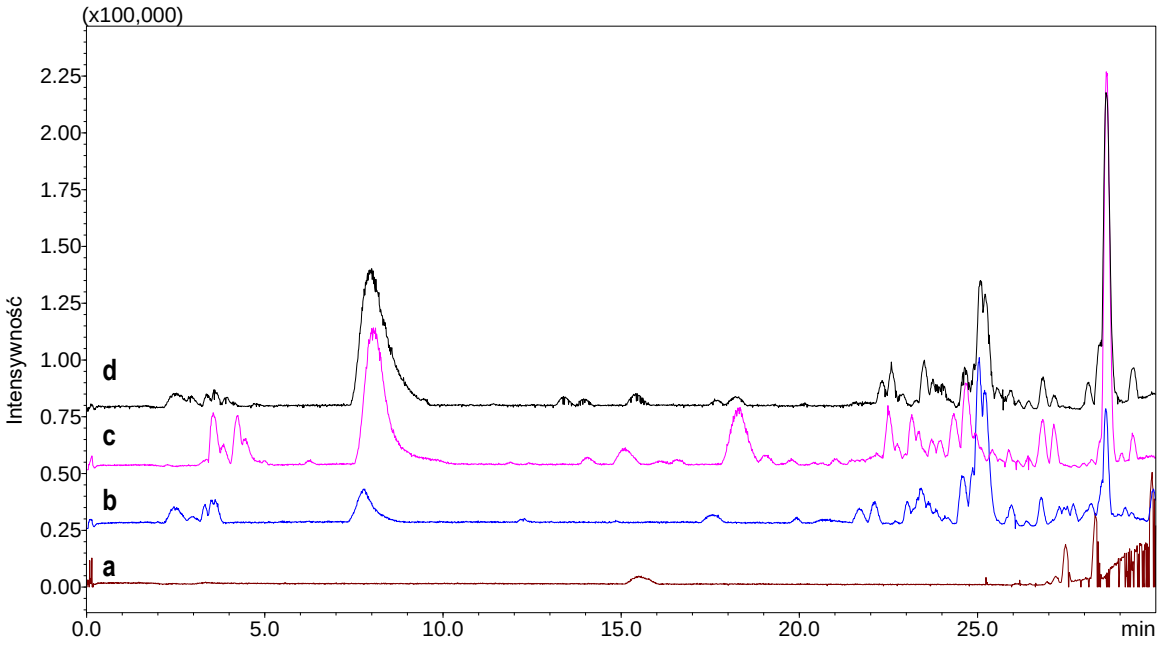
Na Rysunkach 14-17 przedstawiono przykładowe chromatogramy hydrolizatów białek badanych owoców morza (mrożonych, gotowanych i smażonych produktów oraz produktu gotowego do spożycia):



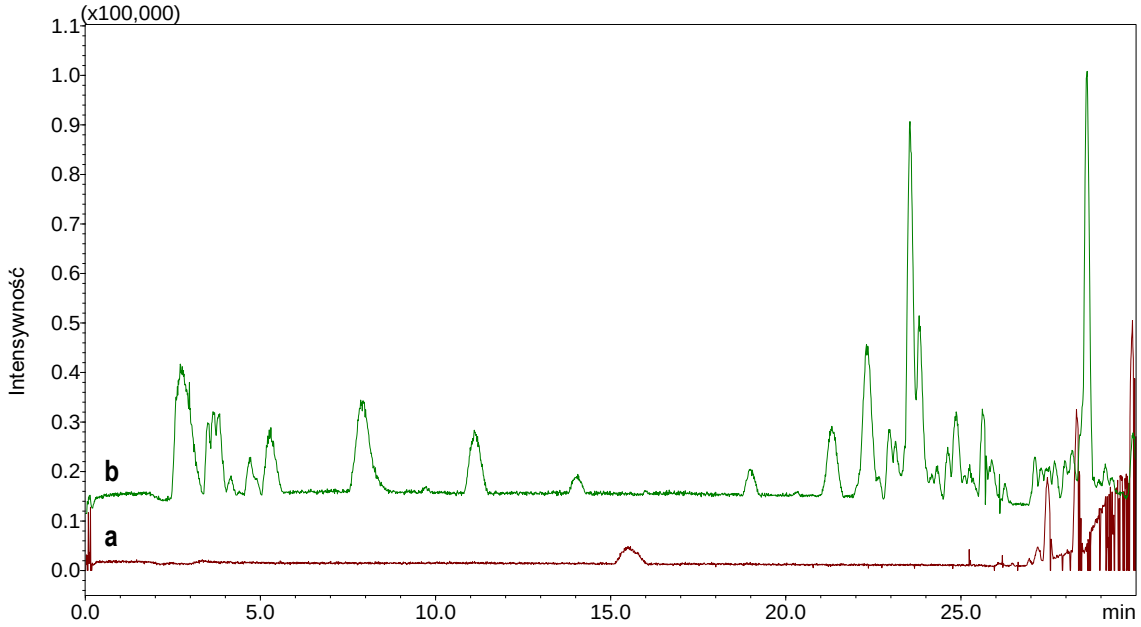
Rys. 14. Chromatogramy z analizy hydrolizatów białek, wyekstrahowanych z produktu nr 1 (sałatka z surowych owoców morza). Poszczególne chromatogramy odpowiadają produktom poddanym przed ekstrakcją: b – rozmrożeniu, c – gotowaniu, d – smażeniu. Chromatogram oznaczony literą a pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7.



Rys. 15. Chromatogramy z analizy hydrolizatów białek, wyekstrahowanych z produktu nr 2 (krewetka kidi, *P. stylifera*). Poszczególne chromatogramy odpowiadają produktom poddanym przed ekstrakcją: b – rozmrożeniu, c – gotowaniu, d – smażeniu. Chromatogram oznaczony literą „a" pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7.



Rys. 16. Chromatogramy z analizy hydrolizatów białek, wyekstrahowanych z produktu nr 4 (omułki chilijskie, *M. chilensis*). Poszczególne chromatogramy odpowiadają produktom poddanym przed ekstrakcją: b – rozmrożeniu, c – gotowaniu, d – smażeniu. Chromatogram oznaczony literą „a" pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7.



Rys. 17. Chromatogram z analizy hydrolizatu białek (b), wyekstrahowanych z produktu nr 6 („Ogonki raków z czosnkiem i pietruszką", rak luizjański *P. clarkii*). Chromatogram oznaczony literą „a" pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7.

Dominujące frakcje peptydów z próbek hydrolizatów z produktów nr 1 (sałatka z surowych owoców morza), nr 2 (krewetki *P. stylifera*) nr 5 („Krewetka na raz") i nr 6 („Ogonki raków z czosnkiem i pietruszką", rak luizjański *P. clarkii*) (hydrolizaty białek z próbek poddanych mrożeniu, gotowaniu i smażeniu) oraz produktu nr 4 (omułki chilijskie, produkt mrożony i poddany smażeniu) i produktu nr 3 (gotowanego i smażonego), eluują

w czasach retencji pomiędzy ok. 3 a 26 min w hydrolizacie białek z próbek produktu nr 4 poddanego gotowaniu oraz mrożonego produktu nr 3, dominujące frakcje eluują w czasie od 20 do 26 min analizy. Zastosowany gradient stężenia roztworu B od 5 do 100% w czasie od 0 do 25 min umożliwił rozdzielenie i wymycie z kolumny peptydów z tropomiozyn, otrzymanych po hydrolizie białek trypsyną. Niektóre z peptydów eluują jednak w bardzo zbliżonym czasie. W przypadku próbki 1a (sałatka z surowych owoców morza) od 23 do 24 minuty analizy z kolumny wymywanych jest aż 8 peptydów, a w przypadku próbki 2a (surowe krewetki *P. stylifera*) – 9 peptydów, w tym w 23,5 min - 3 peptydy. Wydłużenie gradientu pozwoliłoby na lepsze rozdzielenie poszczególnych frakcji.

- **Identyfikacja peptydów za pomocą spektrometrii mas**

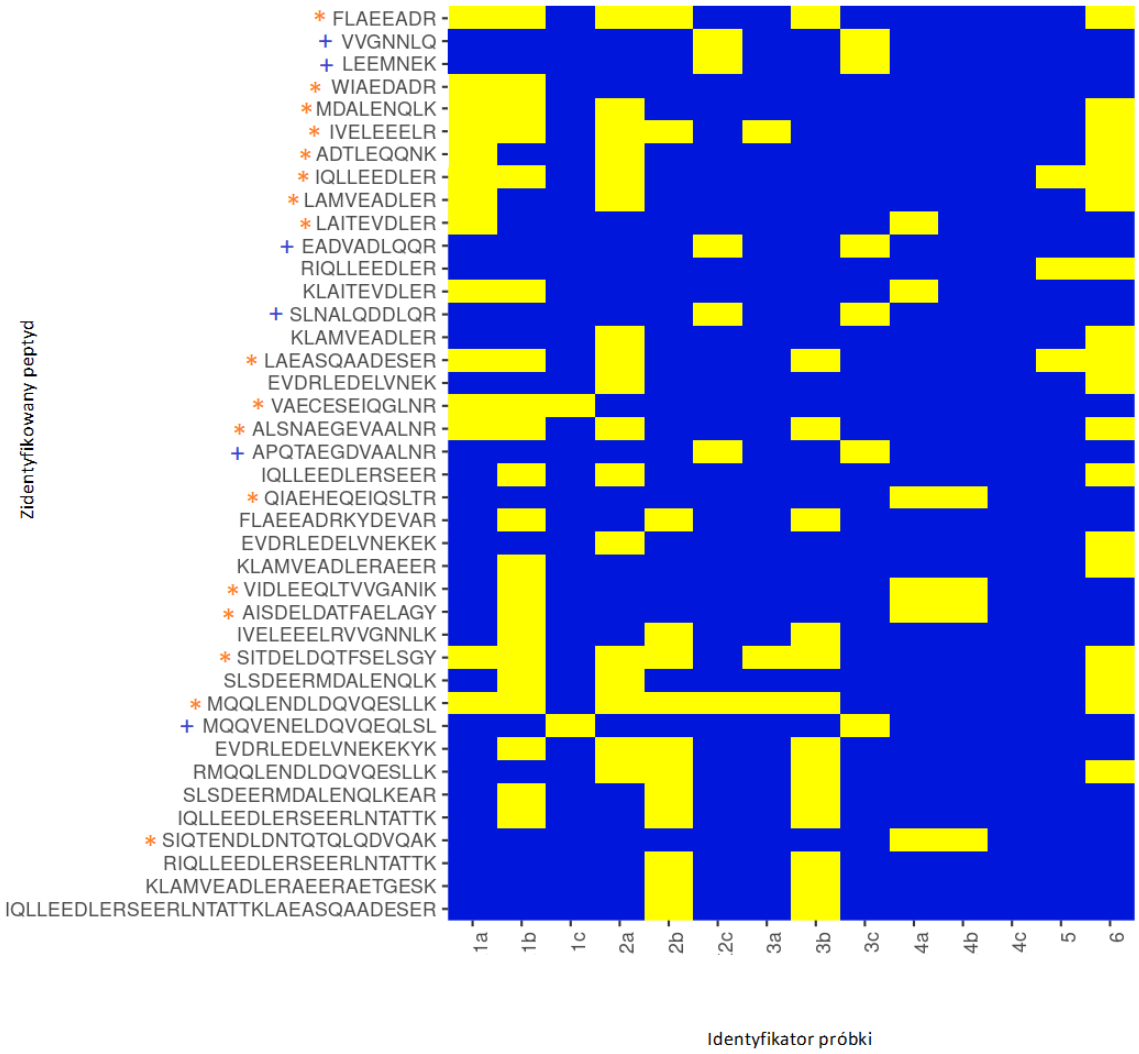
Na podstawie widm masowych otrzymanych w eksperymencie RP-LC-MS/MS, z zastosowaniem metody DDA (ang. data-dependent aquisition - akwizycja zależna od danych) zidentyfikowano 115 peptydów z tropomiozyn (Załącznik 4). Ze względu na liczne modyfikacje (karbamidometylacja cysteiny, deamidacja asparaginy i glutaminy, oksydacja metioniny), identyfikacji niektórych peptydów, w próbkach hydrolizatów białek z produktów po smażeniu (1c 2c, 3c i 4c), dokonano stosując sekwencjonowanie *de novo* (peptydy zaznaczono na szaro w tabeli w Załączniku 4).

Spośród pozostałych 42 peptydów dla 40 odchylenie standardowe czasów retencji s było nie większe niż 1 min, co było zgodne z wynikami dotyczącymi różnic czasu retencji peptydów podczas eksperymentów proteomicznych, opisanymi w literaturze [Gupta i in. 2019; Tóth i in. 2019]. Wszystkie 42 peptydy występujące w więcej niż jednej próbce zostały wzięte pod uwagę przy określaniu stopnia pokrycia sekwencji. Obliczeń dokonano zgodnie z równaniami (4.2) i (4.3). Wyniki przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe czasów retencji zidentyfikowanych peptydów.

L.p.	Sekwencja peptydu	$\bar{x}$ [min]	s [min]	s≤1 [min]
1.	FLAEEADR	11,02	0,95	TAK
2.	WIAEDADR	12,61	0,37	TAK
3.	IVELEEELR	23,52	0,03	TAK
4.	MDALENQLK	21,37	0,53	TAK
5.	ADTLEQQNK	3,22	0,33	TAK
6.	IQLLEEDLER	23,80	0,02	TAK
7.	LAMVEADLER	23,41	0,05	TAK
8.	LAITEVDLER	23,68	0,04	TAK
9.	RIQLLEEDLER	23,35	0,09	TAK
10.	KLAITEVDLER	23,16	0,04	TAK
11.	KLAMVEADLER	22,48	0,03	TAK
12.	LAEASQAADESER	3,70	0,07	TAK
13.	EVDRLEDELVNEK	23,14	0,00	TAK
14.	ALSNAEGEVAALNR	23,22	0,12	TAK
15.	IQLLEEDLERSEER	23,49	0,08	TAK
16.	QIAEHEQEIQSLTR	21,42	0,01	TAK
17.	FLAEEADRKYDEVAR	22,02	0,12	TAK
18.	LAEASQAADESERMR	8,51	2,49	NIE
19.	EVDRLEDELVNEKEK	22,21	0,06	TAK
20.	KLAMVEADLERAEER	22,91	0,01	TAK
21.	VIDLEEQLTVVGANIK	24,97	0,06	TAK
22.	AISDELDATFAELAGY	25,96	0,04	TAK
23.	IVELEEELRVVGNNLK	24,25	0,05	TAK
24.	SITDELDQTFSELSGY	25,94	0,06	TAK
25.	SLSDEERMDALENQLK	23,56	0,05	TAK
26.	MQQLENDLDQVQESLLK	24,84	0,05	TAK
27.	EVDRLEDELVNEKEKYK	22,64	0,12	TAK
28.	RMQQLENDLDQVQESLLK	24,28	0,05	TAK
29.	SLSDEERMDALENQLKEAR	23,44	0,06	TAK
30.	IQLLEEDLERSEERLNTATTK	23,57	0,05	TAK
31.	SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK	23,29	0,06	TAK
32.	RIQLLEEDLERSEERLNTATTK	23,35	0,04	TAK
33.	KLAMVEADLERAEERAETGESK	23,06	0,03	TAK
34.	MQQVENELDQVQEQLSL	24,89	0,08	TAK
35.	APQTAEGDVAALNR	23,26	0,09	TAK
36.	VAECESEIQGLNR	21,53	0,19	TAK
37.	SLNALQDDLQR	22,29	0,15	TAK
38.	EADVADLQQR	23,53	0,10	TAK
39.	LEEMNEK	10,04	0,29	TAK
40.	VVGNNLQ	2,85	0,01	TAK
41.	EDSYEETIR	12,42	1,39	NIE
42.	IQLLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQA ADESER	24,29	0,01	TAK

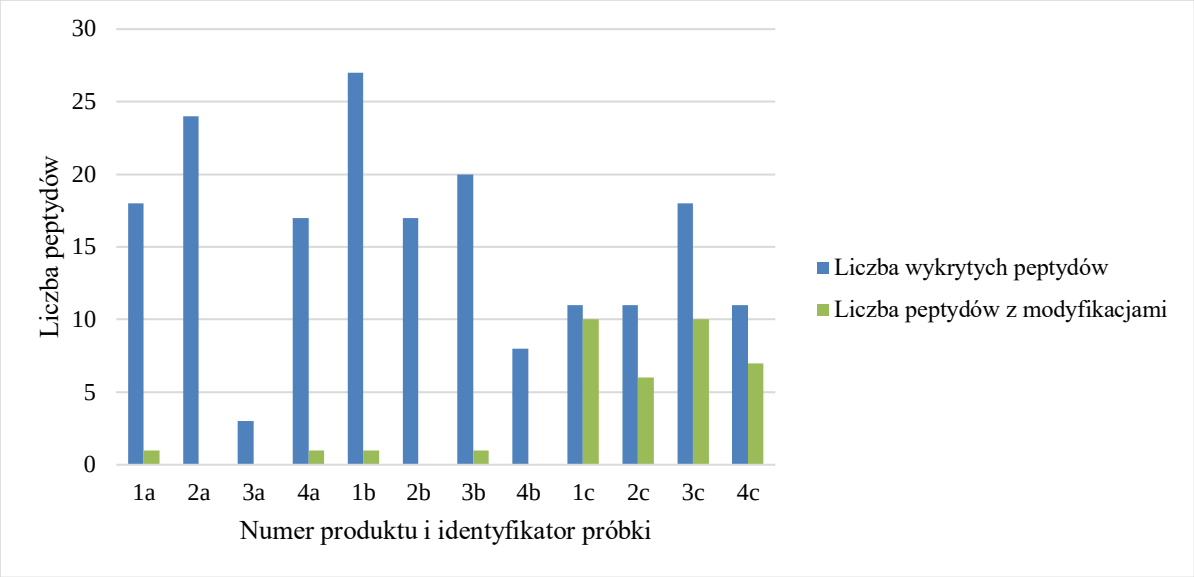
Peptyd uznaje się za zidentyfikowany, jeśli zarejestruje się serię jonów potomnych, które mają takie same czasy retencji [Darewicz i in. 2014, Bucholska i Minkiewicz 2016]. Na rysunku 18 w formie mapy ciepła przedstawiono wyniki identyfikacji peptydów za pomocą techniki RP-LC-MS/MS, która odzwierciedla obecność danych peptydów w próbkach. Wybrano 40 peptydów, które były obecne w co najmniej dwóch próbkach, a ich czasy retencji były powtarzalne (wartość odchylenia standardowego *s* była niższa niż 1 min - Tabela 5):



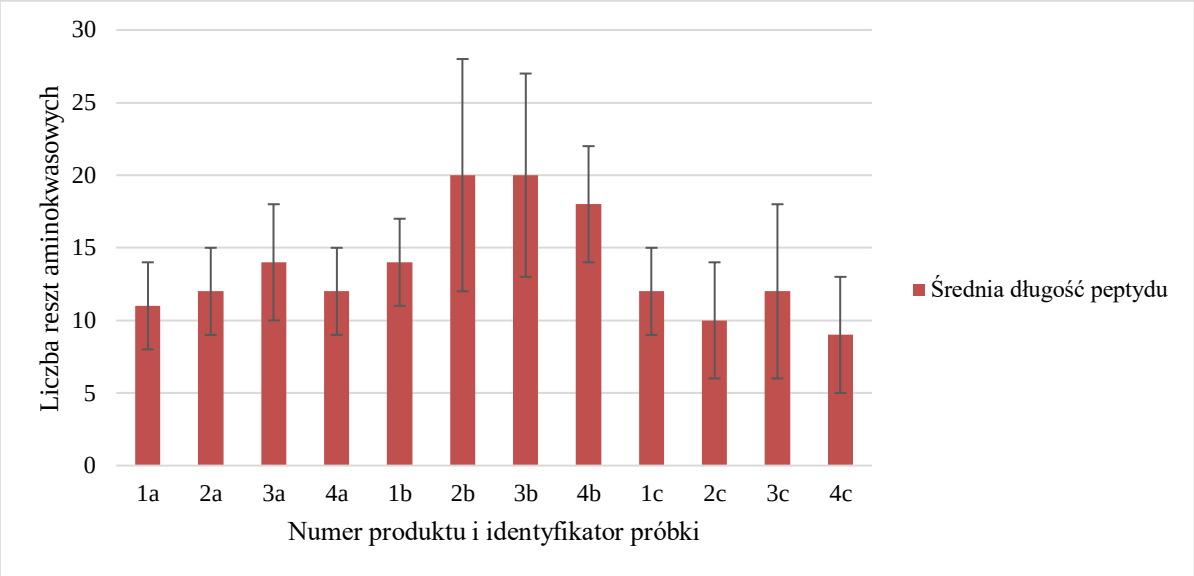
Rys. 18. Mapa ciepła obrazująca obecność peptydów zidentyfikowanych w badanych hydrolizatach. Kolor żółty oznacza, że peptyd był obecny, kolor niebieski zaś, że peptyd był nieobecny w danej próbce. „*" - peptyd był produktem symulowanej proteolizy trypsyną *in silico* sekwencji aminokwasowych tropomiozyn; „+" - peptyd zidentyfikowany *de novo*. Pozostałe peptydy zawierały niezhydrolizowane wiązania, które teoretycznie powinny być podatne na działanie trypsyny (ang. missed cleveages). Wygenerowano w programie Heatmapper [Babicki i in. 2016], http://www.heatmapper.ca/, dostęp: lipiec 2020.

Na rysunku 19 przedstawiono liczby wykrytych peptydów ogółem i peptydów z modyfikacjami (a) oraz średnie długości peptydów (wraz z odchyleniem standardowym) (b) w analizowanych próbkach, poddanych różnym procesom obróbki termicznej.

a)



b)



Rys. 19. Porównanie liczb wykrytych peptydów i peptydów z modyfikacjami (a) i ich średniej długości (b) w próbkach poddanych różnym procesom obróbki: a- rozmrożeniu, b – gotowaniu, c- smażeniu. Średnią oraz odchylenie standardowe obliczono według równań (odpowiednio) (4.3) i (4.2).

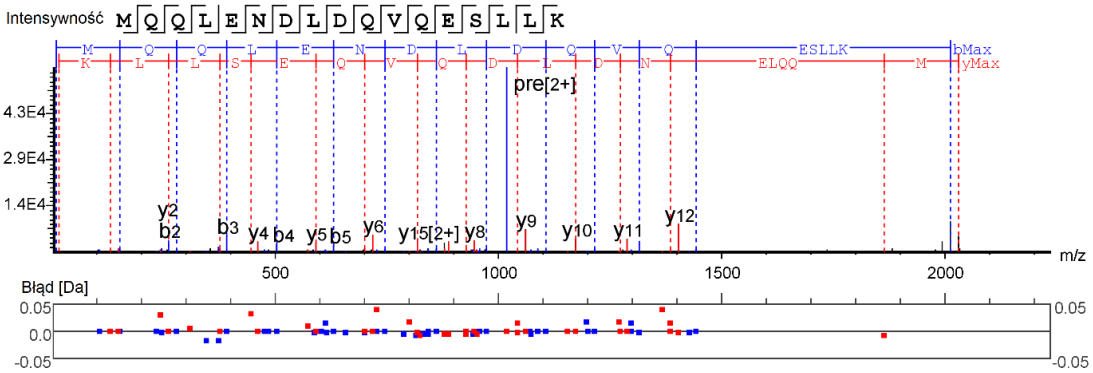
W hydrolizatach białkowych z produktów mrożonych zidentyfikowano głównie krótsze peptydy, będące produktami symulowanej proteolizy trypsyną. Na skutek hydrolizy białek wyekstrahowanych z ugotowanego surowca powstają dłuższe peptydy niż w przypadku białek z surowca mrożonego. Deb-Choundhury i wsp. [2020] jako prawdopodobną przyczynę podają silną agregację białek w warunkach podwyższonej temperatury (pow. 75°C). Trawienie trypsyną zagregowanych białek jest trudniejsze, a co za tym idzie prowadzi do wytworzenia mniejszej liczby peptydów trypsynowych o większej długości w porównaniu z produktami hydrolizy białek, które nie uległy agregacji. Taki efekt trawienia może też być przyczyną zwiększonej alergenności surowca poddanego obróbce termicznej [Faisal i in. 2019],

ponieważ dłuższe fragmenty zawierające epitopy w dużej mierze zostają zachowane. Peptydy zidentyfikowane w hydrolizatach białek z produktów poddanych gotowaniu zawierały w swojej sekwencji aminokwasowej sekwencje epitopów alergennych tropomiozyn, co przedstawiono w tabeli w Załączniku 6. Gotowanie surowca może więc być ważnym etapem wstępnym przy badaniach w kierunku alergenności tropomiozyn. Uwalnianie dłuższych peptydów po hydrolizie białek z surowców gotowanych jest również korzystne, jeśli celem badań jest ustalenie sekwencji aminokwasowej tropomiozyny. W przypadku produktu nr 2 z krewetki o nieznanej sekwencji tropomiozyny, uzyskano częściowe pokrycie sekwencji aminokwasowej z sekwencją alergennej tropomiozyny *M. ensis.*

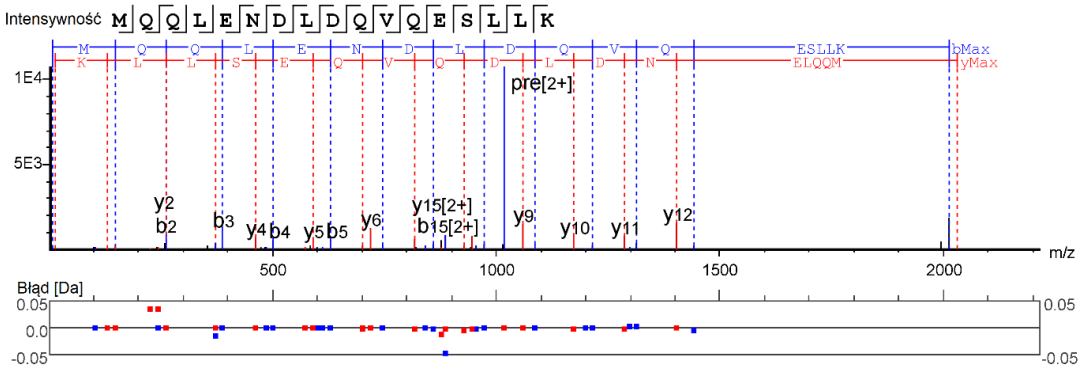
W wyniku smażenia produktów, białka uległy modyfikacji, a co za tym idzie przebieg hydrolizy trypsyną był trudniejszy do przewidzenia. Aminokwasy uległy modyfikacjom, tj. deamidacja i oksydacja. Mimo to, zidentyfikowano peptydy z tropomiozyn, w tym peptyd MQQLENDLDQVQESLLK będący epitopem. Peptydy zawierające zmodyfikowane aminokwasy także mogą być stosowane jako markery do wykrywania obecności białek. Mimo, że modyfikacje potranslacyjne aminokwasów zmieniają wartość masy (m/z) jonu prekursorowego, są one możliwe do wykrycia w próbkach metodami SIM lub SRM. Wprowadzenie marginesu błędu dla identyfikowanego jonu, wynoszącego np. ok. 5 ppm, umożliwia wykrycie peptydu będącego markerem.

Na rysunku 20 przedstawiono widma fragmentacyjne peptydu MQQLENDLDQVQESLLK, otrzymane podczas analizy hydrolizatów białkowych z produktów z krewetki *Parapenaeopsis stylifera* (2a, 2b, 2c), dla której sekwencja tropomiozyny jest nieznana. Część reszt asparaginy i glutaminy, wchodzących w skład peptydu, uległa deamidacji. Deb-Choudhury i in. [2020] wykazali, że poddawanie ogrzewaniu w temperaturze powyżej 70°C białek mięśniowych z wołowiny znacznie zwiększa podatność aminokwasów na deamidację. Podwyższone temperatury zwiększają dostęp wody do białek, powodując ich rozwijanie się i odsłanianie miejsc wcześniej niedostępnych dla deamidacji.

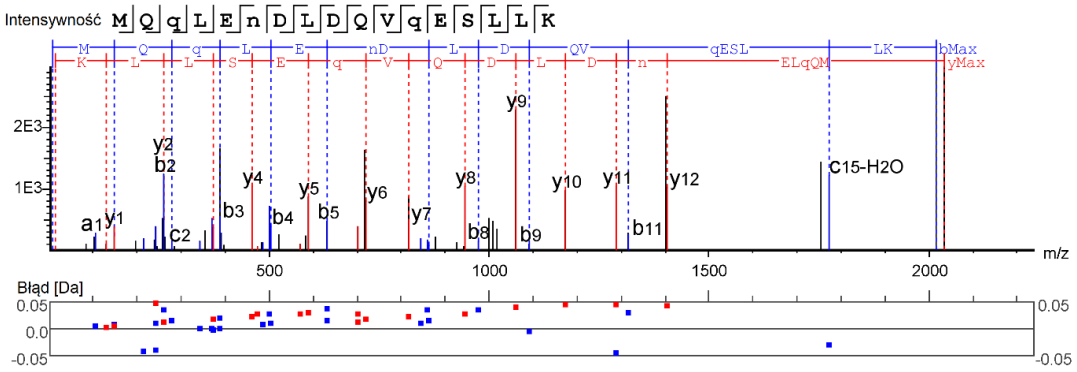
a) 2a



b) 2b



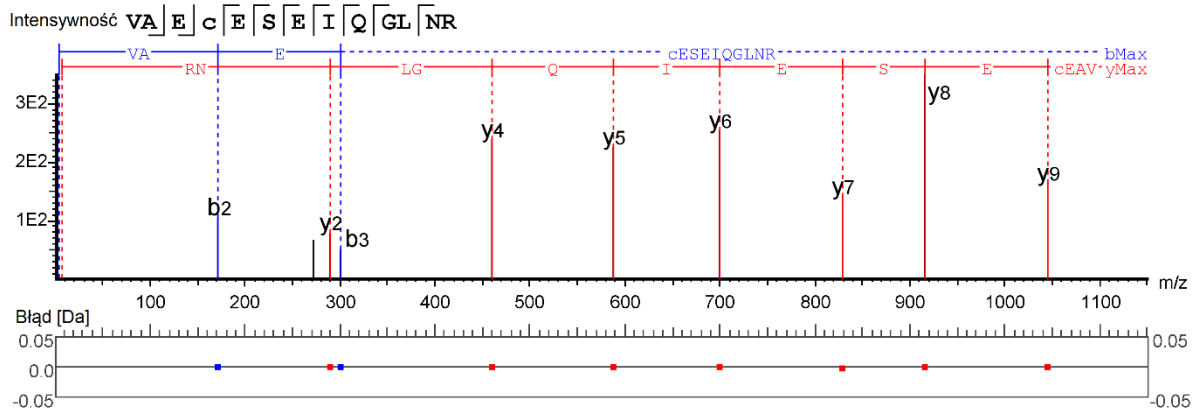
c) 2c



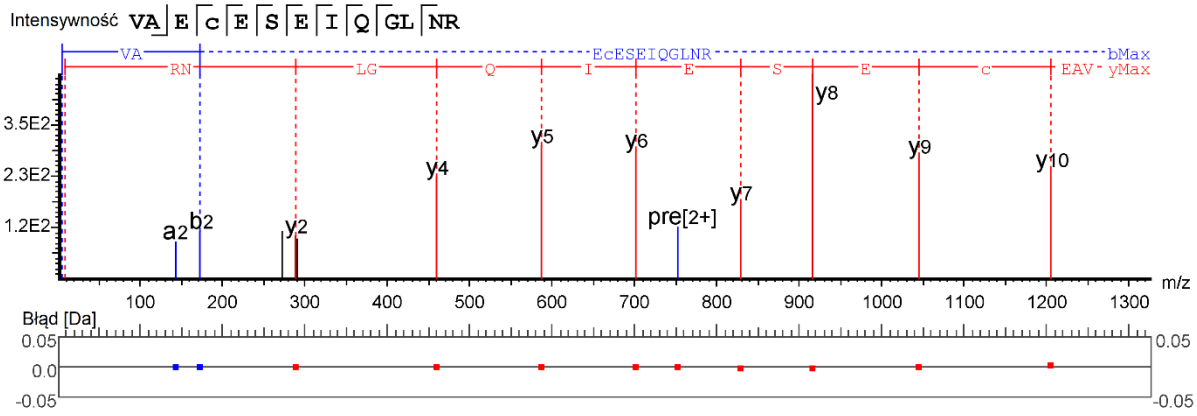
Rys. 20. Widma fragmentacyjne peptydu MQQLENDLDQVQESLLK, wygenerowane w programie PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012]. Małe litery q i n w sekwencjach aminokwasowych peptydów oznaczają deamidację, odpowiednio glutaminy i asparaginy.

Na rysunku 21 przedstawiono widma fragmentacyjne peptydu VAECESEIQGLNR, otrzymane podczas analizy hydrolizatów białkowych z próbek sałatki z owoców morza (1a, 1b, 1c), która zawierała mięczaki o nieznanych sekwencjach tropomiozyn. Peptyd uległ modyfikacjom w procesie obróbki, a cysteina uległa karbamidometylacji podczas przygotowania próbek (reakcji z ditiotreitolem i jodoacetamidem):

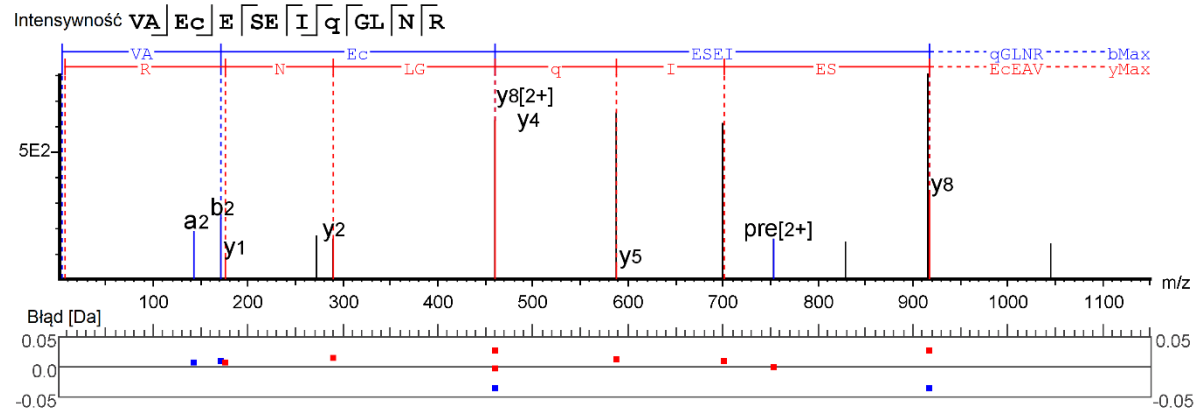
a) 1a



b) 1b



c) 1c



Rys. 21. Widma fragmentacyjne peptydu VAECESEIQGLNR, wygenerowane w programie PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012]. Mała litera c w sekwencjach aminokwasowych peptydów oznacza karbamidometylację cysteiny, a q deamidację glutaminy.

Redukcja cystein jest standardową procedurą podczas przygotowania próbek przeznaczonych do analiz proteomicznych metodą LC-MS. Aby zapewnić lepszy dostępu dla proteazy, zazwyczaj trypsyny, białka denaturuje się i dąży do całkowitego rozwinięcia ich cząsteczek. Podczas ekstrakcji białek stosuje się substancje redukujące i alkilujące reszty cysteiny (takie jak ditiotreitol i jodoacetamid). Środek redukujący niszczy wiązania dwusiarczkowe między cysteinami w białku, a następnie środek alkilujący blokuje grupy tiolowe cysteiny, aby zapobiec regeneracji wiązań [Kuznetsova i in. 2021].

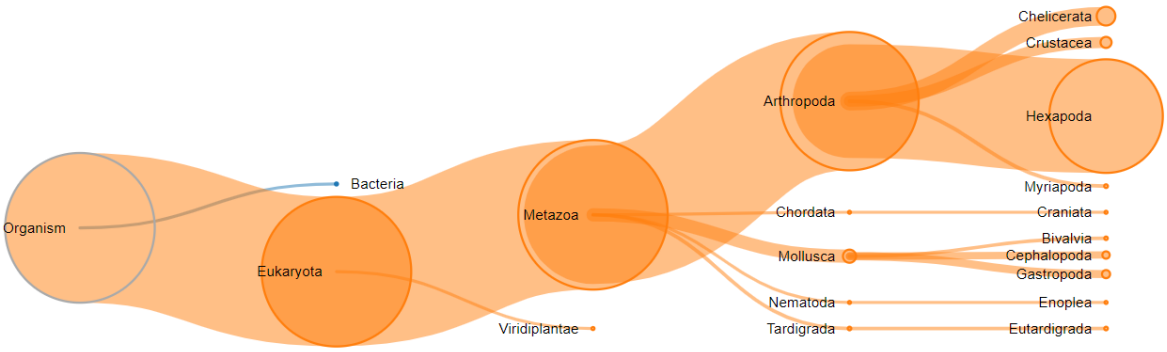
Możliwość detekcji peptydów zależy m.in. od metody jonizacji, zastosowanej w eksperymencie. W swoich badaniach Rahman i in. [2010] porównali skuteczność identyfikacji peptydów z tropomiozyny kraba śnieżnego za pomocą spektrometrii mas, stosując metody jonizacji ESI oraz MALDI. Peptydy takie jak LAEASQAADESER, FLAEEADR oraz IVELEEELR zostały zidentyfikowane w obu przypadkach, zaś peptydy IQLLEEDLER, MDALENQLK i SLEVSEEK tylko wtedy, gdy zastosowano elektrosprej jako metodę jonizacji. Innymi ograniczeniami są możliwości spektrometru i jego zakres mas. Jednak główną przyczyną jest to, że niektóre peptydy nie ulegają jonizacji [Kamińska i Podbielska 2011].

W dalszej części analiz, spośród 40 zidentyfikowanych peptydów wybrano te, których nie było wśród produktów symulowanej proteolizy trypsyną (takie, w których pozostały niezhydrolizowane wiązania peptydowe). Te peptydy (23) przeanalizowano pod kątem obecności w nich fragmentów epitopów alergennych tropomiozyn z bazy IEDB. Pozostałe 17 peptydów, stanowiących produkty symulowanej proteolizy trypsyną, również poddano analizie, aby stwierdzić, czy są fragmentami epitopów. W obu przypadkach obliczono stopień pokrycia sekwencji epitopu i peptydu (SCC). Aby sprawdzić do jakich rodzin należą białka, z których może zostać uwolniony dany peptyd (po trawieniu trypsyną), zastosowano narzędzie Unipept, przy pomocy którego wygenerowano drzewa filogenetyczne, ilustrujące taksonomiczne podobieństwo pomiędzy organizmami, z których pochodzą białka będące prekursorami badanych peptydów (Załącznik 7, Rys. Z18-Z34). Przeanalizowano także rozpowszechnienie tych peptydów w sekwencjach białek z rodziny tropomiozyn (na podstawie wyników z analizy *in silico).* Na podstawie uzyskanych danych oceniono przydatność analizowanych peptydów jako potencjalne markery tropomiozyn.

- **Możliwość uwalniania peptydów z białek różnych organizmów**

Zidentyfikowane peptydy (będące jednocześnie produktami symulowanej proteolizy trypsyną *in silico* sekwencji aminokwasowych tropomiozyn) przeanalizowano pod kątem możliwości ich uwalniania z białek różnych organizmów. W tym celu utworzono przy pomocy narzędzia Unipept drzewa filogenetyczne, które mają postać interaktywnego diagramu tzw. „mapy drzewa" (ang. treemap). Poszczególne koła (węzły) diagramu odpowiadają liczbie organizmów, z których pochodzą białka mogące być prekursorami danego peptydu. Rozmiar pierwszego węzła odpowiada 100% tych organizmów. Średnica każdego węzła jest równa sumie szerokości wszystkich wychodzących z niego gałęzi. Kolory węzłów i gałęzi są przypisywane losowo, aby odróżnić klastry taksonomiczne. Kolory węzłów są sumą kolorów wychodzących z niego gałęzi [Mesuere i in. 2015].

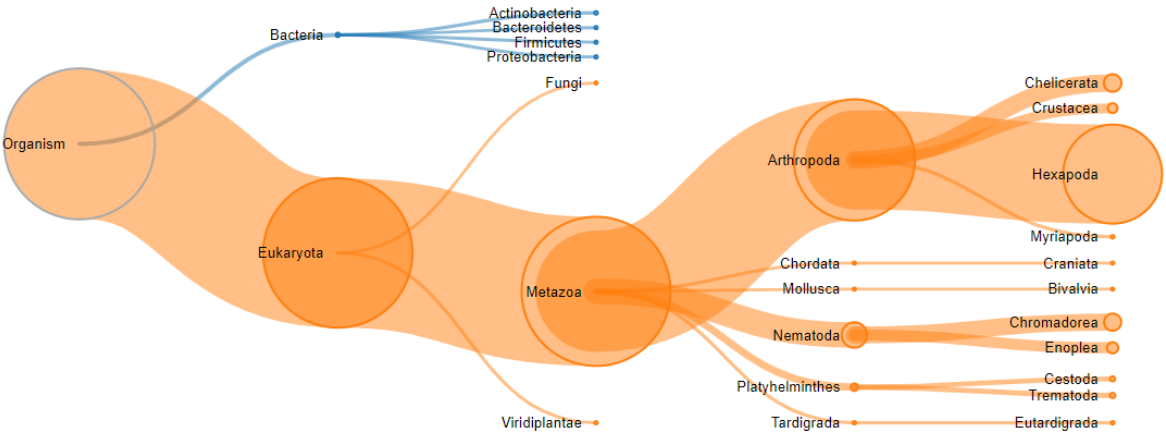
Na podstawie drzew filogenetycznych wykazano, że wybrane peptydy pochodzą nie tylko z rodziny tropomiozyn skorupiaków i mięczaków, ale także owadów i ssaków. Uzyskane wyniki potwierdziły również, że niektóre peptydy występują w sekwencjach białek bakteryjnych oraz wirusowych, innych niż tropomiozyny. Na rysunku 22 przedstawiono drzewo filogenetyczne dla peptydu IQLLEEDLER, który występuje w tropomiozynach mięczaków (*Mollusca*) i skorupiaków (*Crustacea*), ale w szczególności w tropomiozynach sześcionogów (*Hexapoda*), do których należą m.in. owady:



Rys. 22. Drzewo filogenetyczne, przedstawiające obecność peptydu IQLLEEDLER w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021.

Palmer i in. [2020] zastosowali peptyd IQLLEEDLER do ilościowego oznaczania tropomiozyn w ekstraktach białek z owadów.

Peptyd IVELEEELR, który jest typowy dla skorupiaków (według analizy *in silico*, Załączniki 1 i 2), uwalniany jest również po proteolizie *in silico* trypsyną sekwencji aminokwasowych tropomiozyn sześcionogów, co wynika z drzewa filogenetycznego przedstawionego na rysunku 23:



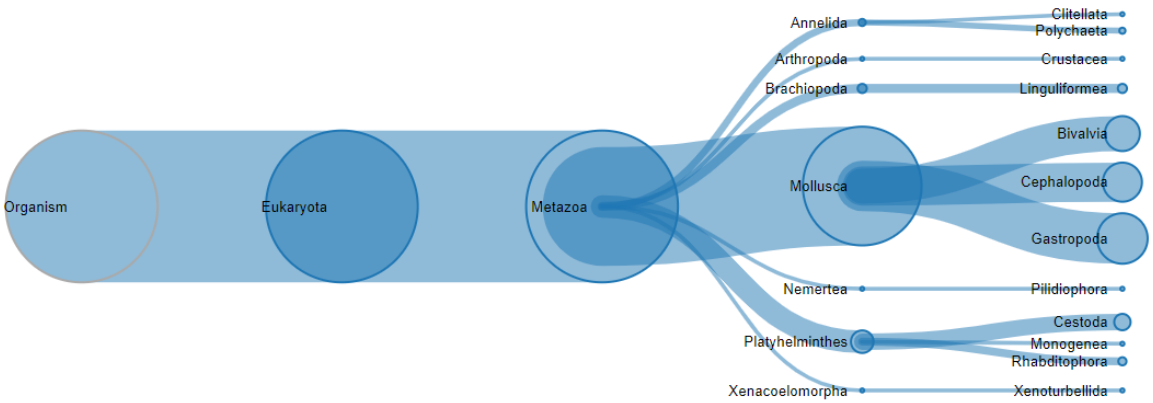
Rys. 23. Drzewo filogenetyczne, przedstawiające obecność peptydu IVELEEELR w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021.

Peptyd ten został zidentyfikowany w ekstraktach białkowych z owadów: czarnej muchy (*Hermetia illucens*) i pleśniakowca lśniącego (*Alphitobius diaperinus*), które mogą być potencjalnym źródłem alergenów [Leni i in. 2020].

Jak wynika z drzewa, peptyd IVELEEELR jest produktem proteolizy *in silico* trypsyną białek bakterii typu *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Szczepy bakterii tych typów występują również w ludzkiej mikrobiocie jelitowej [Nawrocka i in. 2015]. Rozpowszechnienie tego peptydu jest szczególnie istotne, jeśli weźmie się pod uwagę fakt, że jest on epitopem (IEDB ID: 956601, Załącznik 5). Według Minkiewicza i in. [2015],

peptydy stanowiące sekwencje epitopów alergennej tropomiozyny krewetki *Penaeus aztecus* (Pen a 1.102) występują także w sekwencjach białek nie należących do rodziny tropomiozyn. W wyniku badań stwierdzono również, że mikroorganizmy, m.in. chorobotwórcze, syntetyzują białka zawierające takie epitopy. Niektóre gatunki bakterii sprzyjają rozwojowi i zaostrzeniu objawów alergii, szczególnie tych związanych z działaniem układu oddechowego [Nordengrün i in. 2018]. Niektóre białka bakterii fermentacji mlekowej (stosowanych w przemyśle mleczarskim) również mogą wywoływać reakcje alergenne [Wróblewska i in. 2016; Markiewicz i in. 2016].

Peptydem typowym dla mięczaków jest peptyd LAITEVDLER. Drzewo filogenetyczne dla tego peptydu przedstawiono na rysunku 24:



Rys. 24. Drzewo filogenetyczne, przedstawiające obecność peptydu LAITEVDLER w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021.

Z drzewa wynika, że peptyd może być uwalniany zarówno z tropomiozyn małży (*Bivalvia*), jak również ślimaków (*Gastrophoda*) i głowonogów (*Cephalophoda*). Peptyd ten jest również szeroko rozpowszechniony w sekwencjach tropomiozyn organizmów z typu *Platyhelminthes* (płazińców), w nadgromadzie *Cestoda* (tasiemce). Jedynym znanym skorupiakiem, u którego z sekwencji tropomiozyny po proteolizie trypsyną może być uwalniany ten peptyd, jest gatunek wąsonoga *Balanus rostratus*. Z tropomiozyny tego skorupiaka po symulowanej proteolizie trypsyną *in silico* powstają peptydy wspólne z grupą mięczaków, ale żaden, który byłby dzielony z grupą skorupiaków (Załącznik 1).

- **Określenie stopnia pokrycia sekwencji (SCC) peptydów i epitopów**

Peptydy zidentyfikowane metodą spektrometrii mas stanowiły epitopy lub fragmenty znanych epitopów alergennych tropomiozyn, co umożliwiło wykrycie w próbkach alergennych tropomiozyn, bez znajomości ich dokładnej sekwencji aminokwasowej. Wybrano 17 peptydów, będących produktami symulowanej proteolizy trypsyną, które zidentyfikowano w próbkach (po analizie RP-LC-MS/MS). Stopień pokrycia ich sekwencji

z sekwencjami epitopów obejmował zakres od 18 do 100% (Załącznik 5). Epitopy te pochodzą głównie z tropomiozyn skorupiaków (np. krewetki *Litopenaeus vannamei*), ale także owadów (np. karaczana prusaka, *Blattella germanica*). W tabeli 6 przedstawiono epitopy, których fragmentem jest peptyd IQLLEEDLER (produkt symulowanej proteolizy sekwencji aminokwasowych tropomiozyn zarówno skorupiaków, jak i mięczaków):

Tabela 6. Epitopy alergennych tropomiozyn zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej sekwencję peptydu IQLLEEDLER (pogrubiona czcionka) oraz ich stopień pokrycia.

L.p.	**Nr w bazie IEDB**[1]	**Sekwencja epitopu**	**Źródło tropomiozyny**	**Nazwa zwyczajowa**	$\mathbf{n_c}$	$\mathbf{n_e}$	$\mathbf{n_p}$	**SCC**[2] **[%]**
1.	54225	R**IQLLEEDLER**SEER	*Litopenaeus vannamei*	Krewetka biała	10	15	10	66,67
2.	116775	LNRR**IQLLEEDLER**S	*Litopenaeus vannamei*	Krewetka biała	10	15	10	66,67
3.	54224	R**IQLLEEDLER**	*Penaeus aztecus*	Krewetka brązowa	10	11	10	90,91
4.	153863	NRR**IQLLEEDLER**SEER	*Penaeus monodon*	Krewetka tygrysia	10	17	10	58,82
5.	510630	AALNRR**IQLLEEDLER**SEER	*Metapenaeus ensis*	Krewetka błotna	10	20	10	50,00
6.	956737	VAALNRR**IQLLEEDLER**SEER	*Palaemon modestus*	Krewetka syberyjska	10	21	10	47,62

[1]Immune Epitope Database [Vita i in. 2019], https://www.iedb.org/, dostęp: sierpień 2020.
[2]obliczono według równania (4.4)

Parametr SCC obliczono również dla peptydów, które zostały zidentyfikowane w hydrolizatach białek, wyekstrahowanych z próbek surowców poddanych gotowaniu i produktów gotowych do spożycia, ale nie odpowiadały produktom symulowanej proteolizy tropomiozyn trypsyną (Załącznik 6), ponieważ zawierały niezhydrolizowane wiązania peptydowe, które teoretycznie są podatne na hydrolizę trypsyną. Większość z nich zawierała w swojej sekwencji całe sekwencje epitopów lub ich część. W tabeli 7 przedstawiono przykładowy peptyd RMQQLENDLDQVQESLLK, który zidentyfikowano w trzech próbkach: 2b, 3b (próbki z surowca ugotowanego) oraz 6 (produkt gotowy do spożycia), zawierający w swojej sekwencji sekwencje trzech epitopów tropomiozyn krewetek:

Tabela 7. Epitopy alergennych tropomiozyn obecne w sekwencji peptydu RMQQLENDLDQVQESLLK oraz ich stopień pokrycia.

L.p.	Nr w bazie IEDB[1]	Sekwencja epitopu	Źródło tropomiozyny	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC [%]
1.	54945	RMQQLENDLDQVQES	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	18	83,33
2.	116814	QLENDLDQVQESLLK	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	18	83,33
3.	42400	MQQLENDLDQVQESLLK	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	17	17	18	94,44

[1]Immune Epitope Database [Vita i in. 2019], https://www.iedb.org/, dostęp: sierpień 2020.
[2]obliczono według równania (4.4)

W próbkach 1b 2b i 3b zidentyfikowano peptyd IVELEEELRVVGNNLK, w którego sekwencji obecny jest fragment VELEEELRVVGNNLK, będący epitopem tropomiozyny roztoczy kurzu domowego (*Dermatophagoides farinae*).

W próbkach otrzymanych po hydrolizie białek wyekstrahowanych z produktów, zawierających owoce morza o nieznanych sekwencjach tropomiozyn (1b 2b, 4b) i produktu zawierającego nieznany gatunek krewetki (5) zidentyfikowano peptydy, zawierające sekwencje epitopów alergennych skorupiaków, m.in. krewetek *Metapenaeus ensis* i *Penaeus aztecus*, a w próbce 4b (omułek chilijski) także peptydy, które zawierają fragmenty pokrywające się z epitopem mięczaka *Crassostrea gigas* (ostrzyżycy japońskiej).

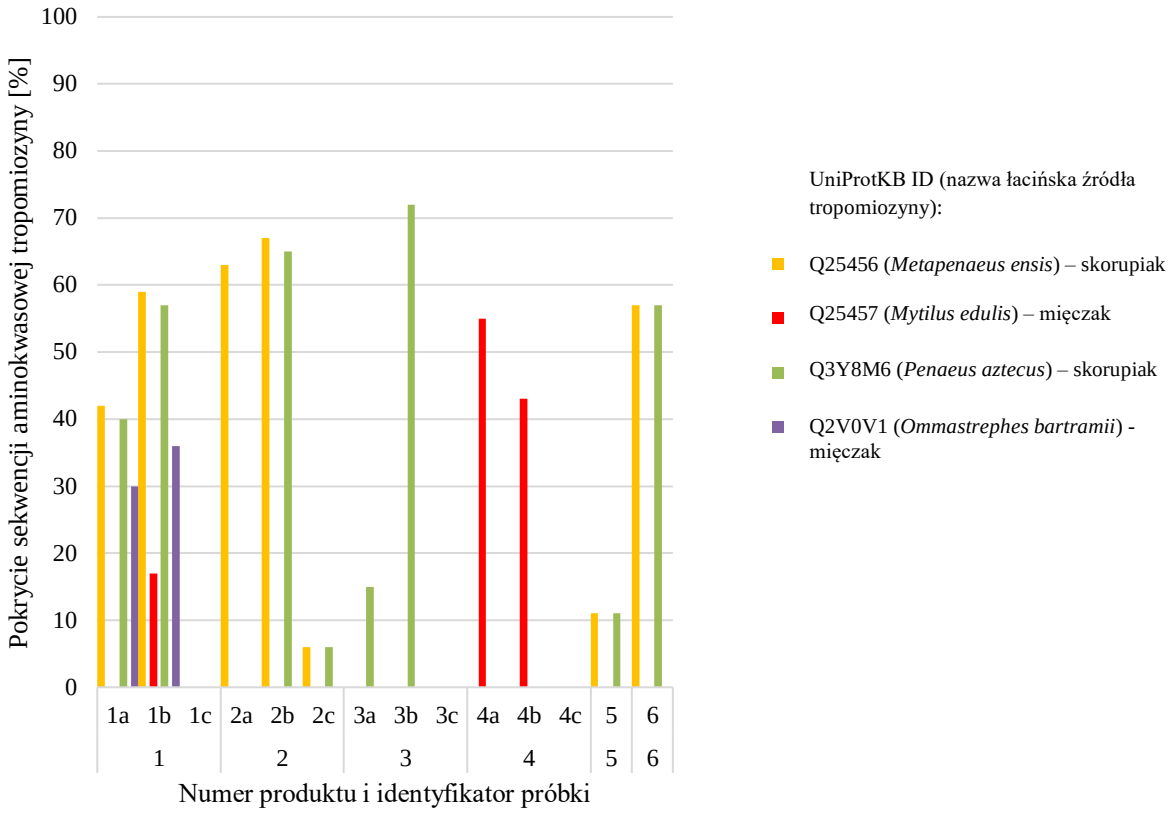
- **Określenie stopnia pokrycia sekwencji aminokwasowych badanych tropomiozyn z tropomiozynami znanych alergenów**

Za pomocą oprogramowania PEAKS określono stopień pokrycia sekwencji aminokwasowych tropomiozyn obecnych w próbce z sekwencjami aminokwasowymi tropomiozyn dostępnych w bazie UniProtKB (Załącznik 8). Oprogramowanie najczęściej identyfikowało analizowane peptydy jako fragmenty tropomiozyn krewetki błotnej (*Metapenaeus ensis*), krewetki brązowej (*Penaeus aztecus*), krewetki tygrysiej (*Penaeus monodon)* omułka jadalnego (*Mytilus edulis*) i latającej kałamarnicy neonowej (*Ommastrephes bartramii*). Na rysunku 25 przedstawiono położenie peptydów zidentyfikowanych metodą RP-LC-MS/MS w próbce 2 (krewetka kidi, *P. stylifera*) w sekwencji tropomiozyny krewetki błotnej *Metapenaeus ensis* (UniProtKB ID: Q25456), która jest znanym alergenem. Sekwencja tropomiozyny *P. stylifera* nie została jak dotąd opublikowana:



Rys. 25. Położenie peptydów zidentyfikowanych metodą RP-LC-MS/MS w próbce 2 (krewetka kidi, *P. stylifera*) w sekwencji tropomiozyny krewetki błotnej *Metapenaeus ensis* (UniProtKB ID: Q25456); a – próbka mrożona; b – próbka ugotowana, c – próbka usmażona. Na niebiesko zostały podkreślone peptydy zidentyfikowane w całości, na szaro - fragmenty peptydów zsekwencjonowanych *de novo*, dla których wartość pewności masy (ang. mass confidence) wynosiła ≥90%. Fragmenty sekwencji tropomiozyny *M. ensis*, które pokrywają się ze zidentyfikowanymi peptydami zostały zacieniowane na szaro. Rysunek wygenerowano w programie PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012].

Schemat obrazujący procentowe pokrycie sekwencji tropomiozyn z analizowanych próbek z tropomiozynami wybranych gatunków owoców morza przedstawiono na rysunku 26:



Rys. 26. Pokrycie sekwencji aminokwasowych tropomiozyn z analizowanych próbek z sekwencjami niektórych alergennych tropomiozyn. Próbki a, b i c oznaczają odpowiednio próbki uzyskane z produktu mrożonego, ugotowanego i usmażonego. Próbki 5 i 6 pochodzą z produktów gotowych do spożycia. Nazwy wykorzystanych produktów, wraz z ich identyfikatorami, przedstawiono w tabeli 3.

Jak wynika z powyższego wykresu, na drodze analizy RP-LC-MS/MS hydrolizatów białek z produktów z owoców morza udało się uzyskać, w niektórych przypadkach, pokrycie sekwencji na poziomie znacznie wyższym niż 50%. Wa i Cerny [2006], stosując zoptymalizowaną metodę analizy oczyszczonej ludzkiej albuminy serum techniką MALDI-TOF-MS uzyskali pokrycie sekwencji na poziomie 97,4%. Zoptymalizowano procedurę przygotowania próbki (zastosowanie do trawienia kolejno enzymów: trypsyny, endoproteinaz Lys-C i Glu-C, oczyszczanie peptydów) i warunki prowadzenia eksperymentu (optymalizacja składu matrycy). Matsuda i in. [2016], stosując zmodyfikowaną procedurę przygotowania próbki z publikacji Wa i Cerny [2006] (trawienie białka trzema enzymami na raz zamiast każdym osobno), a następnie analizując otrzymane hydrolizaty techniką nESI-Q-TOF-MS uzyskali pokrycie sekwencji ludzkiej albuminy serum na poziomie 98,8-99,7%. Fornal i Montowska [2019], przeprowadzając analizę białek mięśniowych drobiu (gotowana pierś z kurczaka, surowe piersi z kaczki i gęsi) techniką LC-ESI-Q-TOF-MS, uzyskały pokrycie sekwencji różnych białek (m.in. troponiny I, ATPazy, kinazy pirogronianowej) pomiędzy 30 a 80%. Powyższe przykłady dowodzą, że wysokie pokrycie sekwencji można uzyskać poddając analizie oczyszczone białko. Procentowe pokrycie sekwencji tropomiozyny z próbek 2a oraz 2b, zawierających hydrolizaty białek z krewetki o nieznanej sekwencji tropomiozyny

(*P. stylifera*), wynosiło odpowiednio aż 63 i 67% (z sekwencją alergennej tropomiozyny *M. ensis*). Łącznie, peptydy zidentyfikowane w próbkach przed i po ugotowaniu tego produktu pokrywają 76% sekwencji aminokwasowej tropomiozyny *M. ensis*. Program PEAKS dopasował peptydy z tropomiozyny z produktu 3 do sekwencji aminokwasowej tropomiozyny krewetki *P. aztecus* (przed i po ugotowaniu odpowiednio w 15 i 72%). Produkt 3 to krewetka *L. vannamei*, której sekwencja tropomiozyny jest znana i identyczna z sekwencją tropomiozyny *P. aztecus*. W przypadku tropomiozyn krewetek (próbki 1b 2b, 3b, 4b), wyższy procent pokrycia sekwencji uzyskano po ugotowaniu surowca – wynika to z obecności dłuższych peptydów w hydrolizacie. W odniesieniu do tropomiozyn mięczaków rezultaty nie były jednoznaczne – w przypadku kałamarnicy (*O. bartramii*) można zaobserwować wzrost stopnia pokrycia sekwencji w wyniku ugotowania surowca, zaś w przypadku tropomiozyny omułka –spadek możliwości zsekwencjonowania białka w ugotowanym surowcu. Próbka 1a zawierała surowe owoce morza (w tym omułka *M. chilensis)*, którego peptydów nie wykryto w próbce przed ugotowaniem, a dopiero w próbce po ugotowaniu produktu (1b). Próbka 4a natomiast zawierała surowiec już wstępnie ugotowany (nie podano na opakowaniu w jakich warunkach surowiec został poddany wstępnej obróbce przed zamrożeniem). Ponowne ugotowanie omułków spowodowało, że mniej peptydów zostało zidentyfikowanych po hydrolizie trypsyną białka z tego produktu. Przyczyną tego zjawiska może być zmiana w konsystencji produktów z mięczaków (małży) po ugotowaniu. Małże stają się bardziej sprężyste z powodu denaturacji kolagenu, a co za tym idzie – ich rozdrobnienie i wyekstrahowanie białka staje się trudniejsze [Zhu i in. 2011]. W toku analiz, przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, nie zidentyfikowano żadnych modyfikacji aminokwasów w próbkach zawierających gotowanego omułka (1a, 1b i 4b), co świadczy o braku wpływu gotowania na zwiększenie liczby zmodyfikowanych aminokwasów w tropomiozynie omułka. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono także, że wstępne zblanszowanie surowca nie wpływa znacząco na możliwość wykrycia peptydów w hydrolizatach białek z produktów po rozmrożeniu. Smażenie, ze względu na zmiany zachodzące w strukturze białka podczas tego procesu, znacznie obniża możliwość pokrycia sekwencji aminokwasowej przy pomocy algorytmów komputerowych, które opierają się na porównywaniu uzyskanych wyników sekwencjonowania do sekwencji białek dostępnych w bazach danych. W tym przypadku może okazać się konieczne wykorzystanie sekwencjonowania *de novo* oraz uwzględnienie modyfikacji, takich jak deamidacja.

W wyniku przeprowadzonych badań dowiedziono jednak, że gdy interpretacja otrzymanych widm opiera się na sekwencjonowaniu *de novo* oraz gdy w sekwencjach peptydów obecnych jest wiele zmodyfikowanych aminokwasów, skutkuje to większą liczbą

dopasowań fałszywie pozytywnych. Taka sytuacja miała miejsce w przypadku próbek hydrolizatów białek z produktów usmażonych (Załącznik 8). Peptydy w próbce hydrolizatu z próbki 4c (smażone omułki) zostały dopasowane do sekwencji tropomiozyny *Monopterus albus* (węgorza ryżowego) i *Danio rerio* (danio pręgowanego), a peptydy z próbki 3c (ugotowane krewetki białe) – do tropomiozyny jednego z gatunków roztoczy (*Dermatophagoides pteronyssinus).*

5.2.4. Wybór uniwersalnego markera peptydowego tropomiozyn

Na podstawie analizy *in silico*, za peptydy wspólne dla tropomiozyn skorupiaków można uznać: VVGNNLK, SLEVSEEK, LNTATTK, LEDELVNEK, LAMVEADLER, LAEASQAADESER. Są one obecne w 96% analizowanych sekwencji tropomiozyn skorupiaków (Załącznik 2, Rys. Z2). Za peptydy typowe dla mięczaków zaś można uznać EDSYEETIR (100% sekwencji) i LAITEVDLER (96%) (Załącznik 2, Rys. Z3). Peptydy LAMVEADLER (w przypadku skorupiaków) i LAITEVDLER (w przypadku mięczaków) występują w tym samym miejscu sekwencji aminokwasowej tropomiozyny, ale różnią się od siebie kilkoma aminokwasami. Można je uznać za peptydy różnicujące tropomiozyny mięczaków i skorupiaków.

Peptydem wspólnym tropomiozyn mięczaków i skorupiaków jest peptyd IQLLEEDLER, który występuje w 63% wszystkich analizowanych sekwencji tropomiozyn (Załącznik 2, Rys. I), w tym w 93% sekwencji tropomiozyn skorupiaków (Załącznik 2, Rys. II) i 26% sekwencji tropomiozyn mięczaków (Załącznik 2, Rys. III). Wykryto jego obecność w próbkach 1a, 1b 2a, 5 i 6, a w 2b i 3b zidentyfikowano dłuższe peptydy, których fragmentem jest ten peptyd (Załącznik 4). Nie wykryto go w próbkach produktu nr 4, zawierającego hydrolizaty białek omułka chilijskiego, co jest uzasadnione, jeśli weźmie się pod uwagę, że w obrębie mięczaków peptyd ten występuje głównie w sekwencjach tropomiozyn ślimaków i głowonogów (Załącznik 7, Rys. Z22). Nie powstaje on również na drodze symulowanej proteolizy trypsyną sekwencji tropomiozyny innego omułka (*Mytilus edulis*) (Załącznik 1, sekwencja nr 5). Nie stwierdzono jego obecności również w próbkach hydrolizatów białek z produktów poddanych smażeniu (1c 2c, 3c). Peptyd ten jest fragmentem 6 epitopów krewetek, opisanych w bazie IEDB (Załącznik 5). Niektóre z sekwencji tych epitopów występują także w tropomiozynach mięczaków (głównie głowonogów) i przypuszcza się, że między innymi mogą być odpowiedzialne za alergię krzyżową na tropomiozyny skorupiaków i mięczaków [Motoyama i in. 2006, Nugraha i in. 2019].

Sekwencje peptydów wspólnych dla różnych gatunków skorupiaków to LAEASQAADESER i LAMVEADLER (występują jako produkty symulowanej proteolizy trypsyną 96% analizowanych sekwencji tropomiozyn skorupiaków) i IVELEEELR (93%)

(Załącznik 2, Rys. Z2). Z drzew filogenetycznych, przedstawiających możliwość uwalniania tych peptydów z sekwencji białek z różnych rodzin (po trawieniu trypsyną) wynika, że występują one głównie w tropomiozynach sześcionogów (*Hexapoda*) (Załącznik 7, Rys. Z23, Z27 i Z24). Do tego taksonu należą owady. Leni i in. [2020] wykazali obecność tych peptydów w hydrolizatach białek z czarnej muchy (*Hermetia illucens*) i pleśniakowca lśniącego (*Alphitobius diaperinus*) – owadów, które mogą wywoływać alergię krzyżową u osób uczulonych na skorupiaki.

Peptyd LAEASQAADESER zidentyfikowano w próbkach 1a, 1b 2a, 3b, 5 i 6, a w 2b zidentyfikowano dłuższy peptyd (z niezhydrolizowanym wiązaniem), zawierający go w swojej sekwencji aminokwasowej. Peptyd ten stanowi fragment epitopu karaczana prusaka (owada) (IEDB ID: 554179) (Załącznik 5).

Obecność peptydu LAMVEADLER stwierdzono w próbkach 1a 2a i 6, a w 1b 2b, 3b peptyd ten stanowił fragment dłuższych peptydów (z niezhydrolizowanymi wiązaniami) (Załącznik 6). Jest on fragmentem epitopów krewetki białej (IEDB ID: 34878; 116676) oraz krewetki tygrysiej (IEDB ID: 241321; 241322). Zawiera również w swojej sekwencji pełną sekwencję jednego z epitopów krewetki białej (IEDB ID: 956508) (Załącznik 5).

Peptyd IVELEEELR wykryto w próbkach 1a, 1b 2a 2b, 3a i 6, a w 3b peptyd ten stanowił fragment dłuższego peptydu (z niezhydrolizowanymi wiązaniami) (Załącznik 6). Jest on w całości epitopem krewetki syberyjskiej (IEDB ID: 956601) oraz fragmentem epitopów krewetki brązowej (IEDB ID: 14183) i krewetki białej (IEDB ID: 116755) (Załącznik 5).

Nie stwierdzono obecności żadnego z tych peptydów w próbkach hydrolizatu białek z produktu nr 4, zawierającego omułka (mięczaka) i próbkach hydrolizatów białek z produktów po usmażeniu (1c 2c, 3c).

Peptyd o sekwencji LAITEVDLER jest wspólny dla tropomiozyn mięczaków, zarówno głowonogów (*Cephalophoda*), jak i ślimaków (*Gastropoda*) oraz małży (*Bivalvia*). Stwierdzono jego obecność w próbkach 1a i 4a, a w 1b jest on fragmentem dłuższego peptydu (zawierającego niezhydrolizowane wiązania) (Załącznik 6).

Początkowo zaplanowano wyszukiwanie markerów wśród peptydów o długości od 7 do 15 aminokwasów, w oparciu o wytyczne z publikacji Bucholskiej i Minkiewicza [2016]. Podczas dalszych eksperymentów wykazano jednak, że dłuższe peptydy, takie jak SITDELDQTFSELSGY czy MQQLENDLDQVQESLLK (będące produktami hydrolizy tropomiozyn trypsyną) również są możliwe do identyfikacji, zarówno w hydrolizatach z mrożonych, jak i gotowanych owoców morza. W przypadku drugiego z peptydów – został on wykryty także w smażonym surowcu (krewetka kidi – *P. stylifera*). Ponadto, peptydy te zawierają w całości sekwencje epitopów (Załącznik 5). Wykrycie dłuższych peptydów było

możliwe ze względu na wykorzystanie w badaniach, opisanych w niniejszej pracy, nowszego sprzętu (w porównaniu z aparaturą zastosowaną przez wspomnianych wcześniej badaczy) o szerszym zakresie mas możliwych do wykrycia. W badaniach Bucholskiej i Minkiewicza [2016] zastosowano spektrometr masowy z pułapką jonową, o niskiej rozdzielczości.

Peptyd MQQLENDLDQVQESLLK jest epitopem liniowym (IEDB ID: 42400), który został wykryty po raz pierwszy w krewetce *Penaeus indicus* i opisany jako jeden z najważniejszych epitopów wiążących IgE w tropomiozynie [Shanti i in. 1993]. Nie jest jednak zbyt rozpowszechniony w sekwencjach tropomiozyn – obecny jest tylko w 17, które są dostępne w UniProtKB. W rzeczywistości jest ich więcej, ponieważ sekwencja *P. indicus* nie została jak dotąd opisana, a w wyniku analizy LC-MS/MS zidentyfikowano ten peptyd w hydrolizatach białek z *P. stylifera* (produkt 2) oraz mieszanki owoców morza (produkt 1), która zawierała skorupiaki o nieznanych sekwencjach tropomiozyn.

Ze względu na to, że wśród jadalnych mięczaków wyróżnia się trzy główne gromady, które są zróżnicowane także pod kątem sekwencji aminokwasowych tropomiozyn, można wybrać peptydy, które są wspólne dla wielu gatunków mięczaków w obrębie jednej gromady. W próbkach hydrolizatów białek z produktu nr 1 (sałatka z surowych owoców morza), zawierających m.in. hydrolizaty tropomiozyn głowonogów, zidentyfikowano peptyd VAECESEIQGLNR, obecny tylko w tropomiozynach mięczaków z gromady *Cephalophoda* (Załącznik 7, Rys. Z28) podgromady płaszczoobrosłych - *Coleoidea* (mątwy, kałamarnice). Nie jest on jednak szeroko rozpowszechniony. Powstał jako produkt symulowanej proteolizy trypsyną 13% analizowanych sekwencji tropomiozyn mięczaków (Załącznik 2, Rys. Z3) i występuje tylko w 5 sekwencjach tropomiozyn z bazy UniProtKB, co stanowi 0,07% tropomiozyn ogółem według bazy InterPro i 0,11% według Pfam. Taki stan wiedzy może wynikać z tego, że mięczaki są jak dotąd najmniej scharakteryzowaną grupą organizmów zaliczanych do owoców morza [Ruethers i in. 2018]. Próbki 1a, 1b i 1c, w których wykryto obecność tego peptydu, zawierały głowonogi o nieznanych sekwencjach tropomiozyn, a więc nie uwzględnia się ich przy wyszukiwaniu w bazie UniProtKB. Peptyd VAECESEIQGLNR może być więc istotny przy wykrywaniu obecności białek głowonogów w żywności przetworzonej, ze względu na jego stabilność w procesie obróbki cieplnej.

Peptydy QIAEHEQEIQSLTR, VIDLEEQLTVVGANIK, AISDELDATFAELAGY, SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK są wspólne dla tropomiozyn mięczaków gromady *Bivalvia* (małże). Peptydy QIAEHEQEIQSLTR i SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK zidentyfikowano w próbkach 4a i 4b, VIDLEEQLTVVGANIK i AISDELDATFAELAGY w 1b, 4a i 4b. Nie stwierdzono obecności żadnego z tych peptydów w próbkach z produktów po usmażeniu (1c, 3c). Peptydy QIAEHEQEIQSLTR i SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK otrzymano na drodze

symulowanej proteolizy trypsyną tylko jednej sekwencji tropomiozyny – omułka jadalnego (*M. edulis*), zaś VIDLEEQLTVVGANIK i AISDELDATFAELAGY po symulowanej proteolizie sekwencji tropomiozyn omułka jadalnego (*M. edulis*) i omułka zielonego (*P. viridis* (Załącznik 1, sekwencje nr 5 i 36). Nie są więc one szeroko rozpowszechnione wśród znanych sekwencji tropomiozyn mięczaków, jednak, podobnie jak w przypadku tropomiozyn głowonogów, należy wziąć pod uwagę niewystarczające scharakteryzowanie tropomiozyn mięczaków.

Nagai i in. [2015] zbadali sześć gatunków krewetek (*Metapenaeopsis barbata, Pasiphaea japonica, Penaeus japonicus, Metapenaeus joyneri, Litopenaeus vannamei, Penaeus monodon*) i produktów na bazie krewetek, jeden gatunek ośmiornicy (*Octopus vulgaris*) i kałamarnicy (*Todarodes pacificus*) oraz kryla (*Euphausia pacifica*) i kraba śnieżnego (*Chionoecetes opilio*) za pomocą techniki chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (zastosowano spektrometr masowy z pułapką jonową i źródłem jonów turbo-ion spray). Jako peptydy wspólne dla wielu gatunków skorupiaków badacze wskazali: FLAEEADR, IQLLEEDLER, LAEASQAADESER, ADTLEQQNK, SLSDEER i IVELEEELR. Najintensywniejszy sygnał pochodził od peptydu FLAEEADR. Jako peptyd różnicujący tropomiozynę kryla spośród tropomiozyn pozostałych skorupiaków wskazano ADTLEQQNK – nie ujawnił się na widmie z analizy tropomiozyny kryla. Na widmach chromatograficznych z analizy tropomiozyn mięczaków (ośmiornicy i kałamarnicy) pojawił się tylko pik pochodzący od peptydu IQLLEEDLER, co sugeruje, że jest on peptydem wspólnym dla tropomiozyn, zarówno skorupiaków jak i mięczaków, co potwierdzają przedstawione w niniejszej pracy wyniki analizy *in silico* oraz LC-MS/MS.

Wang i in. (2021) jako peptydy służące do wykrywania tropomiozyn skorupiaków wytypowali IQLLEEDLER, LAEASQAADESER i IVELEEELR (ostatni jako peptyd do analizy ilościowej). Peptydy zostały wybrane na podstawie analizy bioinformatycznej sekwencji aminokwasowych 35 tropomiozyn skorupiaków, poddając symulowanej proteolizie trypsyną *in silico* najbardziej zakonserwowane fragmenty sekwencji tropomiozyn (od 80 do 215 reszty aminokwasowej), a następnie tylko te peptydy były identyfikowane w hydrolizacie z oczyszczonej tropomiozyny krewetki białej (*L. vannamei*). Jako kryteria przyjęto: długość peptydu od 8 do 25 aminokwasów, brak argininy oraz lizyny wewnątrz sekwencji oraz brak modyfikacji potranslacyjnych. Takie podejście doprowadziło do uzyskania wyników zbliżonych do przedstawionych w poniższej pracy, jednak spowodowało pominięcie niektórych peptydów (np. LAMVEADLER), które mogłyby mieć zastosowanie przy wykrywaniu skorupiaków w produktach spożywczych (są uniwersalne dla sekwencji tropomiozyn). Analiza bioinformatyczna wskazuje kierunek dalszych badań [Dziuba i in.

2013], ale nie jest jedynym wyznacznikiem końcowych rezultatów. Zastosowanie trybu zbierania danych DDA podczas analizy LC-MS (bez wskazywania peptydów do fragmentacji), w połączeniu ze wstępną analizą sekwencji tropomiozyn *in silico* pozwoliło uzyskać pełniejszy obraz.

W tabeli 9 podsumowano wyniki analizy peptydów i określono ich cechy jako potencjalnych uniwersalnych markerów tropomiozyn:

Tabela 8. Podsumowanie analizy bioinformatycznej i laboratoryjnej peptydów z tropomiozyn, wytypowanych jako uniwersalne markery peptydowe alergennych tropomiozyn.

L.p.	Sekwencja peptydu	Analiza bioinformatyczna					Analiza laboratoryjna			Ocena przydatności jako marker tropomiozyn
		Obecność w analizowanych sekwencjach skorupiaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach mięczaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach ogółem [%]	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Interpro	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Pfam	Próbki, w których zidentyfikowano peptyd	Próbki, w których zidentyfikowano fragment zawierający peptyd	Epitop lub fragment epitopu IgE	
1.	FLAEEADR	89,29	0	49,02	0,91	1,46	1a, 1b 2a 2b, 3b, 6	-	tak	Uniwersalny dla skorupiaków, odporny na gotowanie
2.	WIAEDADR	0	21,74	9,80	0,13	0,21	1a, 1b	-	nie	Uniwersalny dla głowonogów z podgromady płaszczoobrosłych - *Coleoidea* (mątwy, kałamarnice, ośmiornice)
3.	MDALENQLK	92,86	0	50,98	4,77	7,66	1a, 1b 2a, 6	2b, 3b	tak	Uniwersalny dla skorupiaków, odporny na gotowanie
4.	ADTLEQQNK	78,57	0	43,14	0,63	1,01	1a 2a, 6	-	tak	Niestabilny po obróbce termicznej
5.	IVELEEELR	92,86	0	50,98	12,24	19,64	1a, 1b 2a 2b, 3a, 6	3b	tak	Uniwersalny dla skorupiaków, odporny na gotowanie

L.p.	Sekwencja peptydu	Analiza bioinformatyczna					Analiza laboratoryjna			Ocena przydatności jako marker tropomiozyn
		Obecność w analizowanych sekwencjach skorupiaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach mięczaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach ogółem [%]	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Interpro	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Pfam	Próbki, w których zidentyfikowano peptyd	Próbki, w których zidentyfikowano fragment zawierający peptyd	Epitop lub fragment epitopu IgE	
6.	IQLLEEDLER	92,86	26,09	62,75	9,40	15,09	1a, 1b 2a, 5, 6	2b, 3b	tak	Uniwersalny dla skorupiaków i mięczaków (głównie ślimaków i głowonogów), odporny na gotowanie
7.	LAMVEADLER	96,43	0	52,94	8,22	13,20	1a 2a, 6	1b 2b, 3b	tak	Uniwersalny dla skorupiaków, odporny na gotowanie
8.	LAITEVDLER	3,57	95,65	45,10	1,55	2,48	1a, 4a	1b	tak	Uniwersalny dla mięczaków z różnych gromad, częściowo odporny na gotowanie
9.	LAEASQAADESER	96,43	0	52,94	2,84	4,56	1a, 1b 2a, 3b, 5, 6	2b	tak	Uniwersalny dla skorupiaków, odporny na gotowane
10.	ALSNAEGEVAALNR	46,43	0	25,49	0,36	0,58	1a, 1b 2a, 3b, 6	2b	tak	Uniwersalny dla skorupiaków (głównie z rzędu dziesięcionogów – *Decapoda*), odporny na gotowane

L.p.	Sekwencja peptydu	Analiza bioinformatyczna					Analiza laboratoryjna			Ocena przydatności jako marker tropomiozyn
		Obecność w analizowanych sekwencjach skorupiaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach mięczaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach ogółem [%]	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Interpro	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Pfam	Próbki, w których zidentyfikowano peptyd	Próbki, w których zidentyfikowano fragment zawierający peptyd	Epitop lub fragment epitopu IgE	
11.	QIAEHEQEIQSLTR	0	4,35	1,96	0,03	0,04	4a, 4b	-	nie	Specyficzny dla małży z gatunku *Mytilus* (omułki), odporny na gotowanie
12.	VIDLEEQLTVVGANIK	0	8,70	3,92	0,04	0,06	1b, 4a, 4b	-	nie	Specyficzny dla małży z gatunku *Mytilus* (omułki) i *Perna*, odporny na gotowanie
13.	AISDELDATFAELAGY	0	8,70	3,92	0,04	0,06	1b, 4a, 4b	-	nie	Uniwersalny dla małży z gatunku *Mytilus* (omułki) i *Perna*, odporny na gotowanie
14.	SITDELDQTFSELSGY	67,86	0	37,25	0,40	0,64	1a, 1b 2a 2b, 3a, 3b, 6	-	tak	Uniwersalny dla skorupiaków (głównie z rzędu dziesięcionogów – *Decapoda*), odporny na gotowane

L.p.	Sekwencja peptydu	Analiza bioinformatyczna					Analiza laboratoryjna			Ocena przydatności jako marker tropomiozyn
		Obecność w analizowanych sekwencjach skorupiaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach mięczaków [%]	Obecność w analizowanych sekwencjach ogółem [%]	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Interpro	Udział procentowy w ogólnej liczbie tropomiozyn w Pfam	Próbki, w których zidentyfikowano peptyd	Próbki, w których zidentyfikowano fragment zawierający peptyd	Epitop lub fragment epitopu IgE	
15.	MQQLENDLDQVQESLLK	28,57	0	15,69	0,23	0,36	1a, 1b 2a 2b 2c, 3a, 3b, 6	-	tak	Uniwersalny dla skorupiaków (głównie z rzędu dziesięcionogów – *Decapoda*), odporny na gotowane i częściowo na smażenie
16.	SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK	0	4,35	1,96	0,15	0,24	4a, 4b	-	nie	Specyficzny dla małży z gatunku *Mytilus* (omułki), odporny na gotowanie
17.	VAECESEIQGLNR	0	13,04	5,88	0,07	0,11	1a, 1b, 1c,	-	nie	Uniwersalny dla głowonogów z podgromady płaszczoobrosłych - *Coleoidea* (mątwy, kałamarnice), odporny na gotowanie i smażenie

6. DYSKUSJA WYNIKÓW

Metody proteomiczne oparte na markerach peptydowych stanowią obiecującą alternatywę dla powszechnie stosowanych metod oceny autentyczności żywności, takich jak analiza DNA czy testy immunologiczne [Ortea i in. 2016]. Czynnikiem przyspieszającym rozwój badań proteomicznych z wykorzystaniem technik bioinformatycznych i spektrometrii mas jest wzrost tempa sekwencjonowania i interpretacji genomów. Szybki rozwój baz danych umożliwia zidentyfikowanie znacznej liczby białek o nieznanych sekwencjach na podstawie już opisanych sekwencji – szczególnie, gdy należą one do rodzin białek wysoce konserwatywnych [Shevchenko i in. 2009]. Z drugiej strony coraz trudniej jest zastosować tradycyjną strategię identyfikacji białek opartą na wyszukiwaniu peptydów unikalnych dla danej sekwencji białka. Taka strategia jest rekomendowana przy identyfikacji alergenów [Johnson i in. 2011]. Wyszukiwanie markerów na podstawie powyższej rekomendacji wymaga znajomości sekwencji danego białka i wyboru peptydów unikalnych dla danej sekwencji aminokwasowej. W publikacjach naukowych jako jedną z cech markera peptydowego wymienia się jego „specyficzność" [Johnson i in. 2011]. Istnienie białek homologicznych, o wysokim podobieństwie sekwencji (w tym nieznanych) jest wymieniane jako utrudnienie w spełnieniu powyższych rekomendacji [Walker i in. 2016]. W przypadku rodzin białek wysoce konserwatywnych (o dużym podobieństwie sekwencji aminokwasowych) ten sam peptyd może występować w białkach różnych gatunków organizmów żywych. Przykładem mogą być markery białek mleka krowiego występujące także w sekwencjach białek mleka bawołu (*Bubalus bubalis*) [Minkiewicz i in. 2015b], czy peptydy będące markerami miozyn śledzia (*Clupea harengus*) i karpia (*Cyprinus carpio*) [Bucholska i Minkiewicz 2016]. Obecnie wykorzystanie jako markerów peptydów występujących w więcej niż jednej sekwencji jest uznawane za dopuszczalne w przypadku alergenów o wysoce podobnych sekwencjach aminokwasowych [Chen i in. 2017; Fu i in. 2019; Wang i in. 2021; Ho i in. 2021].

Tropomiozyny bezkręgowców są przykładem rodziny białek zawierających liczne wspólne fragmenty, między innymi epitopy [Minkiewicz i in. 2015a]. Chen i in. [2017], Wang i in. [2021] oraz Ho i in. [2021] w swoich badaniach za cel postawili sobie znalezienie peptydów, które mogłyby być stosowane do wykrywania tropomiozyn skorupiaków, z eliminacją ryzyka otrzymania wyniku fałszywie pozytywnego (peptyd nieobecny w sekwencjach tropomiozyn mięczaków i owadów). We wspomnianych publikacjach peptydy takie są nazywane „sygnaturowymi" lub „specyficznymi" i występują w więcej niż jednej sekwencji tropomiozyny skorupiaka.

Jeżeli jest wiadome, jaki surowiec znajduje się w produkcie (np. konkretny gatunek krewetki) podejście wykorzystujące peptydy specyficzne dla sekwencji białek krewetek jest w takim przypadku uzasadnione. Jeśli jednak w produkcie znajduje się krewetka nieznanego gatunku lub o nieznanej sekwencji tropomiozyny, która nie zawiera peptydu wybranego jako „specyficzny" – próba wykrycia obecności białka w produkcie może skutkować wynikiem fałszywie ujemnym. W takim przypadku lepiej jest zastosować peptyd, który jest obecny w jak największej liczbie opisanych w literaturze sekwencji tropomiozyn skorupiaków – stwarza to większe prawdopodobieństwo, że obecność białek krewetki zostanie w produkcie wykryta. Takie podejście, proponowane w niniejszej pracy, można uznać za odwrócenie tradycyjnego paradygmatu dotyczącego wykrywania alergenów, zakładającego wyszukiwanie peptydów unikalnych dla danej sekwencji aminokwasowej białka.

Jeśli wybrany marker jest uniwersalny dla sekwencji tropomiozyn wielu gatunków owoców morza, umożliwia także wykrycie w produkcie spożywczym białek, które nie zostały opisane w literaturze, a ich sekwencja nie jest znana. Ponadto, jeśli marker jest uniwersalny dla wielu białek z rodziny tropomiozyn (nie tylko z mięczaków lub skorupiaków), może być zastosowany do wykrywania potencjalnych alergenów w żywności zawierającej składniki nieobjęte obowiązkiem znakowania (np. owady). Ważną cechą takiego markera peptydowego jest jego związek z sekwencją aminokwasową epitopu tropomiozyny. Markery peptydowe, których sekwencje aminokwasowe są jednocześnie fragmentami sekwencji epitopów lub epitopami w całości, mogą być przydatnym narzędziem do wykrywania białek alergennych. Jednakże, podczas gdy sekwencje epitopów alergennych skorupiaków są dostępne w bazach danych, to epitopy alergennych tropomiozyn wielu gatunków mięczaków nie zostały jak dotąd opisane. W bazie IEDB (Immune Epitope Database, dostęp: grudzień 2021) znajdują się sekwencje epitopów liniowych tropomiozyny ślimaka *Turbo cornutus* [Ishikawa i in. 1998a], małża *Crassostrea gigas* [Fang i in. 2019] i przegrzebka *Mimachalmys nobilis* [Bai i in. 2021]. Ishikawa i in. [2001] udowodnili jednak, że sekwencje epitopów tropomiozyny ośmiornicy (*Octopus vulgaris*) częściowo pokrywają się z sekwencjami epitopów tropomiozyn krewetek (*P. indicus* i *P. aztecus*). Dlatego w przypadku tropomiozyn mięczaków, znalezienie markera peptydowego będącego jednocześnie fragmentem lub w całości epitopem jest trudniejsze niż w przypadku tropomiozyn skorupiaków.

Jak wykazano w niniejszej pracy, peptydy powstające po trawieniu trypsyną białek wyekstrahowanych z produktów ugotowanych zawierały często nienaruszone, kompletne sekwencje epitopów liniowych. To wskazuje, że w surowcach poddanych obróbce także można wykrywać białka alergenne, w oparciu o sekwencje epitopów. Jednym z kryteriów uznania białka za alergen jest obecność w jego sekwencji co najmniej dwóch epitopów

wiążących IgE [Bannon 2004]. Powyższe kryterium jest znacznie mniej restrykcyjne niż te uznawane przez IUIS (International Union of Immunological Societies) [Breiteneder, Chapman 2014]. Wg IUIS białko alergenne powinno spełniać szereg kryteriów biochemicznych i immunologicznych. Alergen powinien mieć znaną sekwencję i znane modyfikacje potranslacyjne (jeśli występują) oraz powinien być oczyszczony tak, aby był homogenny lub prawie homogenny. Charakterystyka białka alergennego powinna obejmować oznaczenie podstawowych właściwości fizykochemicznych, takich jak masa cząsteczkowa i punkt izoelektryczny, a także uzyskanie monoklonalnych lub monospecyficznych przeciwciał oddziałujących ze związkiem będącym obiektem badań. Immunologiczne kryteria alergenności obejmują porównanie częstości występowania przeciwciał IgE w surowicy u jak największej liczby pacjentów (zaleca się co najmniej 50), oznaczenie aktywności alergennej (np. testy skórne), zmniejszenie zdolności wiązania przeciwciał IgE po usunięciu alergenu oraz zdolność wiązania IgE przez rekombinowany alergen. Klasyczna strategia analizy alergenów zakłada między innymi użycie wzorców białek spełniających powyższe kryteria [Walker i in. 2016].

W 2001 roku Komisja Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa oraz Światowej Organizacji Zdrowia (FAO/WHO) opublikowała kryteria, według których klasyfikuje się nowo odkryte białka jako alergeny. Muszą one mieć sekwencję identyczną w min. 35% na długości 80 aminokwasów (porównywanie sekwencji za pomocą „przesuwanego okna" o szerokości 80 aminokwasów) z innym znanym białkiem alergennym lub identyczne fragmenty sekwencji o długości 8 aminokwasów (fragmenty teoretycznie będące epitopami liniowymi). Wykazano jednak, że kryteria opracowane ponad dwadzieścia lat temu są nieskuteczne i skutkują często nieprawidłowym zaklasyfikowaniem białek jako alergenne/niealergenne [Herman i in. 2021]. Zastosowanie pierwszego kryterium jest możliwe tylko wtedy, gdy sekwencja nowego białka o nieokreślonej alergenności jest znana. Drugie kryterium zaś mogłoby być zastosowane do białek o nieznanej sekwencji, jednak obecność identycznych peptydów o długości 8 aminokwasów, nie zawsze świadczy o podobieństwie funkcjonalnym białek jako całości i przynależności do tej samej rodziny, a tym samym o podobnej zdolności do wywołania reakcji alergicznej [Ladics i in. 2006, Ladics 2019].

Wykrycie w żywności co najmniej dwóch sekwencji epitopów może więc być wskaźnikiem ostrzegającym o obecności w niej alergennego białka, nawet jeśli taki eksperyment nie spełnia rygorystycznych kryteriów, które opisali Breiteneder i Chapman [2014] oraz Walker i współpracownicy [2016]. Identyfikacja białek obecnych w produkcie z wykorzystaniem markerów peptydowych będących epitopami lub fragmentami epitopów (o długości powyżej 8 aminokwasów) oraz identyfikacja w hydrolizatach z produktów

gotowanych sekwencji peptydów zawierających całe epitopy, pozwoliłaby na wykrycie alergennego białka o nieznanej sekwencji, z większą pewnością co do jego właściwości alergennych, niż w przypadku stosowania kryteriów FAO/WHO. Z drugiej strony, jeśli w produkcie znajdują się białka kilku gatunków bezkręgowców, nie zawsze można udowodnić, że wykryte fragmenty zawierające epitopy pochodzą z tego samego białka. Wynik taki świadczyłby jednak o tym, że badany produkt spożywczy zawiera tropomiozynę skorupiaka, mięczaka lub ogólnie bezkręgowca, która jest potencjalnym alergenem. Przyśpieszyłoby to prace nad weryfikacją bezpieczeństwa nowej żywności.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy świadczą, że peptydy wykrywane w gotowanych produktach były dłuższe, niż peptydy znalezione w hydrolizatach białek z próbek, które nie były poddawane obróbce termicznej, co zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia w hydrolizatach białkowych kompletnych epitopów. Niektóre peptydy identyfikowane w próbkach pochodzących z produktów poddanych gotowaniu zawierały wiązania, które teoretycznie powinny być hydrolizowane przez trypsynę. Otrzymanie w wyniku trawienia trypsyną dłuższych fragmentów polipeptydowych jest szczególnie korzystne w przypadku, gdy celem analizy jest określenie sekwencji aminokwasowej białka lub wyszukiwanie epitopów. Ze względu na fakt, że hydroliza białek z ugotowanego produktu jest niepełna, trudno jest przewidzieć, jakie produkty powstaną w wyniku tej reakcji enzymatycznej. Podczas analizy celowanej (stosowanej najczęściej podczas wykrywania białek w oparciu o markery peptydowe), należy wskazać masę (m/z) jonu prekursorowego peptydu (markera), który ma zostać wykryty w próbce metodami SIM (ang. selected ion monitoring – tryb, w którym rejestrowany jest tylko jon o określonej wartości m/z) lub SRM (ang. selected reaction monitoring – tryb, w którym rejestrowany i fragmentowany jest tylko jon o określonej wartości m/z). Zastosowanie metod niecelowanych (np. trybu akwizycji danych DDA) umożliwia wykrycie produktu hydrolizy białka z ugotowanego produktu oraz może nieść informacje na temat stabilności markera peptydowego.

Ze względu na liczne modyfikacje aminokwasów, zachodzące podczas obróbki termicznej, zwłaszcza smażenia, stosowanie markerów peptydowych do wykrywania białek alergennych w smażonych produktach może być utrudnione i wymaga dalszych badań. W niniejszej pracy zidentyfikowano jednak peptydy, które były obecne w hydrolizatach białek z produktów po rozmrożeniu, ugotowanych oraz usmażonych. Były to peptydy MQQLENDLDQVQESLLK (epitop, obecny w sekwencjach aminokwasowych tropomiozyn skorupiaków) oraz VAECESEIQGLNR (obecny w sekwencjach aminokwasowych tropomiozyn głowonogów – mątw i kałamarnic). Nie są one jednak rozpowszechnione wśród sekwencji tropomiozyn na tyle, aby mogły być stosowane jako uniwersalne markery

tropomiozyn – obecne są odpowiednio w 0,23 i 0,07% sekwencji tropomiozyn ogółem według Interpro oraz 0,36 i 0,11% sekwencji według Pfam.

Analiza *in silico* stanowiła wstęp do dalszych badań i pozwoliła na wytypowanie peptydów, które mogą powstać po proteolizie trypsyną tropomiozyn skorupiaków i mięczaków. Niektóre z peptydów, będących produktami symulowanej proteolizy trypsyną *in silico*, wykryto w próbkach, w których znajdowały się hydrolizaty tropomiozyn o nieznanych sekwencjach aminokwasowych, co dowodzi, że na podstawie markerów peptydowych można stwierdzić obecność alergennego białka w danym produkcie, nie znając jego sekwencji aminokwasowej.

Chen i in. [2017] oraz Ho i in. [2021] zastosowali peptyd ALSNAEGEVAALNR do wykrywania i oznaczania ilościowego zawartości tropomiozyn krewetek (w kulkach rybnych zawierających krewetki *P. vannamei* oraz całych krewetkach siedmiu gatunków, w tym 3 o nieznanych sekwencjach tropomiozyn). Wybrano go m.in. ze względu na intensywność sygnału na widmach z analiz LC-MS. Zweryfikowano również, za pomocą narzędzi bioinformatycznych (BLAST, UniProtKB i UniPept), czy jest on uniwersalny dla tropomiozyn krewetek. Stwierdzono jednocześnie, że nie jest on obecny w większości sekwencji tropomiozyn krabów.

Na podstawie analizy *in silico* przeprowadzonej w niniejszej pracy wykazano jednak, że peptyd ten występuje w mniej niż 50% przeanalizowanych sekwencji tropomiozyn skorupiaków. Lepszym wyborem mógłby być więc peptyd IVELEEELR, dla którego intensywność sygnału we wspomnianych wyżej badaniach Chen i in. [2017] oraz Ho i in. [2021] była porównywalna z intensywnością sygnału zastosowanego peptydu, jednak miałby on szersze zastosowanie do wykrywania tropomiozyn o nieznanej sekwencji lub z krewetek nieznanych gatunków. Peptyd ten był obecny w 93% analizowanych sekwencji skorupiaków, a więc istnieje większe prawdopodobieństwo (niż w przypadku peptydu ALSNAEGEVAALNR), że zostanie wykryty w hydrolizacie białek dowolnej krewetki. Ten peptyd jest także epitopem (IEDB ID: 956601). Do analizy ilościowej tropomiozyn zastosowali go Wang i in. [2021].

Nagai i in. [2015] wybrali peptydy, które są obecne w sekwencjach aminokwasowych tropomiozyn wielu skorupiaków, ale nieobecne w sekwencji tropomiozyny kryla. Wybrano peptydy IQLLEEDLER, LAEASQADESER i IVELEEELR jako peptydy wspólne dla tropomiozyn skorupiaków oraz ADTLEQQNK, SLSDEER i FLAEEADR jako peptydy odróżniające tropomiozynę kryla od innych badanych tropomiozyn skorupiaków. Mimo to, w próbce zawierającej hydrolizat tropomiozyny kryla wykryto dwa z tych trzech peptydów. Badacze wyjaśnili, że taki stan rzeczy może wynikać z niezgodności sekwencji dostępnej

w bazie danych i rzeczywistej sekwencji białka. Wybrane peptydy próbowano też wykryć w próbkach hydrolizatów tropomiozyny larwy osy *Vespula flaviceps* (owad jadalny). Wykazano, że nie były obecne w analizowanym hydrolizacie. Sekwencja tropomiozyny tego owada nie została opisana w bazie UniProtKB. Wybrane peptydy są jednak obecne w wielu sekwencjach tropomiozyn innych owadów, m.in. czarnej muchy (*Hermetia illucens*) i pleśniakowca lśniącego (*Alphitobius diaperinus*) [Leni i in. 2020]. Nie można więc stosować tych peptydów do eliminowania ryzyka otrzymania wyników fałszywie pozytywnych przy wykrywaniu skorupiaków, w przypadku, gdy produkt jest zanieczyszczony białkami owadów.

Wspomniane wyżej wyniki eksperymentów potwierdzają założenie, że należy bardzo ostrożnie podchodzić do typowania markerów do wykrywania białek konkretnych gatunków, bazując tylko na sekwencji aminokwasowej. W niniejszej pracy wykazano, że staranny dobór markera pozwala stwierdzić, że wykrytym białkiem jest tropomiozyna, że jest prawdopodobnie alergenna (obecne są w niej epitopy), ale nie daje jednoznacznej odpowiedzi z jakiego gatunku pochodzi (np. na podstawie wyników analizy próbki nr 6, zawierającej hydrolizat białek z produktu „ogonki raków" gatunku *Procambarus clarkii*, program PEAKS jako gatunek, z którego pochodziła tropomiozyna obecna w próbce, wskazał m.in. krewetki *Metapenaeus ensis, Penaeus aztecus, Penaeus monodon, Penaeus chinensis* i *Penaeus monodon*). Dlatego wykrywanie rodziny białek alergennych daje pewniejszy wynik niż wykrywanie białek poszczególnych gatunków.

W literaturze zwraca się jednak uwagę na pewne ograniczenia w stosowaniu metod proteomicznych do badań żywności. Podkreślana jest konieczność opracowania standaryzowanej metodyki dotyczącej przygotowania próbek żywności, wykorzystania odpowiednich analiz statystycznych oraz doskonalenia narzędzi bioinformatycznych i stosowania sprzętu o większej mocy analitycznej [Walker i in. 2016]. Głównym problemem związanym z wykorzystaniem proteomiki do badań żywności jest ekstrakcja białek ze złożonych matryc i niskie stężenie analizowanych białek. Stąd konieczne jest opracowanie takiej metody ekstrakcji, która zapewni otrzymanie stężenia białka na poziomie umożliwiającym przeprowadzenie testów o wyższej czułości i odtwarzalności [Walker i in. 2016; Nugraha i in. 2021]. Innym czynnikiem ograniczającym, z którym mogą się spotkać laboratoria zajmujące się analizą żywności, jest ograniczona dostępność materiałów odniesienia, biorąc pod uwagę szeroki zakres możliwych analitów, stężeń i kombinacji matryc rzeczywistych próbek do analizy [Emons i in. 2006, Walker i in. 2016].

Podczas wyszukiwania markerów uniwersalnych dla danego białka (w tym przypadku tropomiozyny) i stosowaniu ich do wykrywania alergenów skorupiaków i mięczaków, trzeba brać pod uwagę ryzyko otrzymania wyników fałszywie pozytywnych. Ze względu na wysokie

podobieństwo sekwencji tropomiozyn, w przypadku zanieczyszczenia produktu np. owadami, próba identyfikacji białka skorupiaków może skutkować wykryciem tropomiozyny innego organizmu. W takich przypadkach należy rozważyć zastosowanie do analizy markerów peptydowych, które są uniwersalne dla tropomiozyn skorupiaków, ale nie występują w sekwencjach aminokwasowych innych grup organizmów. Narzędziem, które może służyć do analizy poszczególnych peptydów pod kątem możliwości ich uwalniania z białek różnych rodzin oraz różnych jednostek taksonomicznych (po trawieniu trypsyną) jest m.in. Unipept, użyty w poniższej pracy. Zastosowanie powyższego programu umożliwiło stosunkowo łatwe określenie dystrybucji poszczególnych peptydów w sekwencjach białek organizmów należących do różnych jednostek taksonomicznych (skorupiaki, mięczaki itp.). Rola programu UniPept w niniejszy badaniach może być argumentem za stosowaniem zróżnicowanych narzędzi bioinformatycznych do wspomagania analizy alergenów. Słabym punktem procedur wyboru peptydów, uwzględniających użycie programów analizujących sekwencje aminokwasowe na potrzeby proteomiki celowanej, może być ich dostępność. Przykładem takich problemów mogą być losy programu EVALLER [Martinez-Barrio i in. 2007], wykorzystanego do wspomagania wyboru markerów peptydowych opisanych w pracy Bucholskiej i Minkiewicza [2016]. Wymieniony program nie jest obecnie dostępny w Internecie. Stąd procedury bioinformatyczne muszą być na bieżąco dostosowywane do możliwości aktualnie dostępnych programów.

Ryzyko fałszywego wyniku może wystąpić także w przypadku analizy skoncentrowanej na próbie identyfikacji białka obecnego w próbce, na podstawie fragmentów powstałych po trawieniu białka np. trypsyną. Należy wziąć pod uwagę możliwość niepoprawnego rozpoznania przez program tego białka jako inne, niepowiązane filogenetycznie ani funkcjonalnie, ale mające wspólne fragmenty sekwencji z analizowanym białkiem [Shevchenko i in. 2009]. Problem taki może wystąpić, jeśli peptydy użyte jako markery są zbyt krótkie – poniżej 8 reszt aminokwasowych. Przykłady rozpowszechnienia heksa- lub heptapeptydów w sekwencjach białek należących do licznych rodzin zostały opisane w pracach Minkiewicza i in. [2012; 2015b]. Rozwiązaniem tego problemu może być zawężenie bazy sekwencji, która jest przeszukiwana przez program, do zbioru sekwencji aminokwasowych białek pochodzących z jednej grupy organizmów, np. *Metazoa* (zwierzęta tkankowe) [Ho i in. 2021] lub tylko z jednej rodziny białek, np. tropomiozyn. Zastosowanie takiego rozwiązania w pracy spowodowało, że wyniki uzyskane za pomocą programu PEAKS, dotyczyły dopasowań zidentyfikowanych peptydów tylko do tych sekwencji aminokwasowych tropomiozyn, które zostały opisane w bazie UniProtKB i zastosowane jako baza odniesienia w programie PEAKS.

Strategia wyszukiwania peptydowych markerów wspólnych dla większej liczby białek może być stosowana nie tylko do identyfikacji tropomiozyn, ale także innych wysoce konserwatywnych rodzin np. alergenów pochodzących z mleka [Minkiewicz i in. 2011; 2015b] lub jaj [Minkiewicz i in. 2013]. Powyższa strategia nie ma zastosowania do rodzin białek o wysoce zróżnicowanych sekwencjach, jak parwalbuminy, które były rekomendowane jako prekursory markerów specyficznych dla poszczególnych gatunków ryb [Carrera i in. 2006; Piñeiro i in. 2015]. Przykładem ilustrującym zróżnicowanie parwalbumin jest rozpowszchnienie heksapeptydów pochodzących z parwalbuminy dorsza bałtyckiego w sekwencjach innych białek. Wymienione heksapeptydy występowały w setkach białek z różnych rodziny, ale tylko w jednej parwalbuminie [Minkiewicz i in. 2012].

WNIOSKI I STWIERDZENIA KOŃCOWE

Przeprowadzone analizy pozwoliły na zidentyfikowanie alergennych tropomiozyn w produktach spożywczych z owoców morza, poddanych mrożeniu, gotowaniu lub smażeniu oraz w produktach gotowych do spożycia. Identyfikacji dokonano na podstawie znajomości sekwencji peptydów, które powstają po symulowanym trawieniu trypsyną tropomiozyn oraz na drodze analiz bazujących na homologii białek. Potwierdzono, że aby zidentyfikować białko w próbce nie jest konieczna znajomość całej sekwencji aminokwasowej, ale tylko krótkich fragmentów (peptydów).

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski i stwierdzenia:

1. Analiza *in silico* pozwoliła na wytypowanie peptydów, które mogą powstać po proteolizie trypsyną tropomiozyn skorupiaków i mięczaków. Niektóre z peptydów, będących produktami symulowanej proteolizy trypsyną *in silico*, wykryto w próbkach, w których znajdowały się hydrolizaty tropomiozyn o nieznanych sekwencjach aminokwasowych, co dowodzi, że na podstawie markerów peptydowych można stwierdzić obecność alergennego białka w danym produkcie, nie znając jego sekwencji aminokwasowej.
2. Przeprowadzona analiza *in silico* dowiodła, że można wyodrębnić peptydy, które mogą stanowić markery peptydowe obecności alergennych tropomiozyn w produktach spożywczych, charakterystyczne dla skorupiaków, dla mięczaków oraz takie, które występują w obu tych grupach.
3. Trawienie trypsyną ekstraktów białkowych z produktów poddanych gotowaniu prowadzi do powstania dłuższych peptydów niż w przypadku ekstraktów z produktów rozmrożonych, co zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia w hydrolizatach białkowych kompletnych epitopów.
4. W niniejszej pracy zidentyfikowano peptydy (w tym peptyd zawierający kompletną sekwencję epitopu tropomiozyn skorupiaków), które były obecne w hydrolizatach białek z produktów po rozmrożeniu, ugotowanych oraz usmażonych, co wskazuje na możliwość zastosowania peptydowych markerów do wykrywania takich białek mimo modyfikacji
5. Wykrywanie białek alergennych w żywności w oparciu o uniwersalne markery peptydowe stanowi obiecującą alternatywę dla tradycyjnego podejścia w analizie alergenów (stosowanie peptydów unikalnych), zmniejszając ryzyko otrzymania wyników fałszywie negatywnych. W przypadku stosowania peptydów unikalnych do wykrywania białek alergennych o nieznanych sekwencjach istnieje możliwość, że białko to nie zostanie wykryte, bo jego sekwencja nie zawiera tego peptydu.

6. Staranny dobór uniwersalnego markera peptydowego pozwala stwierdzić, że wykrytym białkiem jest tropomiozyna, że jest prawdopodobnie alergenna (obecne są w niej epitopy), ale nie daje jednoznacznej odpowiedzi z jakiego gatunku pochodzi. Zastosowanie takiego markera niesie więc za sobą istotne informacje o możliwej alergenności białka, ale nie o jego pochodzeniu.
7. Jeśli marker jest uniwersalny dla wielu białek z rodziny, może być zastosowany do wykrywania potencjalnych alergenów w żywności zawierającej składniki nieobjęte obowiązkiem znakowania (np. owady).
8. Markery peptydowe, których sekwencje aminokwasowe są jednocześnie fragmentami sekwencji epitopów lub epitopami w całości, mogą być przydatnym narzędziem do wykrywania białek alergennych.
9. Ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji tropomiozyn, w przypadku zanieczyszczenia produktu np. owadami, próba identyfikacji białka skorupiaków może skutkować wykryciem tropomiozyny innego organizmu. W takich przypadkach należy rozważyć zastosowanie do analizy markerów peptydowych, które są uniwersalne dla tropomiozyn skorupiaków, ale nie występują w sekwencjach aminokwasowych innych grup organizmów.
10. W przypadku analizy skoncentrowanej na próbie identyfikacji białka obecnego w próbce, na podstawie fragmentów powstałych po trawieniu białka np. trypsyną, należy wziąć pod uwagę możliwość niepoprawnego rozpoznania przez oprogramowanie tego białka jako inne, niepowiązane filogenetycznie ani funkcjonalnie, ale mające wspólne fragmenty sekwencji z analizowanym białkiem. Należy w takiej sytuacji zawęzić bazę sekwencji, która jest przeszukiwana przez program, do zbioru sekwencji aminokwasowych białek pochodzących z jednej grupy organizmów lub tylko z jednej rodziny białek, np. tropomiozyn.

LITERATURA

1. Aalberse R.C., 2000, Structural biology of allergens. J Allergy Clin. Immunol. 106 228-238.
2. Abdel Rahman A.M., Lopata A.L., O'Hehir R.E., Robinson J.J., Banoub J.H., Helleur R.J., 2010, Characterization and de novo sequencing of snow crab tropomyosin enzymatic peptides by both electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization QqToF tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 45, 4, 372-381.
3. Ahsan N., Shyama Prasad Rao R., Gruppuso P. A., Ramratnam B., Salomon A. R., 2016, Targeted proteomics: current status and future perspectives for quantification of food allergens, J. Proteomics, 143, 15-23.
4. Albrecht M., Kühne Y., Ballmer-Weber B.K., Becker W.M., Holzhauser T., Lauer I., Reuter A., Randow S., Falk S., Wangorsch A., Lidholm J., Reese G., Vieths S., 2009, Relevance of IgE binding to short peptides for the allergenic activity of food allergens. J. Allergy Clin. Immunol., 124(2), 328-336.
5. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402.
6. Asturias J.A., Eraso E., Moneo I., Martinez A., 2000, Is tropomyosin an allergen in Anisakis? Allergy 55, 9, 898-898.
7. Ayuso R., Grishina G., Ibáñez M.D., Blanco C., Carrillo T., Bencharitiwong R., Sánchez S., Nowak-Wegrzyn A., Sampson H.A., 2009, Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen. J. Allergy Clin. Immunol., 124, 1, 114-120.
8. Ayuso R., Lehrer S.B., Reese G., 2002, Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). Int. Arch. Allergy Immunol.,127(1) 27-37.
9. Ayuso R., Sánchez-Garcia S., Lin J., Fu Z., Ibáñez M.D., Carrillo T., Blanco C., Goldis M., Bardina L., Sastre J., Sampson H.A., 2010, Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. J. Allergy Clin. Immunol. 125, 1286–1293.
10. Ayuso R., Sánchez-Garcia S., Pascal M., Lin J, Grishina G, Fu Z, Ibáñez M.D., Sastre J., Sampson H.A., 2012, Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? Clin. Exp. Allergy 42 293–304.

11. Babicki S., Arndt D., Marcu A., Liang Y., Grant J. R., Maciejewski A., Wishart D.S., 2016, Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Res., 44(W1), W147-W153.
12. Bai T.L., Han X.Y., Li M.S., Yang Y., Liu M., Ji N.R., Yu C.C, Lai D., Cao M.J., Liu G.M., 2021, Effects of the Maillard reaction on the epitopes and immunoreactivity of tropomyosin, a major allergen in *Chlamys nobilis*. Food Funct., 12(11), 5096-5108.
13. Bannon G.A., 2004, What makes a food protein an allergen? Curr. Allergy Asthma Rep. 4, 43–46.
14. Barletta B., Butteroni C., Puggioni E.M., Iacovacci P., Afferni C., Tinghino R., Ariano R., Panzani R.C., Pini C., Di Felice G., 2005, Immunological characterization of a recombinant tropomyosin from a new indoor source, *Lepisma saccharina*. Clin. Exp. Allergy 35, 4, 483-489.
15. Barre A., Simplicien M., Cassan G., Benoist H., Rougé P., 2018, Food allergen families common to different arthropods (mites, insects, crustaceans), mollusks and nematods: cross-reactivity and potential cross-allergenicity. Rev. Fr. Allergol., 58(8), 581-593.
16. Bartuzi Z, Kaczmarski M, Czerwionka-Szaflarska M, Małaczyńska T, Krogulska A., 2017, Position paper if Food Allergy section the Polish Society of Allergology on the diagnosis and mamagment of food allergies. Alergol. Pol. - Pol. J. Allergol. 4, 109-122.
17. Barua B., 2013, Periodicities designed in the tropomyosin sequence and structure define its functions. Bioarchitecture, 3(3), 51-56.
18. Bauermeister K., Wangorsch A., Garoffo L.P., Reuter A., Conti A., Taylor S.L., Lidholm J., Dewitt A.M., Enrique E., Vieths S., Holzhauser T., Ballmer-Weber B., Reese G., 2011, Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp Crangon crangon. Mol. Immunol. 48, 15-16, 1983-1992.
19. Bąchor R., Biernat M., Cebrat M., Kijewska M., Kluczyk A., Kuczer M., Paluch A., Waliczek M., Wierzbicka M., Stefanowicz P., Szewczuk Z., 2018, Spektrometria mas w analizie białek i peptydów: znaczniki jonizacyjne. Wiad. Chem., 72, 7-8, 609-633.
20. Blum M., Chang H.Y., Chuguransky S., Grego T., Kandasaamy S., Mitchell A., Nuka G., Paysan-Lafosse T., Qureshi M., Raj S., Richardson L., Salazar G.A., Williams L., Bork P., Bridge A., Gough J., Haft D.H., Letunic I., Marchler-Bauer A., Mi H., Natale D.A., Necci M., Orengo C.A., Pandurangan A.P., Rivoire C., Sigrist C.J.A., Sillitoe I., Thanki N., Thomas P.D., Tosatto S.C.E., Wu C.H., Bateman A., Finn R.D., 2021, The InterPro protein families and domains database: 20 years on. Nucleic Acids Res., 49(D1), D344-D354.

21. Bodzoń-Kułakowska A., Bierczyńska-Krzysik A., 2016, Analizatory: Analizator czasu przelotu (TOF). (w:) Spektrometria mas. Red. Suder P., Bodzoń-Kułakowska A., Silberring J., Wydawnictwa AGH, Kraków, 142-151.
22. Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72(1-2) 248-254.
23. Breiteneder H., Chapman M. D., 2014, Allergen nomenclature. (w:) Allergens and Allergen Immunotherapy, 5th ed.; Red. Lockey, R.F., Ledford, D.K., CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 37–49.
24. Bucholska J., Minkiewicz P., 2016, The use of peptide markers of carp and herring allergens as an example of detection of sequenced and non-sequenced proteins. Food Technol. Biotechnol., 54(3) 266-274.
25. Carrera M., Cañas B., Piñeiro C., Vázquez J., Gallardo J. M., 2006, Identification of commercial hake and grenadier species by proteomic analysis of the parvalbumin fraction. Proteomics, 6, 5278–5287.
26. Carrera M., Pazos M., Gasset M., 2020, Proteomics-based methodologies for the detection and quantification of seafood allergens. Foods, 9(8), 1134.
27. Cheng J.-H., Wang H., Sun D.-W., 2022, An overview of tropomyosin as an important seafood allergen: Structure, cross-reactivity, epitopes, allergenicity, and processing modifications. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 21, 127-147.
28. Chen Q., Pan X.D., Huang B.F., 2017, Authentication of shrimp muscle in complex foodstuff by in-solution digestion and high-resolution mass spectrometry. Rsc. Advances, 7(52), 32903-32908.
29. Cifuentes A., 2009, Food analysis and foodomics. J. Chromatogr. A, 1216, 43, 7109.
30. Dall'Antonia, F., Pavkov-Keller, T., Zangger, K., Keller, W., 2014, Structure of allergens and structure-based epitope predictions. Methods, 66(1), 3-21.
31. Daul C.B., Slattery M., Reese G., Lehrer S.B., 1994, Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. Int. Arch. Allergy Immunol. 105, 1, 49-55.
32. Deb-Choudhury S., Haines S., Harland D., Clerens S., van Koten C., Lee E., Thomas A., Dyer J., 2020, Multi-parameter evaluation of the effect of processing conditions on meat protein modification. Heliyon, 6(6), e04185.
33. Deepaisarn S., 2019. MALDI mass spectrometry. (w:) Spectral analysis and quantitation in MALDI-MS Imaging. PhD Thesis. The University of Manchester, Wielka Brytania, 47-63.

34. Dziuba J., Darewicz M., Minkiewicz P., Panfil T., 2002, Application of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and reversed-phase-high-performance liquid chromatography on-line with the second and fourth derivatives UV spectroscopy in identification of β-casein and its peptide fractions. Milchwissenschaft, 57(9-10), 497-502.
35. Dziuba M., Minkiewicz P., Dąbek M., 2013, Peptides, specific proteolysis products, as molecular markers of allergenic proteins - *in silico* studies. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 12, 101-112.
36. Dziuba J., Minkiewicz P., Nałęcz D., Dziuba M., Szerszunowicz I., 2009, Reproducibility of two-dimensional electrophoresis gel images of pea (*Pisum sativum* L.) seed proteins evaluated using scatter plots - a short report. Pol. J. Food Nutr. Sci., 59, 141-144.
37. Eischeid A.C., Stadig S.R., 2018, A group-specific, quantitative real-time PCR assay for detection of crab, a crustacean shellfish allergen, in complex food matrices. Food Chem., 244 224-231.
38. Eischeid A.C., Stadig S.R., Rallabhandi P., 2021, Comparison of real-time PCR and ELISA for the detection of crustacean shellfish allergens. Food Addit. Contam. Part A, 38(4), 563-572.
39. Emons H., Held A., Ulberth F., 2006, Reference materials as crucial tools for quality assurance and control in food analysis. Pure Appl. Chem., 78(1), 135-143.
40. Emoto A., Ishizaki S., Shiomi K., 2009, Tropomyosins in gastropods and bivalves: Identification as major allergens and amino acid sequence features. Food Chem. 114, 634-641.
41. Faber M. A., Pascal M., El Kharbouchi O., Sabato V., Hagendorens M. M., Decuyper I. I., Bridts C. H., Ebo D. G., 2017, Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. Alllergy 72, 842-848.
42. Faisal M., Vasiljevic T., Donkor O.N., 2019, Effects of selected processing treatments on antigenicity of banana prawn (*Fenneropenaeus merguiensis*) tropomyosin. Int. J. Food Sci. Technol. 54, 183-193.
43. Fang L., Li G., Gu R., Cai M., Lu J., 2018, Influence of thermal treatment on the characteristics of major oyster allergen Cra g 1 (tropomyosin). J. Sci. Food Agric., 98(14), 5322-5328.
44. Fang L., Li G., Zhang J., Gu R., Cai M., Lu J., 2019, Identification and mutational analysis of continuous, immunodominant epitopes of the major oyster allergen Crag 1. J. Clin. Immunol., 201 20-29.

45. Fishman J.M., Wiles K., Wood K.J 2015, The acquired immune system response to biomaterials, including both naturally occurring and synthetic biomaterials. (w:) Host Response to Biomaterials. Academic Press, Wielka Brytania, 151-187.
46. Fornal E., Montowska M., 2019, Species-specific peptide-based liquid chromatography–mass spectrometry monitoring of three poultry species in processed meat products. Food Chem., 283, 489-498.
47. Fu L., Cherayil B.J., Shi H., Wang Y., Zhu Y., 2019, Detection and quantification methods for food allergens. (w:) Food Allergy. Springer, Singapur.
48. Fuller H.R., Goodwin P.R., Morris G.E., 2006, An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food. Food Agric. Immunol. 17, 1, 43-52.
49. Gamez C., Sanchez-Garcia S., Ibanez M. D., Lopez R., Aguado E., Lopez E., Sastre B., Sastre J., del Pozo V., 2011, Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. Allergy 66, 1375-1383.
50. Garcia B.E., Lizaso M.T., 2011, Cross-reactivity syndromes in food allergy. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 2, 162-170.
51. Gasilova N., Girault H.H., 2015, Bioanalytical methods for food allergy diagnosis, allergen detection and new allergen discovery. Bioanalysis 7(9), 1175-1190.
52. Gaur V., 2009, Food allergy and seed storage proteins. (w:) Comparative structural proteomics of novel seed proteins with allergenic potential. National Institute of Immunology, New Delhi, 12-40.
53. Gawrońska-Ukleja E., Ukleja-Sokołowska N., Żbikowska-Gotz M., Lis K., Sokołowski Ł., Bartuzi Z., 2018, Reakcja anafilaktyczna po spożyciu krewetki. Alerg. Astma Immunol., 23 (2), 86-91.
54. Gillet L.C., Leitner A., Aebersold R., 2016, Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing. Annu. Rev. Anal. Chem., 9, 449-472.
55. Giuffrida M.G., Villalta D., Mistrello G., Amato S., Asero R., 2014, Shrimp allergy beyond tropomyosin in Italy: clinical relevance of arginine kinase, sarcoplasmic calcium binding protein and hemocyanin. Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol. 46, 5, 172-177.
56. Gomez-Gomez L., Feo-Brito F., Rubio-Moraga A., Trapero-Mozos A., Prieto A., Salcedo G., Ahrazem O., 2010, Saffron and other spices as potentiall allergenic sources. Funct. Plant. Sci. Biotechnol. 4, 74-80.

57. González-Fernández J., Daschner A., Cuéllar C., 2017, Allergenicity of vertebrate tropomyosins: challenging an immunological dogma. Allergol. Immunopathol. 45, 3 297-304.
58. González-Fernández J., Rodero M., Daschner A., Cuéllar C., 2014, New insights into the allergenicity of tropomyosin: a bioinformatics approach. Mol. Biol. Rep. 41(10), 6509-6517.
59. Gugała A., Kurowski M., Kowalski M.L., 2021, Alergia na pokarmy w Polsce na tle innych krajów Europy-wyniki projektu EuroPrevall. Alerg. Astma Immunol., 26(1).
60. Gupta S., Ahadi S., Zhou W., Röst H., 2019, DIAlignR Provides Precise Retention Time Alignment Across Distant Runs in DIA and Targeted Proteomics*[S]. Mol. Cell. Proteomics, 18(4), 806-817.
61. Gurdeep Singh R., Tanca A., Palomba A., Van der Jeugt F., Verschaffelt P., Uzzau S., Martens L., Dawyndt P., Mesuere B., 2019, Unipept 4.0: functional analysis of metaproteome data. J. Proteome Res., 18 2, 606–615.
62. Han X.Y., Yang H., Rao S.T., Liu G.Y., Hu M.J., Zeng B.C., Cao M.J., Liu G.M., 2018, The Maillard reaction reduced the sensitization of tropomyosin and arginine kinase from *Scylla paramamosain*, simultaneously. J. Agric. Food Chem., 66(11) 2934-2943.
63. Herman R.A., Song P., Mirsky H.P., Roper J. M., 2021, Evidence-based regulations for bioinformatic prediction of allergen cross-reactivity are needed. Regul. Toxicol. Pharmacol., 120, 104841.
64. Ho C.W., Hsu J.L., Chen S.H., Liaw E.T., Liu S.S., Huang E.S., Chen Y.K., Jean C.C., Yu H.S., 2021, Development and validation of mass spectrometry-based method for detecting shrimp allergen tropomyosin. LWT, 152, 112367.
65. Huang Y.Y., Liu G.M., Cai Q.F., Weng W.Y., Maleki S.J., Su W.J., Cao M.J., 2010, Stability of major allergen tropomyosin and other food proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by *in vitro* gastrointestinal digestion. Food Chem. Toxicol. 48, 5, 1196-1201.
66. Hu L., Ren S., Shen Q., Chen J., Ye X., Ling J., 2017, Proteomic study of the effect of different cooking methods on protein oxidation in fish fillets. RSC Adv., 7(44) 27496-27505.
67. Ishikawa M., Ishida M., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K., 1998a, Purification and IgE-binding epitopes of a major allergen in the gastropod *Turbo cornutus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(7), 1337-1343.
68. Ishikawa M., Ishida M., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K., 1998b, Tropomyosin, the major oyster *Crassostrea gigas* allergen and its IgE binding epitopes. J. Food Sci. 63, 1, 44-47.

69. Ishikawa M., Suzuki F., Ishida M., Nagashima Y., Shiomi K., 2001, Identification of tropomyosin as a major allergen in the octopus *Octopus vulgaris* and elucidation of its IgE-binding epitopes. Fish. Sci., 67(5), 934-942.
70. Ivanciuc O., Schein C.H., and Braun W., 2003, SDAP: Database and Computational Tools for Allergenic Proteins. Nucleic Acids Res., 31(1), 359-362.
71. James J.K., Pike D.H., Khan I.J., Nanda V., 2018, Structural and dynamic properties of allergen and non-allergen forms of tropomyosin. Structure 26(7), 997-1006.
72. Jirapongsananuruk O., Sripramong C., Pacharn P., Udompunturak S., Chinratanapisit S., Piboonpocanun S., Visitsunthorn N., Vichyanond P., 2008, Specific allergy to *Penaeus monodon* (seawater shrimp) *or Macrobrachium rosenbergii* (freshwater shrimp) in shrimp-allergic children. Clin. Exp. Allergy 38, 6, 1038-1047.
73. Johansson S.G., Hourihane J.O., Bousquet J., Bruijnzeel-Koomen C., Dreborg S., Haahtela T., Kowalski M.L., Mygind N., Ring J., van Cauwenberge P., van Hage-Hamsten M., Wüthrich B., 2001, A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy 56, 813–824.
74. Johnson P. E., Baumgartner S., Aldick T., Bessant C., Giosafatto V., Heick J., Mamone G., O'Connor G., Poms R., Popping B., Reuter A., Ulberth F., Watson A., Monaci L., Mills E. N. C., 2011, Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. J. AOAC Int., 94, 1026-1033.
75. Johnston E. B., Kamath S.D., Iyer S.P., Pratap K., Karnaneedi S., Taki A.C., Nugraha R., Schaeffer P.M., Rolland J.M., Robyn E.O., Lopata A.L., 2019, Defining specific allergens for improved component-resolved diagnosis of shrimp allergy in adults. Molecular immunology, 112, 330-337.
76. Joint FAO, World Health Organization 2001, Evaluation of allergenicity of genetically modified foods: report of a Joint FAO (No. WHO/FOS/2001.01). Food and Agriculture Organization of the United Nations (https://apps.who.int/iris/handle/10665/340572).
77. Kamath S. D., Rahman A.M.A., Voskamp A., Komoda T., Rolland J. M., O'hehir R.E., Lopata A.L., 2014, Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. Mol. Nutr. Food Res., 58(5), 1144-1155.
78. Kamemura N., Sugimoto M., Tamehiro N., Adachi R., Tomonari S., Watanabe T., Mito T., 2019, Cross-allergenicity of crustacean and the edible insect *Gryllus bimaculatus* in patients with shrimp allergy. Mol. Immunol., 106, 127-134.

79. Kamińska H., Podbielska H., 2011, Identyfikacja białek z wykorzystaniem techniki Peptide Mass. Część I-charakterystyka eksperymentu identyfikacji. Acta Bio-Opt. Inform. Med., 17(2), 153-160.
80. Khulal U., Jovanović V.B., Ćirković-Veličković T., Mutić J., 2019, Comparative digestomics of tropomyosin of vertebrates and invertebrates in real food matrix. (w:) Book of Abstracts of the XX EuroFoodChem Congress. Portugal: Sociedade Portuguesa de Química.
81. Kinter M., Sherman N., 2000, The prepraration of protein digests for mass spectrometric sequencing experiments. (w:) Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. Vol. 6. John Wiley & Sons, 160-161.
82. Kunimoto A., Sisino T., Sakai K., Matsumoto T., Takahashi K., Yamashita H., Hiemori M., Tsuji H., Kimoto M., 2009, Molecular cloning and allergenicity of Pen j 1, a major allergen of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 4, 840-848.
83. Kuznetsova K.G., Levitsky L.I., Pyatnitskiy M.A., Ilina I.Y., Bubis J.A., Solovyeva E.M., Zgoda V.G., Gorskhov M.V., Moshkovskii S.A., 2021, Cysteine alkylation methods in shotgun proteomics and their possible effects on methionine residues. J. Proteomics 231, 104022.
84. Ladics G.S., 2019, Assessment of the potential allergenicity of genetically engineered food crops. J. Immunotoxicol., 16(1), 43-53.
85. Ladics G.S., Bardina L., Cressman R.F., Mattsson J.L., Sampson H.A., 2006, Lack of cross-reactivity between the *Bacillus thuringiensis* derived protein Cry1F in maize grain and dust mite Der p7 protein with human sera positive for Der p7-IgE. Regul. Toxicol. Pharmacol., 44(2), 136-143.
86. Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259), 680-685.
87. Leni G., Tedeschi T., Faccini A., Pratesi F., Folli C., Puxeddu I., Migliorini P., Gianotten N., Jacobs J., Depraetere S., Caligiani A., Sforza S., 2020, Shotgun proteomics, in-silico evaluation and immunoblotting assays for allergenicity assessment of lesser mealworm, black soldier fly and their protein hydrolysates. Sci. Rep., 10, 1, 1-10.
88. Leung P.S., Chen Y.C., Gershwin M.E., Wong S.H., Kwan H.S., Chu K.H., 1998a, Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. J Allergy Clin Immunol. 102, 5, 847-852.

89. Leung P.S., Chen Y.C., Mykles D.L., Chow W.K., Li C.P., Chu K.H., 1998b, Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. Mol. Marine Biol. Biotechnol. 7, 1, 12-20.
90. Leung P.S., Chow W.K., Duffey S., Kwan H.S., Gershwin M.E., Chu K.H., 1996, IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. J. Allergy Clin. Immunol. 98, 5 Pt 1, 954-961.
91. Leung P.S., Chu K.H., cDNA cloning and molecular identification of the major oyster allergen from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Clin. Exp. Allergy 31, 8, 1287-1294.
92. Leung P.S., Chu K.H., Chow W.K., Ansari A., Bandea C.I., Kwan H.S., Nagy S.M., Gershwin M.E., 1994, Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. J. Allergy Clin. Immunol. 94, 5, 882-890.
93. Li. X.L., Hong L., Xing L.Z., Ishfaq A., Pramod S.N., Hang L., Tao L.L., Lan T.S., Wen Y.Z., 2020, Influence of nonthermal extraction technique and allergenicity characteristics of tropomyosin from fish (*Larimichthys crocea*) in comparison with shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and clam (*Ruditapes philippinarum*). Food Chem., 309, 125575.
94. Lin S. Y., Lee C. H., Huang E. S., Sheu S. C., Yu H. S., 2018, Quantification of crustacean tropomyosin, a major food allergen, in eight species of taiwanese shrimp based on immunoassay. Food Anal. Method. 11, 9 2607-2613.
95. Liu G.M., Huang Y.Y, Cai Q.F., Weng W.Y., Su W.J., Cao M.J., 2011, Comparative study of *in vitro* digestibility of major allergen, tropomyosin and other proteins between grass prawn (Penaeus monodon) and pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). J. Sci. Food Agric. 91, 1, 163-170.
96. Liu M., Huan F., Han T.J., Liu S.H., Li M.S., Yang Y., Wu Y.H., Chen G.X, Cao M.J., Liu G. M., 2021, Combination Processing Method Reduced IgE-Binding Activity of *Litopenaeus vannamei* by Modifying Lysine, Arginine, and Cysteine on Multiple Allergen Epitopes. J. Agric. Food Chem., 69(16), 4865-4873.
97. Liu M., Liu S.H., Han T.J., Xia F., Li M.S., Weng W.Y., Chen G.X, Cao M.J., Liu G.M., 2019, Effects of thermal processing on digestion stability and immunoreactivity of the *Litopenaeus vannamei* matrix. Food Funct., 10(9), 5374-5385.
98. Liu R., Holck A.L., Yang E., Liu C., Xue W., 2013, Tropomyosin from tilapia (Oreochromis mossambicus) as an allergen. Clin. Exp. Allergy 43, 365-377.
99. Lopata A. L., Kamath S., 2012, Shellfish allergy diagnosis - gaps and needs. Curr. Allergy Clin. Im., 25, 60-66.

100. Lo Y.T., Shaw P.C., 2018, DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. Food Chem., 240, 767-774.
101. Lund E.K., 2013, Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids? Food Chem. 140, 413-420.
102. Lu H., Zhang L., Li Q., Luo Y., 2017, Comparison of gel properties and bochemical characteristics of myofibrillar protein from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) affected by frozen storage and a hydroxyl radical generation oxidizing system. Food Chem., 223, 96-103.
103. Lv L., Lin H., Li Z., Wang J., Ahmed I., Chen H., 2017, Changes of structure and IgE binding capacity of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin followed by acrolein treatment. Food Funct., 8(3), 1028-1036.
104. Mari A, Rasi C, Palazzo P, Scala E., 2009, Allergen databases: current status and perspectives. Curr. Allergy Asthma Rep., 9, 376-383.
105. Markiewicz L.H., Szymkiewicz A., Szyc A., Wróblewska B., 2016, A simultaneous two-colour detection method of human IgG-and IgE-reactive proteins from lactic acid bacteria. Journal of microbiological methods, 126, 72-75.
106. Marknell DeWitt A., Mattsson L., Lauer I., Reese G., Lidholm J., 2004, Recombinant tropomyosin from *Penaeus aztecus* (rPen a 1) for measurement of specific immuno-globulin E antibodies relevant in food allergy to crustaceans and other invertebrates. Mol Nutr. Food Res., 48, 5, 370-379.
107. Martinez Barrio A., Soeria-Atmadia D., Nistér A., Gustafsson M. G., Hammerling U., Bongcam-Rudloff E., 2007, EVALLER: a web server for *in silico* assessment of potential protein allergenicity. Nucleic Acids Res., 35, W694-W700.
108. Marzano V., Tilocca B., Fiocchi A.G., Vernocchi P., Mortera S.L., Urbani A., Roncada P., Putignani L., 2020, Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics. J. Proteom., 215, 103636.
109. Matsuda R., Kolli V., Woods M., Dodds E.D., Hage D.S., 2016, Optimizing sequence coverage for a moderate mass protein in nano-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Anal. Biochem., 509, 115-117.
110. Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Suárez J.C., Moreno-Hernández J.M., Pacheco-Aguilar R., 2018, Seafood proteins. (w:) Proteins in food processing. Woodhead Publishing, 445-475.
111. Meng Z., Veenstra T.D., 2011, Targeted mass spectrometry approaches for protein biomarker verification. J. Proteom., 74(12) 2650-2659.

112. Mesuere B., Debyser G., Aerts M., Devreese B., Vandamme P., Dawyndt P., 2015, The Unipept metaproteomics analysis pipeline. Proteomics, 15(8), 1437-1442.
113. Mikita C. P., Padlan, E. A., 2007, Why is there a greater incidence of allergy to the tropomyosin of certain animals than to that of others? Med. Hypotheses, 69, 5, 1070-1073.
114. Millán-Martín S., Carillo S., Füssl F., Sutton J., Gazis P., Cook K., Scheffler K., Bones J., 2021, Optimisation of the use of sliding window deconvolution for comprehensive characterisation of trastuzumab and adalimumab charge variants by native high resolution mass spectrometry. Eur. J. Pharm. Biopharm.,158, 83-95.
115. Minkiewicz P., Bucholska J., Darewicz M., Borawska J., 2012, Epitopic hexapeptide sequences from Baltic cod parvalbumin beta (allergen Gad c 1) are common in the universal proteome. Peptides, 38, 105-109.
116. Minkiewicz P., Darewicz M., Iwaniak A., Sokołowska J., Starowicz P., Bucholska J., Hrynkiewicz M., 2015b, Common amino acid subsequences in a universal proteome-relevance for food science. Int. J. Mol. Sci., 16, 20748-20773.
117. Minkiewicz P., Dziuba J., Gładkowska-Balewicz I., 2011, Update of the list of allergenic proteins from milk based on local amino acid sequence identity with known epitopes from bovine milk proteins – a short report. Pol. J. Food Nutr. Sci., 61, 153-158.
118. Minkiewicz P., Iwaniak A., Darewicz M., 2019, BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities. Int. J. Mol. Sci., 20, 5978.
119. Minkiewicz P., Protasiewicz M., Darewicz M., Hurman K., Iwaniak A., 2013, Mining the protein space to determine prevalence of fragments identical with allergenic epitopes – chicken egg protein fragments as an example. 245th American Chemical Society National Meeting and Exposition, New Orleans, LA, USA, Chemical Information Division (CINF) 51.
120. Minkiewicz P., Sokołowska J., Darewicz M., 2015a, The occurrence of sequences identical with epitopes from the allergen Pen a 1.0102 among food and non-food proteins. Polish J. Food Nutr. Sci., 65(1) 21-29.
121. Mishyna M., Glumac M., 2021, So different, yet so alike Pancrustacea: Health benefits of insects and shrimps. J. Funct. Foods, 76, 104316.
122. Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G. A., Sonnhammer E. L., Tosatto S.C.E., Paladin L., Raj S., Richard L.J., Finn R.D., Bateman A., 2021, Pfam: The protein families database in 2021. Nucleic Acids Res., 49(D1), D412-D419.
123. Miyazawa H., Fukamachi H., Inagaki Y., Reese G., Daul C.B., Lehrer S.B., Inouye S., Sakaguchi M., 1996, Identification of the first major allergen of a squid (*Todarodes pacificus*). J. Allergy Clin. Immunol. 98, 5 Pt 1, 948-953.

124. Motoyama K., Ishizaki S., Nagashima Y., Shiomi K., 2006, Cephalopod tropomyosins: identification as major allergens and molecular cloning. Food Chem. Toxicol. 44, 12, 1997-2002.
125. Motoyama K., Suma Y., Ishizaki S., Nagashima Y., Lu Y., Ushio H., Shiomi K., 2008, Identification of tropomyosins as major allergens in antarctic krill and mantis shrimp and their amino acid sequence characteristics. Mar. Biotechnol. (NY) 10, 6, 709-718.
126. Motoyama K., Suma Y., Ishizaki S., Nagashima Y., Shiomi K., 2007, Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans. J. Agric. Food Chem. 55, 3, 985-991.
127. Nagai H., Minatani T., Goto K., 2015, Development of a method for crustacean allergens using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. AOAC Int. 98(5), 1355-1365.
128. Nakamura A., Watanabe K., Ojima T., Ahn D.H., Saeki H., 2005, Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. J. Agric. Food Chem., 53(19), 7559-7564.
129. Nakano S., Yoshinuma T., Yamada T., Reactivity of shrimp allergy related IgE antibodies to krill tropomyosin. Int. Arch. Allergy Immunol. 145, 3, 175-181.
130. Naqpal S., Rajappa L., Metcalfe D.D., Rao P.V., 1989, Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). J. Allergy Clin. Immunol. 83, 1 26-36.
131. Nawrocka M., Szulińska M., Bogdański P., 2015, Rola mikroflory jelitowej w patogenezie i leczeniu otyłości oraz zespołu metabolicznego. Forum Zaburzeń Metabolicznych, 6, 3, 95-102.
132. Nesbit J.B., Schein C.H., Braun B.A., Gipson S.A.Y., Cheng H., Hurlburt B. K., Maleki S.J., 2020, Epitopes with similar physicochemical properties contribute to cross reactivity between peanut and tree nuts. Mol. Immunol., 122 223–231.
133. Ngo D-H., Vo T-S., Ngo D-N., Wijesekara I., Kim S-K., 2012, Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. Int. J. Biol. Macromol. 51, 378-383.
134. Nordengrün M., Michalik S., Völker U., Bröker B.M., Gómez-Gascón L., 2018, The quest for bacterial allergens. Int. J. Med. Microbiol., 308(6), 738-750.
135. Nugraha R., Kamath S.D., Johnston E., Karnaneedi S., Ruethers T., Lopata A.L., 2019, Conservation analysis of B-cell allergen epitopes to predict clinical cross-reactivity between shellfish and inhalant invertebrate allergens. Front. Immunol., 10 2676.

136. Nugraha R., Ruethers T., Johnston E.B., Rolland J.M., O'Hehir R.E., Kamath S.D., Lopata A.L., 2021, Effects of extraction buffer on the solubility and immunoreactivity of the pacific oyster allergens. Foods, 10(2), 409.
137. Oluwaniyi O.O., Dosumu O.O., Awolola G.V., 2017, Effect of cooking method on the proximate, amino acid and fatty acid compositions of *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus*. J. Turkish Chem. Soc. Sect. Chem., 4(1), 115-132.
138. Ortea I., O'Connor G., Maquet A., 2016, Review on proteomics for food authentication. J. Proteomics. 147 212-225.
139. Palmer L.K., Marsh J.T., Lu M., Goodman R. E., Zeece M.G., Johnson P.E., 2020, Shellfish tropomyosin IgE cross-reactivity differs among edible insect species. Mol. Nutr. Food Res., 64(8), 1900923.
140. Pałgan K., Bartuzi Z., 2012, Czynniki genetyczne i środowiskowe w rozwoju alergii na pokarmy. Postepy Hig. Med. Dosw., 66, 385-391.
141. Pekar J., Ret D., Untersmayr E., 2018, Stability of allergens. Mol. Immunol., 100, 14-20.
142. Pilolli R., Nitride C., Gillard N., Huet A.C., van Poucke C., de Loose M., Tranquet O., Larré C., Adel-Patient K., Bernard H., Mills E.N.C., Monaci L., 2020, Critical review on proteotypic peptide marker tracing for six allergenic ingredients in incurred foods by mass spectrometry. Food Res. Int., 128, 108747.
143. Piñeiro C., Carrera M., Cañas B., Lekube X., Martinez I., 2015, Proteomics and food analysis: principles, techniques, and applications. Handbook of Food Analysis - Two Volume Set. Red. Nollet L. M. L., Toldra F., Taylor and Francis, 369-391.
144. Radauer C., Bublin M., Wagner S., Mari A., Breiteneder H., 2008, Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. J Allergy Clin. Immunol. 121, 847-852.
145. Ravkov E.V., Pavlov I.Y., Martins T.B., Gleich G.J., Wagner L.A., Hill H.R., Delgado J.C., 2013, Identification and validation of shrimp-tropomyosin specific CD4 T cell epitopes. Hum. Immunol., 74(12), 1542-1549.
146. Reese G., Ayuso R., Lehrer S.B., 1999, Tropomyosin: an invertebrate pan–allergen. Int. Arch. Allergy Immunol. 119(4) 247-258.
147. Reese G., Schicktanz S., Lauer I., Randow S., Luttkopf D., Vogel L., Lehrer S.B., Vieths S., 2006, Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, Penaeus aztecus. Clin Exp Allergy 36, 4, 517-524.

148. Reese G., Viebranz J., Leong-Kee S.M., Plante M., Lauer I., Randow S., Moncin M.S., Ayuso R., Lehrer S.B., Vieths S., 2005, Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). J Immunol. 175, 12, 8354-8364.
149. Rodríguez E.M., Ortea I., 2017, Food Authentication of Seafood Species. (w:) Proteomics in food science. Red. Michelle L. Colgrave M.L. Academic Press, 331-342.
150. Roepstorff P., Fohlman J., 1984, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed. Mass Spectrom., 11, 601.
151. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) Nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. W sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=PL).
152. Ruethers T., Taki A.C., Johnston E.B., Nugraha R., Le T.T.K., Kalic T., McLean T.R., Kamath S.D., Lopata A.L., 2018, Seafood allergy: a comprehensive review of fish and shellfish allergens. Mol. Immunol. 100 28-57.
153. Ruethers T., Taki A.C., Karnaneedi S., Nie S., Kalic T., Dai D., Daduang S., Leeming M., Williamson N.A., Breiteneder H., Mehr S.S., Kamath S.D., Campbell D.E., Lopata A.L., 2021, Expanding the allergen repertoire of salmon and catfish. Allergy, 76(5), 1443-1453.
154. Salla V., Murray K.K., 2013, Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of shrimp. Anal. Chim. Acta., 794, 55-59.
155. Santiago H.C., Bennuru S., Boyd A., Eberhard M., Nutman T.B., 2011, Structural and immunologic cross-reactivity among filarial and mite tropomyosin: implications for the higiene hypothesis. J. Allergu Clin. Immunol. 127, 479-486.
156. Sen M., Kopper R., Pons L., Abraham E.C., Burks A.W., Bannon G.A., 2002. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. J. Immunol. 169, 882–887.
157. Schoch C.L., Ciufo S., Domrachev M., Hotton C.L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., Mcveigh R., O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan J.P., Sun L., Turner S., Karsch-Mizrachi I., 2020, NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database, baaa062.
158. Shanti K.N., Martin B.M., Nagpal S., Metcalfe D.D., Rao P.V., 1993, Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. J. Immunol. 151(10), 5354-5363.
159. Shevchenko A., Valcu C-M., Junqueira M., 2009, Tools for exploring the proteomosphere. J. Proteomics. 72, 137-144.

160. Shibahara Y., Yamada I., Uesaka Y., Uneo N., Abe A., Ohashi E., Shiomi K., 2009, Extraction method suitable for detection of unheated crustaceans including cephalothorax by ELISA. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 50, 4, 153-159 (artykuł po Japońsku, streszczenie po angielsku).
161. Siekierzyńska A., Piasecka-Kwiatkowska D., Litwińczuk W., Burzyńska M., Myszka A., Karpiński P., Żygała E., Piórecki N., Springer E., Sozański T., 2021, Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties. International journal of molecular sciences 22(7), 3527.
162. Skowron M., Grabowska-Polanowska B., Waligórski P., Faber J., Śliwka I., Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), jako przykład techniki łączonej-podstawy teoretyczne i przykłady zastosowań. Raport Nr 2089/Ch, Instytut Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk, Kraków 2016
163. Smillie L.B., 1979, Structure and functions of tropomyosins from muscle and non-muscle sources. Trends Biochem. Sci. 4, 151-155.
164. Stella R., Sette G., Moressa A., Gallina A., Aloisi A.M., Angeletti R., Biancotto G., 2020, LC-HRMS/MS for the simultaneous determination of four allergens in fish and swine food products. Food Chem., 331, 127276.
165. Strona Polskiego Towarzystwa Alergologicznego: https://www.pta.med.pl/alergia-i-astma/alergia-info/czym-jest-alergia/, dostęp: wrzesień 2020.
166. Suder P., Bodzoń-Kułakowska A., Silbering J. (red.), Spektrometria mas. Wydawnictwa AGH, Kraków 2016, 66-79.
167. Suder P., Bodzoń-Kułakowska A., 2016, Aparatura. Techniki jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym. (w:) Spektrometria mas. Red. Suder P., Bodzoń-Kułakowska A., Silbering J. Wydawnictwa AGH, Kraków, 66-79.
168. Suder P., Noga M., 2016, Tandemowa spektrometria mas. (w:) Spektrometria mas. Red. Suder P., Bodzoń-Kułakowska A., Silbering J. Wydawnictwa AGH, Kraków 244-270.
169. Teodorowicz M., van Neerven J., Savelkoul H., 2017, Food processing: the Influence of the Maillard reaction on immunogenicity and allergenicity of food proteins. Nutrients, 9(8), 835.
170. The UniProt Consortium 2021, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Res., 49, D480–D489.
171. Thiede B., Höhenwarter W., Krah A., Mattow J., Schmid M., Schmidt F., Jungblut, P.R., 2005, Peptide mass fingerprinting. Methods, 35(3) 237-247.

172. Tóth G., Panić-Janković T., Mitulović G., 2019, Pillar array columns for peptide separations in nanoscale reversed-phase chromatography. J. Chromatogr. A, 1603, 426-432.
173. Tran N.H, Qiao R, Xin L, Chen X, Liu C, Zhang X, Shan B, Ghodsi A, Li M., 2018, Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry. Nat. Methods. 16(1), 63-66.
174. Usui M., Harada A., Ishimaru T., Sakumichi E., Saratani F., Sato-Minami C., Azakami H., Miyasaki T., Hanaoka K. I., 2013, Contribution of structural reversibility to the heat stability of the tropomyosin shrimp allergen. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77, 5, 948-953.
175. Vickery B.P., Chin S., Burks A.W., 2011. Pathophysiology of food allergy. Pediatr Clin. North Am. 58, 363–376.
176. Vita R., Mahajan S., Overton J.A., Dhanda S.K., Martini S., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Sette A., Peters B., 2019, The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. Nucleic Acids Res. 47(D1), D339-D343.
177. Wa C., Cerny R., Hage D.S., 2006, Obtaining high sequence coverage in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry for studies of protein modification: analysis of human serum albumin as a model. Anal. Biochem., 349(2) 229-241.
178. Wal J. M., Løvik M., 2007, Integrative approaches to assessing the allergenicity of foods. (w:) Managing Allergens in Food. Woodhead Publishing, Wielka Brytania 207-227.
179. Walker M. J., Burns D. T., Elliott C. T., Gowland M. H., Clare Mills E. N., 2016, Is food allergen analysis flawed? Health and supply chain risks and a proposed framework to address urgent analytical needs. Analyst, 141, 24-35.
180. Wang J., Ge M., Sun L., Ahmed I., Li W., Lin H., Lin H., Li Z., 2021, Quantification of crustacean tropomyosin in foods using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. J. Sci. Food Agric. 101, 5278-5285.
181. Wawrzeńczyk A, Bartuzi Z., 2018, Zespoły kliniczne alergii krzyżowej. Alerg. Astma Immunol., 23(2), 64-66.
182. Werfel T., Asero R, Ballmer-Weber B.K., Beyer K., Enrique E., Knulst A.C., Mari A., Muraro A., Ollert M., Poulsen L.K., Wieths S., Worm M., 2015, Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. Allergy 70, 1079-1090.
183. Winterová R., Bartošková M.P., Kejík Z., Rysová J., Laknerová I., Urban M., Šmídová Z., 2021, Food allergies and intolerances–A review. Czech J. Food Sci., 39(5), 329-339.

184. Willits E.K., Park M.A., Hartz M.F., Schleck C.D., Weaver A. L., Joshi A.Y., 2018, Food allergy: a comprehensive population-based cohort study. Mayo Clin. Proc. 93(10), 1423-1430.
185. Wong L., Tham E. H., Lee B. W., 2019, An update on shellfish allergy. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol., 19, 3 236-242.
186. Wróblewska B., Markiewicz L.H., Szyc A.M., Dietrich M.A., Szymkiewicz A., Fotschki J., 2016, Lactobacillus casei LcY decreases milk protein immunoreactivity of fermented buttermilk but also contains IgE-reactive proteins. Food Research International, 83, 95-101.
187. Xu G., Stupak J., Yang L., Hu L., Guo B., Li J., 2018, Deconvolution in mass spectrometry-based proteomics. Rapid Commun. Mass Spectrom., 32(10), 763-774.
188. Yadzir Z.H., Misnan R., Abdullah N., Bakhtiar F., Arip M., Murad S., 2012, Identification of the major allergen of *Macrobrachium rosenbergii* (giant freshwater prawn). Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2, 1, 50-54.
189. Yu Y., Liu H., Tu M., Qiao M., Wang Z., Du M., 2017, Mass spectrometry analysis and *in silico* prediction of allergenicity of peptides in tryptic hydrolysates of the proteins from *Ruditapes philippinarum*. J. Sci. Food Agric, 97, 15, 5114-5122.
190. Zaghi A.N., Barbalho S.M., Guiguer E.L., Otoboni A.M., 2019, Frying process: From conventional to air frying technology. Food Rev. Int., 35(8), 763-777.
191. Zhang J., Xin L., Shan B., Chen W., Xie M., Yuen D., Zhang W., Zefeng Zhang Z., Lajoie G.A., Ma B., 2012, PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. Mol. Cell. Proteomics, 11(4).
192. Zielińska-Dawidziak M., Górecka P., Piasecka-Kwiatkowska D., 2015, Immunoreactivity of selected wines commercially available in Poland. Czech J. Food Sci., 33(4), 361-366.
193. Zhang Y., Fonslow B.R., Shan B., Baek M.C., Yates J.R., 2013, Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. Chem. Rev., 113 2343-2394.
194. Zhang Q., Wang Y., Fu L., 2020, Dietary advanced glycation end-products: perspectives linking food processing with health implications. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 19(5) 2559-2587.
195. Zheng C., Chen A., 2014, System biological research on food quality for personalised nutrition and health using foodomics techniques: A review. J. Food Nutr. Res., 2(9), 608-616.
196. Zheng L.N., Lin H., Pawar R. Li Z.X., Li M.H., 2011, Mapping IgE binding epitopes of major shrimp (*Penaeus monodon*) allergen with immunoinformatics tools. Food Chem. Toxicol. 49, 11 2954-2960.

197. Zhu B., Dong X., Sun L., Xiao G., Chen X., Murata Y., Yu C., 2011, Effect of thermal treatment on the texture and microstructure of abalone muscle (*Haliotis discus*). Food Sci. Biotechnol., 20(6), 1467-1473.

KOMPUTEROWE BAZY DANYCH I PROGRAMY WYKORZYSTANE W PRACY

1. **Allergome:** http://www.allergome.org/index.php, dostęp: kwiecień 2019.
2. **AllFam:** http://www.meduniwien.ac.at/allfam/, dostęp: kwiecień 2019.
3. **BIOPEP-UWM:** http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep, dostęp: luty 2019.
4. **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool):** https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, dostęp: lipiec 2020.
5. **Fragment Ion Calculator:** http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html, dostęp: czerwiec 2021.
6. **Heatmapper:** http://www.heatmapper.ca/, dostęp: lipiec 2020.
7. **Image Master 2D Platinum 2.0** (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone).
8. **Immune Epitope Database:** https://www.iedb.org/, dostęp: sierpień 2020, grudzień 2021.
9. **Interpro:** https://www.ebi.ac.uk/interpro/, dostęp: lipiec 2020.
10. **LabSolutions Insight wersja 3.5** (Shimadzu, Tokio, Japonia).
11. **LabSolutions wersja 5** (Shimadzu, Tokio, Japonia).
12. **NCBI Taxonomy (National Center for Biotechnology Information):** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy, dostęp: luty 2019, lipiec 2020.
13. **PEAKS wersja 10.0** (Bioinformatics Solutions Inc, Waterloo, Ontario, Kanada).
14. **Pfam**: https://pfam.xfam.org/, dostęp: lipiec 2020.
15. **PROSITE:** https://prosite.expasy.org/, dostęp: kwiecień 2020.
16. **SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins)**: https://fermi.utmb.edu/, dostęp: kwiecień 2019.
17. **SWISS-MODEL:** https://swissmodel.expasy.org/, dostęp: kwiecień 2020.
18. **Unipept:** https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021.
19. **UniProt:** https://www.uniprot.org/, dostęp: luty 2019, lipiec 2020, czerwiec 2021.

SPIS ILUSTRACJI

Rys. 1. Uproszczona systematyka organizmów stanowiących owoce morza. Na podst. NCBI Taxonomy [Schoch i in. 2020], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy, dostęp: lipiec 2020. 16

Rys. 2. Teoretyczna struktura trójwymiarowa homodimeru tropomiozyny *Penaeus aztecus* (UniProtKB ID: Q3Y8M6) i sekwencja białka, z zaznaczonym odcinkiem zgodnym z sygnaturą L-K-[EAD]-A-E-x-R-A-[ET]. Model białka pobrano z bazy SWISS-MODEL (ID: 1c1g.2) [Waterhouse i in. 2018], https://swissmodel.expasy.org/, dostęp: kwiecień 2020. 19

Rys. 3. Regiony wiążące przeciwciała IgE (nakładające się epitopy liniowe) w sekwencji aminokwasowej tropomiozyny *Penaeus aztecus* (UniProtKB ID: Q3Y8M6), według Ayuso i in. 2002 (kolor szary), Ravkov i in. 2013 (kolor żółty), Albrecht i in. 2009 (kolor zielony) i Reese i in. 2005 (kolor niebieski). Sekwencje epitopów pobrano z Immune Epitope Database [Vita i in. 2019], https://www.iedb.org/, dostęp: sierpień 2020. 22

Rys. 4. Plan badań. 33

Rys. 5. Przygotowanie produktów przed ekstrakcją. 36

Rys. 6. Gradient stężenia roztworu B, zastosowany podczas analizy RP-LC-MS. 39

Rys. 7. Gradient stężenia roztworu B, zastosowany podczas analizy RP-LC-MS/MS. 40

Rys. 8. Schemat wyboru peptydów podczas analizy *in silico* oraz wizualizacji jej wyników. 44

Rys. 9. Mapa ciepła obrazująca częstość występowania sekwencji danego peptydu w ogólnej liczbie tropomiozyn w bazie UniProtKB, wyrażoną jako procent udziału tej liczby w ogólnej liczbie sekwencji w bazach InterPro (100%=7502) i Pfam (100%=4673) (wartości uszeregowano malejąco). Rysunek wygenerowano w programie Heatmapper [Babicki i in. 2016], http://www.heatmapper.ca/, dostęp: lipiec 2020. 45

Rys. 10. Żele po rozdzielaniu elektroforetycznym białek z surowców rozmrożonych, przed (a) i po hydrolizie (b). Spośród prążków wykrytych automatycznie przez oprogramowanie Image Master 2D Platinum 2.0. (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone) zaznaczono te pochodzące od białek o masach zbliżonych do mas tropomiozyn (Rys. a). Dwie skrajne linie zawierają wzorce mas cząsteczkowych. 47

Rys. 11. Żele po rozdzielaniu elektroforetycznym białek z produktów ugotowanych i gotowych do spożycia, przed (a) i po hydrolizie (b). Spośród prążków wykrytych automatycznie przez oprogramowanie Image Master 2D Platinum 2.0. (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone) zaznaczono te pochodzące od białek o masach zbliżonych do mas tropomiozyn (Rys. a). Dwie skrajne linie zawierają wzorce mas cząsteczkowych. 48

Rys. 12. Żele po rozdzielaniu elektroforetycznym białek z produktów smażonych, przed (a) i po hydrolizie (b). Spośród prążków wykrytych automatycznie przez oprogramowanie Image

Master 2D Platinum 2.0. (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone) zaznaczono te pochodzące od białek o masach zbliżonych do mas tropomiozyn (Rys. a). Dwie skrajne linie zawierają wzorce mas cząsteczkowych. 49

Rys. 13. Schemat korekty wyboru peptydów podczas analizy laboratoryjnej. 53

Rys. 14. Chromatogramy z analizy hydrolizatów białek, wyekstrahowanych z produktu nr 1 (sałatka z surowych owoców morza). Poszczególne chromatogramy odpowiadają produktom poddanym przed ekstrakcją: b – rozmrożeniu, c – gotowaniu, d – smażeniu. Chromatogram oznaczony literą a pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7. 54

Rys. 15. Chromatogramy z analizy hydrolizatów białek, wyekstrahowanych z produktu nr 2 (krewetka kidi, *P. stylifera*). Poszczególne chromatogramy odpowiadają produktom poddanym przed ekstrakcją: b – rozmrożeniu, c – gotowaniu, d – smażeniu. Chromatogram oznaczony literą „a" pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7. 54

Rys. 16. Chromatogramy z analizy hydrolizatów białek, wyekstrahowanych z produktu nr 4 (omułki chilijskie, *M. chilensis*). Poszczególne chromatogramy odpowiadają produktom poddanym przed ekstrakcją: b – rozmrożeniu, c – gotowaniu, d – smażeniu. Chromatogram oznaczony literą „a" pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7. 55

Rys. 17. Chromatogram z analizy hydrolizatu białek (b), wyekstrahowanych z produktu nr 6 („Ogonki raków z czosnkiem i pietruszką", rak luizjański *P. clarkii*). Chromatogram oznaczony literą „a" pochodzi z próbki ślepej (mieszanina o składzie: woda : acetonitryl : kwas mrówkowy, 95:5:0,1 [v/v]). Zastosowano gradient według Rys. 7. 55

Rys. 18. Mapa ciepła obrazująca obecność peptydów zidentyfikowanych w badanych hydrolizatach. Kolor żółty oznacza, że peptyd był obecny, kolor niebieski zaś, że peptyd był nieobecny w danej próbce. „*" - peptyd był produktem symulowanej proteolizy trypsyną *in silico* sekwencji aminokwasowych tropomiozyn; „+" - peptyd zidentyfikowany *de novo*. Pozostałe peptydy zawierały niezhydrolizowane wiązania, które teoretycznie powinny być podatne na działanie trypsyny (ang. missed cleveages). Wygenerowano w programie Heatmapper [Babicki i in. 2016], http://www.heatmapper.ca/, dostęp: lipiec 2020. 58

Rys. 19. Porównanie liczb wykrytych peptydów i peptydów z modyfikacjami (a) i ich średniej długości (b) w próbkach poddanych różnym procesom obróbki: a- rozmrożeniu, b – gotowaniu, c- smażeniu. Średnią oraz odchylenie standardowe obliczono według równań (odpowiednio) (4.3) i (4.2). 59

Rys. 20. Widma fragmentacyjne peptydu MQQLENDLDQVQESLLK, wygenerowane w programie PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012]. Małe litery q i n w sekwencjach aminokwasowych peptydów oznaczają deamidację, odpowiednio glutaminy i asparaginy. . 61

Rys. 21. Widma fragmentacyjne peptydu VAECESEIQGLNR, wygenerowane w programie PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012]. Mała litera c w sekwencjach aminokwasowych peptydów oznacza karbamidometylację cysteiny, a q deamidację glutaminy. 62

Rys. 22. Drzewo filogenetyczne, przedstawiające obecność peptydu IQLLEEDLER w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021. 64

Rys. 23. Drzewo filogenetyczne, przedstawiające obecność peptydu IVELEEELR w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021. 64

Rys. 24. Drzewo filogenetyczne, przedstawiające obecność peptydu LAITEVDLER w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021. 65

Rys. 25. Położenie peptydów zidentyfikowanych metodą RP-LC-MS/MS w próbce 2 (krewetka kidi, *P. stylifera*) w sekwencji tropomiozyny krewetki błotnej *Metapenaeus ensis* (UniProtKB ID: Q25456); a – próbka mrożona; b – próbka ugotowana, c – próbka usmażona. Na niebiesko zostały podkreślone peptydy zidentyfikowane w całości, na szaro - fragmenty peptydów zsekwencjonowanych *de novo,* dla których wartość pewności masy (ang. mass confidence) wynosiła ≥90%. Fragmenty sekwencji tropomiozyny *M. ensis,* które pokrywają się ze zidetyfikowanymi peptydami zostały zacieniowane na szaro. Rysunek wygenerowano w programie PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012]. 68

Rys. 26. Pokrycie sekwencji aminokwasowych tropomiozyn z analizowanych próbek z sekwencjami niektórych alergennych tropomiozyn. Próbki a, b i c oznaczają odpowiednio próbki uzyskane z produktu mrożonego, ugotowanego i usmażonego. Próbki 5 i 6 pochodzą z produktów gotowych do spożycia. Nazwy wykorzystanych produktów, wraz z ich identyfikatorami, przedstawiono w tabeli 3..... 69

SPIS TABEL

Tabela 1. Przykładowe alergenne tropomiozyny jadalnych gatunków owoców morza (według baz Allergome [Mari i in. 2009], http://www.allergome.org/index.php, dostęp: kwiecień 2019 i SDAP - Structural Database of Allergenic Proteins [Ivanciuc i in. 2003], https://fermi.utmb.edu/, dostęp: kwiecień 2019). 24

Tabela 2. Produkty wykorzystane jako surowce do eksperymentów laboratoryjnych. 34

Tabela 3. Masy cząsteczkowe tropomiozyn wybranych gatunków owoców morza. Na podst. UniProtKB [UniProt Consortium 2020], https://www.uniprot.org/ dostęp: czerwiec 2021. . 50

Tabela 4. Masy przykładowych (najintensywniejszych) jonów pseudomolekularnych białek o masach zbliżonych do tropomiozyn, obecnych w badanych próbkach..... 51

Tabela 5. Średnia arytmetyczna i odchylenie standardowe czasów retencji zidentyfikowanych peptydów..... 57

Tabela 6. Epitopy alergennych tropomiozyn zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej sekwencję peptydu IQLLEEDLER (pogrubiona czcionka) oraz ich stopień pokrycia..... 66

Tabela 7. Epitopy alergennych tropomiozyn obecne w sekwencji peptydu RMQQLENDLDQVQESLLK oraz ich stopień pokrycia. 67

Tabela 8. Podsumowanie analizy bioinformatycznej i laboratoryjnej peptydów z tropomiozyn, wytypowanych jako uniwersalne markery peptydowe alergennych tropomiozyn. 76

SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

Załącznik 1. Sekwencje aminokwasowe tropomiozyn wybranych owoców morza oraz produkty ich proteolizy trypsyną w warunkach *in silico* (przeprowadzono za pomocą narzędzi dostępnych w bazie BIOPEP-UWM [Minkiewicz i in. 2019], http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie), dostęp: luty 2019. 117

Załącznik 2. Procentowy udział obecności poszczególnych peptydów w analizowanych sekwencjach tropomiozyn mięczaków i skorupiaków. 134

Załącznik 3. Określenie przybliżonych mas cząsteczkowych tropomiozyn metodą spektrometrii mas. Obrazy pochodzą z programów LabSolutions wersja 5 (Shimadzu, Tokio, Japonia) i LabSolutions Insight wersja 3.5 (Shimadzu, Tokio, Japonia). 137

Załącznik 4. Peptydy zidentyfikowane w próbkach po analizie RP-LC-MS/MS. Identyfikacji dokonano za pomocą oprogramowania PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012]. Na szaro zaznaczono peptydy zidentyfikowane *de novo.* 165

Załącznik 5. Epitopy alergennych tropomiozyn, zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej całe sekwencje lub fragmetnty peptydów (będących produktami hydrolizy tropomiozyn trypsyną), zidentyfikowanych w produktach spożywczych po hydrolizie białek, oraz ich stopień pokrycia (SCC – ang. sequence cross-coverage). „b.d.” oznacza brak informacji na temat pochodzenia epitopu. 174

Załącznik 6. Epitopy alergennych tropomiozyn, zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej całe sekwencje lub fragmenty peptydów, zidentyfikowanych w produktach spożywczych ugotowanych (1b 2b, 3b) i gotowych do spożycia (5, 6), po hydrolizie wyekstrahowanych z nich białek oraz ich stopień pokrycia (SCC – ang. sequence cross-coverage). 177

Załącznik 7. Drzewa filogenetyczne, przedstawiające obecność poszczególnych zidentyfikowanych peptydów w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021. 183

Załącznik 8. Tropomiozyny dopasowane przez program PEAKS do tropomiozyn obecnych w próbkach, na podstawie sekwencji aminokwasowych zidentyfikowanych peptydów. 187

WYKAZ SKRÓTÓW

AGE	ang. advanced glycation end products – końcowe produkty zaawansowanej glikacji
AQUA	ang. absolute quantification – bezwzględne oznaczanie ilościowe
CHCA	ang. α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid – kwas alfa-cyjano-4-hydroksycynamonowy
CID	ang. collision induced dissociation – rozpad pobudzony przez kolizję
DDA	ang. data-dependent aquisition - akwizycja zależna od danych
EAACI	ang. European Academy of Allergy and Clinical Immunology - Europejska Akademia Alergologii i Immunologii Klinicznej
ELISA	ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – test immunoenzymatyczny
ESI	ang. electrospray ionization – źródło jonów elektrosprej / jonizacja za pomocą elektrorozpylania
FAO	ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organizacja Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa
IgE	ang. immunoglobulin E - immunoglobulina E
IT	ang. ion trap – pułapka jonowa
LC	ang. liquid chromatography – chromatografia cieczowa
LC-MS	ang. liquid chromatography – mass spectrometry – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
MALDI	ang. matrix-assisted laser desorption ionization – desorpcja/jonizacja laserowa wspomagana matrycą
MHC	w zależności od kontekstu: ang. major histocompatibility complex - zespół białek odpowiedzialny za prezentację antygenu limfocytom T lub ang. myosin heavy chain – ciężki łańcuch miozyny
MLC	ang. myosin light chain – lekki łańcuch miozyny
MRM	ang. multiple reaction monitoring – monitorowanie reakcji następczych
MS	ang. mass spectrometry – spektrometria mas
MS/MS lub MS^2	tandemowa spektrometria mas
PBS	ang. Phosphate-buffered saline - roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanem
PCR	ang. polymerase chain reaction – reakcja łańcuchowa polimerazy
PMF	ang. peptide mass fingerprint – technika identyfikacji białek
ppm	ang. parts per milion - liczba części na milion

Q-IT	kwadrupol z pułapką jonową
QQQ	potrójny kwadrupol
Q-TOF	kwadrupol z analizatorem czasu przelotu
RP-LC	ang. Reversed phase liquid chromatography - chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
SA	ang. sinapic acid – kwas synapinowy
TOF	ang. Time-of-Flight – czas przelotu
SCC	ang. sequence cross-coverage - stopień pokrycia sekwencji peptydu z sekwencją epitopu
SDS-PAGE	ang. SDS poliacrylamide gel electrophoresis – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
SIM	ang. selected ion monitoring – tryb, w którym rejestrowany jest tylko jon o określonej wartości m/z
SPE	ang. solid phase extraction – ekstrakcja do fazy stałej
SRM	ang. selected reaction monitoring – tryb, w którym rejestrowany i fragmentowany jest tylko jon o określonej wartości m/z

Skróty i symbole oraz masy cząsteczkowe aminokwasów białkowych [Suder i in. 2016]

Nazwa	**Skrót**	**Symbol**	**Masa reszty aminokwasowej [Da]**	
			monoizotopowa	**uśredniona**
Alanina	Ala	A	71,0371	71,0790
Arginina	Arg	R	156,1011	156,1881
Asparagina	Asn	N	114,0429	114,1041
Cysteina	Cys	C	103,00928	103,1434
Glicyna	Gly	G	57,0215	57,0520
Fenyloalanina	Phe	F	147,0684	147,1771
Glutamina	Gln	Q	128,0586	128,1310
Histydyna	His	H	137,0589	137,1415
Izoleucyna	Ile	I	113,0840	113,1600
Kwas asparaginowy	Asp	D	115,0270	115,0887
Kwas glutaminowy	Glu	E	129,0426	129,1157
Leucyna	Leu	L	113,0841	113,1600
Lizyna	Lys	L	128,0950	128,1747
Metionina	Met	M	131,0405	131,1974

Nazwa	Skrót	Symbol	Masa reszty aminokwasowej [Da]	
			monoizotopowa	uśredniona
Prolina	Pro	P	97,0528	97,1170
Seryna	Ser	S	87,0320	87,0783
Treonina	Thr	T	101,0477	101,1053
Tryptofan	Trp	W	186,0793	186,2139
Tyrozyna	Tyr	Y	163,0633	163,1764
Walina	Val	V	99,0684	99,1330

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1. Sekwencje aminokwasowe tropomiozyn wybranych owoców morza oraz produkty ich proteolizy trypsyną w warunkach *in silico* (przeprowadzono za pomocą narzędzi dostępnych w bazie BIOPEP-UWM [Minkiewicz i in. 2019], http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie), dostęp: luty 2019.

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
1.	**Q2V0V0 - *Octopus vulgaris*, Oct v 1**	6645	MDAIKKKMLAMKMERELATDKAEQTDQKLRDTE DNKNKLEEDLTTLQKKFSNLENDFDNAKEQLAEA NQKLETSEKRVGECESEIAGLNRRIQLLEEDLERSE ERLSTAQTKLDEASKAADESERGRKVLENRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADRKFDEAARKLAIT EVDLERAEARLEAAEAKIVELEEELKVVGNNMKS LEISEQEASQREDSYEETIRDLTHRLKEAENRAAEA ERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKAISDELDQT FAELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MER - ELATDK - **AEQTDQK** - LR - DTEDNK - NK - **LEEDLTTLQK** - K - **FSNLENDFDNA K** - **EQLAEANQK** - LETSEK - R - **VGECESEIAGLNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LSTAQTK** - LDEASK - **AA DESER** - GR - K - VLENR - **SQGDEER** - IDLLEK - QLEEAK - **WIAEDADR** - K - FDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AE AR - **LEAAEAK** - **IVELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTHR - LK - EAENR - AA EAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK - AISDELDQTFAELAGY
2.	**B4YAH6 – *Penaeus vannamei* (*Litopenaeus vannamei*), Lit v 1**	6689	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVHNLQKRMQQLENDLDQVQESLL KANIQLVEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQESLLK - **ANIQLVEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AE ER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AE FAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK - SITDELDQTFSELSGY
3.	**D7F1J4 - *Crangon crangon*, Cra c 1**	491138	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVFSLQKRMQQLENDLDSVQEALLK ANAHLEEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVFSLQK** - R - MQQLENDLDSVQEALLK - **ANAHLEEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AE ER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AE FAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
4.	**A1KYZ2 - *Penaeus monodon*, Pen m 1**	6687	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVHNLQKRMQQLENDLDQVQESLL KANIQLVEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQESLLK - **ANIQLVEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AE ER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AE FAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
5.	**Q25457 - *Mytilus edulis*, Myt e 1**	6550	MDAIKKKMVAMKMEKENALDRAEQLEQKLRETE EAKAKIEDDYNSLQKKSIQTENDLDNTQTQLQDV QAKYETTEKQIAEHEQEIQSLTRKISMLEEDIMKSE ERYTTAASKLEEASKAADESERNRKVLENLNCGN DERIDQLEKQLTEAKWIAEEADKKYEEAARKLAIT EVDLERAEARLEAAEAKVIDLEEQLTVVGANIKTL QVQNDQASQREDSYEETIRDLTNRLKDAENRATE AERTVSKLRKEVDRLEDELLTEKEKYKAISDELDA TFAELAGY	MDAIK - K - K - MVAMK - MEK - ENALDR - **AEQLEQK** - LR - ETEEAK - AK - **IEDDYNSLQK** - K - SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK - YETTEK - **QIAEHEQEIQSLTR** - K - **ISMLEEDIMK** - SEER - **YTTAASK** - LEEASK - **AADESER** - NR - K - **VLENLNCGNDER** - IDQLEK - QLTEAK - **WIAEEADK** - K - YEEAAR - K - **LAITEVDLER** - AE AR - **LEAAEAK** - VIDLEEQLTVVGANIK - **TLQVQNDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTNR - LK - DAENR - AT EAER - TVSK - LR - K - EVDR - **LEDELLTEK** - EK - YK - AISDELDATFAELAGY
6.	**P86704 - *Pandalus borealis*, Pan b 1**	6703	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVFGLQKKLQQLENDLDSVQEALLK ANQHLEEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVFGLQK** - K - LQQLENDLDSV QEALLK - **ANQHLEEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AE ER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AE FAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK - SITDELDQTFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
7.	**Q9N2R3 - *Charybdis feriata (Cancer feriatus),* Cha f 1**	65693	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NLRAEKTEEEIRATQKKMQQVENELDQAQEQLSA ANTKLDEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLPEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEK	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANLR - AEK - TEEEIR - ATQK - K - MQQVENELDQA QEQLSAANTK - LDEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLPEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AE ER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AE FAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK**
8.	**O44119 - *Homarus americanus,* Hom a 1**	6706	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NIRAEKTEEEIRITHKKMQQVENELDQVQEQLSLA NTKLEEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLERS EERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRSLS DEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARKL AMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLANKLKAAEA RAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITD ELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANIR - AEK - TEEEIR - ITHK - K - MQQVENELDQVQEQLSLANTK - LEEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AE ER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AE FAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK - SITDELDQTFSELSGY
9.	**Q25456 - *Metapenaeus ensis (Penaeus ensis),* Met e 1**	32278	MKLEKDNAMDRADTLEQQNKEANNRAEKSEEEV HNLQKRMQQLENDLDQVQESLLKANNQLVEKDK ALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLERSEERLNTATT KLAEASQAADESERMRKVLENRSLSDEERMDALE NQLKEARFLAEEADRKYDEVARKLAMVEADLER AEERAETGESKIVELEEELRVVGNNLKSLEVSEEK ANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAEARAEFAERSVQ KLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDELDQTFSELS GY	MK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQESLLK - **ANNQLVEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VL ENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQ K - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK - SITDELDQTFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
10.	**O61379 - *Panulirus stimpsoni*, Pan s 1**	71578	MKLEKDNAMDRADTLEQQNKEANIRAEKAEEEV HNLQKRMQQLENDLDQVQESLLKANTQLEEKDK ALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLERSEERLNTATT KLAEASQAADESERMRKVLENRSLSDEERMDALE NQLKEARFLAEEADRKYDEVARKLAMVEADLER AEERAETGESKFVELEEELRVVGNNLKSLEVSEEK ANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAEARAEFAERSVQ KLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDELDQTFSELS GY	MK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANIR - AEK - **AEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQESLLK - **ANTQLEEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VL ENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **FVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQ K - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK - SITDELDQTFSELSGY
11.	**Q3Y8M6 - *Penaeus aztecus*, *(Farfantepenaeus aztecus)*, Pen a 1**	6690	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVHNLQKRMQQLENDLDQVQESLL KANIQLVEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQESLLK - **ANIQLVEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AE ER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AE FAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
12.	**A2V716 - *Balanus rostratus*, Bal r 1**	399131	MDAIKKKMQAMKLEKENALDKAEQLEQKLRDVE ETKAKAEEDLTLLQKKYTNLENEFDQVNEQYNEG VTKLEVSEKRVTEAEDEIKGYTRRIQLLEDDLERTP VKLDEATFKLEDATKTADESERGRKVLESRSIADD DRIDALEKQVKDAKYVAEEADRKYDEAARKLAIT EVDLERSETRLEAAEAKITELSEELAVVGNNCKAL QNAVDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRAAE AERVVNKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKAISDELD QTFAELAGM	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - ENALDK - **AEQLEQK** - LR - DVEETK - AK - **AEEDLTLLQK** - K - YTNLENEFDQVNEQYNEGVTK - LEVSEK - R - **VTEAEDEIK** - GYTR - R - **IQLLEDDLER** - TPVK - LDEATFK - LEDATK - **TADESER** - GR - K - VLESR - **SIADDDR** - IDALEK - QVK - DAK - **YVAEEADR** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - SETR - **LEAAEAK** - ITELSEELAVVGNNCK - **ALQNAVDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - AAEAER - VVNK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – AISDELDQTFAELAGM

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
13.	**A2V735 – *Chionoecetes opilio*, Chi o 1**	41210	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDKADTLEQQNKEA NLRAEKTEEEIRANQKKSQLVENELDHAQEQLSA ATHKLVEKEKAFANAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKNIAD EMDQAFSELSGF	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDK - **ADTLEQQNK** - EANLR - AEK - TEEEIR - ANQK - K - SQLVENELDHAQEQLSAATHK - LVEK - EK - AFANAEGEVAALNR - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – NIADEMDQAFSELSGF
14.	**Q95WY0 - *Crassostrea gigas (Crassostrea angulata)*, Cra g 1**	29159	NSARGFDTVNEKYQECQTKMEEAEKTASEAEQEI QSLNRRIQLLEEDMERSEERLQTATEKLEEASKAA DESERNRKVLENLNNASEERTDVLEKQLTEAKLIA EEADKKYDEAARKLAITEVDLERAEARLEAAEAK VLELEEELKVVGNNMKSLEISEQEASQREDSYEETI RDLTQRLKDAENRATEAERTVSKLQKEVDRLEDE LLAEKERYKAISDELDQTFAELAGY	NSAR - GFDTVNEK - YQECQTK - MEEAEK - TASEAEQEIQSLNR - R - IQLLEEDMER - SEER - **LQTATEK** - LEEASK - **AADESER** - NR - K - **VLENLNNASEER** - TDVLEK - QLTEAK - **LIAEEADK** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **VLELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – AISDELDQTFAELAGY
15.	**O77246 - *Crassostrea virginica*, Cra v 1**	6565	RNRKVLENLNNASEERTDVLEKQLTEAKLIAEEAD KKYDEAARKLAITEVDLERAEARLEAAEAKVLEL EEELKVVGNNMKSLEISEQEASQREDSYEETIRDL TQRLKDAENRATEAERTVSKLQKEVDRLEDELLA EKERYKAISDELDQTFAELAGY	R - NR - K - **VLENLNNASEER** - TDVLEK - QLTEAK - **LIAEEADK** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **VLELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – AISDELDQTFAELAGY
16.	**A4URH3 - *Eriocheir sinensis*, Eri s 1**	95602	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKTEEEIRATQKKMQQVENELDQAQEQLSA ANTKLDEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDE LDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - TEEEIR - ATQK - K - MQQVENELDQAQEQLSAANTK - LDEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
17.	**A2V737 - *Erimacrus isenbeckii*, Eri i 1.0102**	299522	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRAHTLEQQNKEA NLRAEKTEEEIRATQKKMQQIENELDHAQEQLSA ANTKLDEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKNIAD EMDQAFSELSGF	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **AHTLEQQNK** - EANLR - AEK - TEEEIR - ATQK - K - MQQIENELDHAQEQLSAANTK - LDEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – NIADEMDQAFSELSGF
18.	**A2V736 - *Erimacrus isenbeckii*, Eri i 1.0101**	299522	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRAHTLEQQNKEA NLRAEKTEEEIRATQKKMQQIENELDHAQEQLSA ANTKLDEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDE LDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **AHTLEQQNK** - EANLR - AEK - TEEEIR - ATQK - K - MQQIENELDHAQEQLSAANTK - LDEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
19.	**A7VKE1 - *Euphausia pacifica*, Eup p 1**	102976	MDAIKKKMQAMKMEKDSAMDRADALEAQNKET NARAEKADDEVHNLQKRLQTLENDLDQVSEALL KANTQLVEKDKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDL ERSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENR SLLDEERMDALENQLKEARLLAEEADRKYDEVAR KLAMVEADLERAEERAEAGENKIVELEEELRVVG NNLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKHLTHKLKTA EARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKG ITDELDQTFNELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - MEK - DSAMDR - ADALEAQNK - ETNAR - AEK - **ADDEVHNLQK** - R - LQTLENDLDQVSEALLK - **ANTQLVEK** - DK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - SLLDEER - **MDALENQLK** - EAR - **LLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AEAGENK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - HLTHK - LK - TAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – GITDELDQTFNELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
20.	**A7VKE0 - *Euphausia superba,* Eup s 1**	6819	MDAIKKKMQAMKMEKDSAMDRSDALEAQNKET NAKADKADDEVHNLQKRLQTLENDLDQVSEALL KANTQLVEKDKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDL ERSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENR SMLDEERMDALESQLKEARLLAEEADRKYDEVAR KLAMVEADLERAEERAEAGENKIVELEEELRVVG NNLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKHLTHKLKTA EARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKG ITDELDQTFNELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - MEK - DSAMDR - SDALEAQNK - ETNAK - ADK - **ADDEVHNLQK** - R - LQTLENDLDQVSEALLK - **ANTQLVEK** - DK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - SMLDEER - MDALESQLK - EAR - **LLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AEAGENK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - HLTHK - LK - TAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – GITDELDQTFNELSGY
21.	**B7XC67 - *Fulvia mutica,* Ful mu 1**	80828	MEAIKKKMQSMKNEKENAIDKAEQLEIKLKDTED SKAKIEEDLTSLQKKYTNLENEFDQVNEKHADSV AKLEAAEKRLTETEDEIKGYTRKIQLLEDDLERTQ TKLDEATGKLEEATKSADESERGRKVLESRSLADD DRIDGLEKQVKDAKYVAEESDRKYDEAARKLAIT EVDLERAETRLEAAEAKIVELTEELSVVGNNLKGL QNAVDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRASE AERVVIKLQKEVDRLEDELLQEKEKYKQISDELDQ TFAELAGM	MEAIK - K - K - MQSMK - NEK - ENAIDK - AEQLEIK - LK - DTEDSK - AK - **IEEDLTSLQK** - K - **YTNLENEFDQVNEK** - HADSVAK - LEAAEK - R - LTETEDEIK - GYTR - K - **IQLLEDDLER** - TQTK - LDEATGK - LEEATK - SADESER - GR - K - VLESR - SLADDDR - IDGLEK - QVK - DAK - YVAEESDR - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AETR - **LEAAEAK** - IVELTEELS**VVGNNLK** - GLQNAVDQASQR - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ASEAER - VVIK - LQK - EVDR - **LEDELLQEK** - EK - YK – QISDELDQTFAELAGM
22.	**B7XC62 - *Haliotis discus discus,* Hal di 1**	91233	MDAIKKKMLAMKMEKENAVDRAEQNEQKLRDT EEQKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQE AMAKLETSEKRVTEMEQEVSGTTRKITLLEEDLER NEERLQTATERLEEASKAADESERGRKVLESRSLA DDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAERKYDEAARKLAI TEVDLERAEARLEAAEAKILELEEELKVVGNNMK SLEISEQEASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRATE AERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKAISDELDQ TFAELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - ENAVDR - **AEQNEQK** - LR - DTEEQK - AK - **IEEDLNNLQK** - K - CANLENDFDNVNEQLQEAMAK - LETSEK - R - **VTEMEQEVSGTTR** - K - **ITLLEEDLER** - NEER - **LQTATER** - LEEASK - **AADESER** - GR - K - VLESR - **SLADDER** - **IDQLEAQLK** - EAK - **YIAEDAER** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **ILELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – AISDELDQTFAELAGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
23.	**Q9GZ71 - *Haliotis diversicolor (Sulculus diversicolor),* Hal d 1**	36095	MDAIKKKMLAMKMEKENAVDRAEQNEQKLRDT EEQKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQE AMAKLETSEKRVTEMEQEVSGTTRKITLLEEDLER NEERLQTATERLEEASKAADESERGARVLESRSLA DDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAERKYDEAARKLAI TEVDLERAEARLEAAEAKILELEEELKVVGNNMK SLEISEQEASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRATE AERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKAISDELDQ TFAELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - ENAVDR - **AEQNEQK** - LR - DTEEQK - AK - **IEEDLNNLQK** - K - CANLENDFDNVNEQLQEAMAK - LETSEK - R - **VTEMEQEVSGTTR** - K - **ITLLEEDLER** - NEER - **LQTATER** - LEEASK - **AADESER** - GAR - VLESR - **SLADDER** - **IDQLEAQLK** - EAK - **YIAEDAER** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **ILELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – AISDELDQTFAELAGY
24.	**A0A1L3HS57 - *Haliotis laevigata x Haliotis rubra,* Hal l 1**	1924268	MDAIKKKMLAMKMEKENAVDRAEQNEQKLRDT EEQKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQE AMTKLETSEKRVTEMEQEVSGTTRKITLLEEDLER NEERLQTATERLEEASKAADESERGRKVLESRSLA DDERIDQLEAQLKEAKYIAEDAERKYDEAARKLAI TEVDLERAEARLEAAEAKILELEEELKVVGNNMK SLEISEQEASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRATE AERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKAISDELDQ TFAELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - ENAVDR - **AEQNEQK** - LR - DTEEQK - AK - **IEEDLNNLQK** - K - CANLENDFDNVNEQLQEAMTK - LETSEK - R - **VTEMEQEVSGTTR** - K - **ITLLEEDLER** - NEER - **LQTATER** - LEEASK - **AADESER** - GR - K - VLESR - **SLADDER** - **IDQLEAQLK** - EAK - **YIAEDAER** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **ILELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – AISDELDQTFAELAGY
25.	**O97192 - *Cornu aspersum (Helix aspersa),* Hel as 1**	6535	MDAIKKKMLAMKMEKENALDRAEQVEQKLRDC ECNKNKVEEDLNNLQKKFAILENDFDSINEQLLDA NTKLEASEKKNAEIESETAGLQRRIQLLEEDLERSE ERLQSATEKLEEASKAADESERGRKVLESRSLADD ERLDGLEAQLKEAKYIAEDAERKFDEAARKLAITE VDLERAEARLEAAEAKILELEEELKVVGNNMKSL EISEQEASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRASEAE RTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKATSDELDSTF AELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - ENALDR - AEQVEQK - LR - DCECNK - NK - VEEDLNNLQK - K - FAILENDFDSINEQLLDANTK - LEASEK - K - NAEIESETAGLQR - R - **IQLLEEDLER** - SEER - LQSATEK - LEEASK - **AADESER** - GR - K - VLESR - **SLADDER** - LDGLEAQLK - EAK - **YIAEDAER** - K - FDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **ILELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ASEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – ATSDELDSTFAELAGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
26.	**D3XNR9 - *Macrobrachium rosenbergii*, Mac r 1.0101**	79674	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVHNLQKRMQQLENDLDSVQEALL KANQHLEEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDL ERSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENR SLSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVAR KLAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVG NNLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAA EARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSI TDELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDSVQEALLK - **ANQHLEEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
27.	**V5NBV4 - *Macrobrachium rosenbergii*, -**	79674	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVFSLQKRMQQLENDLDSVQEALLK ANQHLEEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVFSLQK** - R - MQQLENDLDSVQEALLK - **ANQHLEEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
28.	**M4M2H6 - *Penaeus latisulcatus (Melicertus latisulcatus)*, Mel l 1**	161925	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NIRAEKAEDDVNKLQKKLQQLENDFDQVQEALLL ANTNAVEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANIR - AEK - AEDDVNK - LQK - K - LQQLENDFDQVQEALLLANTNAVEK - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
29.	**Q9GZ69 -** ***Mimachlamys nobilis (Chlamys nobilis),*** **-**	106276	MDAIKKKMQAMKVDRENAQDLAEQMEQKLKDT ETAKAKLEEEFNELQKKLTATENNYDTVNEQLQE ANTKLENSEKQITQLESDVGGLQRRLTLLEEDYER SEEKLNSTTEKLEEASKAADESERNRKVLEGRSNS YEERIDELEKQLETAKNVATDADHKFDEAARKLAI TEVDLERAETRLEAADAKVLELEEELTVVGANIKT LQVQNDQASQREDSYEETIRDLTKSLKDAENRATE AERQVVKLQKEVDRLEDELLAEKERYKAISDDLD QTFAEIAGY	MDAIK - K - K - MQAMK - VDR - ENAQDLAEQMEQK - LK - DTETAK - AK - LEEEFNELQK - K - LTATENNYDTVNEQLQEANTK - LENSEK - QITQLESDVGGLQR - R - LTLLEEDYER - SEEK - LNSTTEK - LEEASK - **AADESER** - NR - K - VLEGR - SNSYEER - IDELEK - QLETAK - NVATDADHK - FDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AETR - LEAADAK - VLELEEELTVVGANIK - **TLQVQNDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTK - SLK - DAENR - ATEAER - QVVK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – AISDDLDQTFAEIAGY
30.	**B7XC64 -** ***Neptunea polycostata,*** **Nep po 1**	57633	MDLIKKKMLSMKMDKENALDRADVMEQKFRDA EDQKSKLEDDLNLLQKKYSQLENEFDRVNEGLLD ANAKLETQDKRVNEMEQEISGLNRRIQLLEEDLER SEERLQTATEKLEEATKAADESERARKVLESKNQT AEESADSLEAQLKESKYIAEDAERKYDEAARKLAI TEIDLERAETRLEAAEAKCYELDEQLHVVGNNIKT LSIQNDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRAQE AERTVTKLQKEVDRLEDELLAEKERYKNISDELDQ TFAELAGY	MDLIK - K - K - MLSMK - MDK - ENALDR - ADVMEQK - FR - DAEDQK - SK - LEDDLNLLQK - K - YSQLENEFDR - VNEGLLDANAK - LETQDK - R - VNEMEQEISGLNR - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LQTATEK** - LEEATK - **AADESER** - AR - K - VLESK - NQTAEESADSLEAQLK - ESK - **YIAEDAER** - K - YDEAAR - K - LAITEIDLER - AETR - **LEAAEAK** - CYELDEQLHVVGNNIK - TLSIQNDQASQR - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - AQEAER - TVTK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – NISDELDQTFAELAGY
31.	**Q2V0V1 -** ***Ommastrephes bartramii (Loligo bartramii),*** **Omm b 1**	61679	MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLE DAKNKTEEDLSTLQKKYANLENDFDNANEQLTAA NTNLEASEKRVAECESEIQGLNRRIQLLEEDLERSE ERFSSAQSKLEDASKAADESERGRKVLENRSQGDE ERIDLLEKQLEEAKWIAEDADRKFDEAARKLAITE VDLERAEARLEAAEAKIVELEEELKVVGNNMKSL EISEQEASQREDSYEETIRDLTHRLKEAENRAAEAE RTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKTISDELDQTF AELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - EVATDK - **AEQTEQSLR** - DLEDAK - NK - **TEEDLSTLQK** - K - YANLENDFDNANEQLTAANTNLEASEK - R - **VAECESEIQGLNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **FSSAQSK** - LEDASK - **AADESER** - GR - K - VLENR - **SQGDEER** - IDLLEK - QLEEAK - **WIAEDADR** - K - FDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **IVELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTHR - LK - EAENR - AAEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – TISDELDQTFAELAGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
32.	**A9CSJ9 - *Oratosquilla oratoria*, Ora o 1**	337810	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKAEEEVHNLQKRMQQLENDLDQVQEQLL KANTQLEEKDKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDL ERSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENR SLSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVAR KLAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVG NNLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKQLTNKLKAA EARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSI TDELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **AEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQEQLLK - **ANTQLEEK** - DK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - QLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
33.	**A2V734 - *Paralithodes camtschaticus*, Par c 1.0102**	6741	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDKADTLEQQNKEA NNRAEKTEEEIRLTQKKMQQVENELDVAQEQLSL ANTKLEEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLANKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKNI ADEMDQAFSELSGF	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDK - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - TEEEIR - LTQK - K - MQQVENELDVAQEQLSLANTK - LEEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – NIADEMDQAFSELSGF
34.	**A2V733 - *Paralithodes camtschaticus*, Par c 1.0101**	6741	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDKADTLEQQNKEA NNRAEKAEEEVHGLQKRMQQLENDLDQVQESLL KANTQLEDKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDL ERSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENR SLSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVAR KLAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVG NNLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLANKLKAA EARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSI TDELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDK - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - AEEEVHGLQK - R - MQQLENDLDQVQESLLK - ANTQLEDK - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
35.	**A2V731** - ***Penaeus japonicus (Marsupenaeus japonicus),*** **Mar j 1**	27405	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NNRAEKSEEEVHNLQKRMQQLENDLDQVQESLL KANIQLVEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGN NLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAE ARAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSIT DELDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANNR - AEK - **SEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQESLLK - **ANIQLVEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
36.	**Q9GZ70** - ***Perna viridis, (Mytilus viridis),*** **Per v 1**	73031	MDAIKKKMVAMKMEKKNALDRAEQLEQKLRETE EAKAKIEDDYNSLVKKNIQTENDYDNCNTQLQDV QAKYERAEKQIQEHEQEIQSLTRKISLLEEGIMKAE ERFTTASGKLEEASKAADESERNRKVLENLNSGN DERIDQLEKQLTEAKWIAEEADKKYEEAARKLAIT EVDLERAEARLEAAEAKVIDLEEQLTVVGANIKTL QVQNDQASQREDSYEETIRDLTNRLKDAENRATE AERTVSKLQKEVDRLEDELLTEKEKYKAISDELDA TFAELAGY	MDAIK - K - K - MVAMK - MEK - K - NALDR - **AEQLEQK** - LR - ETEEAK - AK - IEDDYNSLVK - K - NIQTENDYDNCNTQLQDVQAK - YER - AEK - QIQEHEQEIQSLTR - K - ISLLEEGIMK - AEER - FTTASGK - LEEASK - **AADESER** - NR - K - VLENLNSGNDER - IDQLEK - QLTEAK - **WIAEEADK** - K - YEEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - VIDLEEQLTVVGANIK - **TLQVQNDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTNR - LK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLTEK** - EK - YK – AISDELDATFAELAGY
37.	**M1H607** - ***Portunus pelagicus,*** **Por p 1**	80836	MDAIKKKMQAMKLEKDDAMDRADTLEQQNKEA NIRAEKAEEEVHNLQKRMQQLENDLDQVQESLLK ANTQLEEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLER SEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRSLS DEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARKL AMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSTTD ELDQAFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DDAMDR - **ADTLEQQNK** - EANIR - AEK - **AEEEVHNLQK** - R - MQQLENDLDQVQESLLK - **ANTQLEEK** - DK - **ALSNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLTNK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – STTDELDQAFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
38.	**A1YYV6 - *Portunus sanguinolentus*, Por s 1**	411673	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NLRAEKTEEEIRATQKKMQQVENELDQAQEQLSA ANTKLDEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDE LDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANLR - AEK - TEEEIR - ATQK - K - MQQVENELDQAQEQLSAANTK - LDEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
39.	**A7L5V3 - *Portunus trituberculatus (Neptunus trituberculatus)*, Por t 1**	210409	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRANTLEQQNKEA NLRAEKTEEEIRATQKKMQQVENELDQAQEQLSA ANTKLDEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDE LDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - ANTLEQQNK - EANLR - AEK - TEEEIR - ATQK - K - MQQVENELDQAQEQLSAANTK - LDEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY
40.	**C0LU07 - *Procambarus clarkii*, Pro c 1**	6728	MDAIKKKMQATKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NIRAEKAEEEVHNLQKRMQHLENDLDQVQESLLK ANTQLEEKDKAISNAEGEVAALNRRIQLLEEDLER SEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRSLS DEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARKL AMVEADLERAEERAETGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLANKLKAAEA RAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITD ELDQTFSELTGY	MDAIK - K - K - MQATK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANIR - AEK - **AEEEVHNLQK** - R - MQHLENDLDQVQESLLK - **ANTQLEEK** - DK - AISNAEGEVAALNR - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AETGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EEAYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELTGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
41.	**B7XC68** - ***Spisula sachalinensis (Pseudocardium sachalinense),* Spi sa 1**	81899	MDSIKKKMQAMKIEKENALDKSEQLDQKLKDVE ETKAKVEEDLSSLQKKYTNLENEFDKVNEQYNES VVKLEASEKRVTECEDEIKGYTRRIQLLEDDLERT QVKLDEALLKLEDATKTADESERGRKVLESRSIAD DDRIDGLEKQVKDAKYVAEEADRKYDEAARKLAI TEVDLERAETRLEAAEAKITELSEELSVVANNCKA LQNAVDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRAA EAERVVNKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKTISDEL DQTFAELAGM	MDSIK - K - K - MQAMK - IEK - ENALDK - SEQLDQK - LK - DVEETK - AK - VEEDLSSLQK - K - YTNLENEFDK - VNEQYNESVVK - LEASEK - R - **VTECEDEIK** - GYTR - R - **IQLLEDDLER** - TQVK - **LDEALLK** - LEDATK - **TADESER** - GR - K - VLESR - **SIADDDR** - IDGLEK - QVK - DAK - **YVAEEADR** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AETR - **LEAAEAK** - ITELSEELSVVANNCK - **ALQNAVDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - AAEAER - VVNK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – TISDELDQTFAELAGM
42.	**B7XC65** - ***Anadara broughtonii (Scapharca broughtonii),* Ana br 1**	148819	MDSIKKKMIAMKMEKENALDRSEQLEQKLRDTEE QKAKVEEELGAYQKKFSILENDFDTVNTKWEDAS VKLEEAEKKLTESEQEIASLTRKTTLLEDDIAKNEE KLMSATQKLEEASHAADESERGRKVLESRSFADD ERIDALEAQLKEAKYIAEDADRKYDEAARKLAITE VDLERAEARLEAAEAKIIELEEELTVVGANIKTLQ VQNDQASQREDSYEETIRDLTANLKDAENRATEA ERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKAISDELDQT FAELAGY	MDSIK - K - K - MIAMK - MEK - ENALDR - **SEQLEQK** - LR - DTEEQK - AK - VEEELGAYQK - K - FSILENDFDTVNTK - WEDASVK - LEEAEK - K - LTESEQEIASLTR - K - TTLLEDDIAK - NEEK - LMSATQK - LEEASH**AADESER** - GR - K - VLESR - SFADDER - IDALEAQLK - EAK - YIAEDADR - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - IIELEEELTVVGANIK - **TLQVQNDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTANLK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – AISDELDQTFAELAGY
43.	**A7L5V2** - ***Scylla serrata,* Scy s 1**	6761	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEA NLRAEKTEEEIRATQKKMQQVENELDQAQEQLSA ANTKLDEKEKALQNAEGEVAALNRRIQLLEEDLE RSEERLNTATTKLAEASQAADESERMRKVLENRS LSDEERMDALENQLKEARFLAEEADRKYDEVARK LAMVEADLERAEERAESGESKIVELEEELRVVGNN LKSLEVSEEKANQREETYKEQIKTLANKLKAAEAR AEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDE LDQTFSELSGY	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - DNAMDR - **ADTLEQQNK** - EANLR - AEK - TEEEIR - ATQK - K - MQQVENELDQAQEQLSAANTK - LDEK - EK - **ALQNAEGEVAALNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LNTATTK** - **LAEASQAADESER** - MR - K - VLENR - **SLSDEER** - **MDALENQLK** - EAR - **FLAEEADR** - K - YDEVAR - K - **LAMVEADLER** - AEER - **AESGESK** - **IVELEEELR** - **VVGNNLK** - **SLEVSEEK** - ANQR - EETYK - EQIK - TLANK - LK - AAEAR - AEFAER - SVQK - LQK - EVDR - **LEDELVNEK** - EK - YK – SITDELDQTFSELSGY

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
44.	**Q2V0V4 - *Sepia esculenta (Diphtherosepion dabryi)*, Sep e 1**	31210	MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLE DAKNKTEEDLSTLQKKYSNLENDFDNANEQLTAA NTNLEASEKRVAECESEIQGLNRRIQLLEEDLERSE ERLTSAQSKLEDASKAADESERGRKVLENRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADRKFDEAARKLAIT EVDLERAEARLEAAEAKIVELEEELKVVGNNMKS LEISEQEASQREDSYEETIRDLTHRLKEAENRAAEA ERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKSISDELDQT FAELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - EVATDK - **AEQTEQSLR** - DLEDAK - NK - **TEEDLSTLQK** - K - YSNLENDFDNANEQLTAANTNLEASEK - R - **VAECESEIQGLNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LTSAQSK** - LEDASK - **AADESER** - GR - K - VLENR - **SQGDEER** - IDLLEK - QLEEAK - **WIAEDADR** - K - FDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **IVELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTHR - LK - EAENR - AAEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – SISDELDQTFAELAGY
45.	**Q2V0V3 - *Sepioteuthis lessoniana*, Sep l 1**	34570	MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLE DAKNKIEEDLSTLQKKYANLENDFDNANEQLTAA NTNLEASEKRVAECESEIQGLNRRIQLLEEDLERSE ERFSSAQSKLEDASKAADESERGRKVLENRSQGDE ERIDLLEKQLEEAKWIAEDADRKFDEAARKLAITE VDLERAEARLEAAEAKIVELEEELKVVGNNMKSL EISEQEASQREDSYEETIRDLTHRLKEAENRAAEAE RTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKTISDELDQTF AELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - EVATDK - **AEQTEQSLR** - DLEDAK - NK - **IEEDLSTLQK** - K - YANLENDFDNANEQLTAANTNLEASEK - R - **VAECESEIQGLNR** - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **FSSAQSK** - LEDASK - **AADESER** - GR - K - VLENR - **SQGDEER** - IDLLEK - QLEEAK - **WIAEDADR** - K - FDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **IVELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTHR - LK - EAENR - AAEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – TISDELDQTFAELAGY
46.	**A7UMC0 - *Sinonovacula constricta*, Sin c 1**	98310	MDAIKKKMQAMKIEKENALDKSEQLENKLKEIED VKVKIEEDLTSLQKKYTNQENEYDKVNEQFNEST VKLEASEKRVTECEDEIKGFTRRIQLLEDELERTQQ KAEEAVLKLEEASKAADESERGRKVLESRSIADDD RIDKLEKDVKDSKYLAEEADRKYDEAARKLAITE VDLERAETRLEAAESKITELSEELQVVGNNCKALQ NAVDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRAAEA ERVVNKLQKEVDRLEDELLQEKEKYKQISDELDQ TFAELAGM	MDAIK - K - K - MQAMK - IEK - ENALDK - SEQLENK - LK - EIEDVK - VK - **IEEDLTSLQK** - K - YTNQENEYDK - VNEQFNESTVK - LEASEK - R - **VTECEDEIK** - GFTR - R - IQLLEDELER - TQQK - AEEAVLK - LEEASK - **AADESER** - GR - K - VLESR - **SIADDDR** - IDK - LEK - DVK - DSK - YLAEEADR - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AETR - LEAAESK - ITELSEELQVVGNNCK - **ALQNAVDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - AAEAER - VVNK - LQK - EVDR - **LEDELLQEK** - EK - YK – QISDELDQTFAELAGM

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
47.	**B7XC70 - *Solen strictus,* Sol st 1**	194331	MDSIKKKMQAMKLEKENALDKSEQLEQKLKETE DSKARAEEDLSSLQKKFTNLENEFDKVNEQYQEG VIKLEASEKRVTECEDEIKGFTRRIQLLEDDLERTQ AKLDEALLKLEDASKTADESERGRKVLESRSIADD DRIDQLEKQVKDAKYVAEEADRKYDEAARKLAIT EVDLERAETRLEAAEAKITELSEELQVVGNNSKAL QNAVDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRAAE AERVVNKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKQISDELD QTFAELAGM	MDSIK - K - K - MQAMK - LEK - ENALDK - **SEQLEQK** - LK - ETEDSK - AR - AEEDLSSLQK - K - FTNLENEFDK - VNEQYQEGVIK - LEASEK - R - **VTECEDEIK** - GFTR - R - **IQLLEDDLER** - TQAK - **LDEALLK** - LEDASK - **TADESER** - GR - K - VLESR - **SIADDDR** - IDQLEK - QVK - DAK - **YVAEEADR** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AETR - **LEAAEAK** - ITELSEELQVVGNNSK - **ALQNAVDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - AAEAER - VVNK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – QISDELDQTFAELAGM
48.	**Q2V0V2 - *Todarodes pacificus (Ommastrephes pacificus),* Tod p 1**	6637	MDAIKKKMLAMKMEKEVATDKAEQTEQSLRDLE AAKNTIEEDLSTLQKKYSNLENDFDNAKENLTVA NTNLEASEKRVNECESEIQGLNRRIQLLEEDLERSE ERLTSAQSKLEDASKAADESERGRKVLENRSQGD EERIDLLEKQLEEAKWIAEDADRKFDEAARKLAIT EVDLERAEARLEAAEAKIVELEEELKVVGNNMKS LEISEQEASQREDSYEETIRDLTHRLKEAENRAAEA ERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKERYKSISDELDQT FAELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - EVATDK - **AEQTEQSLR** - DLEAAK - NT**IEEDLSTLQK** - K - YSNLENDFDNAK - ENLTVANTNLEASEK - R - VNECESEIQGLNR - R - **IQLLEEDLER** - SEER - **LTSAQSK** - LEDASK - **AADESER** - GR - K - VLENR - **SQGDEER** - IDLLEK - QLEEAK - **WIAEDADR** - K - FDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **IVELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTHR - LK - EAENR - AAEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - ER - YK – SISDELDQTFAELAGY
49.	**B7XC69 - *Tresus keenae,* Tre ke 1**	545649	MDSIKKKMQAMKIEKENALDKAEQLDQKLKDTE DSKAKIEEDLSSLQKKYTNLENEFDQVNEKYNDG VVKLESSEKRVTECEDEIKGYTRRIQLLEDDLERT QVKLEEATLKLEDATKTADESERGRKVLESRSIAD DDRIDQLEKQVKDAKYVAEEADRKYDEAARKLAI TEVDLERAETRLEAAEAKITELSEELSVVANNCKA LQNAVDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRAS EAERVVNKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKQISDEL DQTFAELAGM	MDSIK - K - K - MQAMK - IEK - ENALDK - AEQLDQK - LK - DTEDSK - AK - IEEDLSSLQK - K - **YTNLENEFDQVNEK** - YNDGVVK - LESSEK - R - **VTECEDEIK** - GYTR - R - **IQLLEDDLER** - TQVK - LEEATLK - LEDATK - **TADESER** - GR - K - VLESR - **SIADDDR** - IDQLEK - QVK - DAK - **YVAEEADR** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AETR - **LEAAEAK** - ITELSEELSVVANNCK - **ALQNAVDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ASEAER - VVNK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – QISDELDQTFAELAGM

L.p.	UniProtKB ID[1]/nazwa gatunku/nazwa alergenu[2]	NCBI ID[3]	Sekwencja aminokwasowa tropomiozyny	Sekwencja aminokwasowa po symulowanej proteolizie trypsyną (EC 3.4.21.4)[4]
50.	**B7XC63 - *Turbo cornutus (Battilus cornutus),* Tur c 1**	63673	MDAIKKKMLAMKMEKENALDRAEQLEQKLRDTE EQKAKIEEDLNNLQKKCANLENDFDNVNEQLQDA LSKLENSEKRVTEMEQEVSGTTRKITLLEEDLERN EEGLQTATERLEEASKAANESERGSLADDERIDQL EAQLKEAKYIAEDAKYIAEDAERKYDEAARKLAIT EVDLERAEARLEAAEAKILELEEELKVVGNNMKS LEISEQEASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRATEA ERTVSKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKAISDELDQT FAELAGY	MDAIK - K - K - MLAMK - MEK - ENALDR - **AEQLEQK** - LR - DTEEQK - AK - **IEEDLNNLQK** - K - CANLENDFDNVNEQLQDALSK - LENSEK - R - **VTEMEQEVSGTTR** - K - **ITLLEEDLER** - NEEG**LQTATER** - LEEASK - AANESER - G**SLADDER** - **IDQLEAQLK** - EAK - YIAEDAK - **YIAEDAER** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - AEAR - **LEAAEAK** - **ILELEEELK** - **VVGNNMK** - **SLEISEQEASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - ATEAER - TVSK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK – AISDELDQTFAELAGY
51.	**B7XC71 - *Ruditapes philippinarum (Venerupis philippinarum)* – Ven ph 1**	129788	MDAIKKKMQAMKLEKENALDKAEQLEQKLRDVE ETKAKAEEDLTLLQKKYTNLENEFDQVNEKYNEG VNKLEVSEKRVTEAEDEIKGYTRRIQLLEDDLERT QVKLDEATSKLEDATKTADESERGRKVLESRSIAD DDRIDALEKQVKDAKYVAEEADRKYDEAARKLAI TEVDLERSETRLEAAEAKITELSEELAVVGNNCKA LQNAVDQASQREDSYEETIRDLTQRLKDAENRAA EAERVVNKLQKEVDRLEDELLAEKEKYKAISDEL DQTFAELAGM	MDAIK - K - K - MQAMK - LEK - ENALDK - **AEQLEQK** - LR - DVEETK - AK - **AEEDLTLLQK** - K - **YTNLENEFDQVNEK** - YNEGVNK - LEVSEK - R - **VTEAEDEIK** - GYTR - R - **IQLLEDDLER** - TQVK - LDEATSK - LEDATK - **TADESER** - GR - K - VLESR - **SIADDDR** - IDALEK - QVK - DAK - **YVAEEADR** - K - YDEAAR - K - **LAITEVDLER** - SETR - **LEAAEAK** - ITELSEELAVVGNNCK - **ALQNAVDQASQR** - **EDSYEETIR** - DLTQR - LK - DAENR - AAEAER - VVNK - LQK - EVDR - **LEDELLAEK** - EK - YK - AISDELDQTFAELAGM

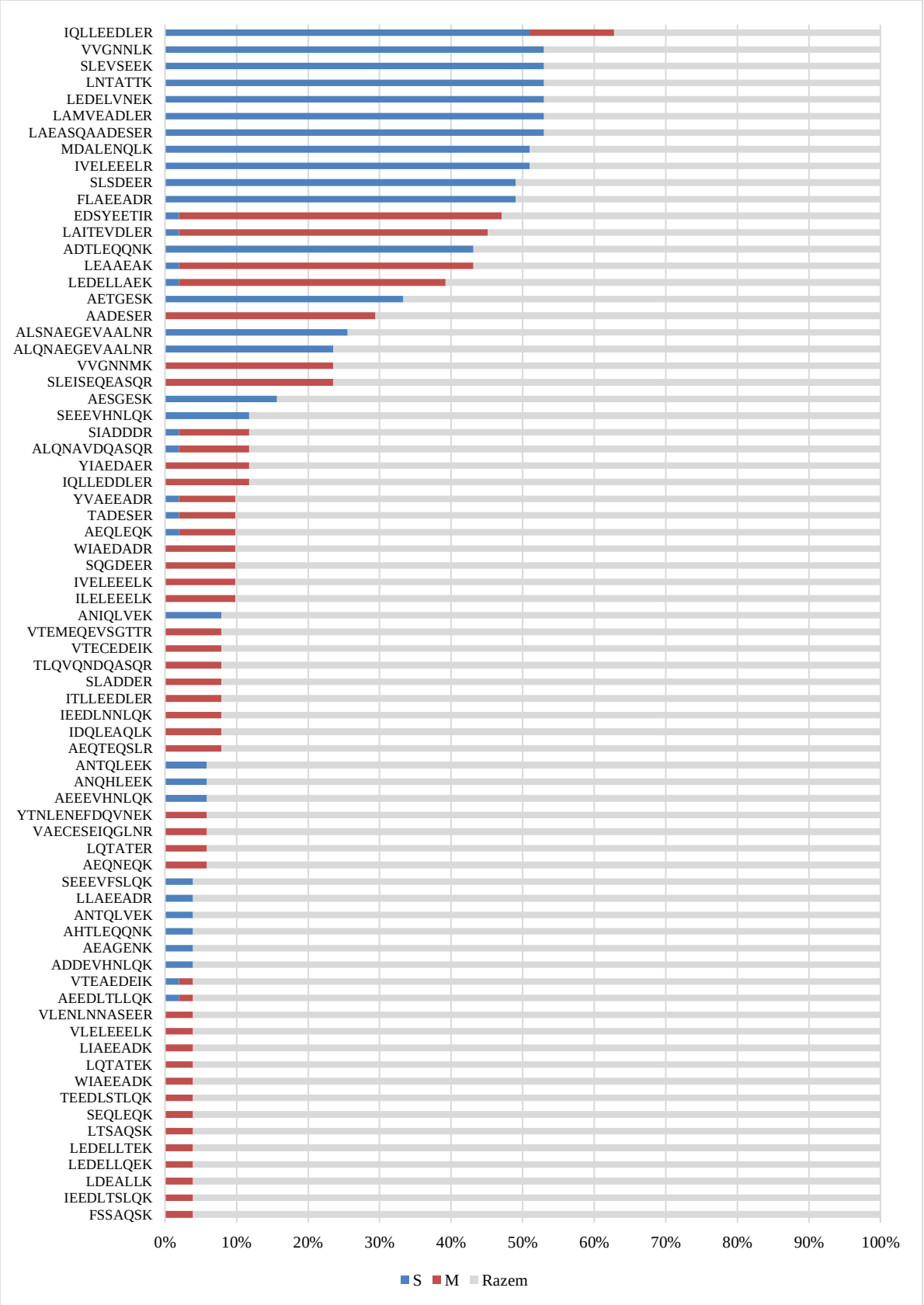
[1]UniProt, https://www.uniprot.org/, dostęp: luty 2019

[2]nazwa alergenu zgodna z IUIS - ang. International Union of Immunological Societies; Międzynarodowa Unia Towarzystw Immunologicznych

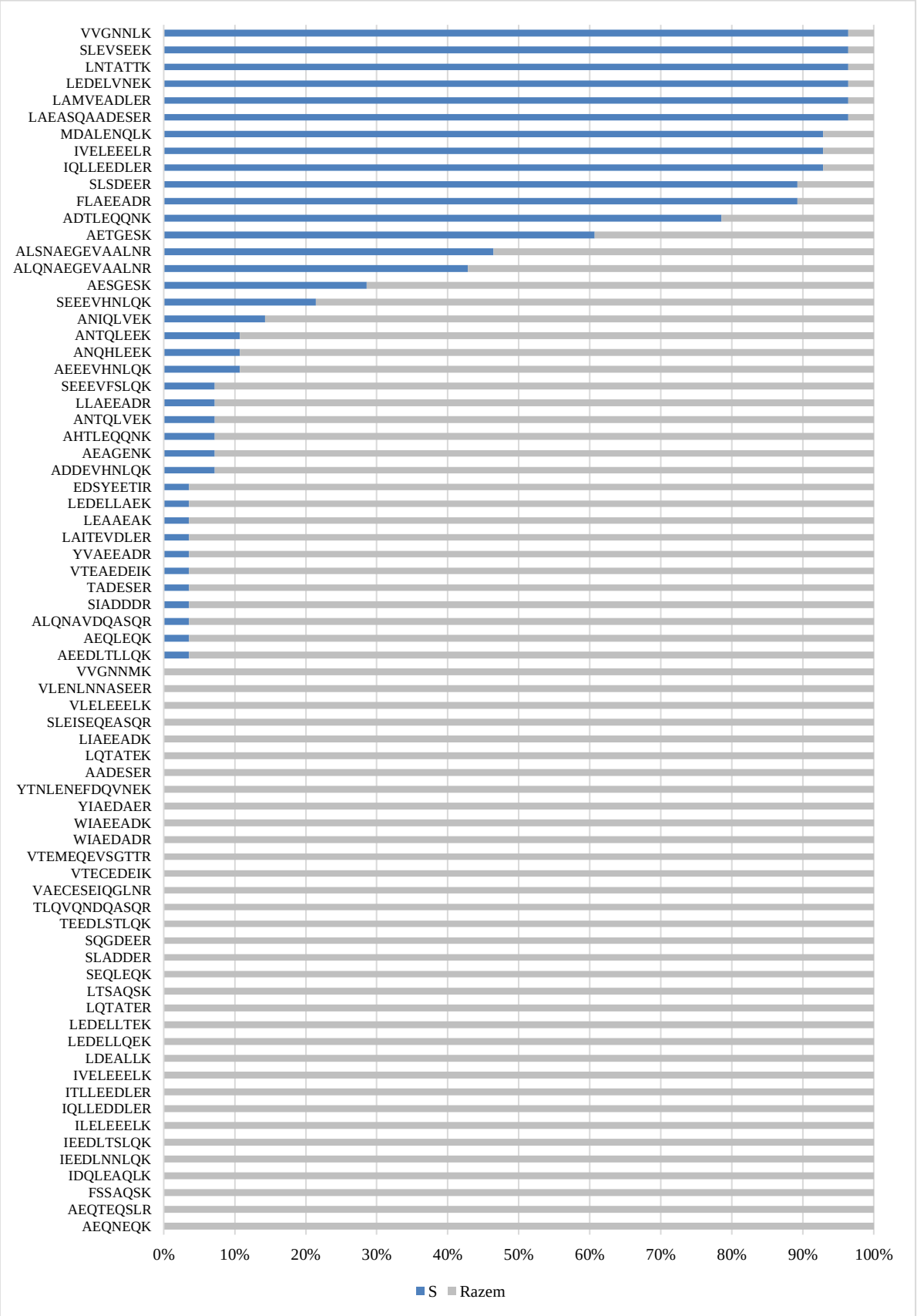
[3]identyfikator taksonomiczny według NCBI - National Center for Biotechnology Information, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy, dostęp: luty 2019

[4]pogrubioną czcionką zaznaczono peptydy o długości od 7 do 15 aminokwasów

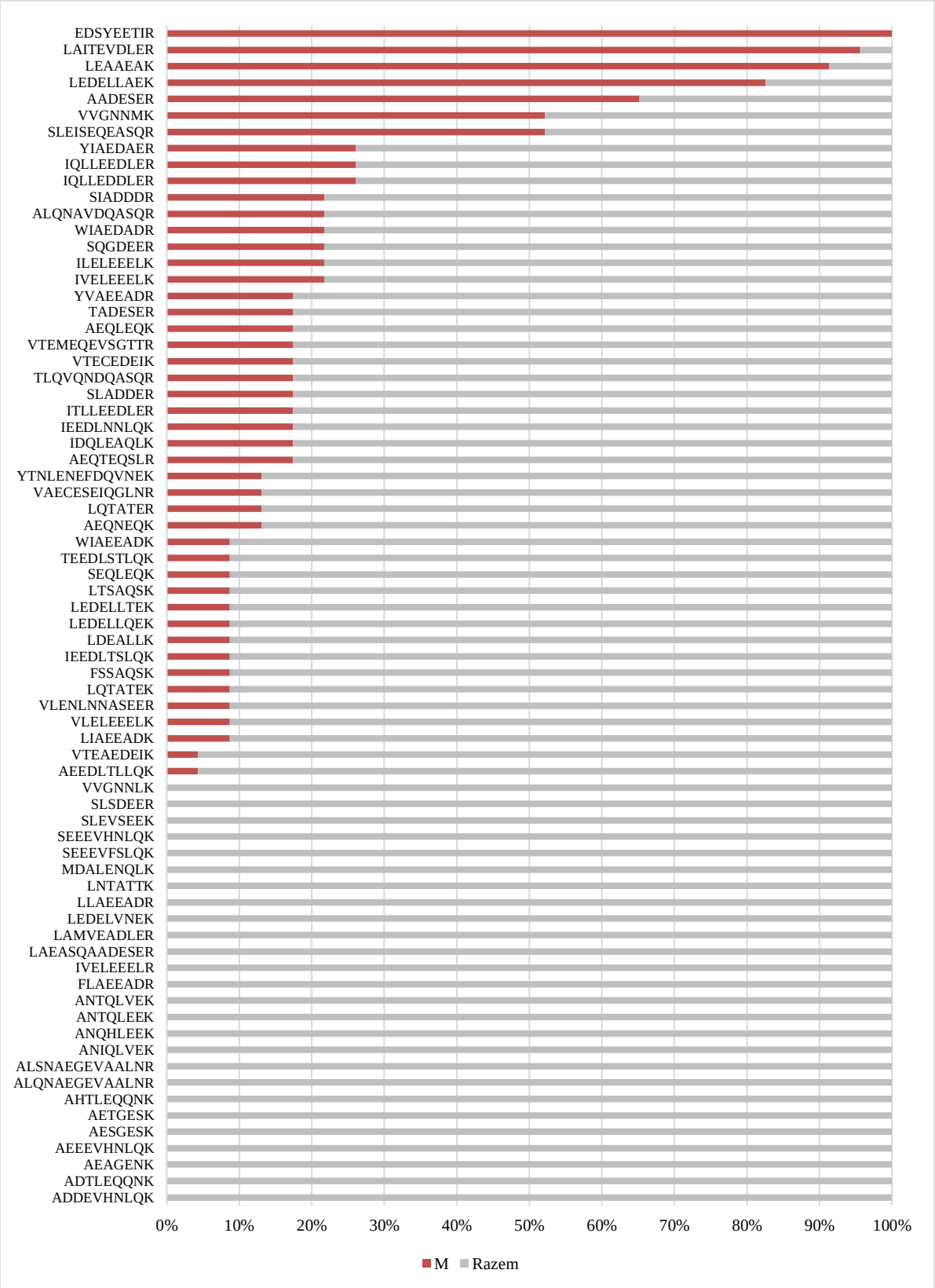
Załącznik 2. Procentowy udział obecności poszczególnych peptydów w analizowanych sekwencjach tropomiozyn mięczaków i skorupiaków.



Rys. Z1. Udział procentowy obecności poszczególnych peptydów w analizowanych sekwencjach tropomiozyn (S/M – udział procentowy liczby sekwencji tropomiozyn skorupiaków/mięczaków, w których występuje dany peptyd; Razem: n=51).

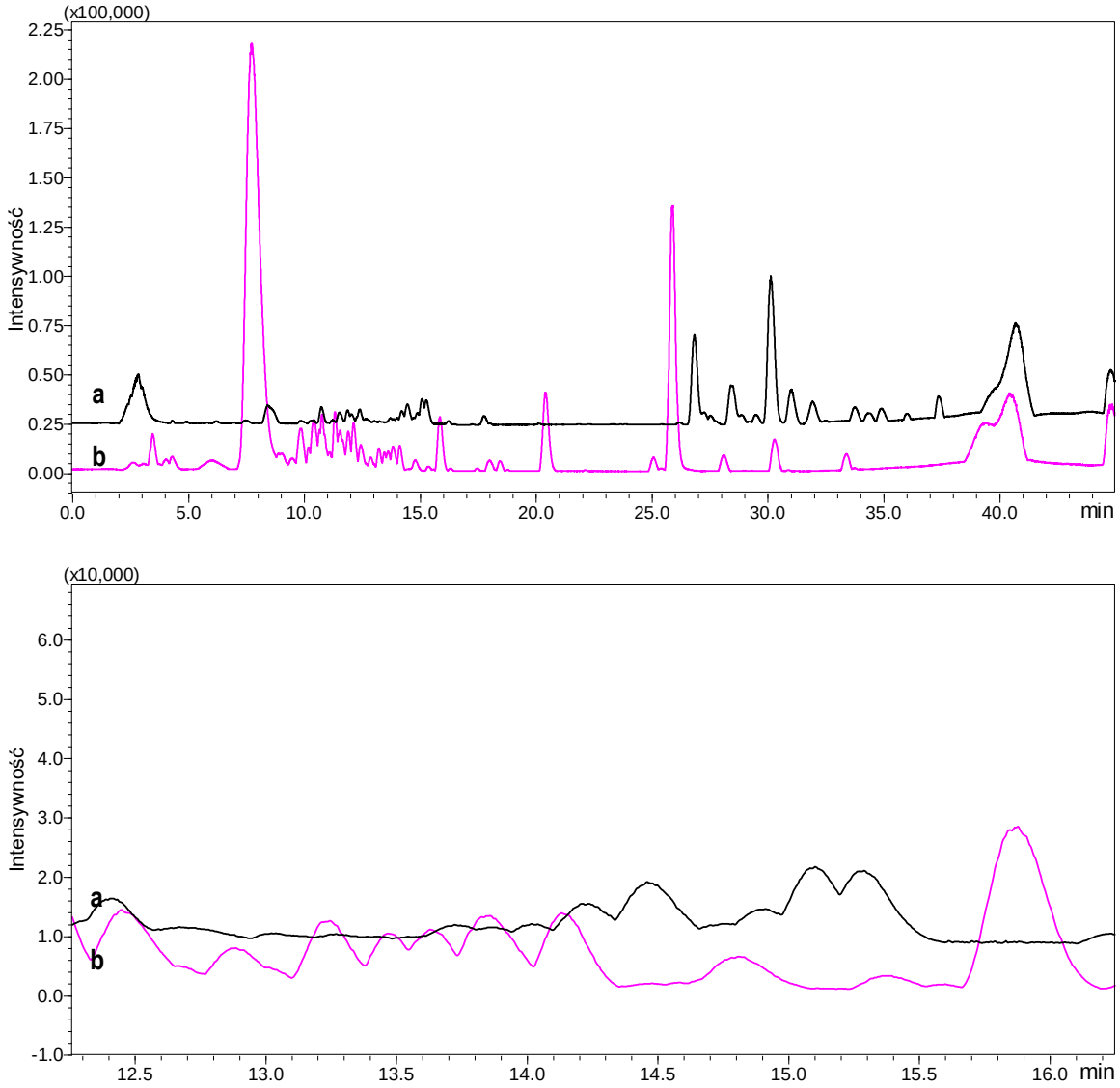


Rys. Z2. Udział procentowy obecności poszczególnych peptydów w analizowanych sekwencjach tropomiozyn skorupiaków (S – udział procentowy liczby sekwencji tropomiozyn skorupiaków, w których występuje dany peptyd; Razem: n=28).

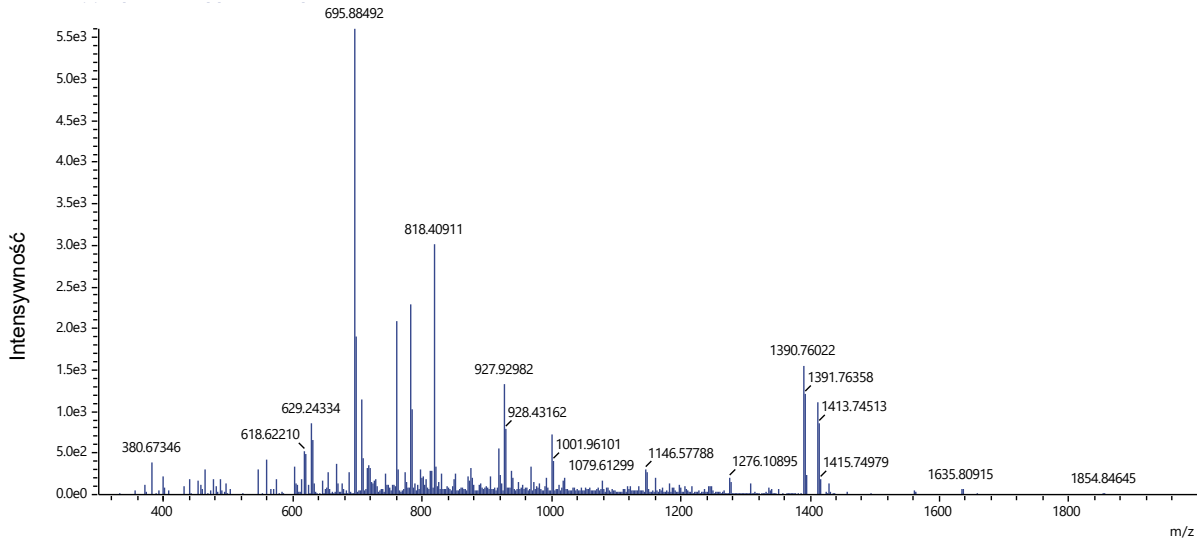


Rys. Z3. Udział procentowy obecności poszczególnych peptydów w analizowanych sekwencjach tropomiozyn skorupiaków (M – udział procentowy liczby sekwencji tropomiozyn skorupiaków, w których występuje dany peptyd; Razem: n=23).

Załącznik 3. Określenie przybliżonych mas cząsteczkowych tropomiozyn metodą spektrometrii mas. Obrazy pochodzą z programów LabSolutions wersja 5 (Shimadzu, Tokio, Japonia) i LabSolutions Insight wersja 3.5 (Shimadzu, Tokio, Japonia).

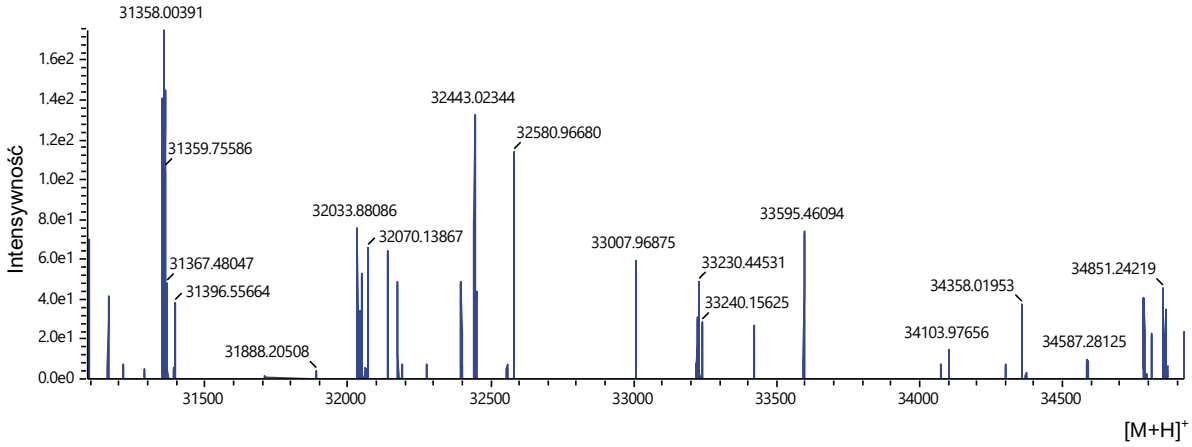


a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 1a (rozmrożona sałatka z surowych owoców morza).



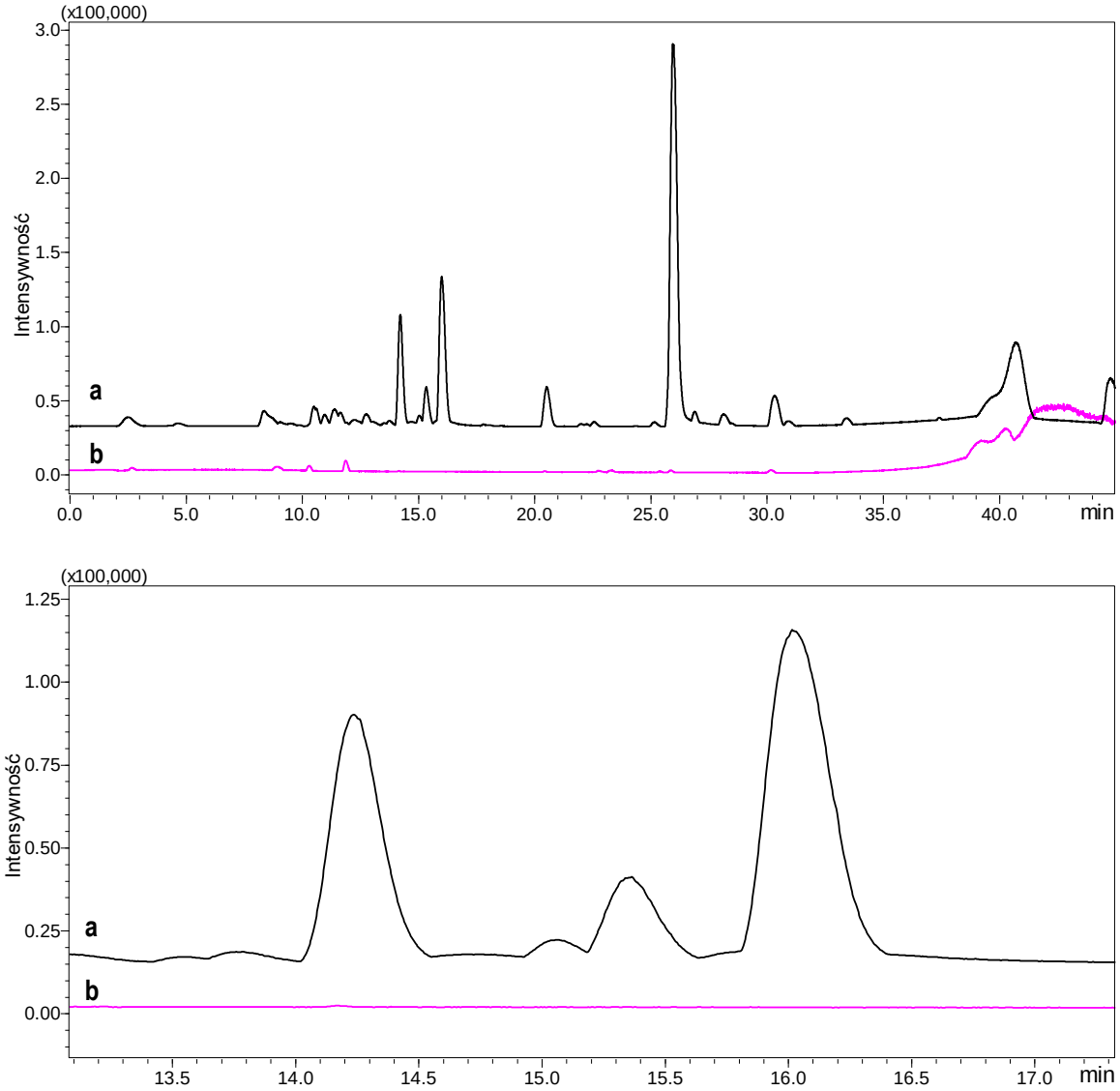
b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,90 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 1a

(rozmrożona sałatka z surowych owoców morza).

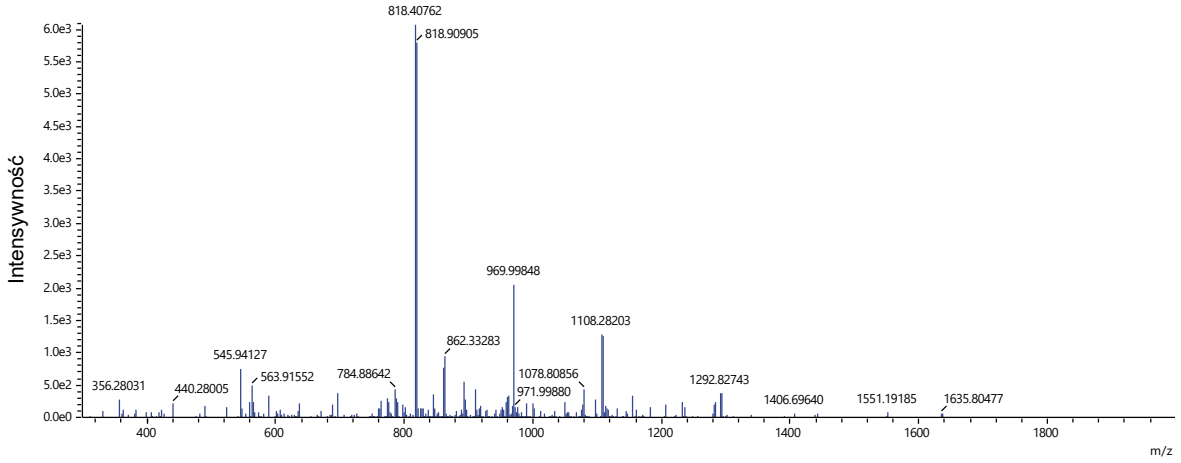


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,90 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 1a (rozmrożona sałatka z surowych owoców morza) po dekonwolucji.

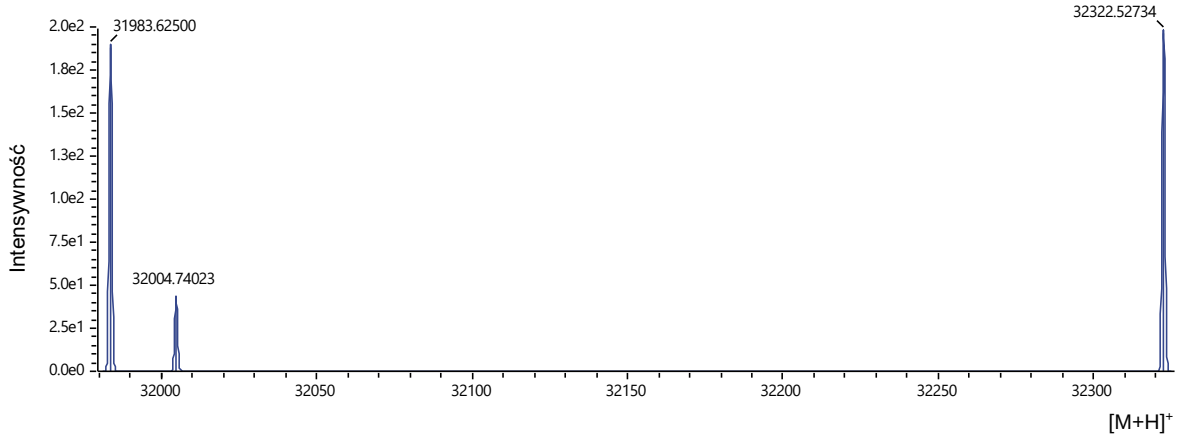
Rys. Z4. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 1a).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 1b (ugotowana sałatka z surowych owoców morza).

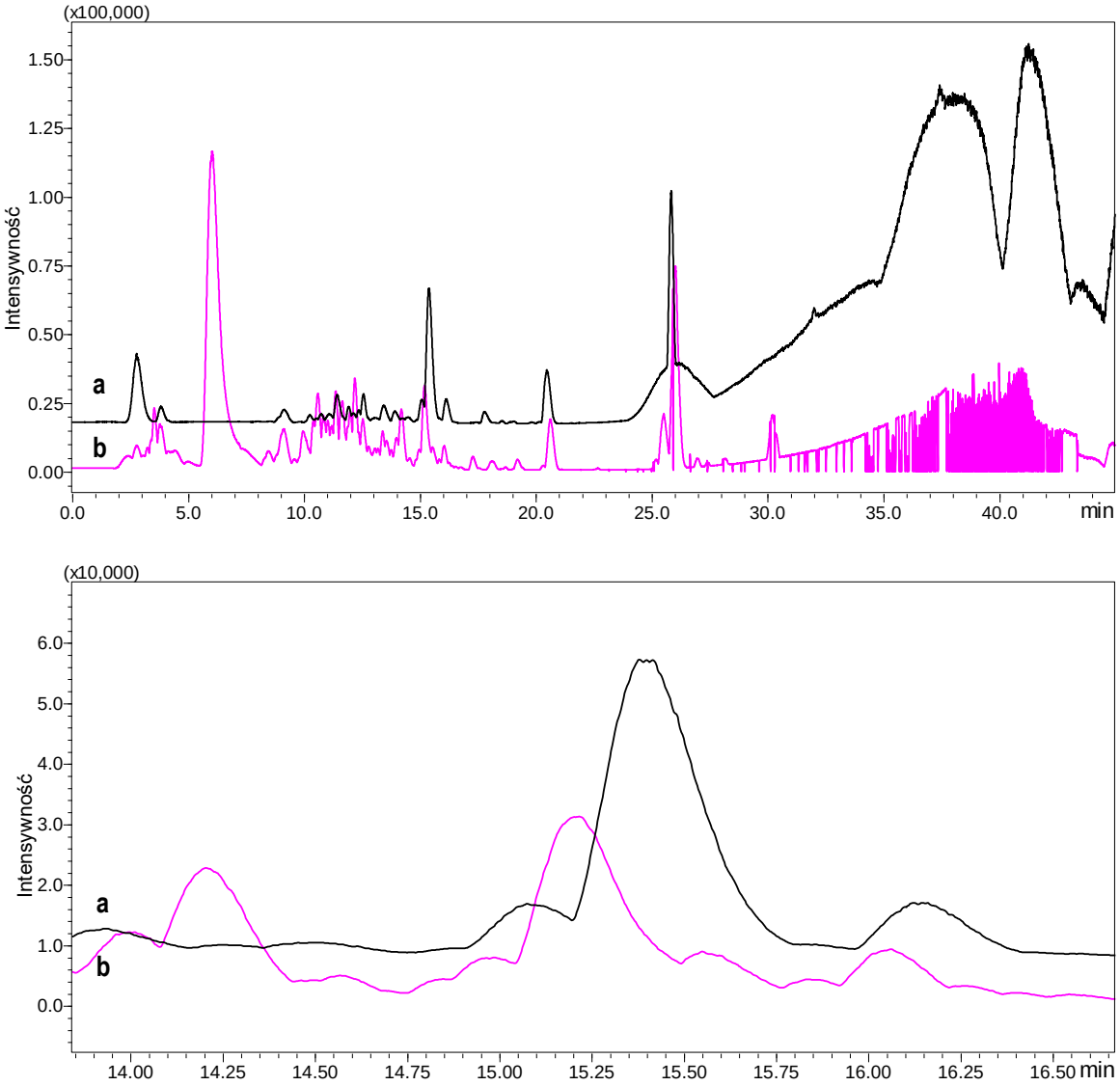


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 15,06 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 1b (ugotowana sałatka z surowych owoców morza).

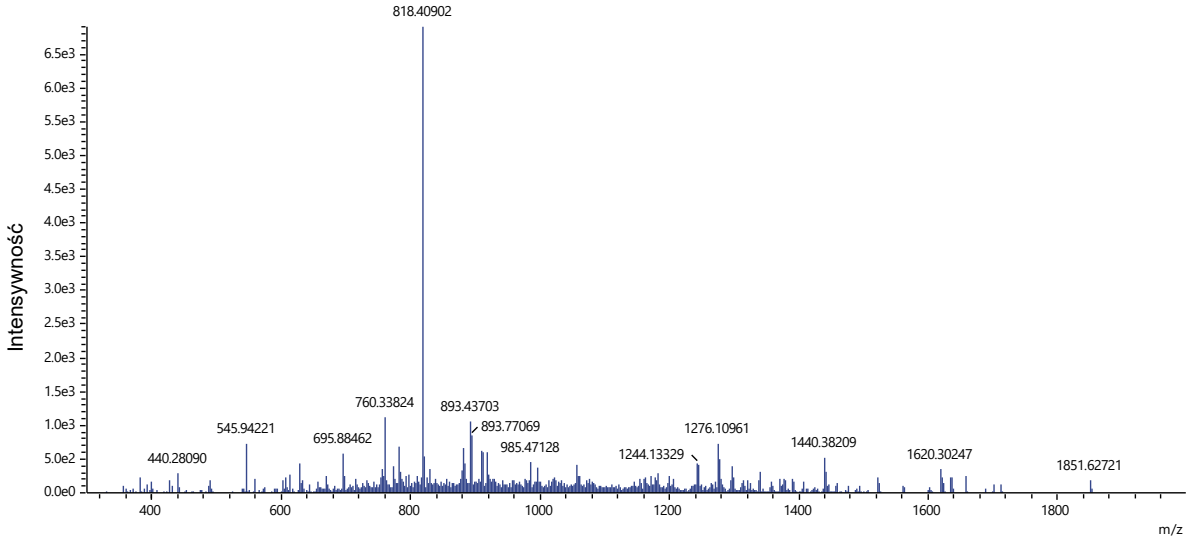


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 15,06 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 1b (ugotowana sałatka z surowych owoców morza) po dekonwolucji.

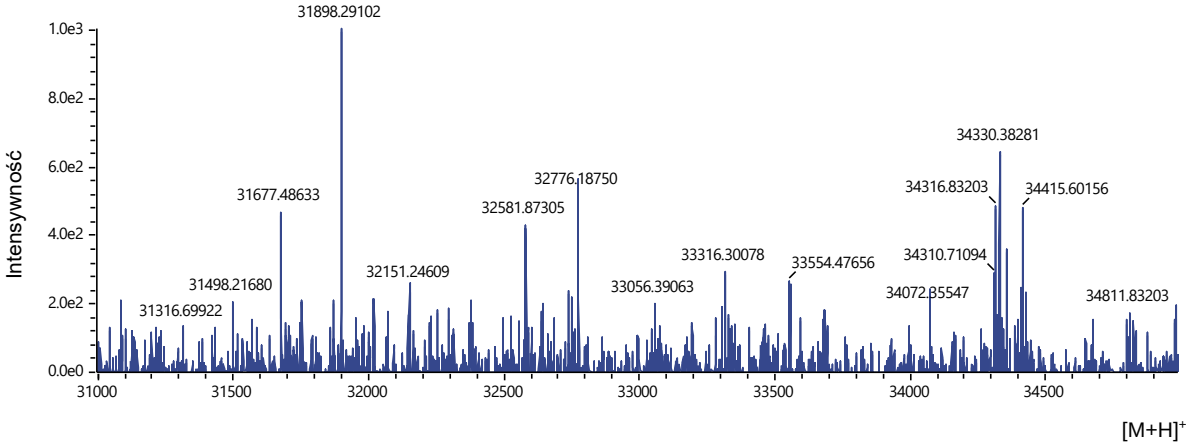
Rys. Z5. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 1b).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 1c (usmażona sałatka z surowych owoców morza).

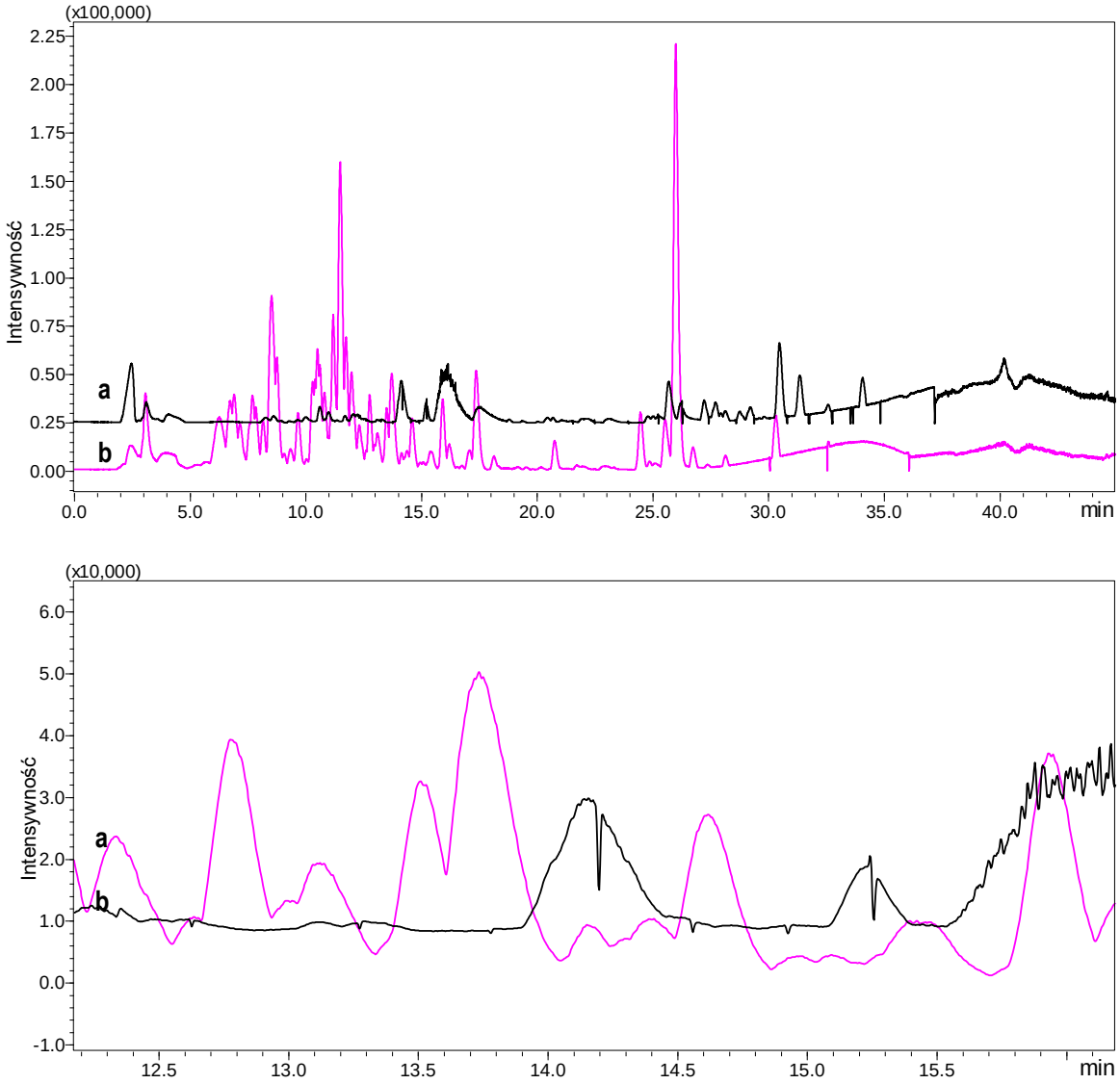


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 15,06 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 1c (usmażona sałatka z surowych owoców morza).

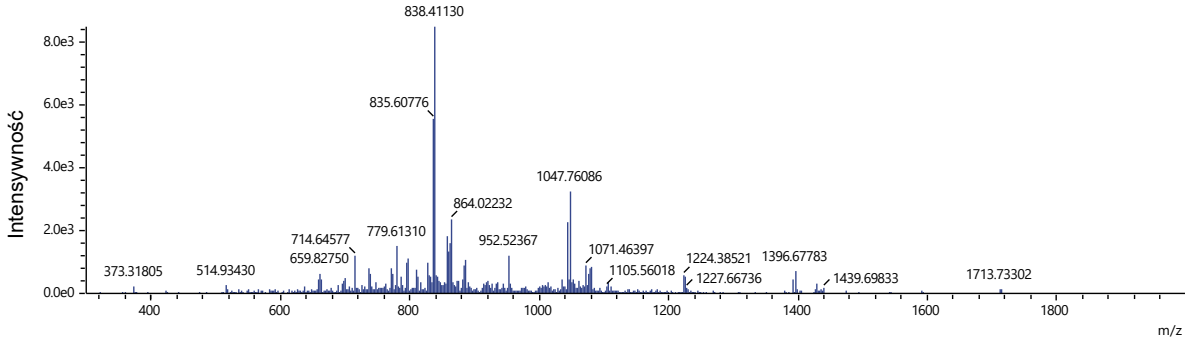


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 15,06 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z prɔbkı 1c (usmażona sałatka z surowych owoców morza) po dekonwolucji.

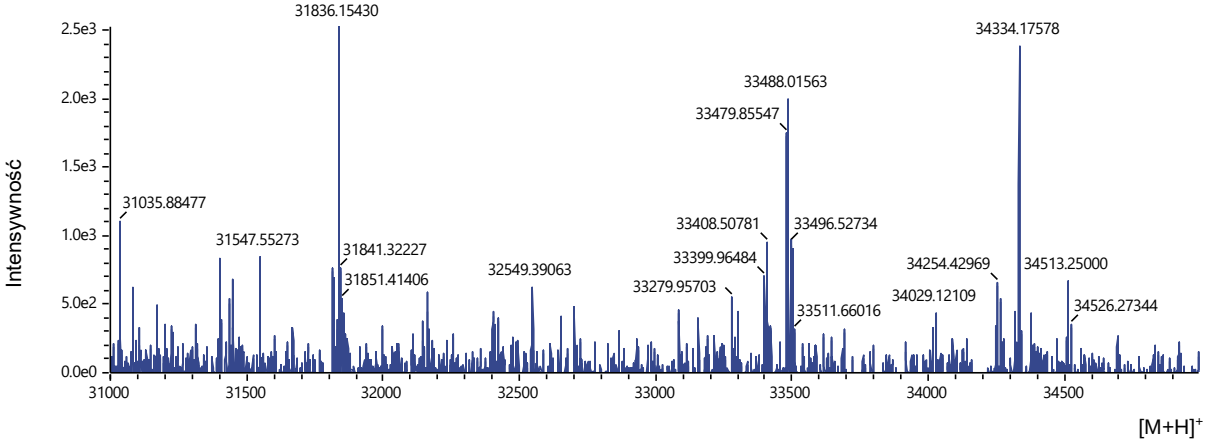
Rys. Z6. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 1c).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 2a (rozmrożone krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*).

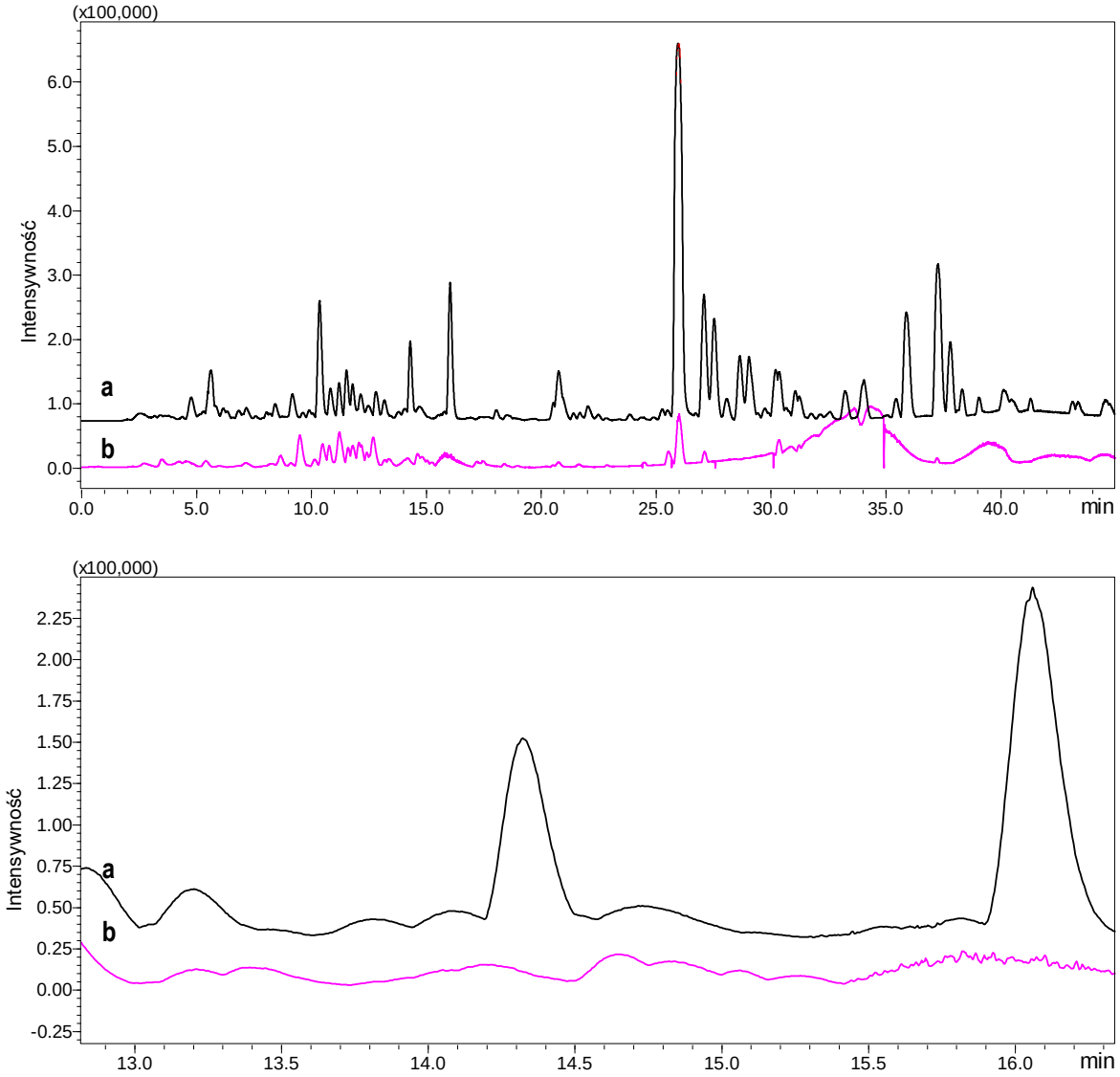


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,17 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 2a (rozmrożone krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*).

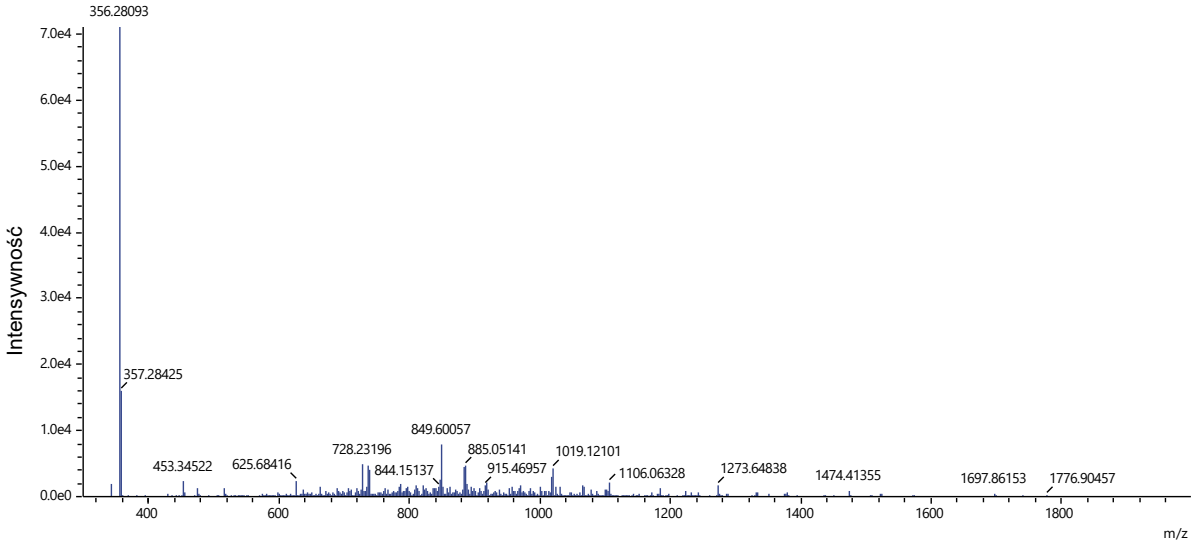


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,17 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 2a (rozmrożone krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*) po dekonwolucji.

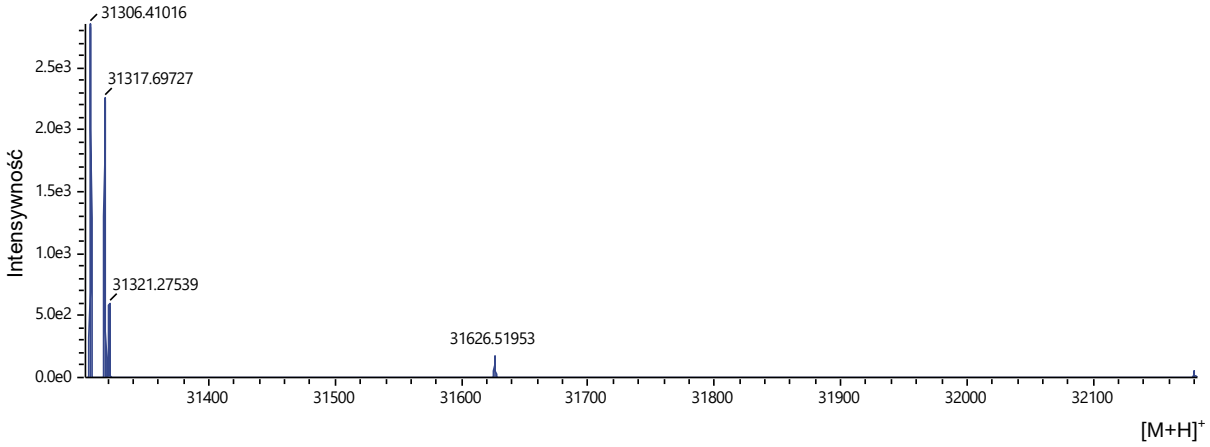
Rys. Z7. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 2a).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 2b (ugotowane krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*).

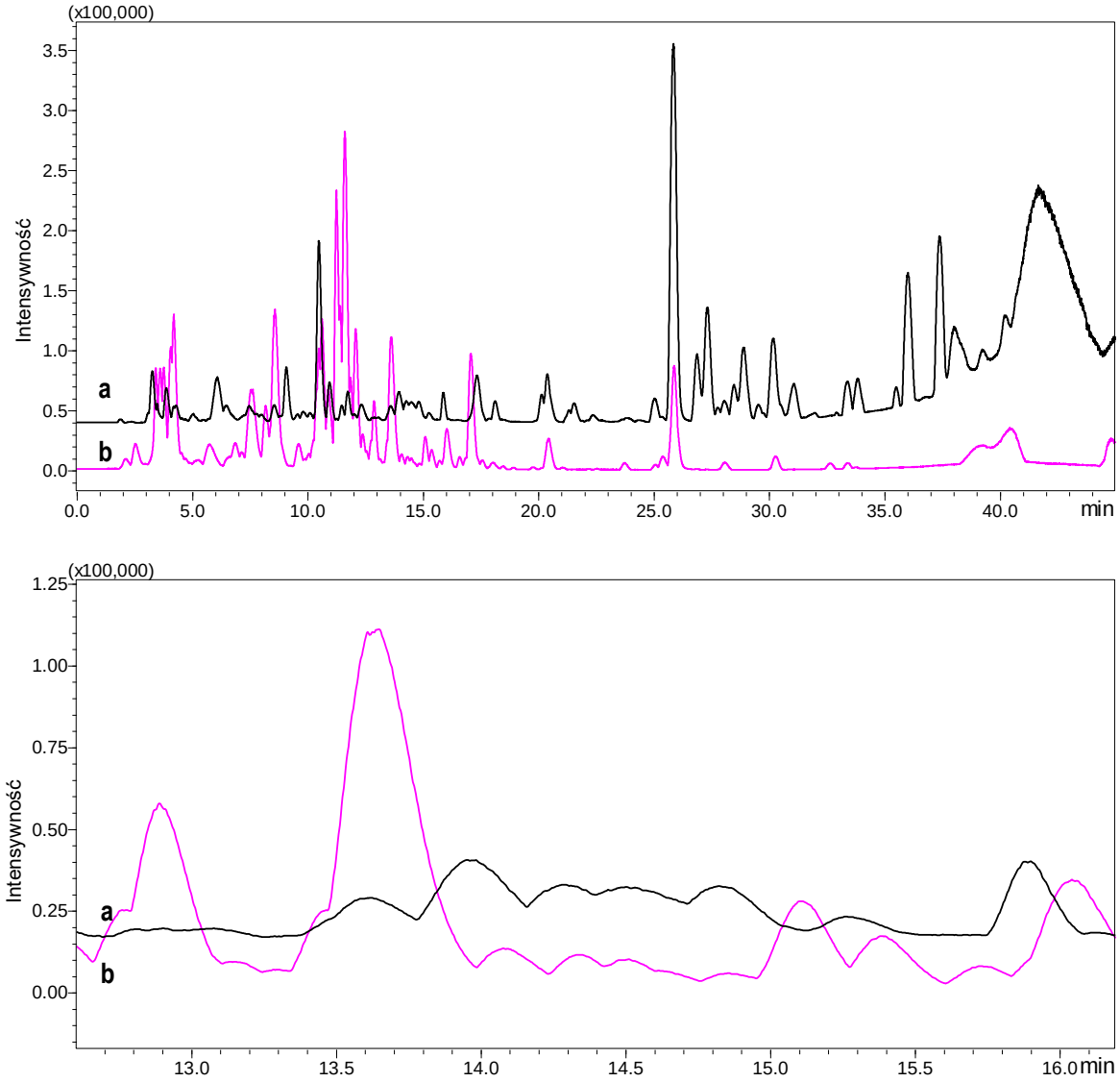


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,35 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 2b (ugotowane krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*).

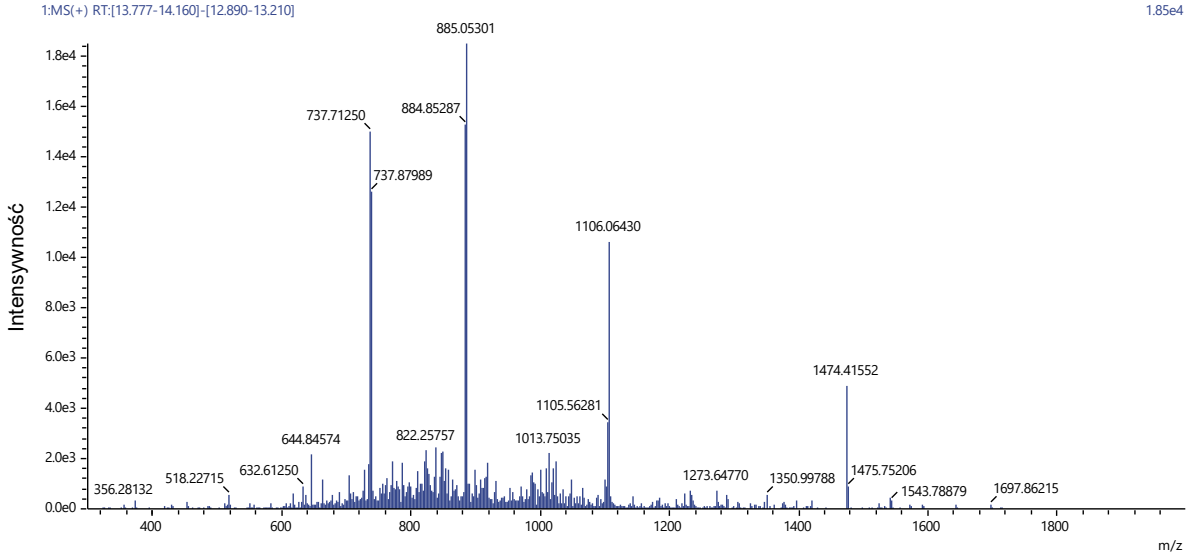


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,35 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 2b (ugotowane krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*) po dekonwolucji.

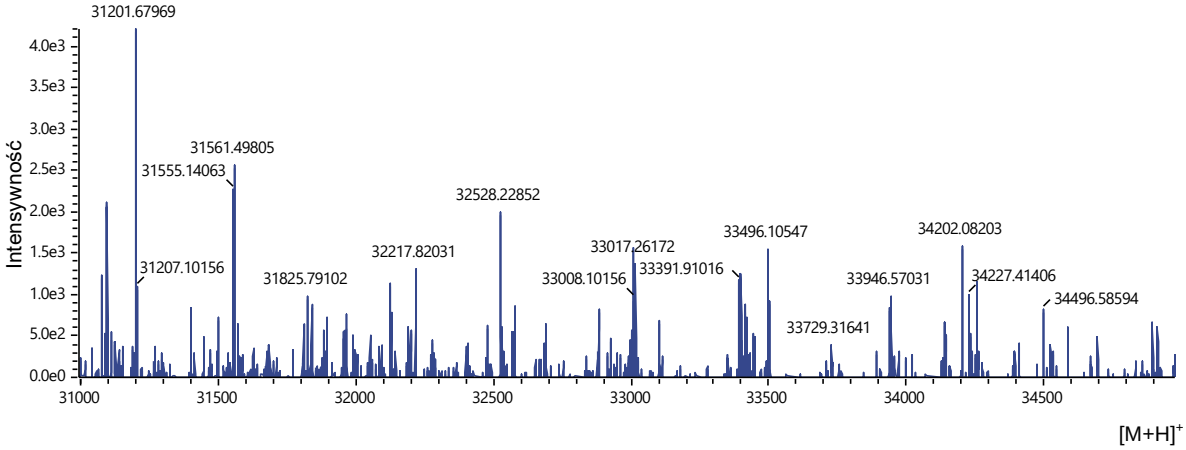
Rys. Z8. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 2b).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 2c (usmażone krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*).

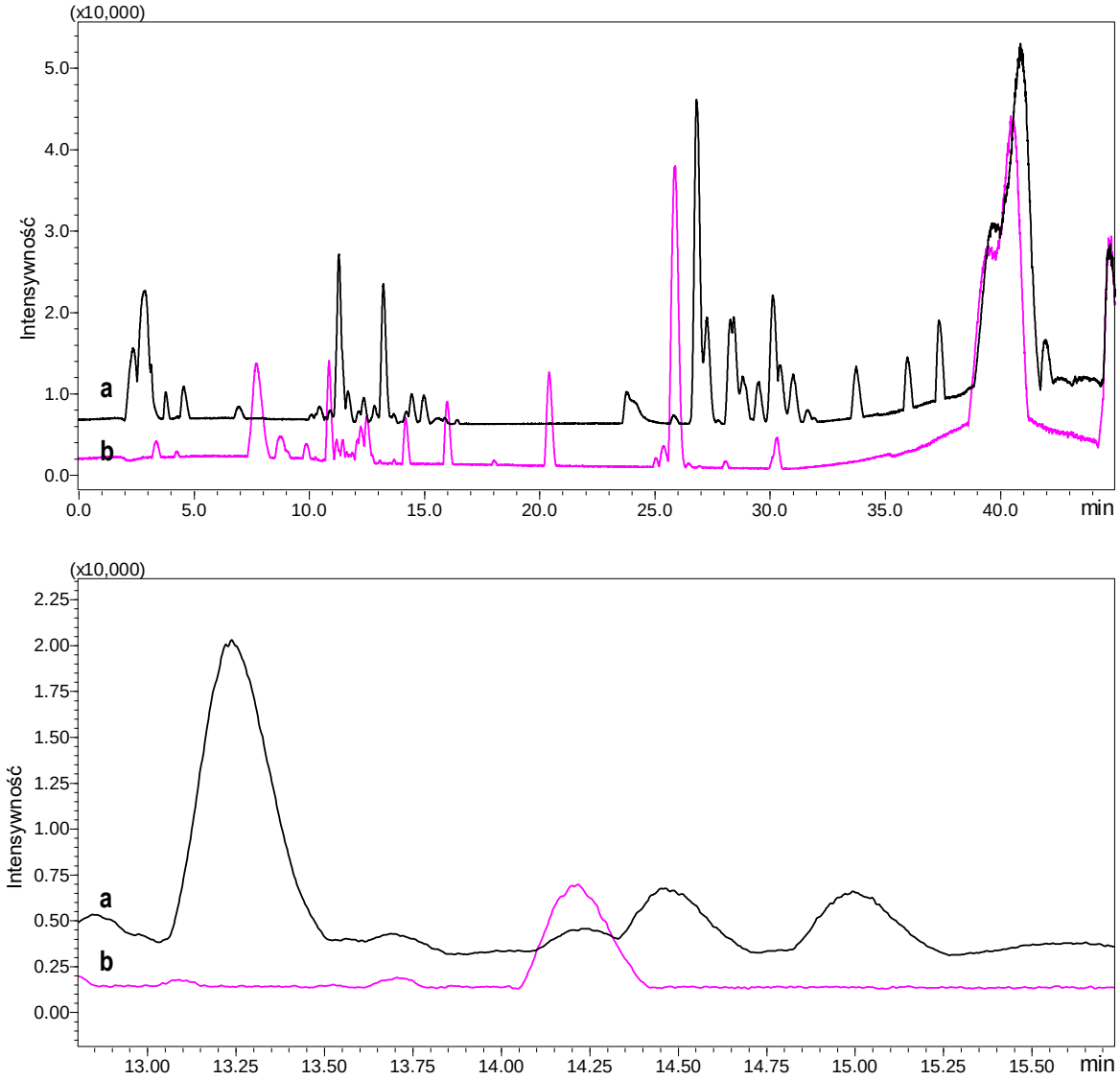


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 13,97 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 2c (usmażone krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*).

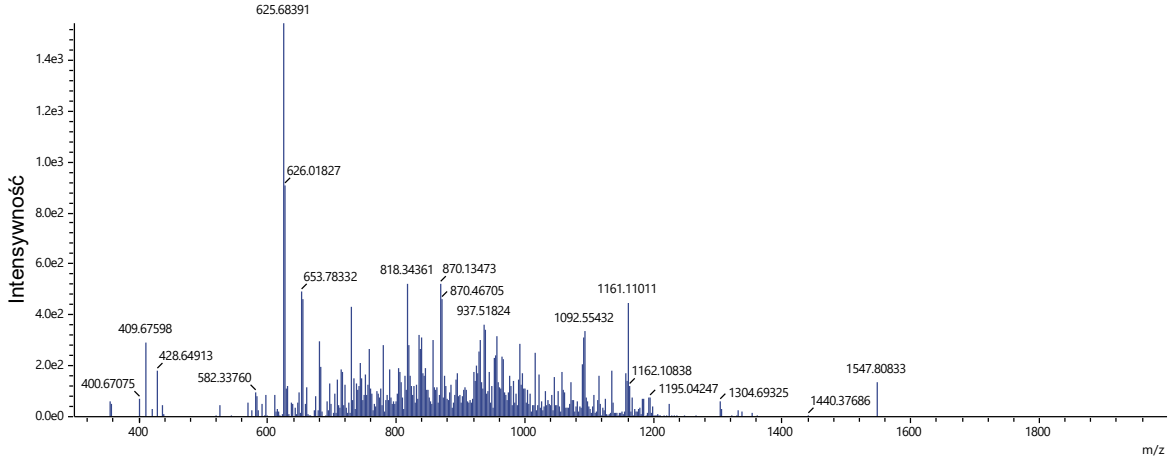


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 13,97 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 2c (usmażone krewetki kidi *Parapenaeopsis stylifera*) po dekonwolucji.

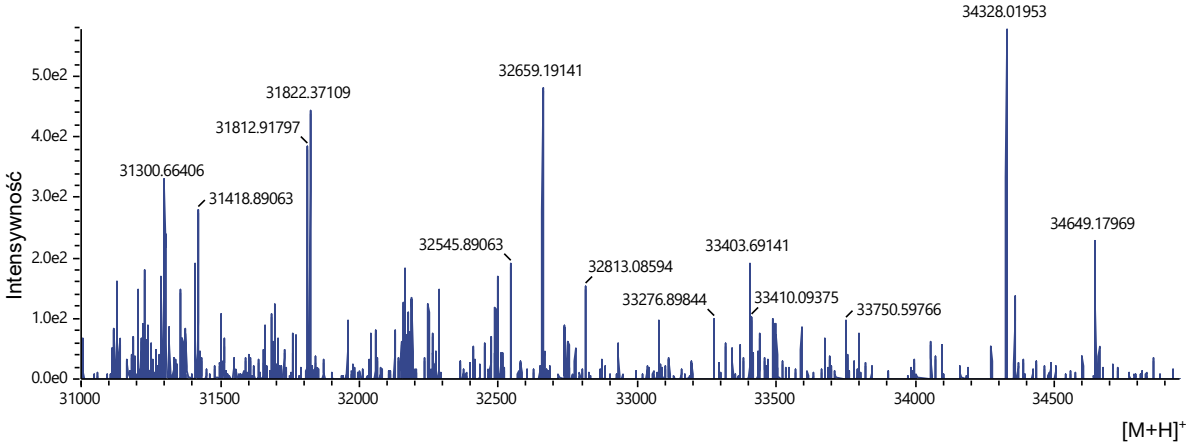
Rys. Z9. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 2c).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 3a (rozmrożone krewetki białe *Litopenaeus vannamei*).

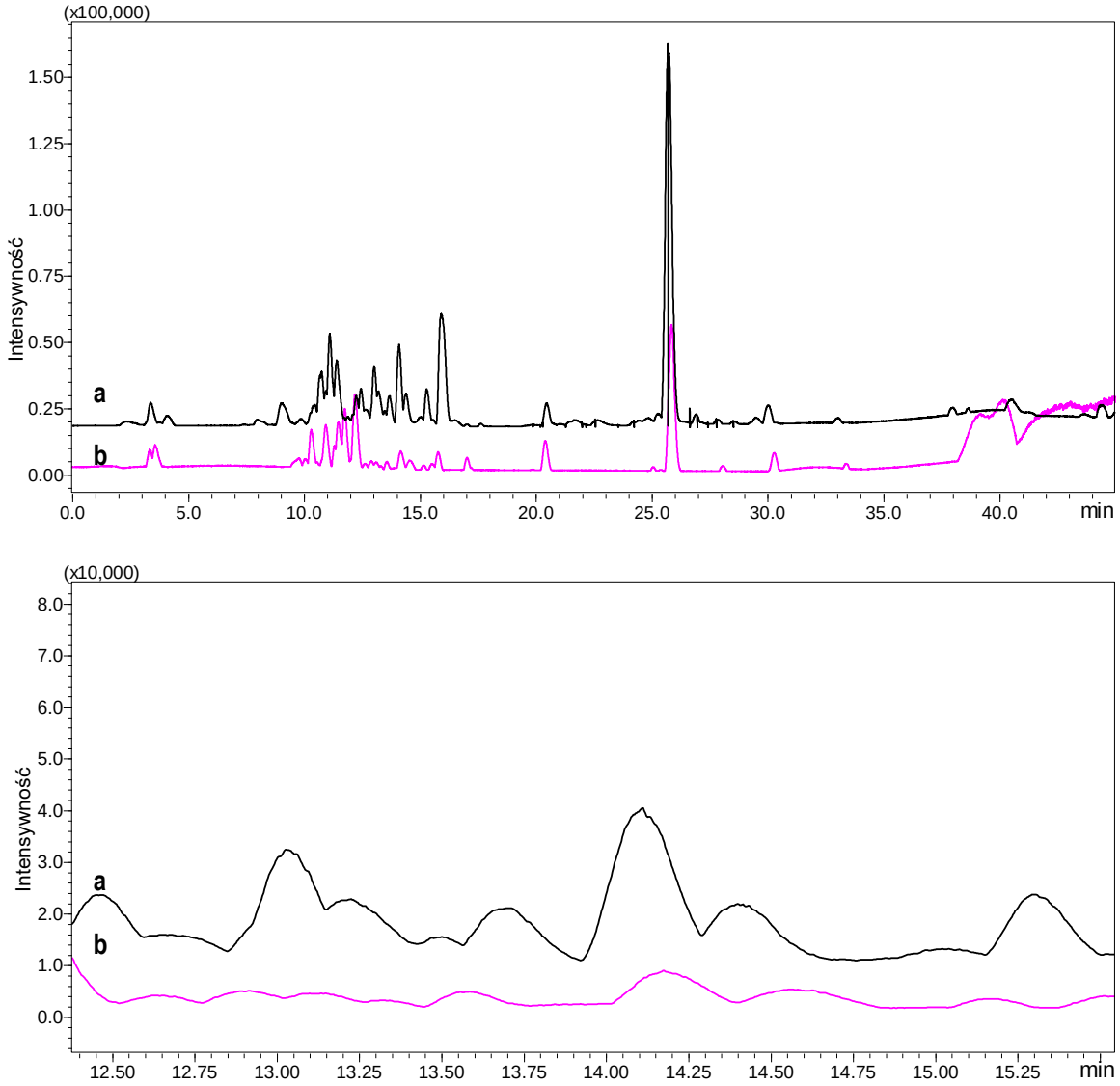


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,22 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 3a (rozmrożone krewetki białe *Litopenaeus vannamei*).

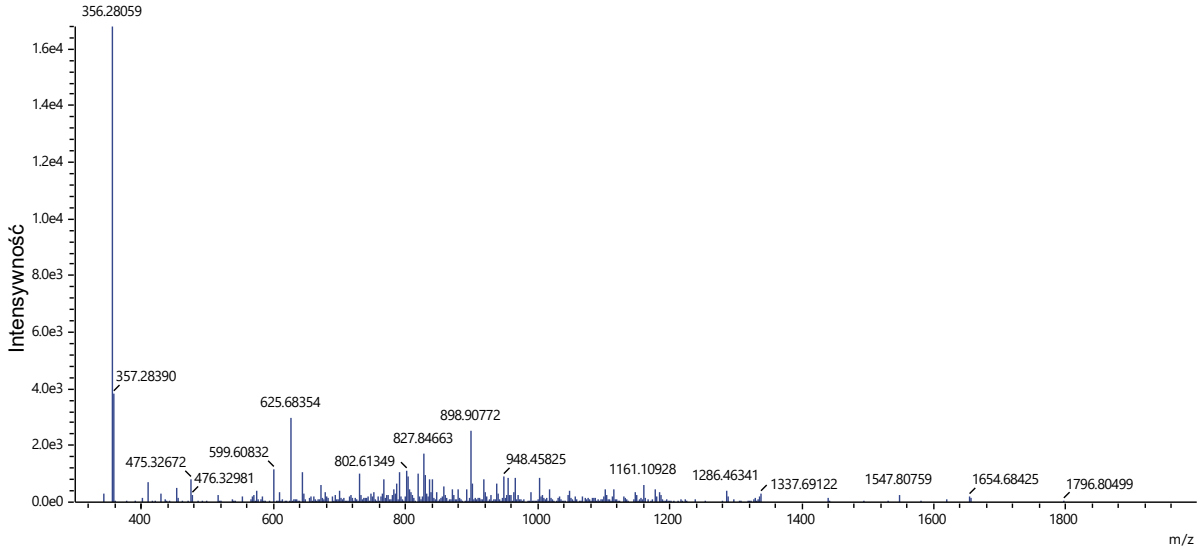


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,22 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 3a (rozmrożone krewetki białe *Litopenaeus vannamei*) po dekonwolucji.

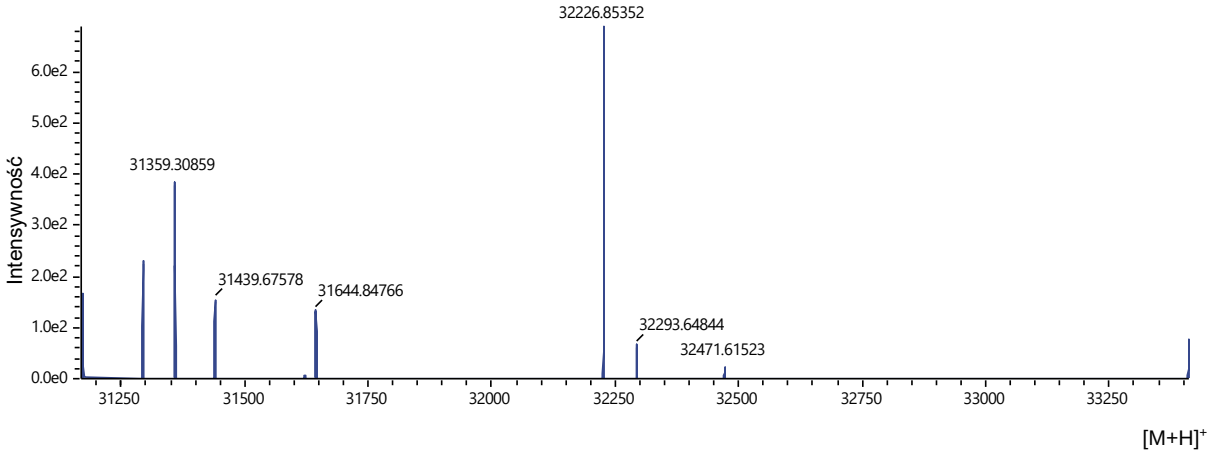
Rys. Z10. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 3a).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 3b (ugotowane krewetki białe *Litopenaeus vannamei*).

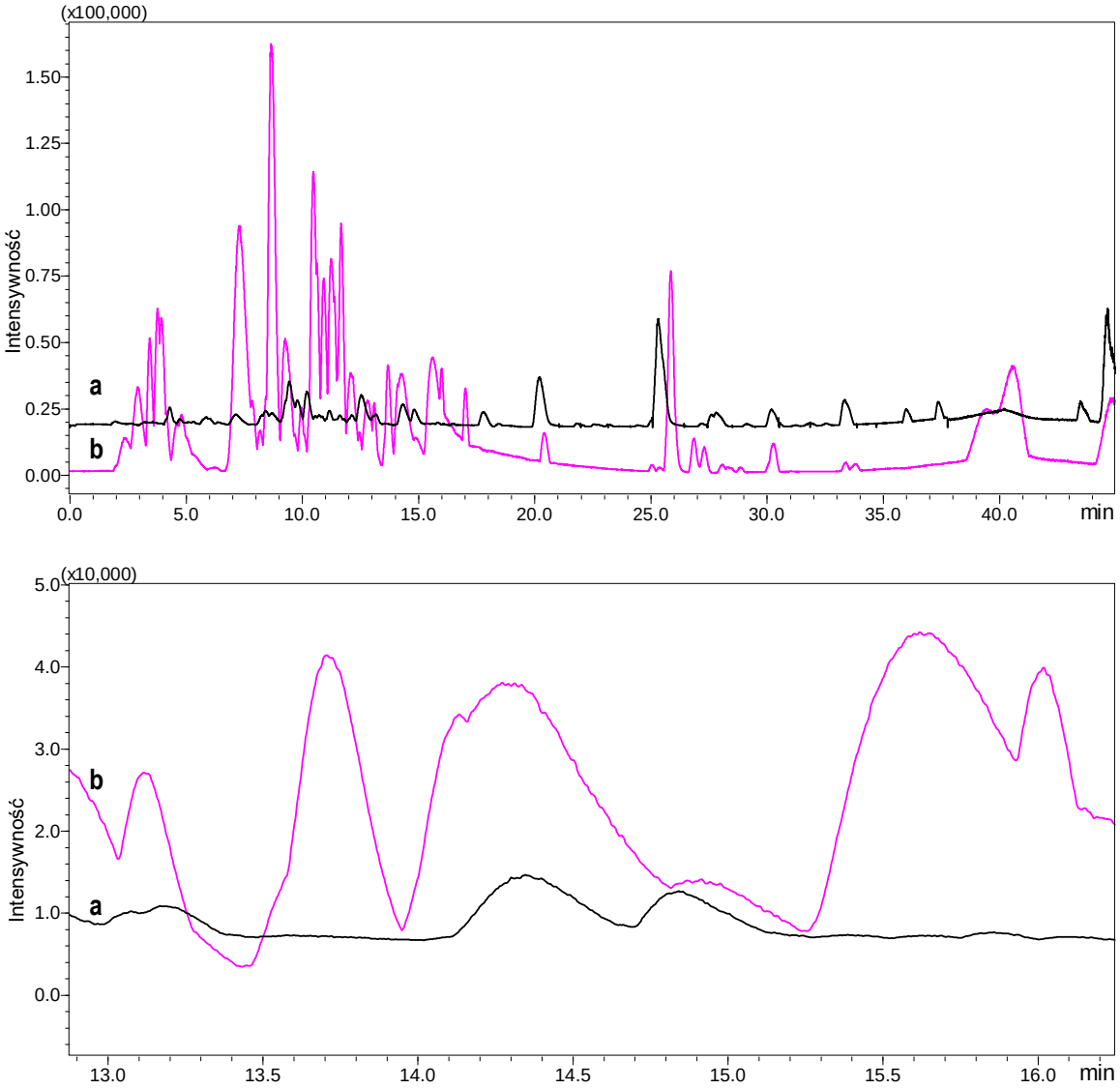


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,11 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 3b (ugotowane krewetki białe *Litopenaeus vannamei*).

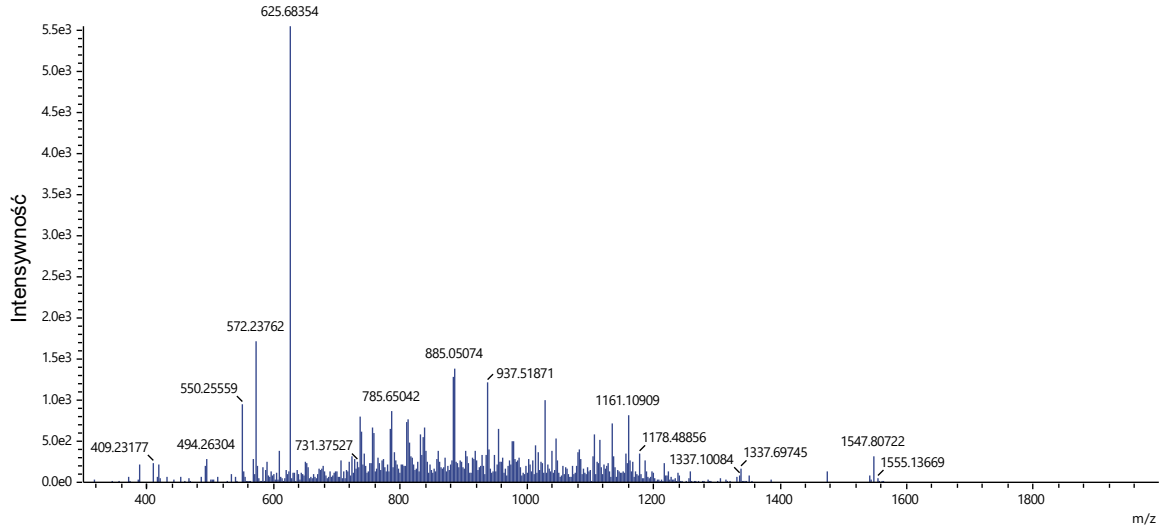


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,11 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 3b (ugotowane krewetki białe *Litopenaeus vannamei*) po dekonwolucji.

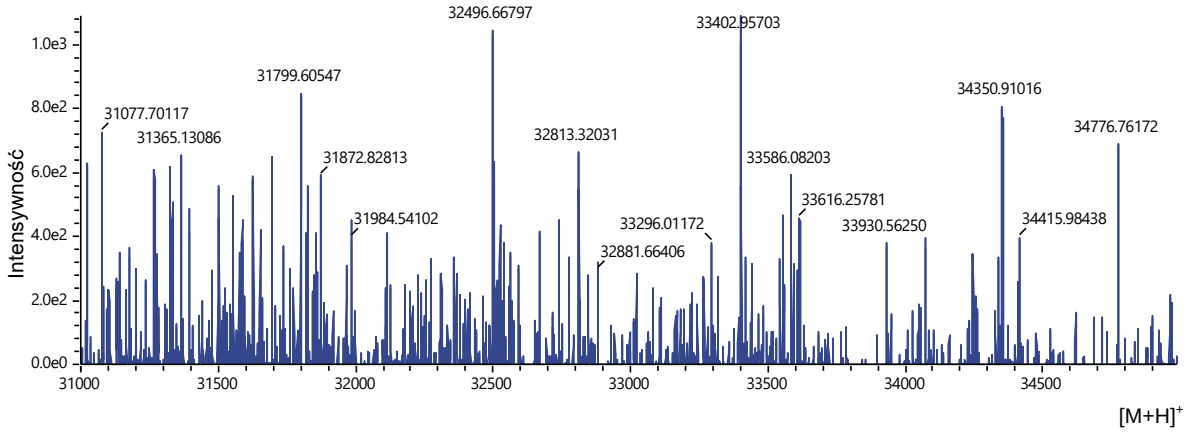
Rys. Z11. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 3b).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 3c (usmażone krewetki białe *Litopenaeus vannamei*).

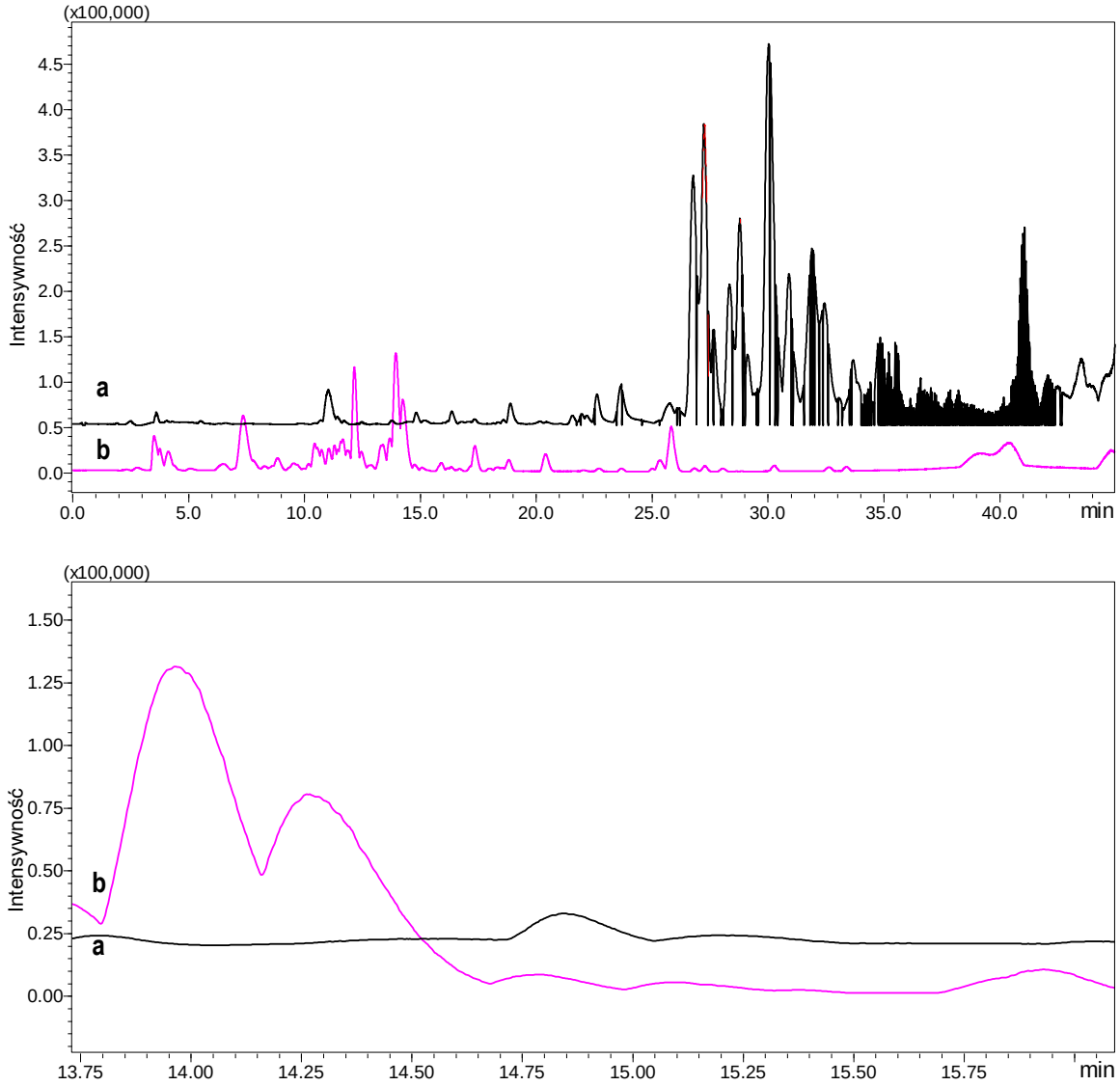


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,38 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 3c (usmażone krewetki białe *Litopenaeus vannamei*).

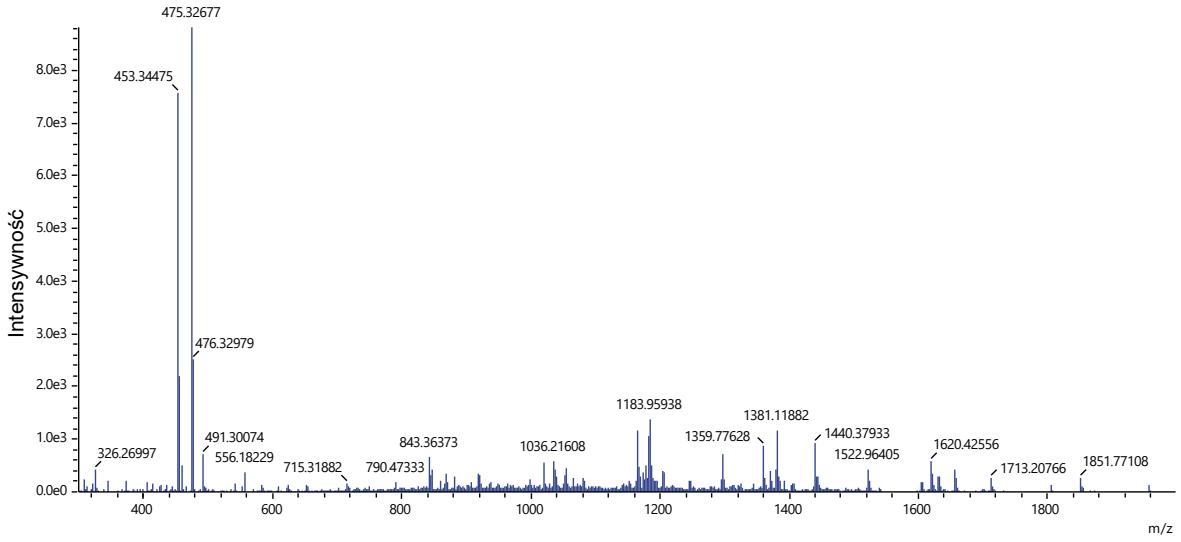


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,38 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 3c (usmażone krewetki białe *Litopenaeus vannamei*) po dekonwolucji.

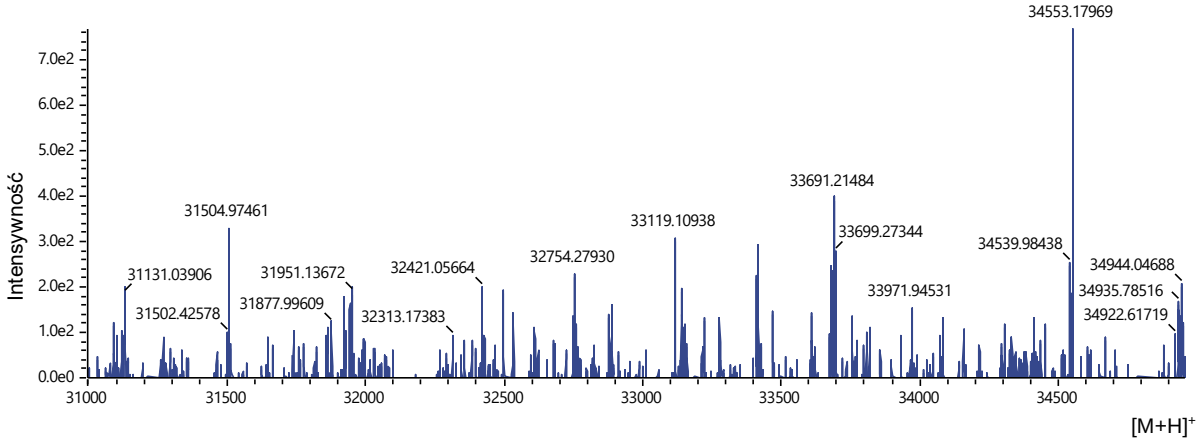
Rys. Z12. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 3c).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 4a (rozmrożone omułki chilijskie *Mytilus chilensis*).

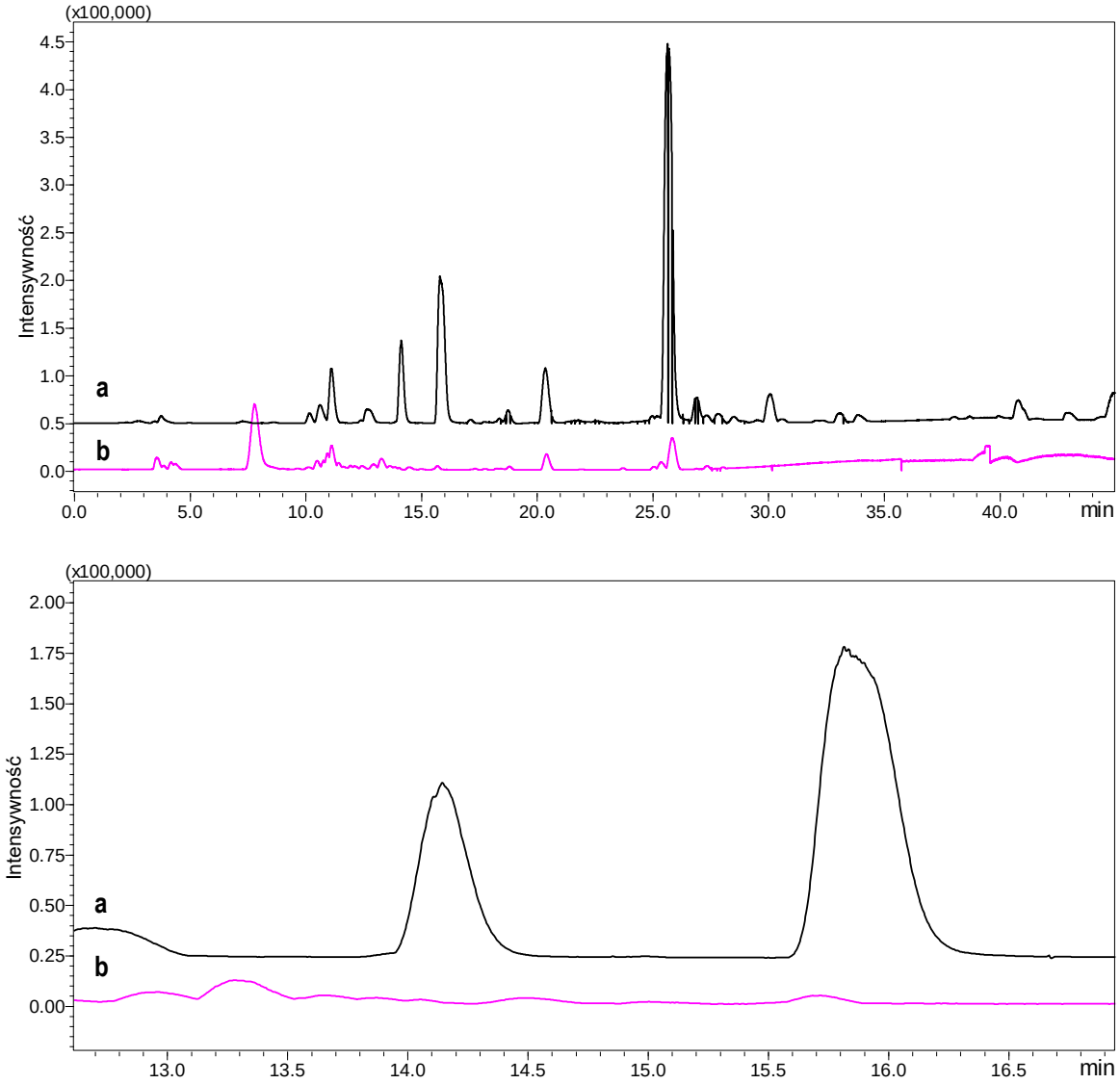


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,88 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 4a (rozmrożone omułki chilijskie *Mytilus chilensis*).

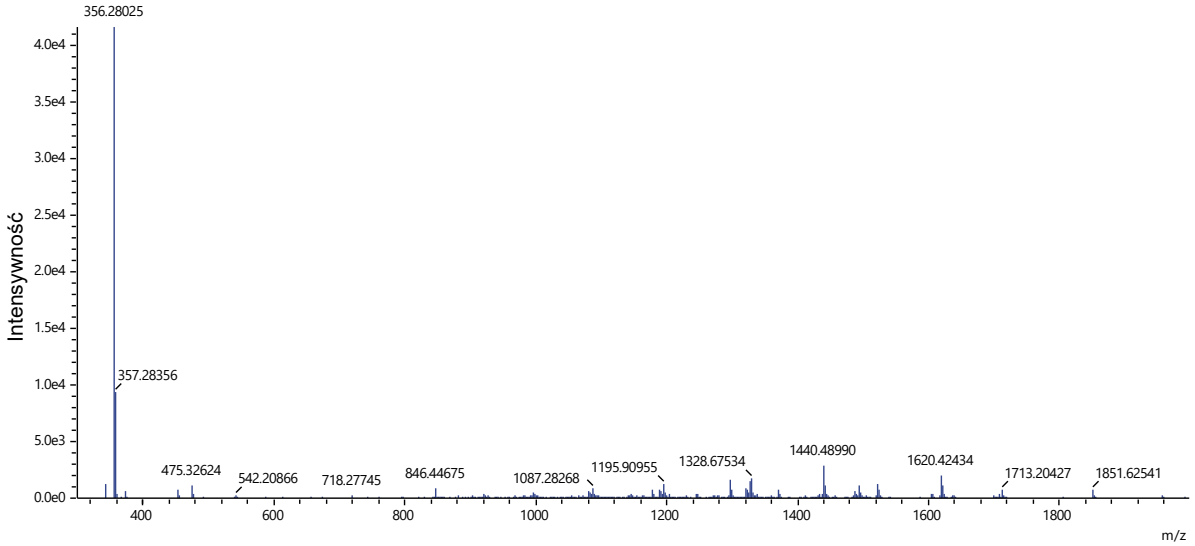


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,88 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 4a (rozmrożone omułki chilijskie *Mytilus chilensis*) po dekonwolucji.

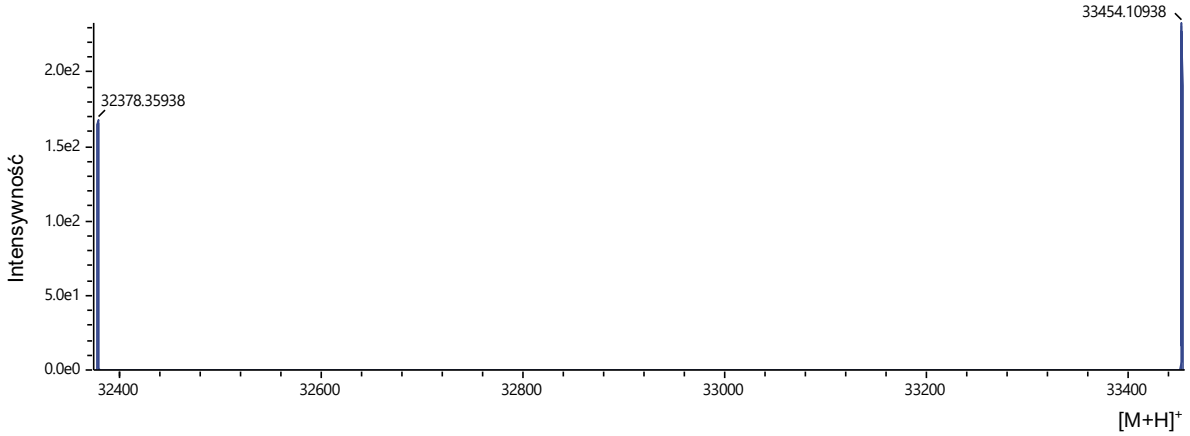
Rys. Z13. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 4a).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 4b (ugotowane omułki chilijskie *Mytilus chilensis*).

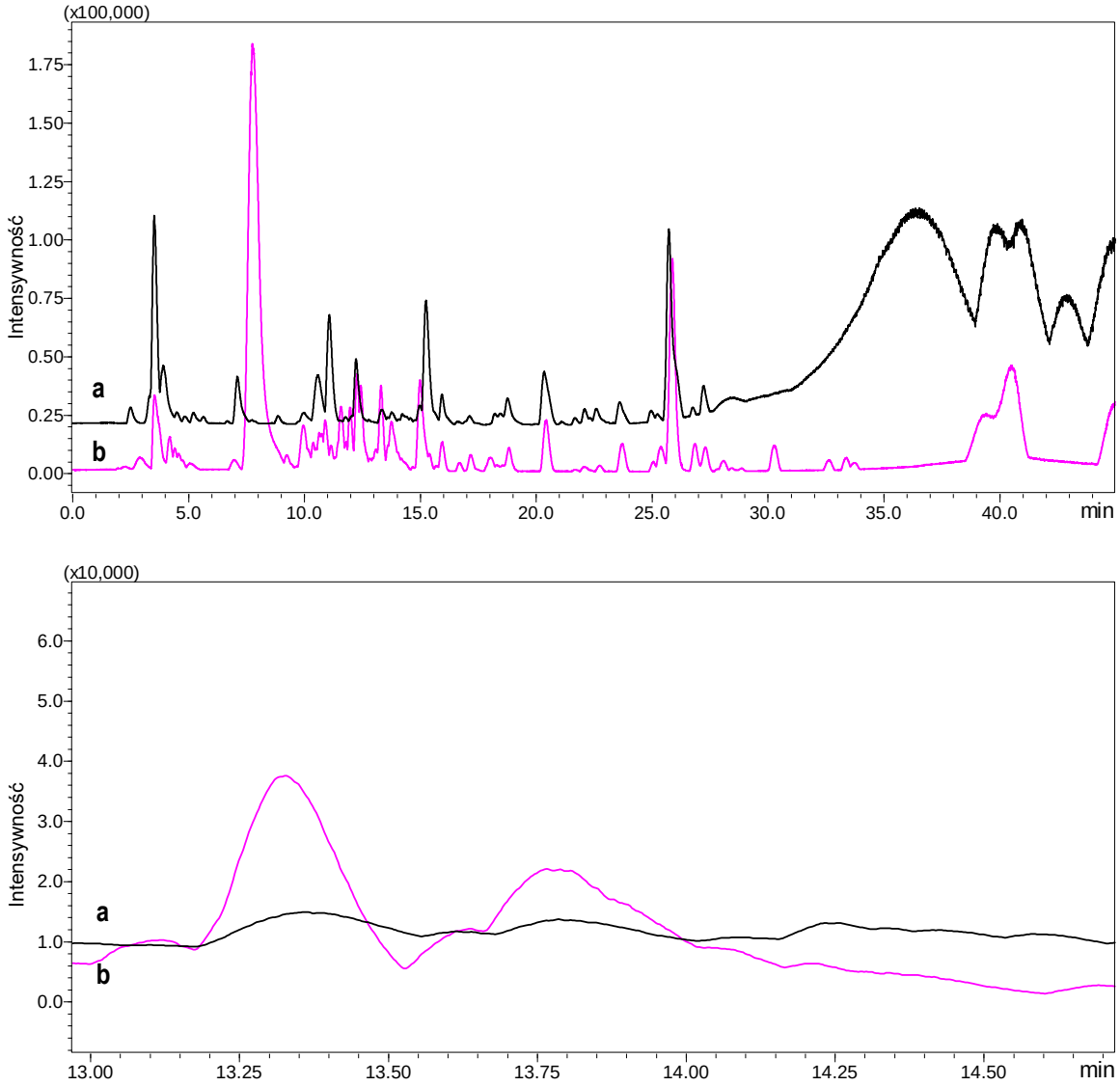


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,12 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 4b (ugotowane omułki chilijskie *Mytilus chilensis*).

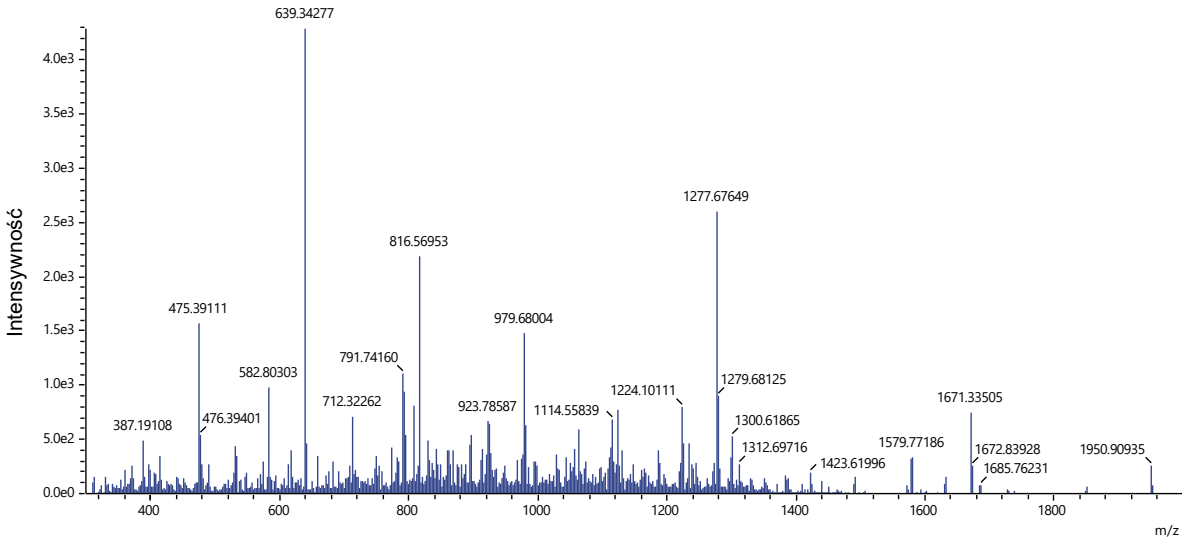


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,12 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 4b (ugotowane omułki chilijskie *Mytilus chilensis*) po dekonwolucji.

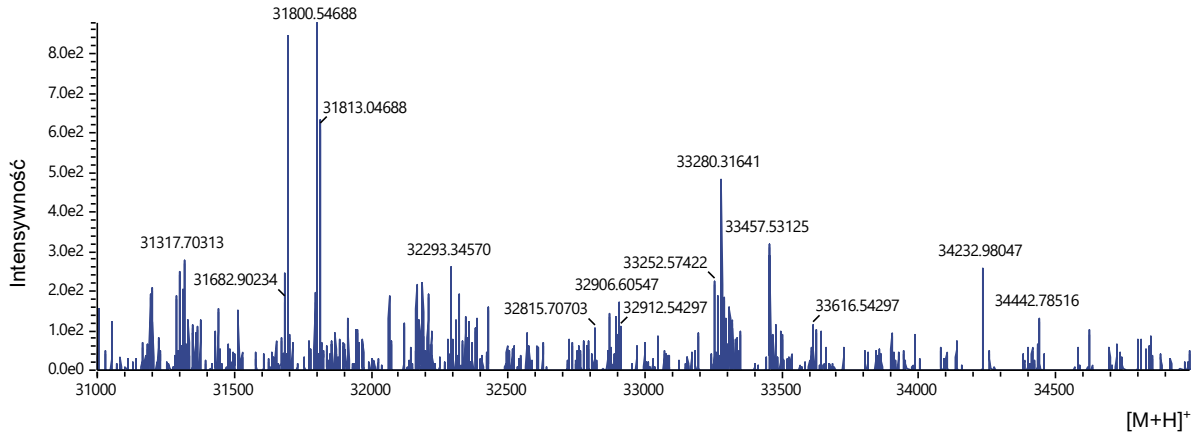
Rys. Z14. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 4b).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 4c (usmażone omułki chilijskie *Mytilus chilensis*).

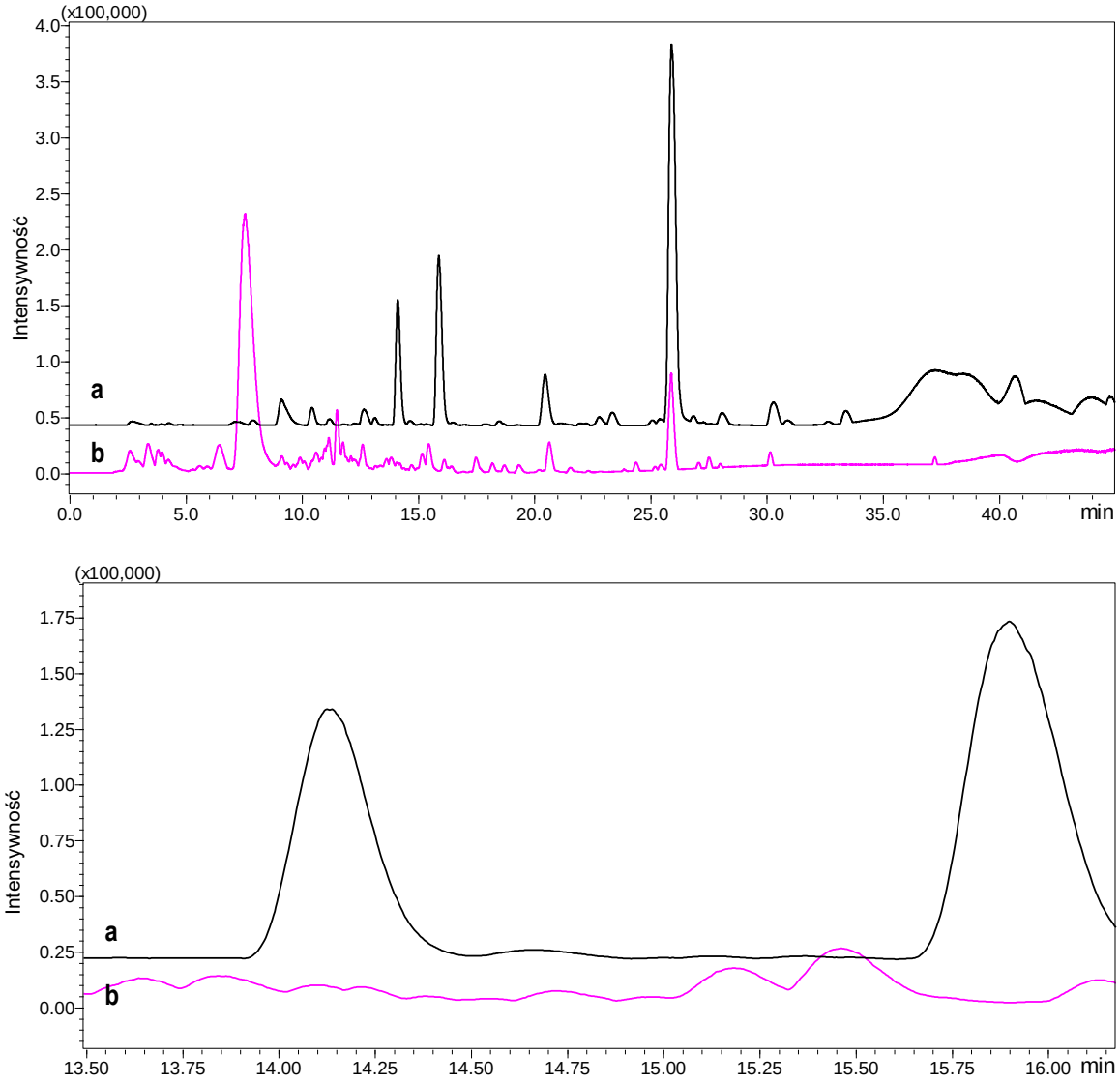


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 13,85 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 4c (usmażone omułki chilijskie *Mytilus chilensis*).

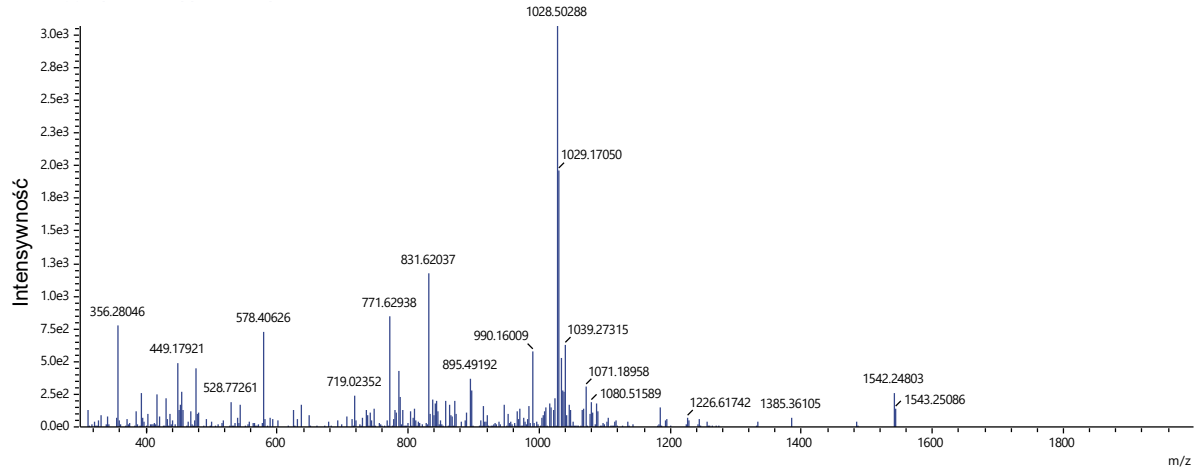


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 13,85 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 4c (usmażone omułki chilijskie *Mytilus chilensis*) po dekonwolucji.

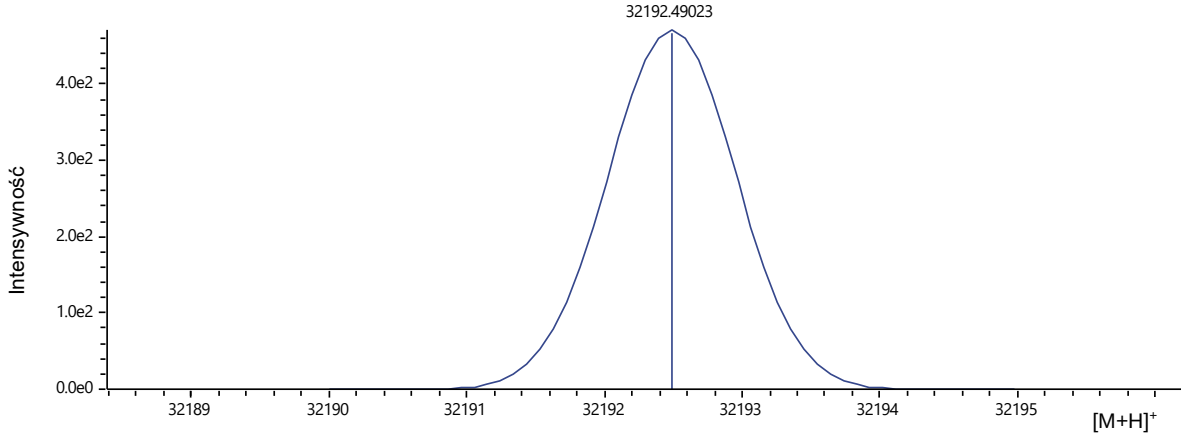
Rys. Z15. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 4c).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 5 („Krewetka na raz”, produkt gotowy).

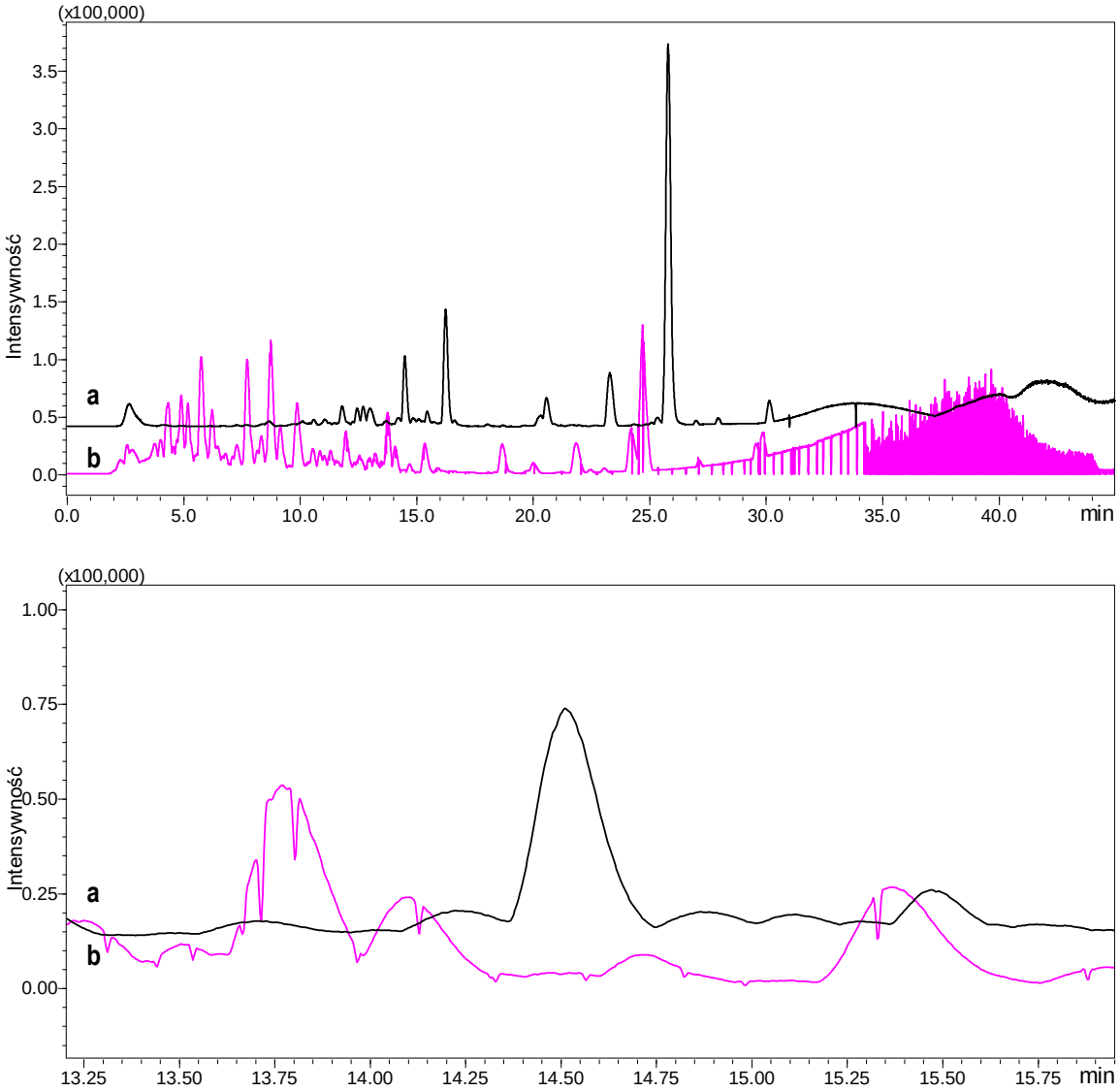


b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,70 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 5 („Krewetka na raz”, produkt gotowy).

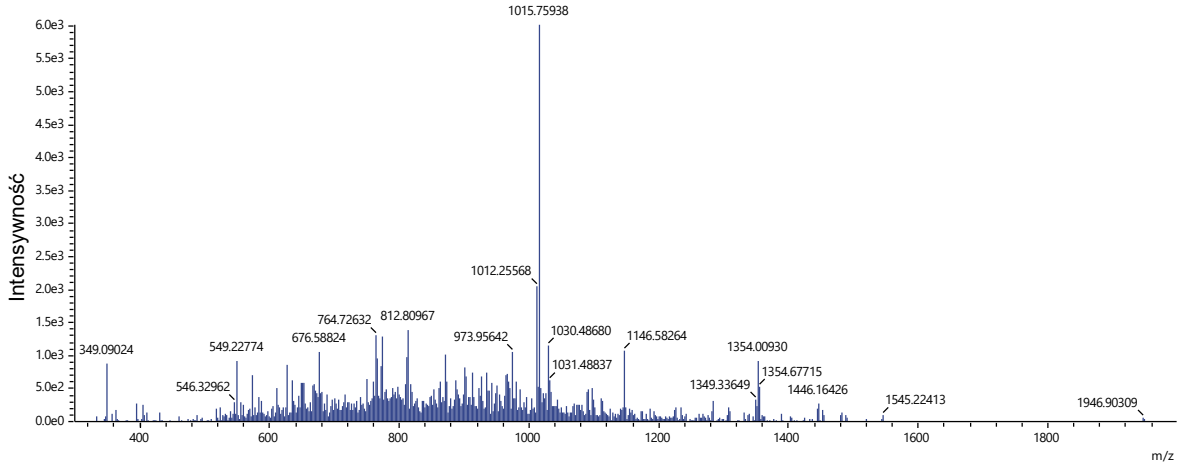


c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,70 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 5 („Krewetka na raz”, produkt gotowy) po dekonwolucji.

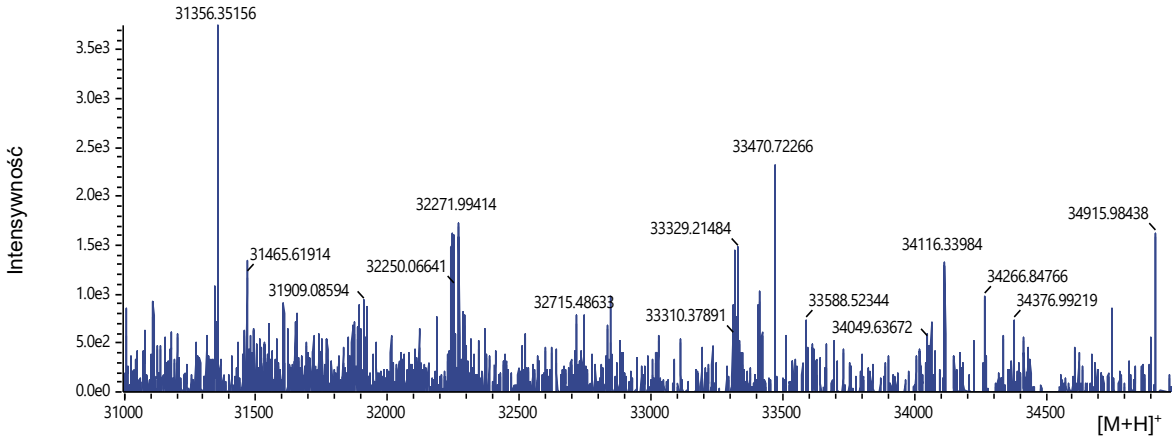
Rys. Z16. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 5).



a) Chromatogram z analizy ekstraktu (a) i hydrolizatu (b) białek z próbki 6 („Ogonki raków z czosnkiem i pietruszką", produkt gotowy).



b) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,25 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 6 („Ogonki raków z czosnkiem i pietruszką", produkt gotowy).



c) Widmo masowe piku o czasie retencji 14,25 min z chromatogramu z analizy hydrolizatu białek z próbki 6 („Ogonki raków z czosnkiem i pietruszką”, produkt gotowy) po dekonwolucji.

Rys. Z17. Szacowanie masy tropomiozyn metodą dekonwolucji widma (próbka 6).

Załącznik 4. Peptydy zidentyfikowane w próbkach po analizie RP-LC-MS/MS. Identyfikacji dokonano za pomocą oprogramowania PEAKS, wersja 10.0 [Zhang i in. 2012]. Na szaro zaznaczono peptydy zidentyfikowane *de novo.*

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
1a	MQQLENDLDQVQESLLK	0	57,30	2030,00	17	2,6	1016,01	2	24,87	
	ALSNAEGEVAALNR	0	49,48	1413,72	14	1,7	707,87	2	23,11	
	LAMVEADLER	0	40,45	1145,58	10	0,7	573,80	2	23,37	
	IQLLEEDLER	0	37,97	1256,66	10	1,3	629,34	2	23,75	
	LAEASQAADESER	0	37,62	1375,62	13	2,1	688,82	2	3,66	
	IVELEEELR	0	29,69	1128,60	9	1,5	565,31	2	23,48	
	MDALENQLK	0	26,54	1060,52	9	1,7	531,27	2	21,08	
	ADTLEQQNK	0	26,41	1045,50	9	2,0	523,76	2	3,40	
	FLAEEADR	0	24,79	949,45	8	4,6	475,73	2	9,59	
	SITDELDQTFSELSGY	0	22,03	1803,81	16	-0,5	902,91	2	25,88	
	VAEC(+57,02)ESEIQGLNR	0	47,96	1503,70	13	2,3	752,86	2	21,26	Karbamidometylacja
	LAITEVDLER	0	46,91	1157,63	10	2,3	579,82	2	23,63	
	KLAITEVDLER	1	40,77	1285,72	11	2,9	643,87	2	23,15	
	EVDRLEDELLAEK	1	33,49	1557,79	13	0,8	779,9	2	23,52	
	IVELEEELK	0	29,52	1100,6	9	1,2	551,31	2	23,42	
	SLEISEQEASQR	0	32,19	1375,66	12	-0,6	688,80	2	15,83	
	EDSYEETIR	0	29,81	1140,49	9	2,9	571,26	2	11,44	
	WIAEDADR	0	24,17	974,45	8	2,2	488,23	2	12,24	
1b	MQQLENDLDQVQESLLK	0	64,20	2030,00	17	2,6	1016,01	2	24,86	
	FLAEEADRKYDEVAR	2	50,01	1810,88	15	1,8	604,64	3	21,96	
	SITDELDQTFSELSGY	0	47,67	1803,81	16	1,6	902,91	2	25,88	
	ALSNAEGEVAALNR	0	47,23	1413,72	14	-0,3	707,87	2	23,17	

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
	LAEASQAADESER	0	35,25	1375,62	13	2,6	688,82	2	3,73	
	IQLLEEDLER	0	34,86	1256,66	10	1,5	629,34	2	23,80	
	EVDRLEDELVNEKEKYK	3	34,54	2135,07	17	-3,3	712,70	3	22,71	
	IVELEEELRVVGNNLK	1	33,20	1853,03	16	3,5	927,52	2	24,31	
	IQLLEEDLERSEER	1	29,64	1757,88	14	2,0	879,95	2	23,55	
	IVELEEELR	0	29,31	1128,60	9	2,0	565,31	2	23,53	
	SLSDEERMDALENQLK	1	26,76	1876,88	16	3,1	626,64	3	23,62	
	FLAEEADR	0	25,08	949,45	8	2,5	475,73	2	10,83	
	SLSDEERMDALENQLKEAR	2	23,67	2233,06	19	4,7	745,37	3	23,53	
	IQLLEEDLERSEERLNTATTK	2	22,86	2487,28	21	3,3	830,10	3	23,61	
	KLAMVEADLERAEER	2	22,30	1758,89	15	2,6	587,31	3	22,92	
	MDALENQLK	0	20,32	1060,52	9	1,1	531,27	2	22,04	
	VAEC(+57,02)ESEIQGLNR	0	50,87	1503,70	13	1,6	752,86	2	21,63	Karbamidometylacja
	WIAEDADRKFDEAAR	2	38,90	1791,85	15	0,7	598,29	3	22,62	
	KLAITEVDLER	1	31,05	1285,72	11	1,1	643,87	2	23,21	
	WIAEDADR	0	28,82	974,45	8	3,0	488,23	2	12,98	
	SQGDEERIDLLEK	1	28,48	1530,75	13	2,6	766,39	2	22,79	
	EVDRLEDELLAEKER	2	24,37	1842,93	15	3,6	461,74	4	23,21	
	IVELEEELKVVGNNMK	1	24,20	1842,98	16	0,1	615,33	3	24,07	
	LAITEVDLERAEAR	1	20,85	1584,85	14	0,2	529,29	3	23,47	
	VIDLEEQLTVVGANIK	0	57,12	1739,97	16	1,5	870,99	2	24,97	
	AISDELDATFAELAGY	0	47,32	1684,78	16	3,3	843,40	2	25,94	
1c	VAEC(+57,02)ESEIQ(+0,98)GLNR	0	29,07	1504,68	13	-3,2	753,34	2	21,69	Karbamidometylacja; Deamidacja (NQ)

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
	RN(+0,98)TSSSC(+57,02)GR	1	19,66	1024,44	9	0,6	513,23	2	3,77	Deamidacja (NQ); Karbamidometylacja
	MQQVEN(+0,98)ELDQVQEQLSL	0	19,34	2030,95	17	3,9	1016,48	2	24,81	Deamidacja (NQ)
	Q(+0,98)DLERSEEKVEM(+15,99)N(+0,98)ESK	2	18,20	1967,86	16	5,6	492,98	4	22,94	Deamidacja (NQ); Oksydacja (M)
	QMELVAN(+0,98)EAER	0	17,91	1289,59	11	-5,1	645,80	2	9,11	Deamidacja (NQ)
	Q(+0,98)Q(+0,98)ESGC(+57,02)DGAITAKTK	1	17,03	1594,72	15	-2,9	532,58	3	16,25	Deamidacja (NQ); Karbamidometylacja
	NNSEMPEK	0	16,71	947,40	8	-5,3	948,40	1	24,10	
	DNAMDRADLAEQQ(+0,98)AR	1	16,66	1703,75	15	-4,4	568,92	3	13,86	Deamidacja (NQ)
	N(+0,98)GTN(+0,98)NLK	0	16,63	761,36	7	-0,3	762,36	1	24,76	Deamidacja (NQ)
	VANSEN(+0,98)ESN(+0,98)K	0	16,52	1092,46	10	2,5	547,24	2	22,86	Deamidacja (NQ)
	DGDTAPAGGSQ(+0,98)GR	0	15,03	1188,50	13	-2,9	595,26	2	14,80	Deamidacja (NQ)
2a	MQQLENDLDQVQESLLK	0	56,00	2030,00	17	2,3	1016,01	22	24,84	
	ALSNAEGEVAALNR	0	45,88	1413,72	14	2,1	707,87	2	23,15	
	SITDELDQTFSELSGY	0	45,74	1803,81	16	2,0	902,91	2	25,93	
	EVDRLEDELVNEKEK	2	40,31	1843,92	15	2,7	615,65	3	22,27	
	LAEASQAADESER	0	38,52	1375,62	13	2,9	688,82	2	3,57	
	SLSDEERMDALENQLK	1	36,74	1876,88	16	2,3	626,64	3	23,50	
	RMQQLENDLDQVQESLLK	1	36,23	2186,1	18	2,5	729,71	3	24,34	
	EVDRLEDELVNEK	1	35,69	1586,78	13	2,4	794,40	2	23,14	
	LAMVEADLER	0	34,11	1145,58	10	2,4	573,80	2	23,42	
	KLAMVEADLER	1	33,93	1273,67	11	1,1	637,84	2	22,51	
	ADTLEQQNK	0	32,31	1045,50	9	3,6	523,76	2	2,76	
	MDALENQLK	0	31,68	1060,52	9	2,4	531,27	2	21,69	

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
	IQLLEEDLER	0	31,51	1256,66	10	2,0	629,34	2	23,81	
	ANNQLVEKDK	1	31,41	1157,6	10	5,9	579,81	2	2,47	
	FLAEEADR	0	29,86	949,45	8	2,5	475,73	2	11,12	
	IQLLEEDLERSEER	1	29,50	1757,88	14	3,4	879,95	2	23,38	
	AMVEADLER	0	27,70	1032,49	9	4,7	517,26	2	19,55	
	IVELEEELR	0	25,52	1128,60	9	2,0	565,31	2	23,54	
	LAMVEADLERAEER	1	23,62	1630,80	14	1,7	816,41	2	23,32	
	DNAMDRADTLEQQNK	1	22,39	1747,78	15	2,6	583,60	3	15,35	
	SITDELDQTFSELSG	0	21,61	1640,74	15	0,2	821,38	2	25,77	
	EVDRLEDELVNEKEKYK	3	20,92	2135,07	17	3,5	534,78	4	22,72	
	SLEVSEEK	0	20,31	919,45	8	3,5	460,73	2	3,71	
	ELEEELR	0	20,31	916,45	7	0,1	917,46	1	23,50	
2b	SLSDEERMDALENQLKEAR	2	64,49	2233,06	19	2,0	745,36	3	23,39	
	MQQLENDLDQVQESLLK	0	63,35	2030,00	17	1,4	1016,01	2	24,75	
	IQLLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADESER	3	62,11	3844,89	34	1,6	962,23	4	24,20	
	MQQLENDLDQVQESLLKANNQLVEKDKALSNAEGEVAALNR	3	60,41	4565,30	41	0,7	914,07	5	24,95	
	ANNQLVEKDKALSNAEGEVAALNRR	3	59,63	2709,42	25	2,8	678,36	4	22,98	
	IVELEEELRVVGNNLK	1	59,07	1853,03	16	1,7	927,52	2	24,18	
	ANNQLVEKDKALSNAEGEVAALNR	2	58,79	2553,31	24	-0,7	852,11	3	23,17	
	FLAEEADRKYDEVAR	2	55,79	1810,88	15	2,0	604,64	3	21,92	
	EVDRLEDELVNEKEKYK	3	53,81	2135,07	17	1,6	712,7	3	22,43	
	SITDELDQTFSELSGY	0	53,10	1803,81	16	0,8	902,91	2	25,91	
	RMQQLENDLDQVQESLLK	1	47,05	2186,10	18	2,0	729,71	3	24,20	
	RIQLLEEDLERSEERLNTATTK	3	43,85	2643,38	22	1,3	661,86	4	23,31	

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
	IQLLEEDLERSEERLNTATTK	2	41,57	2487,28	21	1,3	830,10	3	23,50	
	KLAMVEADLERAEERAETGESK	3	38,66	2461,21	22	0,4	616,31	4	23,03	
	LAEASQAADESERMR	1	35,70	1662,76	15	3,6	555,26	3	6,02	
	IVELEEELR	0	30,89	1128,60	9	2,8	565,31	2	23,49	
	FLAEEADR	0	28,71	949,45	8	0,8	475,73	2	12,17	
2c	MQQ(+0,98)LEN(+0,98)DLDQVQ(+0,98)ESLLK	0	54,72	2032,95	17	4,2	1017,48	2	24,78	Deamidacja (NQ)
	VVGNNLQ	0	40,78	742,40	7	1,3	743,40	1	2,86	
	LM(+15,99)AEEADR	0	37,16	949,42	8	-1,3	950,42	1	10,75	Oksydacja (M)
	APQ(+0,98)TAEGDVAALNR	0	22,56	1412,69	14	-2,9	707,35	2	23,35	Deamidacja (NQ)
	SLNALQ(+0,98)DDLQ(+0,98)R	0	21,69	1273,62	11	-4,2	425,54	3	22,14	Deamidacja (NQ)
	AAADESER	0	18,92	847,37	8	2,8	424,69	2	8,23	
	RVEN(+0,98)GGETPGR	1	17,66	1171,56	11	-2,7	586,78	2	25,56	Deamidacja (NQ)
	TEEPAER	0	16,75	830,38	7	0,8	416,19	2	4,11	
	EADVADLQ(+0,98)Q(+0,98)R	0	16,59	1145,52	10	1,9	573,77	2	23,43	Deamidacja (NQ)
	LEEMNEK	0	16,38	891,40	7	1,1	892,41	1	10,33	
	QGSARENHQDKNHSR	2	16,37	1762,82	15	-0,3	441,71	4	17,22	
3a	MQQLENDLDQVQESLLK	0	63,15	2030,00	17	4,4	1016,01	2	24,91	
	SITDELDQTFSELSGY	0	52,27	1803,81	16	1,6	902,91	2	26,04	
	IVELEEELR	0	36,02	1128,60	9	1,4	565,31	2	23,58	
3b	MQQLENDLDQVQESLLKANIQLVEKDKALSNAEGEVAALNR	3	72,38	4564,34	41	0,3	913,88	5	25,12	
	IQLLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAADESER	3	65,10	3844,89	34	1,6	962,23	4	24,37	
	SLSDEERMDALENQLKEAR	2	61,10	2233,06	19	1,9	745,37	3	23,41	
	MQQLENDLDQVQESLLK	0	58,18	2030,00	17	0,9	1016,01	2	24,82	
	SITDELDQTFSELSGY	0	52,94	1803,81	16	0,9	902,91	2	26	

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
	FLAEEADRKYDEVAR	2	52,73	1810,88	15	2,3	604,64	3	22,19	
	IVELEEELRVVGNNLK	1	48,06	1853,03	16	-0,2	927,52	2	24,26	
	EVDRLEDELVNEKEKYK	3	47,35	2135,07	17	1,6	712,7	3	22,69	
	RMQQLENDLDQVQESLLK	1	44,25	2186,10	18	0,1	729,71	3	24,25	
	RIQLLEEDLERSEERLNTATTK	3	41,51	2643,38	22	0,8	661,86	4	23,38	
	LAEASQAADESERMR	1	40,53	1662,76	15	1,8	555,26	3	10,99	
	ANIQLVEKDKALSNAEGEVAALNRR	3	36,50	2708,46	25	2,1	678,12	4	23,53	
	LAEASQAADESER	0	36,04	1375,62	13	1,5	688,82	2	3,74	
	ALSNAEGEVAALNR	0	36,03	1413,72	14	-0,5	707,87	2	23,46	
	IQLLEEDLERSEERLNTATTK	2	34,18	2487,28	21	1,2	622,83	4	23,59	
	SLEVSEEKANQREEAYKEQIK	3	30,76	2507,25	21	1	627,82	4	15,82	
	KLAMVEADLERAEERAETGESK	3	30,39	2461,21	22	2,2	616,31	4	23,09	
	MQQLENDLDQVQESLLKANIQLVEKDK	2	26,63	3168,63	27	-1,2	793,16	4	24,96	
	FLAEEADR	0	22,87	949,45	8	0,4	475,73	2	11,92	
	SLSDEERM(+15,99)DALENQLKEAR	2	20,44	2249,06	19	-2,0	563,27	4	23,15	Oksydacja (M)
3c	VVGNNLQ	0	40,55	742,40	7	-0,1	743,40	1	2,83	
	APQ(+0,98)TAEGDVAALNR	0	24,80	1412,70	14	2,1	707,35	2	23,17	Deamidacja (NQ)
	EGTDEPLFSDYGSESDDEDEYIKR	1	20,87	2795,16	24	-5,3	1398,57	2	25,55	
	MDSPEDQLK	0	20,53	1061,47	9	-1,2	1062,47	1	21,43	
	TVIGADNNASADRTHHDGDVTGER	1	20,45	2507,14	24	-3,6	627,79	4	16,60	
	TVIGADN(+0,98)NASADRTHHDGDVTGER	1	19,29	2508,12	24	5,5	628,04	4	16,89	Deamidacja (NQ)
	MDSPEDQ(+0,98)LK	0	18,53	1062,45	9	-3,8	532,23	2	22,61	Deamidacja (NQ)
	EADVADLQ(+0,98)Q(+0,98)R	0	18,48	1145,52	10	0,1	573,76	2	23,62	Deamidacja (NQ)
	SQ(+0,98)APQ(+0,98)YR	0	18,18	850,38	7	-5,6	426,19	2	15,17	Deamidacja (NQ)
	MQQVEN(+0,98)ELDQVQEQLSL	0	17,97	2030,95	17	-2,5	677,98	3	24,97	Deamidacja (NQ)

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
	LEEMNEK	0	17,52	891,40	7	-3,7	892,40	1	9,75	
	TIDDLEDEVYAQ(+0,98)K	0	17,51	1538,70	13	6,0	385,68	4	2,28	Deamidacja (NQ)
	LQEAEAR	0	16,94	815,41	7	-4,1	816,41	1	10,48	
	M(+15,99)DSLEDQLK	0	16,52	1093,50	9	3,2	1094,50	1	24,35	Oksydacja (M)
	QAEALER	0	15,92	815,41	7	-3,6	408,71	2	10,45	
	EELASSR	0	15,81	790,38	7	-4,1	791,38	1	9,41	
	Q(+0,98)ASVSDRDVK	1	15,63	1104,54	10	2,1	553,28	2	23,41	Deamidacja (NQ)
	SLNALQ(+0,98)DDLQ(+0,98)R	0	15,44	1273,62	11	-3,1	425,54	3	22,43	Deamidacja (NQ)
4a	VIDLEEQLTVVGANIK	0	71,15	1739,97	16	2,2	870,99	2	25,04	
	SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK	0	67,04	2388,14	21	2,7	1195,08	2	23,35	
	AISDELDATFAELAGY	0	64,79	1684,78	16	3,5	843,40	2	26,01	
	TLQVQNDQASQR	0	57,57	1386,69	12	3,2	694,35	2	3,62	
	ISMLEEDIMK	0	49,87	1207,58	10	3,1	604,80	2	23,94	
	VLENLNC(+57,02)GNDER	0	49,27	1431,64	12	2,6	716,83	2	15,84	Karbamidometylacja
	LAITEVDLER	0	48,90	1157,63	10	3,6	579,82	2	23,72	
	EVDRLEDELLTEK	1	47,03	1587,80	13	1,1	794,91	2	23,44	
	KISMLEEDIMK	1	46,84	1335,68	11	1,0	668,85	2	23,27	
	KLAITEVDLER	1	46,06	1285,72	11	0,1	643,87	2	23,11	
	EDSYEETIR	0	42,16	1140,49	9	3,1	571,26	2	13,40	
	IEDDYNSLQK	0	40,67	1223,57	10	2,3	612,79	2	14,86	
	EVDRLEDELLTEKEK	2	31,37	1844,94	15	0,9	615,99	3	22,90	
	LEDELLTEK	0	27,12	1088,56	9	2,9	545,29	2	22,77	
	WIAEEADKK	1	22,76	1088,55	9	3,9	545,28	2	3,71	
	WIAEEADK	0	24,84	960,46	8	3,4	481,24	2	11,06	
	QIAEHEQEIQSLTR	0	21,27	1680,84	14	2,2	561,29	3	21,43	

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
4b	VIDLEEQLTVVGANIK	0	69,68	1739,97	16	1,1	870,99	2	24,89	
	AISDELDATFAELAGY	0	52,65	1684,78	16	0,8	843,4	2	25,93	
	SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK	0	49,49	2388,14	21	1,4	797,06	3	23,23	
	WIAEEADKKYEEAAR	2	43,76	1807,87	15	1,5	603,63	3	20,06	
	TLQVQNDQASQREDSYEETIRDLTNR	2	40,57	3108,47	26	0,9	778,13	4	23,45	
	TLQVQNDQASQREDSYEETIR	1	38,1	2509,17	21	-0,3	837,4	3	22,47	
	KISMLEEDIMKSEER	2	36,06	1836,90	15	-2,0	613,31	3	22,96	
	QIAEHEQEIQSLTR	0	32,36	1680,84	14	-1,1	561,29	3	21,41	
4c	EEVEAEA	0	20,70	775,32	7	-4,6	776,33	1	17,15	
	ETN(+0,98)DKLR	1	18,42	875,43	7	2,6	876,44	1	7,90	Deamidacja (NQ)
	M(+15,99)AN(+0,98)Q(+0,98)GPSYGFSR	0	17,48	1331,55	12	4,8	666,78	2	19,90	Oksydacja (M); Deamidacja (NQ)
	IAEDSDR	0	17,44	804,36	7	5,7	403,19	2	9,79	
	TN(+0,98)VGDATYLSR	0	17,28	1196,57	11	-5,5	599,29	2	21,64	Deamidacja (NQ)
	LSN(+0,98)QRQR	1	17,19	901,47	7	-0,2	451,74	2	24,27	Deamidacja (NQ)
	VVGNNLKSLEVSEEKN(+0,98)Q(+0,98)QR	2	16,69	2172,10	19	-1,3	725,04	3	24,14	Deamidacja (NQ)
	TEN(+0,98)DC(+57,02)LR	0	16,45	907,37	7	3,1	908,38	1	23,21	Deamidacja (NQ); Karbamidometylacja
	EAHPANGK	0	16,18	822,40	8	4,9	412,21	2	23,35	
	N(+0,98)VTN(+0,98)N(+0,98)LK	0	15,48	804,39	7	-4,6	403,20	2	9,58	Deamidacja (NQ)
	AGASPEK	0	15,19	658,33	7	0,2	330,17	2	2,54	
5	LAEASQAADESER	0	44,31	1375,62	13	2,3	688,82	2	3,78	
	IQLLEEDLER	0	40,64	1256,66	10	1,6	629,34	2	23,82	
	LNTATTKLAEASQAADESER	1	30,85	2105,02	20	1,3	702,68	3	22,21	
	RIQLLEEDLER	1	27,04	1412,76	11	-0,4	707,39	2	23,26	

Numer i identyfikator próbki	Zidentyfikowane peptydy	Liczba pominiętych miejsc hydrolizy	-10logP[1]	Masa [Da]	Długość	Błąd [ppm][2]	m/z	z	Czas retencji [min]	Modyfikacja potranslacyjna
6	MQQLENDLDQVQESLLK	0	49,73	2030,00	17	0,2	1016,01	2	24,87	
	ALSNAEGEVAALNR	0	43,56	1413,72	14	0,9	707,87	2	23,21	
	SITDELDQTFSELSGY	0	42,14	1803,81	16	0,2	902,91	2	25,97	
	RMQQLENDLDQVQESLLK	1	37,56	2186,10	18	0,9	729,71	3	24,31	
	KLAMVEADLER	1	37,49	1273,67	11	0,3	637,84	2	22,45	
	RIQLLEEDLER	1	34,02	1412,76	11	-0,8	707,39	2	23,44	
	LAMVEADLER	0	33,07	1145,58	10	1,3	573,80	2	23,49	
	LAEASQAADESER	0	32,94	1375,62	13	2,2	688,82	2	3,70	
	EVDRLEDELVNEK	1	32,21	1586,78	13	-0,8	794,40	2	23,14	
	KLAMVEADLERAEER	2	31,60	1758,89	15	1,4	587,31	3	22,90	
	IQLLEEDLER	0	30,71	1256,66	10	0,8	629,34	2	23,81	
	MDALENQLK	0	29,93	1060,52	9	1,1	531,27	2	20,66	
	VVGNNLK	0	29,79	742,43	7	1,3	743,44	1	3,48	
	IQLLEEDLERSEER	1	29,63	1757,88	14	1,3	586,97	3	23,53	
	FLAEEADR	0	28,74	949,45	8	1,4	475,73	2	10,46	
	EVDRLEDELVNEKEK	2	27,67	1843,92	15	-0,1	615,65	3	22,15	
	ADTLEQQNK	0	25,63	1045,50	9	2,6	523,76	2	3,50	
	IVELEEELR	0	25,50	1128,60	9	0,7	565,31	2	23,51	
	SLSDEERMDALENQLK	1	24,23	1876,88	16	1,2	626,64	3	23,57	

[1] P jest definiowane jako prawdopodobieństwo, że fałszywa identyfikacja w bieżącym wyszukiwaniu daje taki sam lub lepszy wynik dopasowania [Zhang i in. 2012]. Wartość P wynosząca 1% odpowiada -10logP równej 20 (lg to logarytm dziesiętny)

[2] obliczono według równania (4.1).

Załącznik 5. Epitopy alergennych tropomiozyn, zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej całe sekwencje lub fragmenty peptydów (będących produktami hydrolizy tropomiozyn trypsyną), zidentyfikowanych w produktach spożywczych po hydrolizie białek, oraz ich stopień pokrycia (SCC – ang. sequence cross-coverage). „b.d." oznacza brak informacji na temat pochodzenia epitopu.

L.p.	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
1.	FLAEEADR	4143	AR**FLAEEADR**KYDEV	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	8	15	8	53,33
		116770	LKEAR**FLAEEADR**KY	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	8	15	8	53,33
		153825	ENQLKEAR**FLAEEADR**KYDE	b.d.	b.d	8	20	8	40,00
		16496	**FLAEEADR**K	b.d.	b.d.	8	9	8	88,89
		523192	NQLKEAR**FLAEEADR**KYDEV	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	8	20	8	40,00
		956537	EAR**FLAEEADR**K	b.d.	b.d.	8	12	8	66,67
		956549	ENRSLSDEERMDALENQLKEAR**FLAEEADR**KYDE	b.d.	b.d.	8	34	8	23,53
		1312072	**FLAEEADR**KY	b.d.	b.d.	8	10	8	80,00
2.	WIAEDADR	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	MDALENQLK	14039	ER**MDALENQLK**EARF	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	9	15	9	60,00
		116825	SDEER**MDALENQLK**E	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	9	15	9	60,00
		7976	DEER**MDALENQLK**EARMLAEEDRKYDEVARKLAMVEADLERAEERAESG	b.d.	b.d.	9	49	9	18,37
		554179	**MDALENQLK**EARFMA	*Blattella germanica*	karaczan prusak	9	15	9	60,00
		956549	ENRSLSDEER**MDALENQLK**EARFLAEEADRKYDE	b.d.	b.d.	9	34	9	26,47
4.	ADTLEQQNK	41267	MDR**ADTLEQQNK**EAN	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	9	15	9	60,00
		116691	DNAMDR**ADTLEQQNK**	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	9	15	9	60,00
		116671	**ADTLEQQNK**EANNRA	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	9	15	9	60,00
5.	IQLLEEDLER	54225	R**IQLLEEDLER**SEER	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	10	15	10	66,67

L.p.	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
		116775	LNRR**IQLLEEDLER**S	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	10	15	10	66,67
		54224	R**IQLLEEDLER**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	10	11	10	90,91
		153863	NRR**IQLLEEDLER**SEER	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	10	17	10	58,82
		510630	AALNRR**IQLLEEDLER**SEER	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	10	20	10	50,00
		956737	VAALNRR**IQLLEEDLER**SEER	*Palaemon modestus*	krewetka syberyjska	10	21	10	47,62
6.	LAEASQAADESER	550098	AK**LAEASQAADESER**	*Blattella germanica*	karaczan prusak	13	15	13	86,67
7.	IVELEEELR	14183	ESK**IVELEEELR**VVG	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	9	15	9	60,00
		956601	**IVELEEELR**	*Palaemon modestus*	krewetka syberyjska	9	9	9	100,00
		116755	**IVELEEELR**VVGNNL	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	9	15	9	60,00
8.	SITDELDQTFSELSGY	28850	**ITDELDQTFSELSGY**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	16	93,75
		179555	**TDELDQTFSELSGY**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	14	14	16	87,50
		12995	**ELDQTFSEL**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	9	9	16	56,25
		839848	**LDQTFSELSG**	*Scylla serrata*	krab błotny	10	10	16	62,50
9.	MQQLENDLDQVQESLLK	116814	**QLENDLDQVQESLLK**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	17	88,24
		42400	**MQQLENDLDQVQESLLK**	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	17	17	17	100,00
10.	LAMVEADLER	34878	**LAMVEADLER**AEERA	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	10	15	10	66,67
		116676	ARK**LAMVEADLER**AE	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	10	15	10	66,67

L.p.	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
		7976	DEERMDALENQLKEARMLAEEDRKY DEVARK**LAMVEADLER**AEERAESG	b.d.	b.d.	10	49	10	20,41
		241321	KYDEVARK**LAMVEADLER**AE	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	10	20	10	50,00
		241322	**LAMVEADLER**AEERAETGES	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	10	20	10	50,00
		956508	**AMVEADL**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	7	7	10	70,00
11.	VAECESEIQGLNR	-	-	-	-	-	-	-	-
12.	QIAEHEQEIQSLTR	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	VIDLEEQLTVVGANIK	-	-	-	-	-	-	-	-
14.	AISDELDATFAELAGY	-	-	-	-	-	-	-	-
15.	LAITEVDLER	34822	**LAITEVDLER**AEARLEAAEAK	*Turbo cornutus*	gatunek morskiego ślimaka	10	21	10	47,62
16.	SIQTENDLDNTQTQLQDVQ AK	-	-	-	-	-	-	-	-
17.	ALSNAEGEVAALNR	116756	K**ALSNAEGEVAALNR**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	14	15	14	93,33
		522256	LVEKDK**ALSNAEGEVAALNR**	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	14	20	14	70,00
		956705	**SNAEGEVAAL**	b.d.	-	10	10	14	71,43

[1]Immune Epitope Database [Vita i in. 2019], https://www.iedb.org/, dostęp: sierpień 2020.
[2] pogrubioną czcionką zaznaczono sekwencję peptydu obecną w sekwencji epitopu
[3]obliczono według równania (4.4)

Załącznik 6. Epitopy alergennych tropomiozyn, zawierające w swojej sekwencji aminokwasowej całe sekwencje lub fragmenty peptydów, zidentyfikowanych w produktach spożywczych ugotowanych (1b 2b, 3b) i gotowych do spożycia (5, 6), po hydrolizie wyekstrahowanych z nich białek oraz ich stopień pokrycia (SCC – ang. sequence cross-coverage).

L.p.	Numery i identyfikatory próbek	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
1.	**1b 2b, 3b**	FLAEEADRKYDEVAR	16496	**FLAEEADRK**	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	9	9	15	60,00
			956761	**YDEVAR**	b.d.	b.d.	6	6	15	40,00
2.	**1b 2b, 3b**	EVDRLEDELVNEKEKYK	68058	**VDRLEDELVNEKEKY**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	17	88,24
			519749	K**EVDRLEDELVNEKEKYK**SI	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	17	20	17	85,00
			840508	**VDRLEDELVNEK**	b.d.	b.d.	12	12	17	70,59
			956552	ERSVQKLQK**EVDRLEDELVNEKEKY K**SITDELDQTFSE	b.d.	b.d.	17	38	17	44,74
3.	**1b 2b, 3b**	IVELEEELRVVGNNLK	116755	**IVELEEELRVVGNNL**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	16	93,75
			169942	**VELEEELRVVGNNLK**	*Dermatophagoides farinae*	roztocza kurzu domowego	15	15	16	93,75
			956601	**IVELEEELR**	b.d.	b.d.	9	9	16	56,25
			956754	**VVGNNLK**	b.d.	b.d.	7	7	16	43,75
4.	**1b, 6**	IQLLEEDLERSEER	54225	R**IQLLEEDLERSEER**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	14	15	14	93,33
			153863	NRR**IQLLEEDLERSEER**	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	14	17	14	82,35
			510630	AALNRR**IQLLEEDLERSEER**	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	14	20	14	70,00
			956737	VAALNRR**IQLLEEDLERSEER**	b.d.	b.d.	14	21	14	66,67
5.	**1b, 6**	SLSDEERMDALENQLK	7975	**DEERM**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	5	5	16	31,25
			956549	ENR**SLSDEERMDALENQLK** EARFLAEEADRKYDE	b.d.	b.d.	16	34	16	47,06
6.	**1b 2b, 3b**	SLSDEERMDALENQLKEAR	116825	**SDEERMDALENQLKE**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	19	78,95
			7975	**DEERM**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	5	5	19	26,32
			35633	**LENQLKEA**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	8	8	19	42,11
			839112	**ALENQLKEAR**	b.d.	b.d.	10	10	19	52,63

L.p.	Numery i identyfikatory próbek	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
			956549	ENR**SLSDEERMDALEN QLKEAR**FLAEEADRKYDE	b.d.	b.d.	19	34	19	55,88
7.	**1b 2b, 3b**	IQLLEEDLERSEERLNTATTK	11378	**EDLERSEERLNTATT**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	21	71,43
			116771	**LLEEDLERSEERLNT**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	21	71,43
			840225	**RLNTATTK**	b.d.	b.d.	8	8	21	38,10
			956551	**ERSEERL**	b.d.	b.d.	7	7	21	33,33
			956628	**LNTATTK**	b.d.	b.d.	7	7	21	33,33
			956700	**SEERLNTATTK**	b.d.	b.d.	11	11	21	52,38
			1087203	**EDLERSEERLNT**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	12	12	21	57,14
8.	**1b, 6**	KLAMVEADLERAEER	7976	DEERMDALENQLKEARMLAEEDRK YDEVAR**KLAMVEADLERAEER**AESG	b.d.	b.d.	15	49	15	30,61
			956508	**AMVEADL**	b.d.	b.d.	7	7	15	46,67
9.	**1b**	WIAEDADRKFDEAAR	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	**1b**	KLAITEVDLER	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	**1b**	SQGDEERIDLLEK	-	-	-	-	-	-	-	-
12.	**1b**	EVDRLEDELLAEKER	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	**1b**	IVELEEELKVVGNNMK	-	-	-	-	-	-	-	-
14.	**1b**	LAITEVDLERAEAR	34822	**LAITEVDLERAEAR**LEAAEAK	*Turbo cornutus*	gatunek morskiego ślimaka	14	21	14	66,67
15.	**2b, 3b**	IQLLEEDLERSEER LNTATTKLAEASQ AADESER	5169	**ATTKLAEASQAADES**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	34	44,12
			11378	**EDLERSEERLNTATT**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	34	44,12
			11861	**EERLNTATTKLAEAS**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	34	44,12
			116776	**LNTATTKLAEASQAA**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	34	44,12
			116706	**ERSEERLNTATTKLA**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	34	44,12
			116771	**LLEEDLERSEERLNT**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	34	44,12
			241186	**EDLERSEERLNTATTKLAEA**	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	20	20	34	58,82

L.p.	Numery i identyfikatory próbek	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
			840225	**RLNTATTK**	b.d.	b.d.	8	8	34	23,53
			956551	**ERSEERL**	b.d.	b.d.	7	7	34	20,59
			956628	**LNTATTK**	b.d.	b.d.	7	7	34	20,59
			956661	**NTATTKL**	b.d.	b.d.	7	7	34	20,59
			956700	**SEERLNTATTK**	b.d.	b.d.	11	11	34	32,35
			1087203	**EDLERSEERLNT**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	12	12	34	35,29
16.	**2b, 3b**	MQQLENDLDQ VQESLLKAN NQLVEKDKALSNAEG EVAALNR	12646	**EKDKALSNAEGEVAA**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	41	36,59
			116814	**QLENDLDQVQESLLK**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	41	36,59
			42400	**MQQLENDLDQVQESLLK**	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	17	17	41	41,46
			116815	**QLVEKDKALSNAEGE**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	41	36,59
			513131	**DLDQVQESLLKANNQLVEKD**	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	20	20	41	48,78
17.	**2b**	ANNQLVEKDKA LSNAEGEVAALNRR	12646	**EKDKALSNAEGEVAA**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	25	60,00
			116815	**QLVEKDKALSNAEGE**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	25	60,00
			840500	**VAALNRR**	b.d.	b.d.	7	7	25	28,00
18.	**2b**	ANNQLVEKDKA LSNAEGEVAALNR	12646	**EKDKALSNAEGEVAA**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	24	62,50
			116815	**QLVEKDKALSNAEGE**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	24	62,50
19.	**2b, 3b, 6**	RMQQLENDLDQVQESLLK	54945	**RMQQLENDLDQVQES**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	18	83,33
			116814	**QLENDLDQVQESLLK**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	18	83,33
			42400	**MQQLENDLDQVQESLLK**	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	17	17	18	94,44
20.	**2b, 3b**	RIQLLEEDLERSEERLNTATTK	54225	**RIQLLEEDLERSEER**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	22	68,18
			11378	**EDLERSEERLNTATT**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	22	68,18
			54224	**RIQLLEEDLER**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	11	11	22	50,00
			116771	**LLEEDLERSEERLNT**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	22	68,18

L.p.	Numery i identyfikatory próbek	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
			840225	**RLNTATTK**	b.d.	b.d.	8	8	22	36,36
			956551	**ERSEERL**	b.d.	b.d.	7	7	22	31,82
			956628	**LNTATTK**	b.d.	b.d.	7	7	22	31,82
			956700	**SEERLNTATTK**	b.d.	b.d.	11	11	22	50,00
			1087203	**EDLERSEERLNT**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	12	12	22	54,55
21.	**2b, 3b**	KLAMVEADLERAEERAETGESK	34878	**LAMVEADLERAEERA**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	22	68,18
			9068	**DLERAEERAETGESK**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	22	68,18
			116848	**VEADLERAEERAETG**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	22	68,18
			241322	**LAMVEADLERAEERAETGES**	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	20	20	22	90,91
			956508	**AMVEADL**	b.d.	b.d.	7	7	22	31,82
22.	**3b**	ANIQLVEKDKAL SNAEGEVAALNRR	3320	**ANIQLVEKDKALSNA**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	25	60,00
			12646	**EKDKALSNAEGEVAA**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	25	60,00
			116815	**QLVEKDKALSNAEGE**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	25	60,00
			840500	**VAALNRR**	b.d.	b.d.	7	7	25	28,00
23.	**3b**	SLEVSEEKANQREEAYKEQIK	11712	**EEKANQREEAYKEQI**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	21	71,43
			153886	**SEEKANQREEAYKEQ**	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	15	15	21	71,43
			956539	**EEAYKEQIK**	b.d.	b.d.	9	9	21	42,86
24.	**3b**	MQQLENDLDQVQE SLLKANIQLVEKDK	50696	**QESLLKANIQLVEKD**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	27	55,56
			116814	**QLENDLDQVQESLLK**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	27	55,56
			42400	**MQQLENDLDQVQESLLK**	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	17	17	27	62,96
			43482	**NDLDQVQESLLKANI**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	27	55,56
			116693	**DQVQESLLKANIQLV**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	27	55,56

L.p.	Numery i identyfikatory próbek	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
25.	**3b**	MQQLENDLDQVQES LLKANIQLVEKDKA LSNAEGEVAALNR	50696	**QESLLKANIQLVEKD**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	41	36,59
			3320	**ANIQLVEKDKALSNA**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	41	36,59
			12646	**EKDKALSNAEGEVAA**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	41	36,59
			116772	**LLKANIQLVEKDKAL**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	41	36,59
			116814	**QLENDLDQVQESLLK**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	41	36,59
			42400	**MQQLENDLDQVQESLLK**	*Penaeus indicus*	krewetka biała indyjska	17	17	41	41,46
			43482	**NDLDQVQESLLKANI**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	41	36,59
			116693	**DQVQESLLKANIQLV**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	41	36,59
			116815	**QLVEKDKALSNAEGE**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	41	36,59
26.	**4b**	SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK	-	**-**	-	-	-	-	-	-
27.	**4b**	WIAEEADKKYEEAAR	-	**-**	-	-	-	-	-	-
28.	**4b**	TLQVQNDQASQR EDSYEETIRDLTNR	886615	**VQNDQASQREDSYEET**	*Crassostrea gigas*	ostrzyżyca japońska	16	16	26	61,54
29.	**4b**	TLQVQNDQASQR EDSYEETIR	886615	**VQNDQASQREDSYEET**	*Crassostrea gigas*	ostrzyżyca japońska	16	16	21	76,19
30.	**4b**	KISMLEEDIMKSEER	-	**-**	-	-	-	-	-	-
31.	**5**	LNTATTKLAEASQAADESER	5169	**ATTKLAEASQAADES**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	15	15	20	75,00
			116776	**LNTATTKLAEASQAA**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	15	15	20	75,00
			956628	**LNTATTK**	b.d.	b.d.	7	7	20	35,00
			956661	**NTATTKL**	b.d.	b.d.	7	7	20	35,00

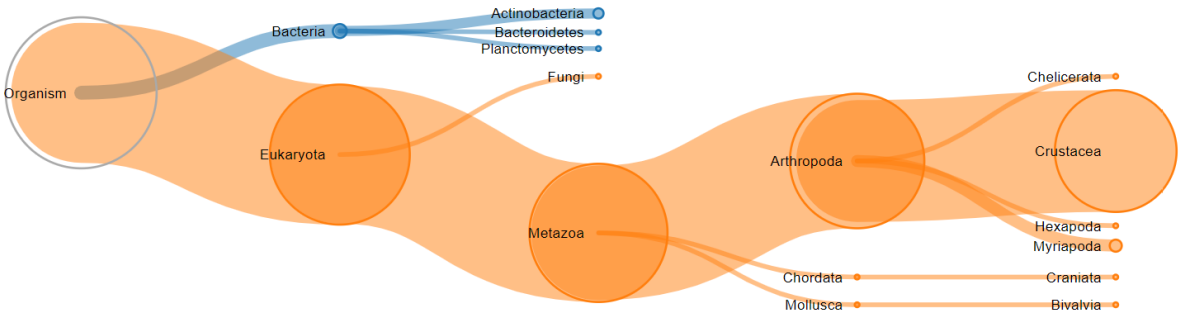
L.p.	Numery i identyfikatory próbek	Sekwencja peptydu	IEDB ID[1]	Sekwencja epitopu[2]	Nazwa gatunku	Nazwa zwyczajowa	n_c	n_e	n_p	SCC[3] [%]
32.	**5, 6**	RIQLLEEDLER	54225	**RIQLLEEDLER**SEER	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	11	15	11	73,33
			116775	LNR**RIQLLEEDLER**S	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	11	15	11	73,33
			153863	NR**RIQLLEEDLER**SEER	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	11	17	11	64,71
			54224	**RIQLLEEDLER**	*Penaeus aztecus*	krewetka brązowa	11	11	11	100,00
			510630	AALNR**RIQLLEEDLER**SEER	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	11	20	11	55,00
			956737	VAALNR**RIQLLEEDLER**SEER	b.d.	b.d.	11	21	11	52,38
33.	**6**	KLAMVEADLER	116676	AR**KLAMVEADLER**AE	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	11	15	11	73,33
			7976	DEERMDALENQLKEA RMLAEEDRKYDEVAR **KLAMVEADLER**AEERAESG	b.d.	b.d.	11	49	11	22,45
			241321	KYDEVAR**KLAMVEADLER**AE	*Penaeus monodon*	krewetka tygrysia	11	20	11	55,00
			956508	**AMVEADL**	b.d.	b.d.	7	7	11	63,64
34.	**6**	EVDRLEDELVNEK	116811	QK**EVDRLEDELVNEK**	*Litopenaeus vannamei*	krewetka biała	13	15	13	86,67
			519749	K**EVDRLEDELVNEK**EKYKSI	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	13	20	13	65,00
			840508	**VDRLEDELVNEK**	b.d.	b.d.	12	12	13	92,31
			956552	ERSVQKLQK**EVDRLEDE LVNEK**EKYKSITDELDQTFSE	b.d.	b.d.	13	38	13	34,21
35.	**6**	EVDRLEDELVNEKEK	519749	K**EVDRLEDELVNEKEK**YKSI	*Metapenaeus ensis*	krewetka błotna	15	20	15	75,00
			840508	**VDRLEDELVNEK**	b.d.	b.d.	12	12	15	80,00
			956552	ERSVQKLQK**EVDRLEDE LVNEKEK**YKSITDELDQTFSE	b.d.	b.d.	15	38	15	39,47

[1] Immune Epitope Database [Vita i in. 2019], https://www.iedb.org/, dostęp: sierpień 2020.

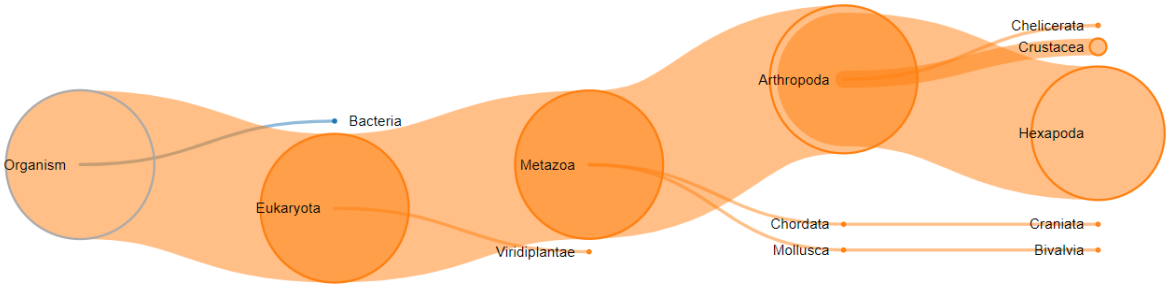
[2] pogrubioną czcionką zaznaczono sekwencję peptydu obecną w sekwencji epitopu

[3] obliczono według równania (4.4)

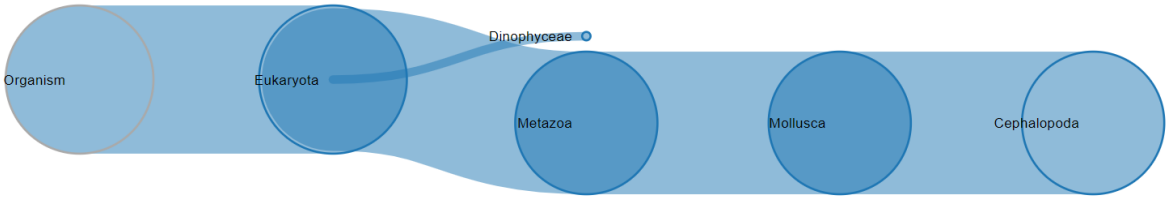
Załącznik 7. Drzewa filogenetyczne, przedstawiające obecność poszczególnych zidentyfikowanych peptydów w sekwencjach białek z różnych rodzin. Wygenerowano w programie Unipept [Mesuere i in. 2015], https://unipept.ugent.be/, dostęp: lipiec 2021.



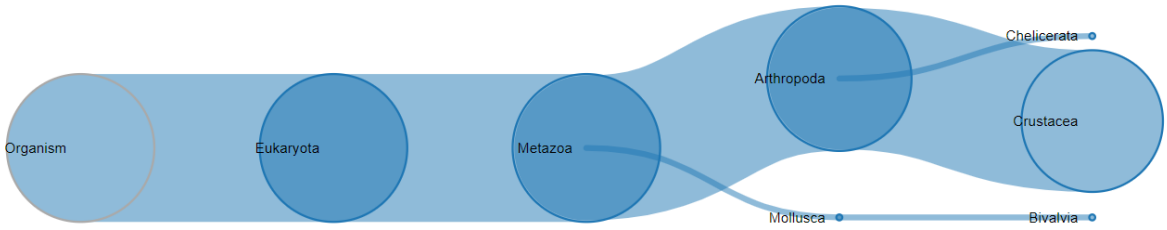
Rys. Z18. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu FLAEEADR w sekwencjach białek.



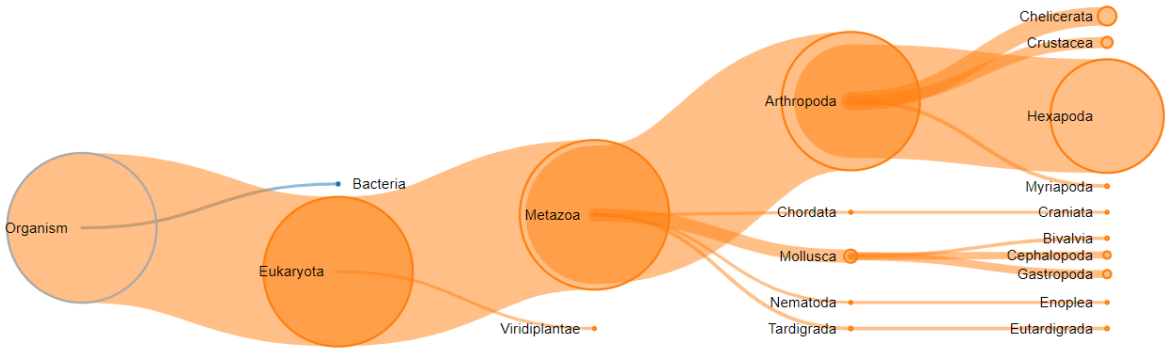
Rys. Z19. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu MDALENQLK w sekwencjach białek.



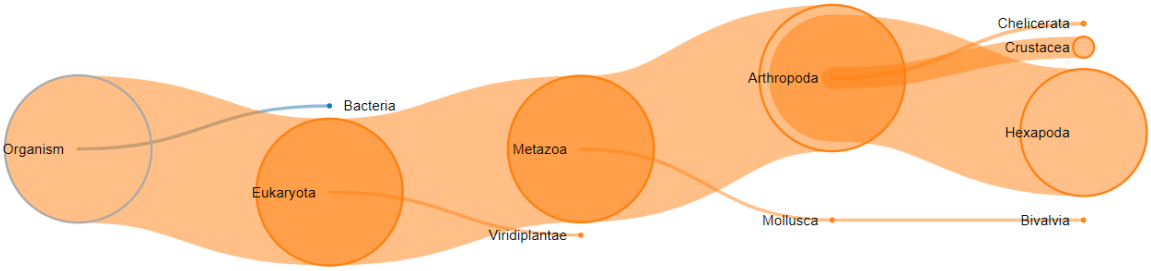
Rys. Z20. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu WIAEDADR w sekwencjach białek.



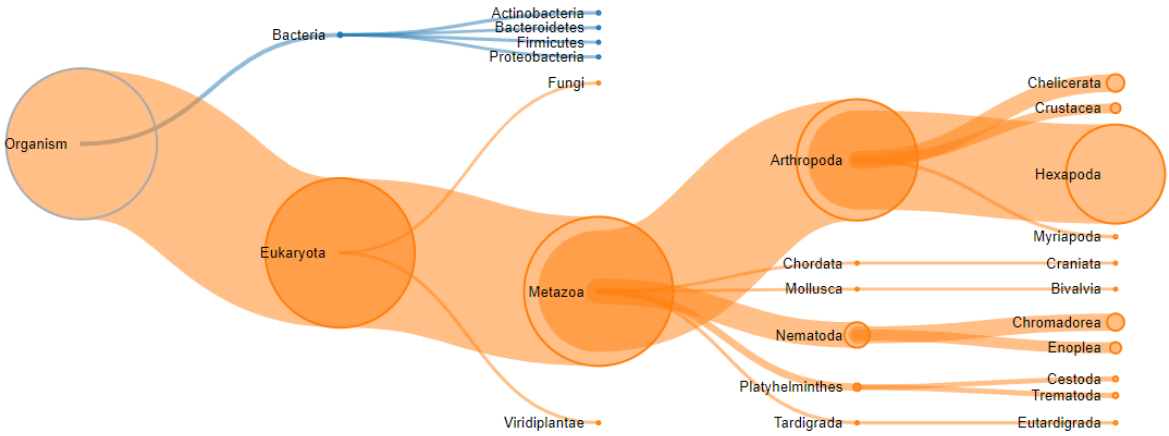
Rys. Z21. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu ADTLEQQNK w sekwencjach białek.



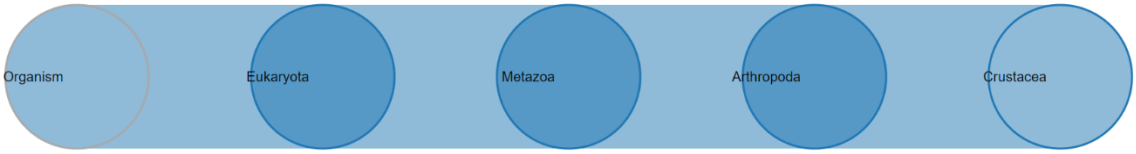
Rys. Z22. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu IQLLEEDLER w sekwencjach białek.



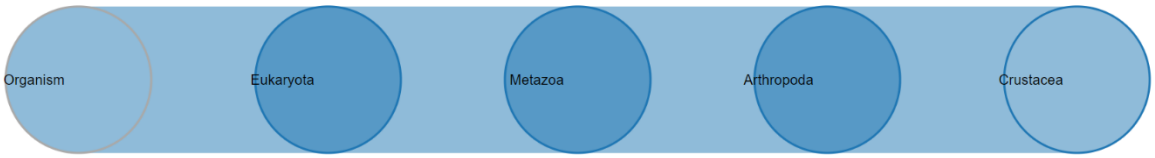
Rys. Z23. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu LAEASQAADESER w sekwencjach białek.



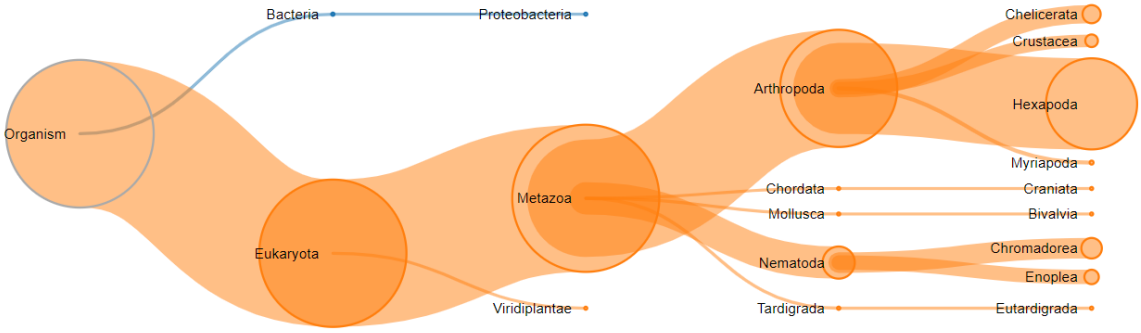
Rys. Z24. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu IVELEEELR w sekwencjach białek.



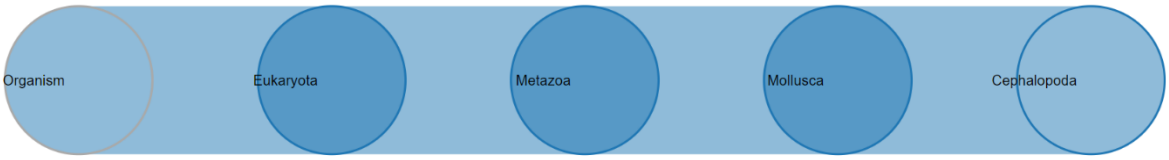
Rys. Z25. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu SITDELDQTFSELSGY w sekwencjach białek.



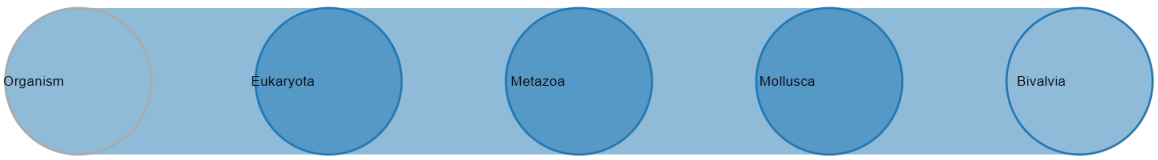
Rys. Z26. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu MQQLENDLDQVQESLLK w sekwencjach białek.



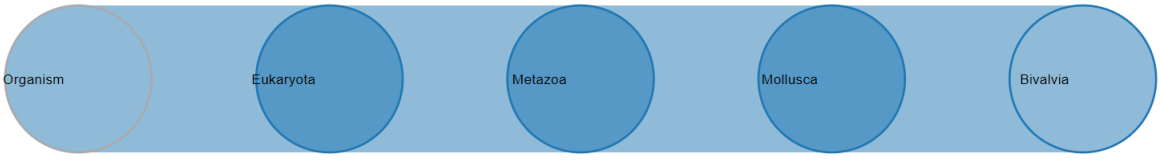
Rys. Z27. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu LAMVEADLER w sekwencjach białek.



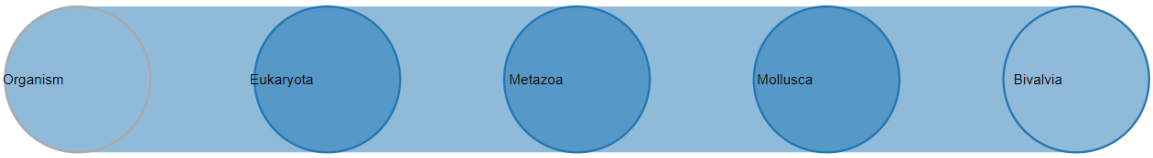
Rys. Z28. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu VAECESEIQGLNR w sekwencjach białek.



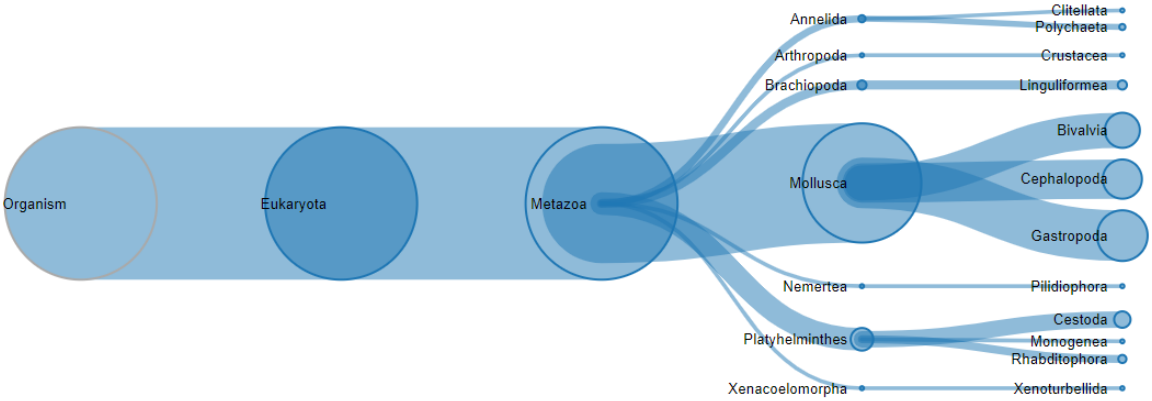
Rys. Z29. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu QIAEHEQEIQSLTR w sekwencjach białek.



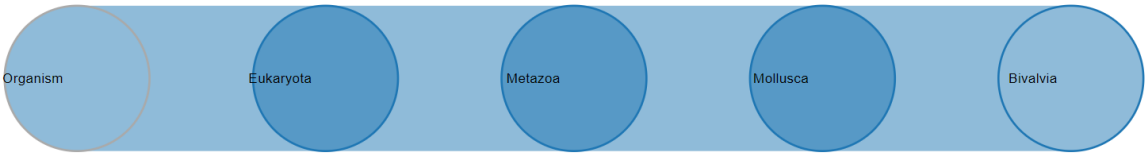
Rys. Z30. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu VIDLEEQLTVVGANIK w sekwencjach białek.



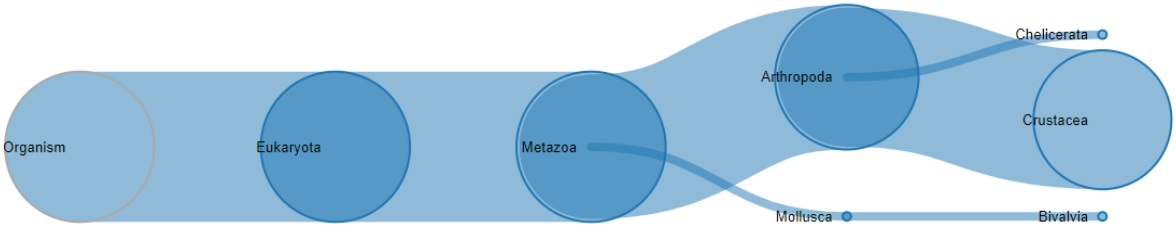
Rys. Z31. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu AISDELDATFAELAGY w sekwencjach białek.



Rys. Z32. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu LAITEVDLER w sekwencjach białek.



Rys. Z33. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu SIQTENDLDNTQTQLQDVQAK w sekwencjach białek.



Rys. Z34. Drzewo filogenetyczne obrazujące rozpowszechnienie fragmentu ALSNAEGEVAALNR w sekwencjach białek.

Załącznik 8. Tropomiozyny dopasowane przez program PEAKS do tropomiozyn obecnych w próbkach, na podstawie sekwencji aminokwasowych zidentyfikowanych peptydów.

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
1a	Q25456|TPM_METEN	129,55	42	10	31705	*Metapenaeus ensis*
	Q3Y8M6|TPM_PENAT	129,55	40	10	32849	*Penaeus aztecus*
	A1KYZ2|TPM_PENMO	129,55	40	10	32849	*Penaeus monodon*
	tr|D2KMW0|D2KMW0_PENCE	129,55	40	10	32849	*Penaeus chinensis*
	tr|E7CGC1|E7CGC1_PENMO	129,55	40	10	32849	*Penaeus monodon*
	tr|Q2V0V1|Q2V0V1_OMMBA	117,20	30	9	32679	*Ommastrephes bartramii*
	tr|Q2V0V4|Q2V0V4_SEPES	117,20	30	9	32661	*Sepia esculenta*
	A7UMC0|TPM_SINCO	84,19	11	4	32957	*Sinonovacula constricta*
	tr|A0A5K3EHK7|A0A5K3EHK7_9CEST	61,76	8	2	27905	*Mesocestoides corti*
	tr|A0A5K3EH14|A0A5K3EH14_9CEST	61,76	8	2	28921	*Mesocestoides corti*
	tr|A0A5K3EFY8|A0A5K3EFY8_9CEST	61,76	7	2	32868	*Mesocestoides corti*
	tr|A0A158QTT5|A0A158QTT5_9CEST	61,76	3	2	63447	*Mesocestoides corti*
1b	A1KYZ2|TPM_PENMO	155,82	57	16	32849	*Penaeus monodon*
	Q3Y8M6|TPM_PENAT	155,82	57	16	32849	*Penaeus aztecus*
	tr|E7CGC1|E7CGC1_PENMO	155,82	57	16	32849	*Penaeus monodon*
	tr|D2KMW0|D2KMW0_PENCE	155,82	57	16	32849	*Penaeus chinensis*
	Q25456|TPM_METEN	155,82	59	16	31705	*Metapenaeus ensis*
	tr|Q2V0V1|Q2V0V1_OMMBA	114,00	36	10	32679	*Ommastrephes bartramii*
	tr|Q2V0V4|Q2V0V4_SEPES	114,00	36	10	32661	*Sepia esculenta*
	tr|A0A1D2NEN2|A0A1D2NEN2_ORCCI	99,03	19	6	35547	*Orchesella cincta*
	Q25457|TPM_MYTED	96,35	17	4	32798	*Mytilus edulis*
	P91958|TPM_MYTGA	96,35	17	4	32770	*Mytilus galloprovincialis*
	Q9GZ70|TPM_PERVI	96,35	17	4	32749	*Perna viridis*
	tr|A0A226F5Q4|A0A226F5Q4_FOLCA	91,27	25	7	30452	*Folsomia candida*
	tr|D3PFK2|D3PFK2_LEPSM	90,41	17	5	32837	*Lepeophtheirus salmonis*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
	tr|C1BVW6|C1BVW6_LEPSM	90,41	17	5	32902	*Lepeophtheirus salmonis*
	tr|C1BVK0|C1BVK0_LEPSM	90,41	17	5	32851	*Lepeophtheirus salmonis*
	tr|A0A0K2TX45|A0A0K2TX45_LEPSM	90,41	21	5	27446	*Lepeophtheirus salmonis*
	tr|C1BZW3|C1BZW3_CALCM	90,41	17	5	32898	*Caligus clemensi*
	tr|A0A3M7QLK1|A0A3M7QLK1_BRAPC	53,99	4	1	35166	*Brachionus plicatilis*
	tr|A0A3M7QK51|A0A3M7QK51_BRAPC	53,99	4	1	40225	*Brachionus plicatilis*
	tr|A0A3M7QKM0|A0A3M7QKM0_BRAPC	53,99	8	1	19078	*Brachionus plicatilis*
	tr|A0A3M7QLB3|A0A3M7QLB3_BRAPC	53,99	6	1	24921	*Brachionus plicatilis*
	tr|A0A3M7QK59|A0A3M7QK59_BRAPC	53,99	4	1	42780	*Brachionus plicatilis*
1c	tr|F6JYD0|F6JYD0_SEPOF	29,07	6	1	26666	*Sepia officinalis*
2a	Q25456|TPM_METEN	162,36	63	24	31705	*Metapenaeus ensis*
	tr|A7L5V3|A7L5V3_PORTR	113,73	25	9	32786	*Portunus trituberculatus*
	tr|Q6LEH1|Q6LEH1_DROME	95,46	20	10	30851	*Drosophila melanogaster*
	tr|A0A0B7A4F3|A0A0B7A4F3_9EUPU	60,94	8	3	26213	*Arion vulgaris*
2b	Q25456|TPM_METEN	200,31	67	17	31705	*Metapenaeus ensis*
	Q3Y8M6|TPM_PENAT	189,05	65	15	32849	*Penaeus aztecus*
	tr|D2KMW0|D2KMW0_PENCE	189,05	65	15	32849	*Penaeus chinensis*
	A1KYZ2|TPM_PENMO	189,05	65	15	32849	*Penaeus monodon*
	tr|E7CGC1|E7CGC1_PENMO	189,05	65	15	32849	*Penaeus monodon*
	tr|A0A455R7Q9|A0A455R7Q9_9CRUS	176,40	56	13	32834	*Bathynomus doederleini*
	tr|A0A226F5Q4|A0A226F5Q4_FOLCA	121,41	20	6	30452	*Folsomia candida*
	tr|A0A1D2NEN2|A0A1D2NEN2_ORCCI	109,06	17	5	35547	*Orchesella cincta*
	tr|A0A5B7GZ78|A0A5B7GZ78_PORTR	94,69	17	3	23744	*Portunus trituberculatus*
	Q9NG56|TPM_BLAGE	94,59	21	4	32838	*Blattella germanica*
	tr|A0A443SLL1|A0A443SLL1_9ACAR	50,70	3	1	66274	*Leptotrombidium deliense*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
2c	tr|A0A5B7GZ78|A0A5B7GZ78_PORTR	54,72	8	1	23744	*Portunus trituberculatus*
	tr|A0A423SL41|A0A423SL41_PENVA	54,72	11	1	17766	*Penaeus vannamei*
	tr|A0A4P8D349|A0A4P8D349_PENST	54,72	6	1	30257	*Penaeus setiferus*
	Q25456|TPM_METEN	54,72	6	1	31705	*Metapenaeus ensis*
	O61379|TPM_PANST	54,72	6	1	31739	*Panulirus stimpsoni*
	tr|E1A682|E1A682_PENMO	54,72	6	1	32718	*Penaeus monodon*
	tr|W5RFX0|W5RFX0_CHEDE	54,72	6	1	32820	*Cherax destructor*
	Q3Y8M6|TPM_PENAT	54,72	6	1	32849	*Penaeus aztecus*
	tr|A2V733|A2V733_PARCM	54,72	6	1	32722	*Paralithodes camtschaticus*
	tr|B4YAH6|B4YAH6_PENVA	54,72	6	1	32849	*Penaeus vannamei*
	tr|M1H607|M1H607_PORPE	54,72	6	1	32809	*Portunus pelagicus*
	tr|D3XNS0|D3XNS0_PENME	54,72	6	1	32849	*Penaeus merguiensis*
	tr|D2KMW0|D2KMW0_PENCE	54,72	6	1	32849	*Penaeus chinensis*
	tr|A2V731|A2V731_PENJP	54,72	6	1	32849	*Penaeus japonicus*
	A1KYZ2|TPM_PENMO	54,72	6	1	32849	*Penaeus monodon*
	tr|W5RFZ5|W5RFZ5_THEOI	54,72	6	1	32839	*Thenus orientalis*
	tr|E7CGC1|E7CGC1_PENMO	54,72	6	1	32849	*Penaeus monodon*
	tr|A0A553PM05|A0A553PM05_TIGCA	40,78	1	1	63662	*Tigriopus californicus*
	tr|A0A076L010|A0A076L010_NEPPI	37,16	3	1	26714	*Nephila pilipes*
	tr|A0A2L2XZU7|A0A2L2XZU7_PARTP	37,16	3	1	32932	*Parasteatoda tepidariorum*
	tr|A0A6B9KL18|A0A6B9KL18_LOXRU	37,16	7	1	12377	*Loxosceles rufescens*
	tr|A0A2L2Z400|A0A2L2Z400_PARTP	37,16	6	1	16685	*Parasteatoda tepidariorum*
	tr|A0A4Y2WFK7|A0A4Y2WFK7_ARAVE	37,16	5	1	17198	*Araneus ventricosus*
	tr|A0A4Y2WFH5|A0A4Y2WFH5_ARAVE	37,16	5	1	17326	*Araneus ventricosus*
	tr|A0A087SUU6|A0A087SUU6_STEMI	37,16	3	1	32901	*Stegodyphus mimosarum*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
	tr|A0A484AS44|A0A484AS44_DRONA	37,16	3	1	32968	*Drosophila navojoa*
	tr|A5D6I5|A5D6I5_9ARAC	37,16	3	1	32918	*Neoscona nautica*
	tr|A0A061QLJ8|A0A061QLJ8_CUPSA	37,16	3	1	32919	*Cupiennius salei*
	tr|A0A484ANT0|A0A484ANT0_DRONA	37,16	3	1	32804	*Drosophila navojoa*
	tr|A0A2L2Y2S5|A0A2L2Y2S5_PARTP	37,16	3	1	32944	*Parasteatoda tepidariorum*
	tr|A0A061QFY6|A0A061QFY6_CUPSA	37,16	3	1	32874	*Cupiennius salei*
	tr|A0A2L2XZR8|A0A2L2XZR8_PARTP	37,16	3	1	33013	*Parasteatoda tepidariorum*
	tr|A0A076KV15|A0A076KV15_NEPPI	37,16	3	1	37321	*Nephila pilipes*
	tr|A0A076KZE2|A0A076KZE2_NEPPI	37,16	2	1	37764	*Nephila pilipes*
3a	Q3Y8M6|TPM_PENAT	101,3	15	3	32849	*Penaeus aztecus*
	tr|A0A5B7GZ78|A0A5B7GZ78_PORTR	71,98	8	1	23744	*Portunus trituberculatus*
3b	Q3Y8M6|TPM_PENAT	201,82	72	19	32849	*Penaeus aztecus*
	A1KYZ2|TPM_PENMO	201,82	72	19	32849	*Penaeus monodon*
	tr|D2KMW0|D2KMW0_PENCE	201,82	72	19	32849	*Penaeus chinensis*
	tr|E7CGC1|E7CGC1_PENMO	201,82	72	19	32849	*Penaeus monodon*
	A2V735|TPM_CHIOP	160,49	45	11	32675	*Chionoecetes opilio*
	tr|A0A226F5Q4|A0A226F5Q4_FOLCA	102,95	20	5	30452	*Folsomia candida*
	tr|A0A1D2NEN2|A0A1D2NEN2_ORCCI	102,58	17	5	35547	*Orchesella cincta*
	Q9NG56|TPM_BLAGE	85,85	32	5	32838	*Blattella germanica*
	tr|A0A182MT32|A0A182MT32_9DIPT	65,71	8	2	35341	*Anopheles culicifacies*
	tr|A0A1S4F2Z9|A0A1S4F2Z9_AEDAE	65,71	3	2	94649	*Aedes aegypti*
	tr|A0A2M3Z2H2|A0A2M3Z2H2_9DIPT	65,71	11	2	29365	*Anopheles braziliensis*
	tr|F5HMF1|F5HMF1_ANOGA	65,71	11	2	29433	*Anopheles gambiae*
	tr|Q17H78|Q17H78_AEDAE	65,71	11	2	29096	*Aedes aegypti*
	tr|Q17H73|Q17H73_AEDAE	65,71	11	2	29361	*Aedes aegypti*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
	tr|A0A1Q3FYB9|A0A1Q3FYB9_CULTA	65,71	11	2	29399	*Culex tarsalis*
	tr|A0A6B2EHW5|A0A6B2EHW5_9DIPT	53,69	10	2	29217	*Phlebotomus kandelakii*
3c	tr|A0A553PM05|A0A553PM05_TIGCA	40,55	1	1	63662	*Tigriopus californicus*
	tr|B6E457|B6E457_DERPT	24,80	5	1	32943	*Dermatophagoides pteronyssinus*
4a	Q25457|TPM_MYTED	197,44	55	17	32798	*Mytilus edulis*
	P91958|TPM_MYTGA	197,44	55	17	32770	*Mytilus galloprovincialis*
4b	Q25457|TPM_MYTED	147,11	43	8	32798	*Mytilus edulis*
	P91958|TPM_MYTGA	147,11	43	8	32770	*Mytilus galloprovincialis*
	Q9GZ69|TPM_MIMNO	53,55	13	2	32667	*Mimachlamys nobilis*
4c	tr|A0A3Q3K5B5|A0A3Q3K5B5_MONAL	25,19	6	2	28154	*Monopterus albus*
	tr|A0A3Q3K2I0|A0A3Q3K2I0_MONAL	25,19	5	2	32861	*Monopterus albus*
	tr|A0A5C6NGT0|A0A5C6NGT0_9TELE	25,19	5	2	32764	*Takifugu flavidus*
	tr|A0A1L6UW65|A0A1L6UW65_DANRE	25,19	5	2	32688	*Danio rerio*
5	tr|A0A0P4W2I1|A0A0P4W2I1_9EUCA	81,68	11	4	32701	*Scylla olivacea*
	tr|A0A0P4VTY1|A0A0P4VTY1_9EUCA	81,68	12	4	28943	*Scylla olivacea*
	tr|A0A0P4W2I5|A0A0P4W2I5_9EUCA	81,68	12	4	28986	*Scylla olivacea*
	tr|A0A0P4WDT9|A0A0P4WDT9_9EUCA	81,68	12	4	29088	*Scylla olivacea*
	tr|A0A0P4W0R8|A0A0P4W0R8_9EUCA	81,68	11	4	32502	*Scylla olivacea*
	Q3Y8M6|TPM_PENAT	81,68	11	4	32849	*Penaeus aztecus*
	tr|D2KMW0|D2KMW0_PENCE	81,68	11	4	32849	*Penaeus chinensis*
	A1KYZ2|TPM_PENMO	81,68	11	4	32849	*Penaeus monodon*
	tr|E7CGC1|E7CGC1_PENMO	81,68	11	4	32849	*Penaeus monodon*
	tr|A1YYV6|A1YYV6_9EUCA	81,68	11	4	32787	*Portunus sanguinolentus*
	O44119|TPM_HOMAM	81,68	11	4	32907	*Homarus americanus*
	tr|A1KYZ3|A1KYZ3_9EUCA	81,68	14	4	26384	*Scylla olivacea*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
	tr|A0A0P4W155|A0A0P4W155_9EUCA	81,68	11	4	32817	*Scylla olivacea*
	tr|A0A6C0N3G5|A0A6C0N3G5_SCYPA	81,68	11	4	32787	*Scylla paramamosain*
	Q25456|TPM_METEN	81,68	11	4	31705	*Metapenaeus ensis*
	O61379|TPM_PANST	81,68	11	4	31739	*Panulirus stimpsoni*
	P86704|TPM_PANBO	81,68	11	4	32753	*Pandalus borealis*
	tr|A2V736|A2V736_ERIIS	81,68	11	4	32832	*Erimacrus isenbeckii*
	tr|A0A0P4VTW4|A0A0P4VTW4_9EUCA	81,68	11	4	32715	*Scylla olivacea*
	tr|A2V737|A2V737_ERIIS	81,68	11	4	32801	*Erimacrus isenbeckii*
	A4URH3|TPM_ERISI	81,68	11	4	32788	*Eriocheir sinensis*
	tr|K9UTQ8|K9UTQ8_JASLA	81,68	11	4	32881	*Jasus lalandii*
	tr|A0A6C0N4N2|A0A6C0N4N2_9EUCA	81,68	11	4	32743	*Scylla tranquebarica*
	tr|W6E8R7|W6E8R7_MACNP	81,68	11	4	32900	*Macrobrachium nipponense*
	tr|A0A6C0N4N6|A0A6C0N4N6_9EUCA	81,68	11	4	32647	*Scylla olivacea*
	tr|W6EKR0|W6EKR0_MACNP	81,68	11	4	32931	*Macrobrachium nipponense*
	tr|B6DUC3|B6DUC3_JASLA	81,68	13	4	26739	*Jasus lalandii*
	tr|B6DUC4|B6DUC4_JASLA	81,68	14	4	25368	*Jasus lalandii*
	A2V735|TPM_CHIOP	81,68	11	4	32675	*Chionoecetes opilio*
	tr|A5YWA8|A5YWA8_TYRPU	81,68	11	4	32814	*Tyrophagus putrescentiae*
	tr|E1A682|E1A682_PENMO	81,68	11	4	32718	*Penaeus monodon*
	tr|D7F1J4|D7F1J4_CRACN	81,68	11	4	32772	*Crangon crangon*
	tr|M4M2H6|M4M2H6_9EUCA	81,68	11	4	32684	*Penaeus latisulcatus*
	tr|W5RFZ5|W5RFZ5_THEOI	81,68	11	4	32839	*Thenus orientalis*
	tr|A0A0P4W6F5|A0A0P4W6F5_9EUCA	81,68	12	4	29302	*Scylla olivacea*
	tr|Q6E7L4|Q6E7L4_HOMAM	81,68	11	4	32876	*Homarus americanus*
	tr|A7VKE0|A7VKE0_EUPSU	81,68	11	4	32663	*Euphausia superba*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
	tr|A7VKE1|A7VKE1_9EUCA	81,68	11	4	32698	*Euphausia pacifica*
	tr|A0A455R7Q9|A0A455R7Q9_9CRUS	81,68	11	4	32834	*Bathynomus doederleini*
	tr|A0A0P4VYW2|A0A0P4VYW2_9EUCA	81,68	12	4	29257	*Scylla olivacea*
	tr|A0A0N7ZAL6|A0A0N7ZAL6_9EUCA	81,68	12	4	29155	*Scylla olivacea*
6	Q25456|TPM_METEN	143,72	57	19	31705	*Metapenaeus ensis*
	Q3Y8M6|TPM_PENAT	143,72	55	19	32849	*Penaeus aztecus*
	A1KYZ2|TPM_PENMO	143,72	55	19	32849	*Penaeus monodon*
	tr|D2KMW0|D2KMW0_PENCE	143,72	55	19	32849	*Penaeus chinensis*
	tr|E7CGC1|E7CGC1_PENMO	143,72	55	19	32849	*Penaeus monodon*
	tr|A0A224XJX1|A0A224XJX1_9HEMI	104,15	34	11	24995	*Panstrongylus lignarius*
	tr|A0A5E4NNV1|A0A5E4NNV1_9HEMI	104,15	34	11	25979	*Cinara cedri*
	tr|A0A1B6IV88|A0A1B6IV88_9HEMI	104,15	30	11	28530	*Homalodisca liturata*
	tr|A0A1B6J928|A0A1B6J928_9HEMI	104,15	30	11	28556	*Homalodisca liturata*
	tr|A0A1B6I004|A0A1B6I004_9HEMI	104,15	30	11	28600	*Homalodisca liturata*
	tr|A0A151I293|A0A151I293_9HYME	104,15	30	11	29234	*Atta colombica*
	tr|A0A026WJC8|A0A026WJC8_OOCBI	104,15	30	11	29234	*Ooceraea biroi*
	tr|A0A1B6GMG2|A0A1B6GMG2_9HEMI	104,15	30	11	29476	*Cuerna arida*
	tr|A0A0A9X9F3|A0A0A9X9F3_LYGHE	104,15	30	11	29449	*Lygus hesperus*
	tr|A0A1E1WUG4|A0A1E1WUG4_PECGO	104,15	30	11	29316	*Pectinophora gossypiella*
	tr|A0A1E1WF25|A0A1E1WF25_PECGO	104,15	30	11	29528	*Pectinophora gossypiella*
	tr|A0A1L8E4X8|A0A1L8E4X8_9DIPT	104,15	29	11	30463	*Nyssomyia neivai*
	tr|R4J9C9|R4J9C9_9HEMI	104,15	28	11	30789	*Euscelidius variegatus*
	tr|A0A2S2PI08|A0A2S2PI08_SCHGA	104,15	27	11	31826	*Schizaphis graminum*
	tr|Q5XUB7|Q5XUB7_TOXCI	104,15	27	11	32746	*Toxoptera citricida*
	tr|A0A170Y0V3|A0A170Y0V3_TRIIF	104,15	27	11	32767	*Triatoma infestans*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
	tr|M9VSN8|M9VSN8_LAOST	104,15	27	11	32775	*Laodelphax striatellus*
	tr|B7ZGK7|B7ZGK7_9HEMI	104,15	27	11	32784	*Lethocerus indicus*
	tr|A0A455LAV6|A0A455LAV6_9HYME	104,15	27	11	32587	*Habrobracon hebetor*
	tr|A0A5E4NRK8|A0A5E4NRK8_9HEMI	104,15	27	11	32731	*Cinara cedri*
	tr|Q64F38|Q64F38_MYZPE	104,15	27	11	32704	*Myzus persicae*
	tr|A0A0A9YWZ5|A0A0A9YWZ5_LYGHE	104,15	27	11	32595	*Lygus hesperus*
	P31816|TPM_LOCMI	104,15	27	11	32439	*Locusta migratoria*
	tr|B7ZGK6|B7ZGK6_9HEMI	104,15	26	11	32830	*Lethocerus indicus*
	tr|A0A151X364|A0A151X364_9HYME	104,15	26	11	32591	*Trachymyrmex zeteki*
	tr|A0A3Q0ISQ4|A0A3Q0ISQ4_DIACI	104,15	26	11	33146	*Diaphorina citri*
	tr|A0A2A3EHJ9|A0A2A3EHJ9_APICC	104,15	26	11	32900	*Apis cerana cerana*
	tr|A0A1L8E4Y9|A0A1L8E4Y9_9DIPT	104,15	26	11	32711	*Nyssomyia neivai*
	tr|B2DBG0|B2DBG0_PAPXU	104,15	26	11	32774	*Papilio xuthus*
	tr|A0A146LIJ5|A0A146LIJ5_LYGHE	104,15	26	11	32884	*Lygus hesperus*
	tr|A0A1B6FV90|A0A1B6FV90_9HEMI	104,15	26	11	32746	*Cuerna arida*
	tr|V9I8B2|V9I8B2_APICE	104,15	24	11	36560	*Apis cerana*
	tr|K7IU29|K7IU29_NASVI	104,15	22	11	39250	*Nasonia vitripennis*
	tr|A0A0A9X546|A0A0A9X546_LYGHE	104,15	21	11	39614	*Lygus hesperus*
	tr|F4WSG5|F4WSG5_ACREC	104,15	21	11	41171	*Acromyrmex echinatior*
	tr|A0A1B6EIN9|A0A1B6EIN9_9HEMI	104,15	18	11	46893	*Cuerna arida*
	tr|A0A3L8DBK6|A0A3L8DBK6_OOCBI	104,15	16	11	50853	*Ooceraea biroi*
	tr|A0A3Q0ITI0|A0A3Q0ITI0_DIACI	104,15	11	11	76807	*Diaphorina citri*
	tr|A0A3Q0IMY8|A0A3Q0IMY8_DIACI	104,15	11	11	77166	*Diaphorina citri*
	tr|T1L4U7|T1L4U7_TETUR	100,06	11	9	46762	*Tetranychus urticae*
	tr|Q6LEH1|Q6LEH1_DROME	97,20	18	8	30851	*Drosophila melanogaster*

Numery i identyfikatory próbek	Odnośnik do bazy UniProtKB	-10logP	Pokrycie sekwencji (%)	Liczba wspólnych peptydów	Średnia masa cząsteczkowa [Da]	Źródło tropomiozyny (nazwa łacińska)
	tr|A0A1D2NEN2|A0A1D2NEN2_ORCCI	92,7	12	7	35547	*Orchesella cincta*
	tr|A0A4U5P9E7|A0A4U5P9E7_STECR	87,44	7	6	73286	*Steinernema carpocapsae*
	tr|G4XTD3|G4XTD3_ANISI	85,66	17	6	33166	*Anisakis simplex*
	tr|H3FQ19|H3FQ19_PRIPA	85,66	8	6	63344	*Pristionchus pacificus*
	tr|A0A2A6BMJ3|A0A2A6BMJ3_PRIPA	85,66	8	6	63344	*Pristionchus pacificus*
	tr|A0A0V1FE24|A0A0V1FE24_TRIPS	85,00	5	5	67900	*Trichinella pseudospiralis*
	tr|A0A0V0X4K9|A0A0V0X4K9_9BILA	85,00	5	5	67918	*Trichinella sp,*
	tr|A0A423SL41|A0A423SL41_PENVA	81,09	17	3	17766	*Penaeus vannamei*