

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00108

锯缘青蟹主要过敏原的纯化与鉴定

刘光明 梁银龙 翁 凌 苏文金 黄园园 曹敏杰

(集美大学生物工程学院, 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 厦门 361021)

摘要: 以锯缘青蟹为研究对象, 从免疫鉴定、分离纯化、抗体制备和免疫学分析等方面对其主要过敏原进行研究。首先利用过敏者血清的免疫印迹法, 确定锯缘青蟹的主要过敏原为分子量约 38 kD 的蛋白。然后通过制备丙酮粉、等电点沉淀、硫酸铵沉淀及加热处理对分子量为 38 kD 的主要过敏蛋白进行了高度纯化。该蛋白的 pI 约为 4.5, 与虾的原肌球蛋白 Pen a 1 性质相近, 证实了锯缘青蟹的主要过敏原为原肌球蛋白。通过免疫新西兰大白兔, 制备了原肌球蛋白的抗血清, 采用 Protein A Sepharose 亲和层析柱对动物抗体进行了纯化。该抗血清效价高, 经 4×10^5 倍稀释后仍能与抗原进行反应。该抗体与甲壳类动物及软体动物的原肌球蛋白具有较强的免疫交叉反应, 可用于食品过敏原检测。

关键词: 锯缘青蟹; 过敏原; 原肌球蛋白; 纯化

中图分类号: TQ93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)01-0108-07

食物过敏是人类常见的一种过敏性疾病, 主要由食物中的蛋白质引起。食物过敏的主要症状有哮喘、荨麻疹等, 严重的甚至会危及到生命^[1]。近年来, 国民因食用水产品而发生过敏的比率逐年增高^[2]。蟹类作为甲壳类动物的一种, 是主要的过敏食物之一^[3]。国外的研究表明, 甲壳类动物的主要过敏原为原肌球蛋白^[4-6], 该蛋白的分子量约为 36—38 kD, 对热稳定, 蛋白质保守性好, 种间交叉反应明显^[7]。国内赵绮华等^[8]报道梭子蟹的主要过敏原分子量为 48.7 和 74.4 kD 的蛋白质, 但未对这两种蛋白质进行鉴定。

锯缘青蟹(*Scylla serrata*), 俗名青蟹, 其肉味鲜美, 营养丰富, 是我国蟹类增养殖的重要对象, 远销日本及东南亚国家, 随着消费人群的扩大, 过敏人数越来越多。随着物种的不同, 以及人种等各方面的差异, 针对国人的蟹类主要过敏原是否为原肌球蛋白, 或者是其他蛋白, 仍有待进一步研究证实, 而以锯缘青蟹为对象的过敏原研究尚未见报道。据此, 本文以锯缘青蟹为研究对象, 分离纯化其主要过敏原并进行鉴定, 制备动物抗体并检测不同水产

品间的交叉反应。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

鲜活的水产品购自厦门市集美菜市场(表 1)。现杀取肉或置于 -20°C 保存备用。

新西兰大白兔约 2 kg/只, 购于厦门大学医学院, 用于抗体制备, 提供充足的标准饲料和清水, 并保证干燥通风和清洁安静。

11 份甲壳类(含虾、蟹等)过敏者血清(编号 1—11)及 5 份正常人阴性血清由厦门市妇幼保健院和集美大学医疗中心提供, 11 位过敏者均有典型的过敏病史, 症状包括荨麻疹、哮喘、过敏性鼻炎等; 5 份正常人血清混合作为阴性血清池。

SDS-PAGE 标准蛋白购自 Fermentas 公司; 辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 二次抗体购自 Pierce 公司; 辣根过氧化酶标记的羊抗人 IgE 抗体购自 KPL 公司; 免疫印迹用蛋白质标准分子量购自 New England Biolab 公司。

收稿日期: 2008-09-01, 修订日期: 2009-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(30871947); 福建省自然科学基金(2008J0067); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划(NCETFJ-2007); 集美大学创新团队基金(2008A002)资助

作者简介: 刘光明(1972—), 男, 湖南株洲人; 副教授; 主要从事海洋生物技术方面的研究。E-mail: gmlu@jmu.edu.cn

通讯作者: 曹敏杰, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

表 1 本文实验所用的水产品
Tab. 1 Aquatic products used in this study

中文名称	英文名称	拉丁文名称
锯缘青蟹	Mud crab	<i>Scylla serrata</i>
中华绒螯蟹	Chinese mitten crab	<i>Eriocheir sinensis</i>
三疣梭子蟹	Japanese blue crab	<i>Portunus trituberculatus</i>
南美白对虾	White-leg shrimp	<i>Penaeus vannamei</i>
斑节对虾	Grass prawn	<i>Penaeus monodon</i>
日本对虾	Kuruma prawn	<i>Penaeus japonicus</i>
杂色鲍	Abalone	<i>Haliotis diversicolor</i>
菲律宾蛤仔	Short necked clam	<i>Ruditapes philippinarum</i>
缢蛏	Razor clam	<i>Sinonovacula constricta</i>
彩虹明樱蛤		<i>Moerella iridescens</i>
太平洋牡蛎	Pacific Oyster	<i>Crassostrea gigas</i>
阿根廷滑柔鱼	Argentine shortfin squid	<i>Illex argentinus</i>
中国鲤鱼	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>

1.2 粗提物制备

粗提物的制备参考黎锋等^[9]的方法。取 5 g 锯缘青蟹肌肉, 以 4 倍体积的冰冷 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0, 含 3% NaCl)进行组织捣碎, 重复两次(每次不超过 30s, 间隔 1min)。于 100℃沸水浴中加热处理 15min, 冰水冷却后 15000 r/min 离心 20min, 上清即为粗提物。

1.3 SDS-PAGE

参照蛋白质电泳技术^[10]。

1.4 Western-blot 和 Dot-blot 分析

参照 Western-blot 和 Dot-blot 技术^[10]。

1.5 肌原纤维的制备

取新鲜肌肉用组织捣碎机以 10 倍体积(v/w)的冰冷 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)(含 50 mmol/L KCl)捣碎。重复两次(每次不超过 30s, 中间间隔 1min), 将悬浮液于 7000 r/min 离心 10min, 得上清及沉淀, 上清即为肌浆蛋白。将沉淀重新悬浮于 10 倍体积的磷酸缓冲液中并捣碎, 再以同样的条件离心, 弃上清, 再次取用沉淀, 如此重复 4 次。将最后一次离心得到的沉淀溶解在含有 0.5 mol/L KCl 的 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)中, 得到的溶液即为肌原纤维。

1.6 主要过敏原的纯化

主要过敏原的纯化参考 Liang, *et al.*^[11]的方法, 主要步骤有制备丙酮粉、等电点沉淀、硫酸铵盐析等。

1.7 抗体制备及纯化

抗血清的制备及血清滴度的确定参考杜雪莉等^[12]的方法。纯化的过敏蛋白以 100 μg 的剂量免疫体重约 2 kg 的新西兰大白兔。免疫时抗原按免疫剂量稀释至 300 μL, 混合 300 μL 弗氏佐剂(初次免疫

用弗氏完全佐剂, 二、三次免疫用弗氏不完全佐剂), 乳化后用注射器在兔子的颈背部皮下多点注射。初免后隔两周进行二免, 二免一周后三免; 三免后一周耳缘静脉取血, 测定抗血清的效价; 效价达到要求后, 冲击免疫 1 次, 5d 后颈动脉采血; 血液于 37℃水浴 1h 后 4℃放置过夜, 离心, 上清即为抗血清。

多克隆抗体的纯化方法参考分子克隆的方法^[13], 并分装成小份于-80℃冰箱中保存。

1.8 不同水产品粗提物的制备及检测

不同水产品粗提物的制备方法与步骤 1.2 一致。制备得到的粗提物分别上样于 SDS-PAGE, 电转移至 NC 膜, 采用制备的兔抗青蟹原肌球蛋白抗体, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 显色, 检测不同水产品间原肌球蛋白的免疫交叉性。同时以甲壳类过敏者血清检测不同水产品粗提物的过敏蛋白。

2 结 果

2.1 粗提物组分的分析

锯缘青蟹肌肉经含 3% NaCl 的磷酸缓冲液捣碎后加热抽提, 采用胶浓度为 12%的 SDS-PAGE 进行分析(图 1), 上清所含的蛋白组分约有 15 种, 分子量从 14—150 kD 不等, 主要的蛋白条带为 15、19、22、30、31、38、50、60 kD, 其中 38 kD 和 50 kD 组分分别占总含量的 50%和 30%左右。

2.2 锯缘青蟹肌肉加热前后的差异

分别制备锯缘青蟹肌肉的肌浆蛋白和肌原纤维, 并对其进行 100℃加热处理 15min, 分别进行电泳(图 2), 肌浆蛋白经加热处理后, 上清已基本没有蛋白(泳道 3 中没有明显条带); 而肌原纤维加热后的主要变化是肌球蛋白重链、肌动蛋白和 90—110 kD

的条带被沉淀或降解, 而 38 kD 左右的条带无明显变化。

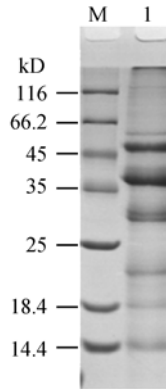


图 1 锯缘青蟹加热粗提物电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of cooked crude extract from Mud crab

M. protein marker; 1. cooked crude extract of Mud crab

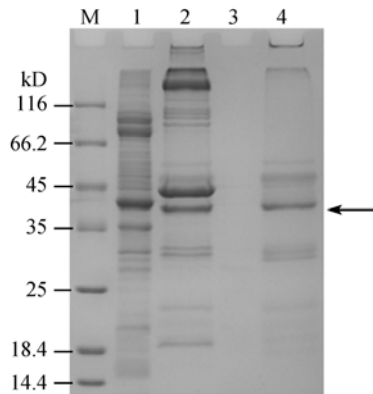


图 2 锯缘青蟹肌肉蛋白加热的电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of proteins from Mud crab with or without heating

M. protein marker; 1. sarcoplasmic protein; 2. myofibrillar protein; 3. supernatant of cooked myogen; 4. supernatant of cooked myofibrillar protein

采用甲壳类过敏者血清分别对锯缘青蟹肌肉的肌浆蛋白和肌原纤维蛋白组分进行免疫印迹检测。肌浆蛋白部分的结果(图 3), 反应条带主要集中在 175 kD 以上的大分子蛋白(泳道 1—8), 以及分子量约为 40 kD 的蛋白(泳道 1、2), 部分阳性血清(泳道 9—11)则与阴性混合血清池(泳道 12—14)一样没有反应条带。

肌原纤维部分的结果(图 4), 反应条带主要为 38 kD 的蛋白(泳道 1—10)和 100 kD 以上的大分子蛋白(泳道 2—11), 阴性混合血清池没有反应条带。泳道 11 的阳性血清 11 与肌原纤维蛋白在 38 kD 没有

反应条带, 推测分析可能是加热改变了过敏原的空间构象及三级结构, 导致某些 IgE 结合位点被破坏而无法与该血清反应。

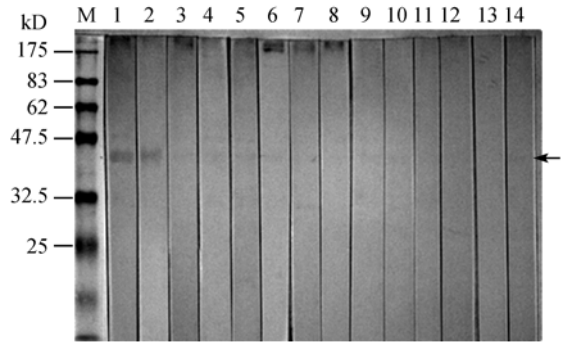


图 3 锯缘青蟹肌肉肌浆部分过敏蛋白的免疫印迹检测

Fig. 3 Western-blot analysis of allergenicity of sarcoplasmic protein from Mud crab

M. Prestained Protein Marker; 1—11. Sera from subjects with crustacean allergy (1—11, respectively); 12—14. Normal control sera pool

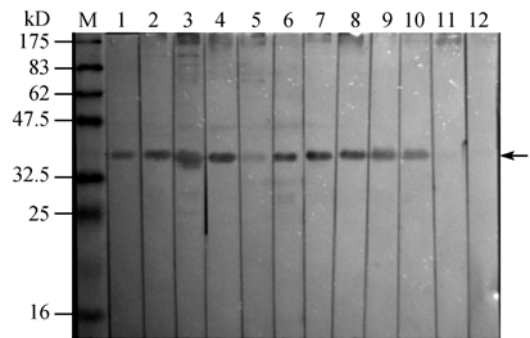


图 4 锯缘青蟹肌肉肌原纤维部分过敏蛋白的免疫印迹检测

Fig. 4 Western-blot analysis of allergenicity of myofibrillar protein from Mud crab

M. Prestained Protein Marker; 1—11. Sera from subjects with crustacean allergy (1—11, respectively); 12. Normal control sera pool

2.3 锯缘青蟹主要过敏原的纯化

制备的锯缘青蟹肌肉丙酮粉经 1 mol/L KCl 溶液抽提后, SDS-PAGE 结果如图 5 泳道 2, 与肌原纤维(泳道 1)对比, 主要去除的杂蛋白为分子量约 200 kD 肌球蛋白重链及 90 kD 蛋白, 同时分子量为 45 kD 的肌动蛋白含量也有明显下降。

制备的丙酮粉经盐溶液抽提后的上清, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 进行等电点沉淀, 以过敏者血清 1 的 Dot-blot 检测沉淀中过敏蛋白质的杂交反应显示, pH 为 6.0 时, 无显色; pH 为 5.0 时, 有轻微显色; pH 为 4.5 时, 着色反应最为明显; 进一步降低 pH 时着色反应随之下降, pH 为 3 时, 无显色; 因此确定

最佳等电点为 pH 4.5。等电点沉淀的 SDS-PAGE 结果如图 5 泳道 3, 该步骤主要去除了分子量约为 23、31、32 kD 的条带, 同时对蛋白进行了沉淀浓缩, 有利于后续纯化。

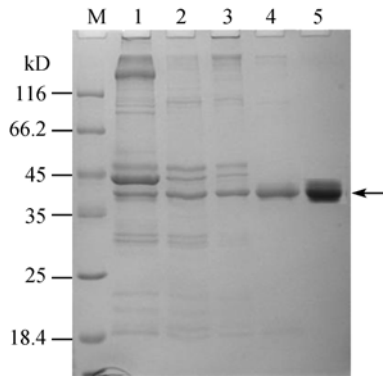


图 5 锯缘青蟹主要过敏原纯化电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purification of major allergen from Mud crab

M. protein marker; 1. myofibrillar protein; 2. supernatant of salting in; 3. isoelectric point precipitation of pH 4.5; 4. precipitation of 40%—60% ammonium sulfate fractionation; 5. supernatant of cooked precipitation after ammonium sulfate fractionation

硫酸铵起始饱和度从 20%开始, 以 10%为梯度依次递增进行硫酸铵盐析, 以过敏者血清 1 的 Dot-blot 检测沉淀中过敏蛋白质的杂交反应显示, 饱和度为 30%以下时, 无显色; 达到 40%时, 有轻微显色; 饱和度进一步增加到 50%和 60%时, 显色程度进一步加深; 达到 70%时, 无显色; 因此确定硫酸铵盐析的饱和度范围为 40%—60%。硫酸铵盐析的 SDS-PAGE 结果如图 5 泳道 4, 经 40%—60% 硫酸铵盐析后的主要蛋白为 38 kD 组分。

2.4 加热处理

对 40%—60%硫酸铵盐析后沉淀进行溶解及 100℃加热处理 15min, 其上清的 SDS-PAGE 结果如图 5 泳道 5, 加热处理使 19 kD 及 100 kD 处的条带消失, 而对 38 kD 的蛋白则影响不大; 将加热处理后的蛋白进行 Dot-blot 分析(图 6), 该蛋白与过敏者血清 1 有很强的显色, 而混合阴性血清池则没有显色, 说明纯化得到的 38 kD 条带即为锯缘青蟹主要过敏原。

2.5 锯缘青蟹主要过敏原的抗体制备与纯化

纯化的 38 kD 蛋白免疫新西兰大白兔后采血分离得到抗血清, Western-blot 检测抗血清的滴度结果显示, 抗血清在较高浓度下反应很强烈, 稀释至

409600 倍后仍能与抗原进行特异反应, 未免疫的兔阴性对照血清在 1:100 下没有条带出现。进一步采用 Protein A Sepharose 对抗血清的免疫球蛋白 IgG 进行纯化, SDS-PAGE 结果显示纯化的 IgG 为两条条带, 分别为 50 kD 重链和 25 kD 轻链。

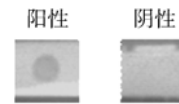


图 6 纯化过敏蛋白的点杂交分析

Fig. 6 Dot-blot analysis of the purified allergen by Dot-blot Left, serum 1 from subject with crustacean allergy; Right, Normal control sera pool

2.6 不同水产品粗提物的制备及检测

对 12 种不同水产品进行粗提物抽提(图 7), 12 种水产品的粗提物均在 34—38 kD 附近有明显蛋白条带, 其中杂色鲍、彩虹明樱蛤和太平洋牡蛎三者的条带较淡, 蛋白含量较低; 蟹类和虾类各自之间的蛋白条带较为相似。

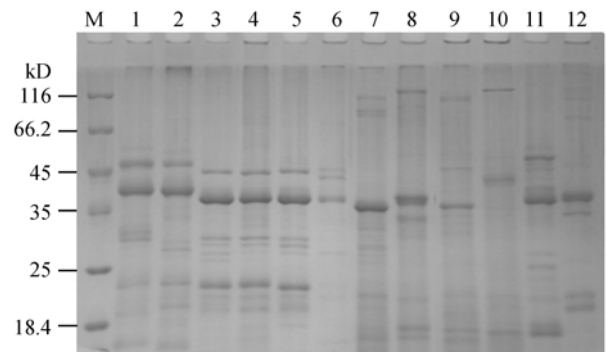


图 7 不同水产品加热粗提物的电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of crude cooked extracts from different species

M. protein marker; 1. Mud crab; 2. Chinese mitten crab; 3. White-leg shrimp; 4. Kuruma prawn; 5. Grass prawn; 6. Abalone; 7. Short necked clam; 8. Razor clam; 9. *Moerella iridescens*; 10. Pacific Oyster; 11. Argentine shortfin squid; 12. Common carp

分别采用兔抗锯缘青蟹 38 kD 蛋白抗体以及过敏者血清 1 对 12 种水产品的粗提物进行 Western-blot 分析。动物抗体检测结果(图 8), 蟹类及虾类的杂交反应较强, 条带较浓; 其他物种反应较弱, 条带较淡, 而中国鲤鱼则没有反应条带出现; 而且不同种类杂交反应条带的分子量也有所差异, 蟹类的杂交反应条带为 38 kD, 菲律宾蛤仔和彩虹明樱蛤的杂交反应条带为 35 kD, 其余 8 种水产品的杂交反

应条带均为 36 kD。过敏者血清 1 检测结果(表 2), 中国鲤鱼仍然没有出现显色条带, 其余 11 种水产品均在 34—38 kD 附近出现杂交显色条带, 并还出现其他不同的反应条带, 分子量因物种而异, 从 20—100 kD 不等, 这些蛋白可能为不同物种的特异次要过敏蛋白。

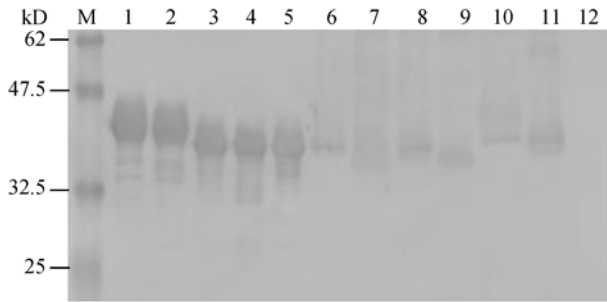


图 8 采用 38 kD 蛋白抗体的免疫印迹检测不同水产品加热粗提物

Fig. 8 Western-blot analysis of crude cooked extracts from different species with 38 kD-protein antibody
M. protein marker; 1. Mud crab; 2. Chinese mitten crab; 3. White-leg shrimp; 4. Kuruma prawn; 5. Grass prawn; 6. Abalone; 7. Short necked clam; 8. Razor clam; 9. Moerella iridescens; 10. Pacific Oyster; 11. Argentine shortfin squid; 12. Common carp

3 讨论

虽然国外已有大量研究证实原肌球蛋白是甲壳类动物的主要过敏原, 但是随着物种的不同, 以及人种等各方面的差异, 针对国人的蟹类主要过敏原是否为原肌球蛋白, 或者是其他蛋白, 仍有待进一步研究证实。赵绮华等^[8]通过免疫印迹实验报道了梭子蟹主要过敏原为分子量 48.7、74.4 kD 的蛋白, 并对其进行了纯化, 但没有进行性质鉴定, 与国外的报道差别较大。

本文以锯缘青蟹为研究对象, 首先采用直观的免疫杂交电泳法, 以过敏者血清对锯缘青蟹粗提物进行免疫检测, 确定其主要过敏原为分子量约 38 kD 的蛋白。该主要过敏蛋白, 与国外报道的原肌球蛋白分子量相近^[4-6], 且都存在于肌原纤维部分, 因此初步推测该蛋白可能就是原肌球蛋白。而对于次要过敏原, 不同研究者的结果各不相同, 这与动物材料及过敏者血清的不同有很大关系。例如, 本文在对肌浆蛋白部分的检测中, 发现分子量约为 40 kD 的次要过敏原, 该次要过敏原是否即为台湾学者报道的精氨酸激酶^[14], 还有待于后续实验来研究确定。

表 2 采用甲壳类过敏者血清的免疫印迹检测不同水产品加热粗提物
Tab. 2 Western-blot analysis of crude cooked extracts from different species with the sera of crustacean allergic patients

品名 Species	显色条带的数量 Number of color band	显色条带的分子量 Molecular weight of color band (kD)
锯缘青蟹 Mud crab	2	28、38
中华绒螯蟹 Chinese mitten crab	3	38、83、90
南美白对虾 White-leg shrimp	2	28、36
日本对虾 Kuruma prawn	2	28、36
斑节对虾 Grass prawn	3	20、28、36
杂色鲍 Abalone	1	36
菲律宾蛤仔 Short necked clam	2	34、80
缢蛏 Razor clam	3	36、80、96
彩虹明樱蛤 Moerella iridescens	3	30、34、85
太平洋牡蛎 Pacific Oyster	4	28、32、36、45
阿根廷鱿鱼 Argentine shortfin squid	2	34、50
中国鲤鱼 Common carp	0	/

然后通过制备丙酮粉、等电点沉淀及硫酸铵沉淀对锯缘青蟹的主要过敏原进行了纯化, 获得的纯化蛋白的 pI 约为 4.5, 硫酸铵饱和度为 40%—60%, 这与虾的原肌球蛋白 Pen a 1 性质相近^[5]。对热稳定是食物过敏原的另一个重要特性^[15], 针对这一特性, 本文进一步采用了 100℃加热处理 15min 的方法去除了剩下的杂蛋白, 由此获得的纯化蛋白在 SDS-

PAGE 上显示有两条分子量极为相近的条带, 推测分析可能为两个不同的亚基, 该 38 kD 的蛋白即为锯缘青蟹主要过敏原-原肌球蛋白, 该蛋白的过敏原性还需要进一步的动物模型或人体试验来研究确定。

最后选择了新西兰大白兔为试验动物对纯化的 38 kD 蛋白进行多克隆抗体制备, 经 4 次免疫后, 得

到的抗体效价较高, 血清经 4×10^5 倍稀释后仍能与抗原进行反应; 并通过 Protein A Sepharose 对血清中的 IgG 进行亲和纯化, 获得的抗体纯度较高, 无明显杂蛋白, 提示其可用于食品过敏原检测。提取 12 种不同水产品的粗提物, 分别以兔抗青蟹原肌球蛋白抗体和过敏者血清的 Western-blot 检测不同水产品间的免疫交叉情况。结果表明, 除了中国鲤鱼没有显色条带外, 其余均有不同显色程度的条带出现, 主要为 34—38 kD 附近的原肌球蛋白。在这些水产品中, 虾类和蟹类属于节肢动物门, 其余几种属于软体动物门, 而中国鲤鱼属于脊索动物门。鲤鱼原肌球蛋白与兔抗青蟹原肌球蛋白抗体没有反应, 说明二者的抗原决定簇差异较大, 没有交叉反应。而节肢动物门和软体动物门差异较小, 相互间交叉反应明显, 结果提示原肌球蛋白是这些物种的主要过敏原。

致谢:

厦门市妇幼保健院彭桂兰主任医师和集美大学医疗中心李玉宝副主任技师提供实验所用的血清, 并帮助完成临床确诊, 深表谢意!

参考文献:

- [1] Lehrer S B, Ayuso R, Reese G. Seafood Allergy and Allergens: A Review [J]. *Marine Biotechnology (NY)*, 2003, **5**(4): 339—348
- [2] Lü X Z, Liu X M, Yang X G. Preliminary survey on status of food allergy in young Chinese student [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2005, **17**(2): 119—121 [吕相征, 刘秀梅, 杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查. 中国食品卫生杂志, 2005, **17**(2): 119—121]
- [3] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Report of the FAO technical consultation on food allergies [M]. Rome, Italy. 1995, 13—14
- [4] Shanti K N, Martin B M, Nagpal S, *et al.* Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes [J]. *Journal of Immunology*, 1993, **151**(10): 5354—5363
- [5] Daul C B, Slattery M, Reese G, *et al.* Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1994, **105**(1): 49—55
- [6] Leung P S, Chen Y, Gershwin M R, *et al.* Identification and molecular characterization of Charybdis feriatus tropomyosin, the major crab allergen [J]. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 1998, **102**(5): 847—852
- [7] Motoyama K, Suma Y, Ishizaki S, *et al.* Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, **55**(3): 985—991
- [8] Zhao Q H, Wang X Z, Chen L J, *et al.* Purification, identification and characterization of the major allergen from Linnaeus [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2007, **23**(3): 256—259 [赵绮华, 王锡忠, 陈丽金, 等. 梭子蟹变应原的分离、纯化与鉴定. 中国免疫学杂志, 2007, **23**(3): 256—259]
- [9] Li F, Wu H Q, Ge Z C, *et al.* Comparison of Five Extraction Methods by Analyzing the Total Proteins from Carp Using EMKC [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(1): 125—128 [黎锋, 吴海强, 戈早川, 等. 利用胶束电动毛细管电泳比较五种提取鲫鱼总蛋白方法研究. 水生生物学报, 2008, **32**(1): 125—128]
- [10] Ausubel F, Short protocols in molecular biology (4th ed) [M]. Beijing: Science Press. 2005 [奥斯特伯. 精编分子生物学实验指南(第四版). 北京: 科学出版社. 2005]
- [11] Liang Y L, Cao M J, Su W J, *et al.* Identification and characterization of the major allergen of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Food Chemistry*, 2008, **111**(4): 998—1003
- [12] Du X L, Liang Y L, Wang X C, *et al.* Separation, purification and antibody preparation of α -actinin from Skeletal Muscle of Sparus Latus [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, **7**(4): 8—12 [杜雪莉, 梁银龙, 王锡昌, 等. 黄鳍鲷骨骼肌 α -辅肌动蛋白的分离纯化及抗体制备. 中国食品学报, 2007, **7**(4): 8—12]
- [13] Joseph S, David W R. Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed) [M]. Beijing: Science Press. 2002 [萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社. 2002]
- [14] Yu C J, Lin Y F, Chiang B L, *et al.* Proteomics and immunological analyses of a novel shrimp allergen, Pen m 2 [J]. *Journal of Immunology*, 2003, **170**(1): 445—453
- [15] Leung P S, Chu K H, Chow W K, *et al.* Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen [J]. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 1994, **94**(5): 882—890

PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF THE MAJOR ALLERGEN OF MUD CRAB

LIU Guang-Ming, LIANG Yin-Long, WENG Ling, SU Wen-Jin, HUANG Yuan-Yuan and CAO Min-Jie

(College of Biological Engineering, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety in Fujian Province, Jimei University, Xiamen 361021)

Abstract: IgE-mediated hypersensitive reactions to ingestion of crustacean are among the most serious forms of food allergies. Sensitized individuals can develop urticaria, angioedema, asthma, and even life-threatening anaphylaxis. Mud crab (*Scylla serrata*) is a kind of crab constitutes a promising fishery industry in China. Because of the increasing consumption of such kind of crab, the occurrence of hypersensitive reactions is extending year by year. Although tropomyosin is assumed to be a major allergen in crustaceans, few experimental data are available on allergens in crabs in China, such as Mud crab. Thus, it is important to confirm whether tropomyosin is the major allergen of Mud crab or not. In order to characterize and confirm the biochemical quality of Mud crab allergen, we report herein the isolation, identification, and determination of the major allergen of Mud crab. Crude cooked extract of Mud crab muscle was used as antigen and sera samples from 11 crustacean-allergic patients used as antibody investigated by Western-blot. Allergen with molecular mass about 38 kD was detected by all of 11 sera with crustacean allergy by Western-blot, suggesting this protein was the major allergen of Mud crab. The 38 kD protein was purified to homogeneity by isoelectric point precipitation, ammonium sulfate fractionation, and heating, and it was further characterized as tropomyosin. Polyclonal antibody against Mud crab-tropomyosin was prepared and further purified by Protein A Sepharose affinity column. The antibody cross reacted positively with tropomyosins from other crustaceans, suggesting its potential application in the detecting of the major allergen tropomyosin in crustacean foods. The identification and characterization of the major allergen in Mud crab will facilitate not only the elucidation of cross-reactions to crustaceans but also the advance of the diagnosis and treatment of seafood allergy. The 38 kD tropomyosin allergen in Mud crab as identified in the present study will benefit further allergic studies not only in this species of crab but also in other species of aquatic products.

Key words: Mud crab; Allergen; Tropomyosin; Purification