

凡纳对虾原肌球蛋白硫酸铵沉淀分离纯化方法的优化

傅玲琳¹, 富舒洁¹, 王彦波¹, 王 翀¹, 张 岩², 吴 琦³, 马爱进^{3,*}

(1. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018;

2. 河北省食品检测研究院, 河北 石家庄 050091; 3. 中国标准化研究院, 北京 100191)

摘 要: 虾原肌球蛋白(tropomyosin, TM)食物过敏是一种全球性的食品安全问题, 研究发现TM的分离纯化对于系统准确地鉴定和控制过敏具有重要的意义, 鉴于此, 本研究以南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)为对象, 改进了TM分离纯化的方法。结果表明, 抽提液pH 6.5~7.5、硫酸铵饱和度30%时, 可以有效分离纯化TM; 经喹啉酸法测定其质量浓度最高可达43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。该方法省去了高效液相色谱、层析技术等对TM的进一步纯化, 减少了纯化步骤, 避免了在这些纯化步骤中出现的蛋白损失及蛋白稀释; 高质量浓度的TM溶液可无须经过冷冻干燥, 直接用于对其理化性质及过敏原性的研究。

关键词: 过敏原; 南美白对虾; 原肌球蛋白; 分离; 纯化

Optimization of Purification by Ammonium Sulfate Precipitation of the Major Allergen Tropomyosin from Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

FU Linglin¹, FU Shujie¹, WANG Yanbo¹, WANG Chong¹, ZHANG Yan², WU Qi³, MA Aijin^{3,*}

(1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China;

2. Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050091, China;

3. China National Institute of Standardization, Beijing 100191, China)

Abstract: Tropomyosin (TM), the major shrimp allergen, is one of the serious food safety problems throughout the world and has drawn much attention. It has been reported that the isolation and purification of TM is of very importance in the identification and control of allergy. In the present study, tropomyosin was purified from *Litopenaeus vannamei* by an improved method. The results indicated that TM could be purified effectively by adjusting the extraction buffer to pH 6.5 to 7.5 and then adding ammonium sulfate to approximately 30% saturation. The concentration of TM was about 43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, as determined by a BCA Protein Assay Kit. The improved method avoided further purification of TM using high performance liquid chromatography (HPLC) or another chromatographic technology. In addition, the process of TM isolation was simplified and TM loss and dilution were avoided during further purification. High concentration of purified TM solution obtained in the present study could be directly used to study its physicochemical properties and allergenicity without being freeze-dried.

Key words: allergen; *Litopenaeus vannamei*; tropomyosin (TM); isolation; purification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718030

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2017)18-0187-06

引文格式:

傅玲琳, 富舒洁, 王彦波, 等. 凡纳对虾原肌球蛋白硫酸铵沉淀分离纯化方法的优化[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 187-192.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718030. <http://www.spkx.net.cn>

FU Linglin, FU Shujie, WANG Yanbo, et al. Optimization of purification by ammonium sulfate precipitation of the major allergen tropomyosin from shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Food Science, 2017, 38(18): 187-192. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718030. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-03-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31571770); “十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD0401203); 浙江省科技厅公益技术应用研究计划项目(2016C32058)

作者简介: 傅玲琳(1981—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品安全与过敏原。E-mail: fulinglin@zjgsu.edu.cn

*通信作者: 马爱进(1975—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品与农业标准化。E-mail: maaj@cnis.gov.cn

食物过敏是一种全球性的严重食品安全问题,其中水产品过敏的人群比例为2.4%,且仍有不断上升的趋势。另据统计,虾蟹等甲壳类水产品是亚洲地区最普遍的食物过敏原,约有40%的亚洲儿童和33%的亚洲成人对虾蟹过敏。我国是对虾养殖生产、消费和出口大国,对虾因其味美、营养价值高深受人们喜爱,但是对虾容易引起食物过敏。对虾中主要存在4种过敏原:氨基酸序列高度保守的肌原纤维蛋白原肌球蛋白(tropomyosin, TM),分子质量约为35~38 kD;精氨酸激酶(arginine kinase, AK), Pen m 2或Lit v 2,分子质量约为40 kD;肌质钙结合蛋白(sarcoplasmic calcium-binding protein, SCP), Lit v 4,分子质量约为22 kD;肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC), Lit v 3,分子质量约为20 kD^[1]。其中, TM是最主要的过敏原,对虾过敏患者中有至少有80%对TM过敏,过敏患者血清约有85%会与TM发生特异性反应,引起不同强度的过敏反应^[2]。由于TM耐热,在一般的食品加工过程中难以使其失活,近来也有文献表明超高压、酶解、美拉德反应等能在一定程度上降低TM的过敏性;但是,避免TM过敏的方式至今为止只有避免食用对虾^[3-6]。为了进一步研究TM的结构、理化性质及过敏机理,首要的是从对虾中有效分离纯化出TM。

目前用于TM分离纯化的方法主要有硫酸铵沉淀、等电点沉淀、高效液相色谱技术、层析技术等^[7-11]。高效液相色谱、层析技术等的应用虽然能得到纯度较高的TM,但其质量浓度较低,不易回收利用,且生物学活性难以保持,往往对后续的实验产生不利影响。硫酸铵沉淀是最常用的分离纯化手段,但是现有文献报道用于TM的饱和度和在40%~90%之间,区间范围太大,在实际操作过程中存在很大的局限性^[8,12]。因此,为了研究TM引发的食物过敏的机制,有些学者会选择重组蛋白^[13-17],即将TM的cDNA序列克隆到质粒上后在大肠杆菌中进行表达,最后纯化得到重组TM。但是细菌为原核生物,甲壳类等水产品为真核生物,其蛋白质表达系统存在差异,因此通过重组TM构建致敏小鼠模型并不能完全模拟实际情况下的食物过敏,也就无法更好地探究其致敏机理。

鉴于此,本研究针对广泛应用的硫酸铵沉淀方法中存在的问题,以南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)为对象,开展TM分离纯化条件的改进研究,旨在有效快速分离提纯TM,得到高质量浓度、高活性的TM,用于对其理化性质及过敏机理等的研究,具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*) 杭州萧山

养殖场;二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT) 美国Sigma公司;喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit) 江苏凯基生物技术股份有限公司;其余常规化学试剂均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

台式冷冻高速离心机、EASY-nLC1000纳升级液相色谱仪、Q Exactive质谱仪 美国Thermo公司;infiniteM200酶标仪 瑞士Tecan公司;Milli-Q超纯水装置 美国Millipore公司;FluorChem HD2 Alpha化学发光凝胶成像系统 美国ProteinSimple公司。

1.3 方法

1.3.1 丙酮粉的制备

丙酮粉的制备参照文献[18]并做细微的改动:将南美白对虾去头、去尾、去虾线,按1:10(g/mL)加入Buffer A(50 mmol/L KCl和2 mmol/L NaHCO₃)中,充分均质后于4℃抽提20 min,4℃、10 000 r/min离心20 min后取沉淀;将沉淀重悬在10倍体积的Buffer A中,4℃、10 000 r/min离心20 min后取沉淀,以上步骤重复5次;沉淀经预冷丙酮充分洗涤至无色后用6层纱布过滤取沉淀,于室温晾干,除去脂肪及脂溶性色素等杂质得到对虾丙酮粉。

1.3.2 TM抽提液pH值及抽提时间的优化

称取5份等质量的丙酮粉(0.5 g),按1:5(g/mL)加入pH 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5的Buffer B(0.02 mol/L的Tris-HCl、1 mol/L的KCl和0.1 mmol/L的DTT),4℃抽提48 h,4℃、10 000 r/min离心30 min;将离心后的上清液沸水浴10 min后,4℃、8 000 r/min离心15 min取上清液,分装后保存于-80℃待用;将离心后的沉淀按1:5(g/mL)复溶于上述不同pH值的Buffer B中,4℃抽提48 h,4℃、10 000 r/min离心30 min取上清液,上清液沸水浴10 min后,4℃、8 000 r/min离心15 min取上清液,分装后保存于-80℃待用。蛋白质量浓度测定采用BCA试剂盒。

1.3.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析

SDS-PAGE参照文献[19]并略改动:根据Bio-Rad推荐配方制备5 g/100 mL的浓缩胶和12 g/100 mL的分离胶,将蛋白样品稀释到1 μg/μL,与上样缓冲液充分混匀后沸水浴5 min,上样量为每孔10 μL,浓缩胶电泳电压为70 V,分离胶电泳电压为120 V,SDS-PAGE结束后用考马斯亮蓝R250染色后脱色,采用Alpha化学发光凝胶系统扫描,并用Alpha View SA 3.4.0点用图像分析软件分析。

1.3.4 TM硫酸铵盐析饱和度的优化

通过2步离心确定TM最佳硫酸铵沉淀条件。根据上

述实验结果取1 g丙酮粉溶于最适pH值的Buffer B（料液比1:5（g/mL））中，4℃抽提一段时间后10 000 r/min离心30 min取上清液；上清液沸水浴10 min后，4℃、8 000 r/min离心15 min取上清液。将上清液分装于1.5 mL离心管中，每管1 mL，记为0号管；取6个0号管分别加入不同质量的硫酸铵使其饱和度分别为20%、30%、40%、50%、60%、70%，分别记为1、2、3、4、5、6号管，充分混匀后4℃孵育1 h，4℃、8 000 r/min离心15 min取上清液，继续加固体硫酸铵使各管的饱和度增加10%，为30%、40%、50%、60%、70%、80%，充分混匀后4℃孵育1 h，4℃、8 000 r/min离心15 min取沉淀，用PBS复溶；SDS-PAGE分析及BCA浓度测定。

1.3.5 TM纯化分析

TM的纯化参考文献[15]，并根据以上实验结果做相应的改动。称取1 g丙酮粉溶于最适pH值的Buffer B（料液比1:5（g/mL））中，4℃抽提一段时间后10 000 r/min离心30 min取上清液；上清液沸水浴10 min后，4℃、8 000 r/min离心15 min取上清液；在上清液中加入固体硫酸铵至最佳饱和度，充分沉淀后4℃、8 000 r/min离心20 min取沉淀，用PBS复溶；用1 mol/L的HCl溶液调pH值至4.6，4℃、8 000 r/min离心10 min取沉淀，用PBS复溶。上述每一步骤的沉淀和上清液留样，于-80℃保存，用于后续的SDS-PAGE分析及BCA蛋白含量的计算。

1.3.6 TM质谱鉴定

1.3.6.1 酶解

将纯化的蛋白约1 μg溶于100 μL 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液，加入10 ng Trypsin，37℃酶解过夜，然后冷却至室温，加入2 μL甲酸，混匀后高速离心，转移至进样瓶中备质谱分析。

1.3.6.2 纳升级液相色谱-串联质谱检测

捕集柱：Eksigent ChromXP C_{18} -CL（350 μm×0.5 mm，3 μm，120 Å），分析柱：ChromXP C_{18} -CL（75 μm×15 cm，3 μm，120 Å）。流动相A为0.1%甲酸溶液，B为0.1%甲酸-乙腈溶液。进样体积2 μL，上样泵以3 μL/min的流速上样10 min，然后以300 nL/min的流速，梯度分析分离肽段。梯度条件为45 min内B从5%升至25%，45~50 min B从25%升至45%，50~55 min B从45%升至90%，55~65 min B保持90%，反相过程共65 min，分离后分析柱用初始流动相比比例条件平衡10 min。纳升级电喷雾电压：2.5 kV；毛细管温度：250℃；S-lens：55%；采用Full MS/data dependent MS2（dd-MS2）扫描模式，每次全扫描后采集10个MS2扫描，电荷数大于1的MS1进行MS2扫描；碰撞能量：28% HCD；分辨率：MS1 70 000，MS2 17 500；母离

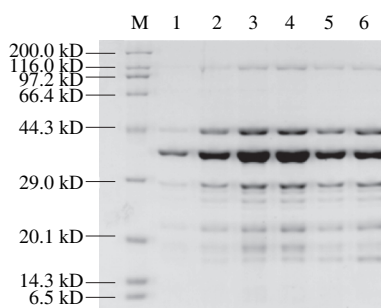
子扫描范围： m/z 350~1 500；子离子扫描范围最小 m/z 为100；MS1最大离子注入数目（自动增益控制）为 1×10^6 ，最大离子注入时间为20 ms，MS2自动增益控制为 2×10^5 ，注入时间为120 ms，动态排除时间为60 s。

1.4 数据检索及蛋白鉴定

采集的原始数据采用ThermoFisher公司的Proteome Discoverer 1.4进行搜库，搜索引擎使用SEQUEST，使用NCBI下载该蛋白的氨基酸序列fasta文件为蛋白数据库，同时使用正反库搜索方法，将错误发生率控制在1%以内。

2 结果与分析

2.1 抽提液pH值及抽提时间对TM提取的影响

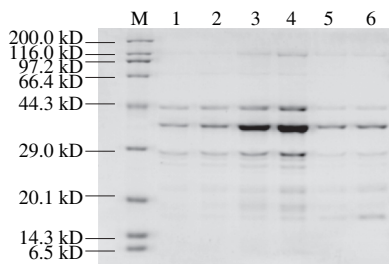


M. Marker；泳道1~6. pH值分别为4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5。

图1 丙酮粉经不同pH值Buffer B抽提2 d后上清液的SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the soluble proteins obtained after 2 days of extraction with Buffer B at different pH values

不同pH值抽提液抽提2 d后的上清液SDS-PAGE如图1所示。总体而言，在pH 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5的抽提液中，蛋白种类大致相同，但相应蛋白的含量相差较大：当pH值小于7.5，随着pH值的升高，如泳道1、2、3、4所示，根据AlphaView SA 3.4.0点用图像分析软件分析可知，主要蛋白质条带分子质量从上到下分别约为110.2、42.5、27.6、26.0、25.6、22.2、21.3、19.0、18.4、16.6 kD，条带数目没有明显变化，但是颜色深度显著增加，说明Buffer B溶出的蛋白质种类没有明显的变化，但是蛋白质含量逐渐增加；当pH值在6.5~7.5之间，蛋白条带颜色最深，说明该pH值条件下能够大量富集分子质量为36 kD的蛋白；当pH值大于7.5，条带数目没有明显变化，但是条带颜色变浅。值得注意的是，除pH 4.5的Buffer B抽提液外，所有抽提液中均存在分子质量约为36.0 kD的蛋白条带。根据国内外文献报道，TM的分子质量约为36 kD，等电点约为4.5~4.6，在等电点附近，其溶解度最低。pH 4.5的Buffer B抽提液基本不含有36 kD的蛋白条带可能是由该原因造成。综上所述，分子质量约为36 kD对应的蛋白可能是虾类的主要过敏原TM。



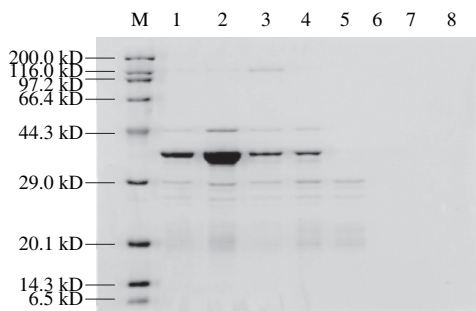
M. Marker; 泳道1~6. pH值分别为4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5。

图2 丙酮粉经不同pH值Buffer B继续抽提2 d后上清液的SDS-PAGE分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the soluble proteins obtained after another 2 days of extraction with Buffer B at pH values

不同pH值抽提液继续抽提2 d后的上清液SDS-PAGE如图2所示。通过比较图1、2可知,随着抽提时间的延长,抽提液中仍有蛋白溶出,尤其是分子质量约为36.0 kD的蛋白,在不同pH值的抽提液中含量存在显著差异,在pH 6.5、7.5的抽提液中含量最高。

2.2 硫酸铵饱和度对TM提取的影响



M. Marker; 泳道1. Buffer B抽提后的粗蛋白; 泳道2~8.硫酸铵饱和度分别为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。

图3 抽提液经不同饱和度硫酸铵沉淀后上清液的SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the soluble proteins precipitated with ammonium sulfate at different degrees of saturation

通过2步离心法确认TM硫酸铵沉淀的最佳饱和度。一次沉淀的饱和度为20%、30%、40%、50%、60%、70%,离心去除不溶性蛋白;测定离心后上清液的体积,按比例加入相应的硫酸铵固体,使其饱和度增加10%,此时得到的沉淀分别为20%~30%、30%~40%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%饱和度条件下的沉淀,沉淀用PBS复溶后进行SDS-PAGE,如图3所示,泳道2分子质量约为36 kD的蛋白条带颜色较深,说明该蛋白含量较多,初步判断为TM,其硫酸铵沉淀区间为30%~40%。各泳道分子质量为36.0 kD的蛋白含量显著低于第2泳道。因此,可确定TM的最佳饱和度区间为20%~30%,30%最佳。进一步测定蛋白质质量浓度,用等量的PBS溶解不同饱和度硫酸铵盐析出来的沉淀时,从图4可知,30%的饱和度效果最佳,其质量浓度高达13.72 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,远高于其他饱和度,因此,可判断30%是硫酸铵盐析该蛋白的最佳饱和度。

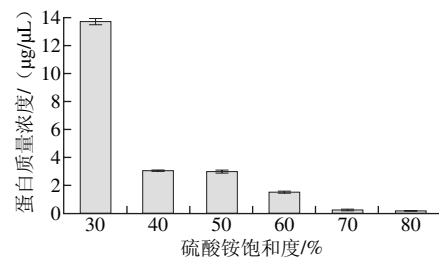
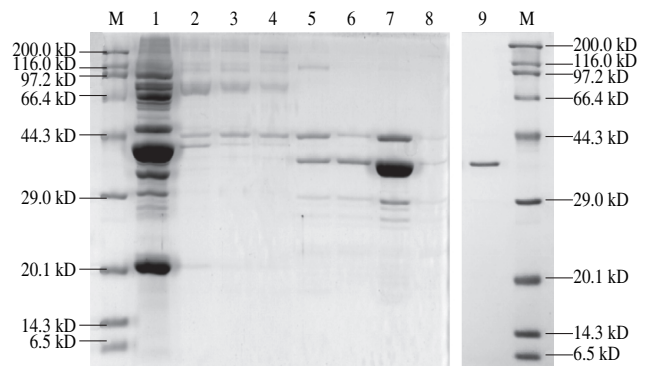


图4 不同饱和度硫酸铵对蛋白质提纯的影响

Fig. 4 Effect of ammonium sulfate saturation on protein concentration

2.3 TM纯化分析



M. Marker; 泳道1~4.分别是Buffer A抽提第1、3、4、5次的上清液; 泳道5. Buffer B抽提后的粗蛋白; 泳道6. Buffer B抽提后的粗蛋白加热离心得到的上清液; 泳道7. 30%盐析沉淀; 泳道8. 30%盐析上清液; 泳道9.等电点沉淀纯化后的上清液。

图5 TM纯化的SDS-PAGE分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified tropomyosin

根据上述得到的最适抽提液pH值、抽提时间及最适硫酸铵饱和度,再辅以等电点纯化,各步骤蛋白样品纯度分析如图5所示,低盐溶液可以除去虾肉中的水溶性肌浆蛋白,随着低盐溶液抽提次数的增加,水溶性肌浆蛋白含量越来越少,直至肉眼观察不到蛋白质条带。丙酮粉经高盐溶液抽提后,可见4条较为明显的蛋白质条带,分子质量从上到下约为111.2、42.3、36.0、27.5 kD。经过沸水浴后,分子质量约为111.2 kD的条带消失,分子质量约为42.3 kD的条带颜色变浅。30%硫酸铵盐析后,上清液中无肉眼可见条带,说明蛋白质已经完全沉淀;沉淀经PBS复溶后,其蛋白质量浓度提高,杂条带数目减少。尤其是在经过等电点沉淀后,SDS-PAGE图上只出现了分子质量约为36.0 kD的单一一条带。根据文献报道,TM是一种热稳定性蛋白,且分子质量为36 kD左右,等电点约为4.6,可以初步判断该蛋白为虾类蛋白主要过敏原TM。

2.4 TM质谱验证

采集的原始数据采用ThermoFisher公司的Proteome Discoverer 1.4进行搜库,搜索引擎使用SEQUEST,使用NCBI下载该蛋白的氨基酸序列fasta文件为蛋白数据

库,同时使用正反库搜索方法,将FDR控制在1%以内;同时结合图6可知:通过上述提纯方法提纯的蛋白为Lit v 1 tropomyosin (*Litopenaeus vannamei*),分子质量为32.8 kD,等电点为4.75。

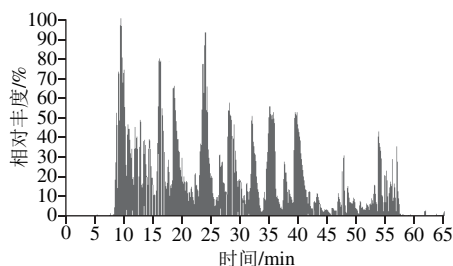


图6 TM质谱鉴定

Fig. 6 Mass spectrometric analysis of tropomyosin

3 讨论

硫酸铵可溶性强、价格低廉、纯品易获得,更重要的是能够稳定蛋白质结构,因此,常用作蛋白质沉淀剂。Bailey等^[20]用41%~70%的硫酸铵饱和度盐析兔肌肉组织中的TM; Yu等^[7]用70%、90%的硫酸铵饱和度盐析蛋白后用离子交换层析柱(HITrap Q Sepharose Fast Flow column)从斑节对虾中纯化TM; Li Zhenxing等^[21]用35%~60%的硫酸铵饱和度盐析蛋白辅以等电点沉淀法从凡纳滨对虾中分离TM; Liu Guangming等^[19]用41%、60%的硫酸铵饱和度从拟穴青蟹中分离TM; Huang等^[22]用50%~60%的硫酸铵饱和度从鱼中分离TM; Zhang Hong等^[23]用30%~55%的硫酸铵饱和度从多种虾中分离TM; Kunimoto等^[24]用40%~60%的硫酸铵饱和度从日本对虾中分离TM。大多数的研究沉淀TM的硫酸铵的饱和度在40%~90%,硫酸铵的饱和度区间范围太大,使得大量的杂蛋白与TM同时沉淀,所以往往需要层析技术(离子交换层析、凝胶层析等)、高效液相色谱、等电点沉淀法进一步分离纯化得到TM。

硫酸铵盐析时每增加10%的饱和度,即可使90%的蛋白质发生沉淀,实验表明南美白对虾TM的硫酸铵盐析最佳饱和度为30%左右。与上述研究结果存在着较大的差异。造成差异的原因可能是TM的来源不同,不同品种虾、蟹等甲壳类动物中的TM虽然有着较高的同源性,但是细微的差异可能就可以导致TM沉淀的饱和度不同。

TM广泛存在于软体动物、甲壳类动物、棘皮动物门中,甲壳类动物之间TM的同源性高达98%;不同类别间的同源性也高达70%~85%,是引起交叉反应的主要过敏原^[25]。根据大量文献报道,对虾过敏的患者也可能对尘螨、蟑螂、牡蛎等中的TM过敏^[26-27]。

目前, TM过敏的机制及其交叉反应性尚不清楚,有

待于进一步研究。Wai等^[28]根据TM氨基酸序列合成18个肽段,用18个肽段刺激从重组TM致敏小鼠中分离出来的脾细胞,通过脾细胞增殖及释放的细胞因子,确定具有免疫活性的6个肽段(T细胞表位),给重组TM致敏的小鼠口服灌胃具有活性的肽段,发现小鼠的过敏反应减弱,抗体分泌减少,肠道组织病变有所缓解,细胞因子释放朝Th1方向偏移,研究TM过敏的机制; Lam等^[13]用重组TM构建致敏小鼠模型,通过其肠道组织病理切片;血清中组胺、细胞因子、抗体的释放量;组织中细胞因子mRNA表达量等多方面探究TM的机理; Kumjim等^[29]通过克隆并且在酵母中表达得到淡水长臂大虾的重组TM,研究其与海虾之间的交叉反应性。重组TM虽然与天然TM的结构相似,但是存在2个多态氨基酸,表明重组TM是天然TM的突变体。但是细菌为原核生物,甲壳类等水产品为真核生物,其蛋白质表达系统存在差异,因此通过重组TM研究TM的结构、功能、过敏原性在一定程度上并不能与自然界天然存在的TM相比较;用重组蛋白构建致敏小鼠模型也不能完全模拟人食物过敏,无法更好地探究其过敏机理。因此需要大量天然提纯且具有高纯度及生理活性的TM。Jeong等^[30]通过重组TM研究TM与IgE结合能力的强弱,验证其过敏原性的强弱。

研究表明,抽提液pH值在6.5~7.5之间,抽提4 d后得到TM粗提液,将硫酸铵固体加入原球蛋白粗提液,使其饱和度达到30%,辅以等电点沉淀,即可在SDS-PAGE上得到单一蛋白质条带,且质量浓度可达43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,有效分离纯化南美白对虾中的主要过敏原TM。该方法确定了抽提液的最佳pH值、最佳抽提时间及硫酸铵的最佳饱和度,快速、高效地得到高浓度、高纯度的TM。省去了高效液相色谱、层析柱等方法对TM的进一步纯化,减少了纯化步骤,避免了在这些纯化步骤中出现的蛋白损失及蛋白稀释。为进一步研究TM的空间结构、功能性质、抗原表位、过敏原性及过敏机制提供了现实可能。

参考文献:

- [1] SOLOMEN P D, MARGARET M, SELAMAT J, et al. Allergens derived from shrimp[J]. International Food Research Journal, 2015, 22(5): 1751-1754.
- [2] BESLER M, STEINHART H, PASCHKE A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods[J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 756(1): 207-228. DOI:10.1016/S0378-4347(01)00110-4.
- [3] WILD L G, LEHRER S B. Fish and shellfish allergy[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2005, 5(1): 74-79. DOI:10.1007/s11882-005-0059-z.
- [4] 蔺海鑫, 林洪, 王晓斐, 等. 美拉德反应对菲律宾蛤仔原肌球蛋白结构及免疫活性的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 22-26. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201603005.
- [5] 胡志和. 虾类过敏原及消减方法研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 319-323.

- [6] 张晴晴, 吴子健, 胡志和, 等. 凡纳滨对虾过敏原结构与性质的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 285-290. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201409056.
- [7] YU C J, LIN Y F, CHIANG B L, et al. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2[J]. The Journal of Immunology, 2003, 170(1): 445-453. DOI:10.4049/jimmunol.170.1.445.
- [8] LIU G M, CHENG H, NESBIT J B, et al. Effects of boiling on the IgE-binding properties of tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(1): T1-T5. DOI:10.1111/j.1750-3841.2009.01391.x.
- [9] SHEN H W, LIU Y Y, CHEN F, et al. Purification, characterization and immunoreactivity of tropomyosin, the allergen in *Octopus fangsiao*[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(10): 1747-1756. DOI:10.1016/j.procbio.2014.07.005.
- [10] 张铁群, 林洪, 李振兴, 等. 虾过敏原蛋白纯化中硫酸铵沉淀法的改进[J]. 食品与药品, 2008, 10(6): 50-52. DOI:10.3969/j.issn.1672-979X.2008.06.017.
- [11] 胡志和, 张晴青, 吴子健, 等. 超高压处理对凡纳滨对虾原肌球蛋白构象的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 25-31. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201623005.
- [12] CAPOBIANCO F, BUTTERONI C, BARLETTA B, et al. Oral sensitization with shrimp tropomyosin induces in mice allergen-specific IgE, T cell response and systemic anaphylactic reactions[J]. International Immunology, 2008, 20(8): 1077-1086. DOI:10.1093/intimm/dxn065.
- [13] LAM Y F, TONG K K, KWAN K M, et al. Gastrointestinal immune response to the shrimp allergen tropomyosin: histological and immunological analysis in an animal model of shrimp tropomyosin hypersensitivity[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2015, 167(1): 29-40. DOI:10.1159/000431228.
- [14] AYUSO R, GRISHINA G, BARDINA L, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008, 122(4): 795-802. DOI:10.1016/j.jaci.2008.07.023.
- [15] NAKANO S, YOSHINUMA T, YAMADA T. Reactivity of shrimp allergy-related IgE antibodies to krill tropomyosin[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2007, 145(3): 175-181. DOI:10.1159/000109286.
- [16] GÁMEZ C, SÁNCHEZ-GARCÍA S, IBÁÑEZ M D, et al. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy[J]. Allergy, 2011, 66(10): 1375-1383. DOI:10.1111/j.1398-9995.2011.02663.x.
- [17] WANG S, DELGADO J C, RAVKOV E, et al. Penaeus monodon tropomyosin induces CD4 T-cell proliferation in shrimp-allergic patients[J]. Human Immunology, 2012, 73(4): 426-431. DOI:10.1016/j.humimm.2011.12.019.
- [18] SMILLIE L B. Preparation and identification of α - and β -tropomyosins[J]. Methods in Enzymology, 1982, 85: 234-241.
- [19] LIU G M, LI B, YU H L, et al. Induction of mud crab (*Scylla paramamosain*) tropomyosin and arginine kinase specific hypersensitivity in BALB/c mice[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(2): 232-238. DOI:10.1002/jsfa.4565.
- [20] BAILEY K. Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril[J]. Biochemical Journal, 1948, 43(2): 271. DOI:10.1042/bj0430271.
- [21] LI Z X, LIN H, CAO L M, et al. Impact of irradiation and thermal processing on the immunoreactivity of shrimp (*Penaeus vannamei*) proteins[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87(6): 951-956. DOI:10.1002/jsfa.2746.
- [22] HUANG M C, OCHIAI Y. Fish fast skeletal muscle tropomyosins show species-specific thermal stability[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 141(4): 461-471. DOI:10.1016/j.cbpc.2005.05.008.
- [23] ZHANG H, LU Y, USHIO H, et al. Development of sandwich ELISA for detection and quantification of invertebrate major allergen tropomyosin by a monoclonal antibody[J]. Food Chemistry, 2014, 150: 151-157. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.10.154.
- [24] KUNIMOTO A, SISINO T, SAKAI K, et al. Molecular cloning and allergenicity of Pen j 1, a major allergen of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(4): 840-848. DOI:10.1271/bbb.80751.
- [25] TAYLOR S L. Molluscan shellfish allergy[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2008, 54: 139-177. DOI:10.1016/S1043-4526(07)00004-6.
- [26] FARAG-MAHMOD F I, HESSAM W I. Life threatening shrimp allergy cross reacting with mite allergy: a case report[J]. Allergy, Asthma & Clinical Immunology, 2014, 10(1): A9. DOI:10.1186/1710-1492-10-S1-A9.
- [27] MARTINS T, DIAS M, PRADO R, et al. Bronchial hyperreactivity induced by tropomyosins from cockroach and shrimp: a mouse model to study *in vivo* cross-reactivity[J]. World Allergy Organization Journal, 2015, 8(1): A264. DOI:10.1186/1939-4551-8-S1-A264.
- [28] WAI C Y Y, LEUNG N Y H, LEUNG P S C, et al. T cell epitope immunotherapy ameliorates allergic responses in a murine model of shrimp allergy[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2016, 46(3): 491-503. DOI:10.1111/cea.12684.
- [29] KUMJIM S, JIRAPONGSANANURUK O, PIBOONPOCANUN S. Cloning and characterization of recombinant tropomyosin of giant freshwater shrimp *M. rosenbergii* to determine major allergens causing allergic reactions among shrimp-allergic children[J]. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, 2016, 34(3): 229-235. DOI:10.12932/AP0698.
- [30] JEONG K Y, LEE J, LEE I Y, et al. Allergenicity of recombinant Bla g 7, German cockroach tropomyosin[J]. Allergy, 2003, 58(10): 1059-1063. DOI:10.1034/j.1398-9995.2003.00167.x.