

口虾蛄主要过敏原原肌球蛋白的免疫活性

蔡秋凤^{1,2,3}, 王锡昌^{1*}, 刘光明^{2,3}, 罗志湖², 曹敏杰^{2,3}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021;

3. 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要:原肌球蛋白(TM)是甲壳类动物的主要过敏原,其氨基酸序列具有很高的保守性。本研究以口虾蛄为研究对象,旨在探明TM是否是其主要过敏原并对其相关性质进行研究。利用过敏患者血清通过免疫印迹法确定口虾蛄的主要过敏原分子量约为36 ku。通过制备丙酮粉、等电点沉淀、硫酸铵盐析及加热等方法纯化了该主要过敏原。采用抗中华绒螯蟹TM多克隆抗体进行免疫学性质分析表明该蛋白为TM。抑制性免疫印迹和抑制性ELISA实验表明口虾蛄TM与凡纳滨对虾和锯缘青蟹等甲壳类动物的TM具有较强的免疫交叉反应,但与贝类动物杂色蛤的免疫交叉性较低。通过ELISA方法对甲壳类动物的TM进行定量测定,结果表明,口虾蛄肌肉中TM的含量约只有凡纳滨对虾TM含量的1/45,但仍具有一定的致敏性。

关键词:口虾蛄;原肌球蛋白;纯化;免疫交叉反应;定量

中图分类号:Q 939.91; S 917

文献标识码:A

食物过敏是由IgE介导的I型过敏反应,其临床症状主要有水肿、皮炎、哮喘以及肠道综合症等,严重时甚至会引起死亡^[1]。流行病学调查显示,在国外大约有1%~2%的成人以及5%~7%的儿童遭受由花生、坚果、小麦、大豆、牛奶、鸡蛋、鱼以及甲壳类动物等食物引起的过敏反应^[2]。其中,甲壳类是常见的主要过敏食物之一。中国疾病预防控制中心吕相征等^[3]对4 052名在校大学生食物过敏的流行情况调查发现,15~24岁年龄段健康人群中,约有36%对水产品过敏。

目前对甲壳类动物的研究主要集中在可食用的软甲纲十足目动物,包括印度对虾(*Penaeus indicus*)^[4]、棕虾(*Penaeus aztecus*)^[5]、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)^[6]、龙虾^[7]、锈斑蟊(*Charybdis feriatus*)^[8]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[9]等。研究结果表明,甲壳类动物的主要过敏原是原肌球蛋白(tropomyosin, TM),该蛋白的分子量在35~38 ku,易生成同源二聚体。在十足类动物

中,由于氨基酸序列的高度同源(>90%),TM具有很强的免疫交叉反应性。除了十足类,Suma等^[10]报道了鞘甲亚纲藤壶的主要过敏原也是TM,与十足类动物的TM有免疫交叉反应,但其氨基酸序列与十足类动物TM的同源性仅为60%左右,而与鲍TM则有76%~78%的同源性。以上结果表明,TM可能是甲壳类动物的主要交叉过敏原并具有一定的种属特异性。

口虾蛄是我国食用较多的甲壳类水产品之一,其在分类学上与虾蟹距离较远,属掠虾亚纲十足目。2008年,Motoyama等^[11]的研究指出,口虾蛄与其它虾类相比,由于TM的含量极低,其致敏性很低。而李振兴等^[12]对口虾蛄粗提物的研究表明,口虾蛄的主要过敏原为稳定存在的TM,不同种类虾的致敏性无显著差异。Alonso等^[13]报道了虾蛄中的过敏原为25 ku的蛋白,但该蛋白不是TM。因此,对于口虾蛄过敏原的存在情况、过敏原的性质及致敏性仍需作进一步研究。

收稿日期:2009-09-14

修回日期:2009-12-08

资助项目:“十一五”国家科技支撑计划重大项目(2008BAD94B09);集美大学水产科学技术与食品安全省高校重点实验室开放基金(2008J401)和集美大学中青年创新团队基金(2006A002)

通讯作者:王锡昌,E-mail: xcwang@shou.edu.cn

本研究通过采用过敏患者血清鉴定口虾蛄主要过敏原,并对该主要过敏原进行分离、纯化及性质分析,以期探明口虾蛄过敏原的存在情况,为对其作进一步研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲜活水产品包括口虾蛄(*Squilla oratoria*)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和杂色蛤(*Venerupis variegata*)均购自厦门市集美菜市场。

甲壳类过敏患者血清及正常人血清由集美大学医疗中心提供,血清提供者均为在校学生,年龄为 17~25 岁。

HRP 标记的羊抗人 IgE 抗体购自 KPL 公司;兔抗中华绒螯蟹 TM 抗体为本实验室制备^[9];HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自 Pierce 公司;蛋白质分子质量标准为 Fermentas 公司和 New England Biolabs 公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.2 水产品肌肉粗提物的制备

取新鲜肌肉样品均质于 4 倍含 0.6 mol/L KCl 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)。匀浆混合物在沸水浴中加热 10 min,离心取上清即得加热粗提物。

1.3 TM 的纯化

参考 Liang 等^[9]的方法并做少量修改,将口虾蛄肌肉用 10 倍体积含有 50 mmol/L KCl 的 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)抽提,离心,取沉淀重复上述操作 4 次后,用预冷的丙酮处理,制备丙酮粉。将制备得到的丙酮粉用 10 倍体积含 1 mol/L KCl 的 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)溶液抽提过夜,离心,取上清调整 pH 至等电点,离心,沉淀溶于 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5 后,进行 40%~60% 硫酸铵盐析。将硫酸铵盐析后的样品置于 100 °C 水浴中加热 15 min,冷却后,离心,上清即为纯化的 TM。

1.4 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

取制备的蛋白样品加入 SDS 上样缓冲液,95 °C 加热 10 min 后上样于 12 % 聚丙烯酰胺凝胶。电泳后凝胶以考马斯亮蓝染色,凝胶成像系统(G: BOX, Syngene 公司)成像后,蛋白条带的分子量采用 Syngene 公司的 GeneTools 图像分析软

件(3.07)分析。

1.5 免疫印迹和抑制性免疫印迹

以 12 % 的分离胶进行电泳后,转膜。5 % 脱脂奶封闭 1 h,采用抗中华绒螯蟹 TM 抗体为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行免疫印迹实验,DAB 显色。抑制性免疫印迹即在上述操作中对照组以抗中华绒螯蟹 TM 抗体为一抗,实验组的一抗预先与纯化的 TM 在 37 °C 预孵育 1 h,其余操作同免疫印迹。

1.6 ELISA 和抑制性 ELISA

标准曲线的制作:将分别稀释为 0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1 $\mu\text{g/mL}$ 的锯缘青蟹 TM 于 96 孔板 4 °C 包被过夜;TBS-T 洗涤后,加入 5 % 脱脂奶 37 °C 封闭 1 h;TBS-T 洗涤 5 次,加入一抗(抗中华绒螯蟹 TM 抗体)37 °C 反应 1 h;TBS-T 洗涤 5 次,加入二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG)37 °C 反应 40 min;TBS-T 洗涤 5 次后,加入 TMB 显色 25 min,用 2 mol/L H_2SO_4 终止,最后在 96 孔板酶标仪(Benchmark, Bio-Rad 公司)测定 $A_{450\text{ nm}}$ 值。

稀释各种甲壳类动物粗提物的蛋白浓度,其它操作同上,最终使其 $A_{450\text{ nm}}$ 值落在标准曲线范围内。根据标准曲线计算所含 TM 的浓度。

抑制性 ELISA^[14]的操作同上。一抗对照组采用过敏患者血清,实验组为过敏患者血清与纯化的 TM 在 37 °C 预孵育 1 h。

2 结果

2.1 口虾蛄粗提物过敏原的检测

口虾蛄肌肉粗提物采用 SDS-PAGE 进行分析,结果如图 1-A 所示。粗提物所含的蛋白组分子量从 14 ku 至 200 ku 不等,条带较为弥散,与 Motoyama 等^[11]的结果较为相似,但不同的是,本实验中,在 36 ku 处有一明显的蛋白条带,推测可能是 TM。

粗提物电泳后转移至硝酸纤维素膜,进行蛋白免疫印迹检测,结果如图 1-B 所示。粗提物中分子量为 36 ku 的蛋白能与 4 份甲壳类过敏患者血清反应,而与混合阴性血清无反应。该结果表明,粗提物中分子量为 36 ku 的蛋白是口虾蛄的主要过敏原。而第 2、4 份血清的结果中还有一些其他条带,可能是口虾蛄肌肉中的其它过敏原;结合后面的实验结果,推测这些条带也可能是 TM

的降解产物。

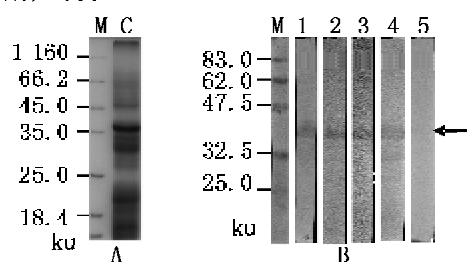


图1 口虾蛄粗提物的检测

(A) SDS-PAGE; (B) 与过敏患者血清的免疫印迹反应。M: 蛋白分子量标准; C: 粗提物; 1~4: 甲壳类过敏患者血清; 5: 混合阴性血清。箭头所指为主要过敏原条带。

Fig.1 Analysis of heated extracts from mantis shrimp

(A) SDS-PAGE; (B) IgE immunoblotting using patient sera. Lanes: M, protein marker; C, heated extracts; 1~4, sera from 4 patients with crustacean allergy; 5, pooled normal sera. Arrowhead indicates the major allergen protein band.

2.2 口虾蛄主要过敏原的纯化

经丙酮处理、等电点沉淀、硫酸铵盐析和加热可得到纯度较高的口虾蛄主要过敏原,其分子量约为 36 ku(图 2-A)。以抗中华绒螯蟹 TM 抗体进行的免疫印迹实验结果表明,纯化的蛋白为口虾蛄 TM(图 2-B)。采用甲壳类过敏患者混合血清为一抗,HRP 标记的羊抗人 IgE 为二抗进行的免疫印迹结果显示,在 36 ku 左右有一明显的条带,说明其具有致敏性,这与粗提物与血清的反应结果相一致,进一步说明纯化所得的 TM 是口虾蛄的主要过敏原(图 2-C)。

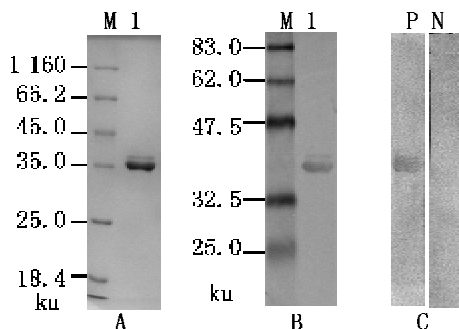


图2 口虾蛄主要过敏原的纯化结果

(A) SDS-PAGE; (B) 与抗中华绒螯蟹 TM 抗体的免疫印迹反应; (C) 与过敏患者血清的免疫印迹反应。M: 蛋白分子量标准; 1: 纯化蛋白; P: 甲壳类过敏患者混合血清; N: 混合阴性血清。

Fig.2 Purification of major allergen from mantis shrimp

(A) SDS-PAGE; (B) IgG immunoblotting using the polyclonal antibody against Chinese mitten crab; (C) IgE immunoblotting using pooled patient sera. Lanes: M, protein marker; 1, purified protein; P, pooled sera from patients with crustacean allergy; N, pooled normal sera.

2.3 免疫交叉反应性的检测

为了研究口虾蛄 TM 与其它甲壳类动物过敏原的交叉反应性,首先提取口虾蛄、凡纳滨对虾、锯缘青蟹、杂色蛤等甲壳类动物肌肉的粗提物进行 SDS-PAGE(图 3)。在采用相同的提取方法、蛋白上样量一致的前提下,不同甲壳类动物肌肉粗提物电泳图谱有明显差异。对应免疫印迹实验结果,口虾蛄和凡纳滨对虾 TM 的分子量在 36 ku 左右,杂色蛤 TM 的分子量约为 34 ku,锯缘青蟹的 TM 的分子量约为 38 ku。其中,凡纳滨对虾和锯缘青蟹 TM 的含量明显高于口虾蛄和杂色蛤。与其它 3 种甲壳类动物的粗提物不同,口虾蛄粗提物的电泳条带较为弥散,结合 Motoyama 等^[11]的结果推测,口虾蛄肌肉中可能存在较高的蛋白酶活性。

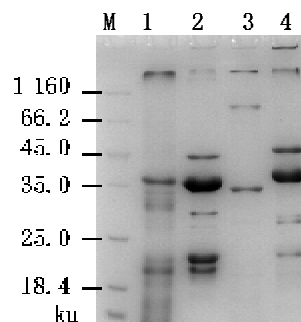


图3 不同甲壳类动物粗提物的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白分子量标准; 1. 口虾蛄; 2. 凡纳滨对虾; 3. 杂色蛤; 4. 锯缘青蟹。

Fig.3 Analysis of heated extracts from four species of crustaceans by SDS-PAGE

M, Protein marker; 1, mantis shrimp; 2, pacific white shrimp; 3, short necked clam; 4, mud crab.

采用抑制性免疫印迹实验检测纯化的口虾蛄 TM 与其它水产品 TM 的免疫交叉反应性。由图 4A 可以看出,纯化的口虾蛄 TM、口虾蛄粗提物、凡纳滨对虾粗提物和锯缘青蟹粗提物与抗中华绒螯蟹 TM 抗体均产生免疫交叉反应,而杂色蛤粗提物的反应程度很弱,表明中华绒螯蟹 TM 与口虾蛄、凡纳滨对虾以及锯缘青蟹 TM 在氨基酸序列上有较高的同源性,与杂色蛤 TM 的同源性则低很多。其中,在口虾蛄的粗提物中可以检测到一些分子量小于 36 ku 的条带,提示可能是蛋白酶作用后 TM 的降解片段。实验组中,采用 100 $\mu\text{g/mL}$ 纯化的口虾蛄 TM 与抗中华绒螯蟹 TM 抗体预孵育,结果显示,纯化的口虾蛄 TM、口虾

蛄粗提物、凡纳滨对虾粗提物和锯缘青蟹粗提物的 TM 条带与抗体的反应几乎全部被抑制,进一步表明口虾蛄 TM 与凡纳滨白对虾 TM、锯缘青蟹 TM 存在着较强的免疫交叉反应。而杂色蛤 TM 由于与抗中华绒螯蟹 TM 抗体的反应性很弱,因此,从该结果难以判断口虾蛄 TM 与杂色蛤 TM 的同源性。

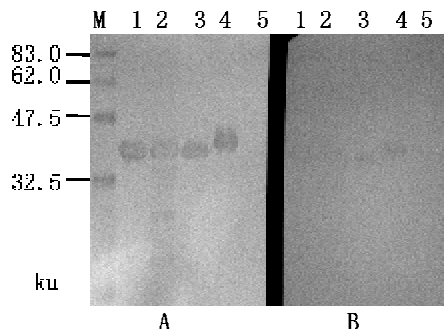


图4 不同甲壳类动物粗提物的免疫交叉反应性分析 (A)以抗中华绒螯蟹 TM 抗体为一抗; (B)采用 100 µg/mL 纯化的口虾蛄 TM 与抗中华绒螯蟹 TM 抗体预孵育后作免疫印迹反应。M. 蛋白分子量标准; 1. 纯化的口虾蛄 TM; 2. 口虾蛄粗提物; 3. 凡纳滨白对虾粗提物; 4. 锯缘青蟹粗提物; 5. 杂色蛤粗提物。

Fig. 4 Analysis of TM cross-reactivity among different species of crustaceans by inhibition immunoblotting

(A) IgG immunoblotting using anti-TM polyclonal antibody against Chinese mitten crab; (B) Inhibition immunoblotting using anti-TM antibody preincubated with 100 µg/mL of purified TM. M. protein marker; 1. purified TM from mantis shrimp; 2. heated extract from mantis shrimp; 3. heated extract from pacific white shrimp; 4. heated extract from mud crab; 5. heated extract from short necked clam.

不同甲壳类动物粗提物的致敏性及其与口虾蛄 TM 的免疫交叉反应性,采用过敏患者血清和纯化的口虾蛄 TM 进行抑制性 ELISA 实验(图 5)。口虾蛄、凡纳滨白对虾、锯缘青蟹粗提物的致敏性相近,杂色蛤粗提物的致敏性相对较低;纯化的口虾蛄 TM 与血清的预孵育使凡纳滨白对虾、锯缘青蟹及杂色蛤的粗提物与过敏患者血清的反应明显减弱,表明这 3 种甲壳类动物的过敏原与口虾蛄的 TM 存在着免疫交叉反应性。其中杂色蛤粗提物与口虾蛄 TM 的免疫交叉反应程度相对较低,该结果与抑制性免疫印迹实验相符。

2.4 甲壳类动物 TM 含量的测定

目前,已有多项技术应用于水产品过敏原的检测,如 SDS-PAGE^[15-16]、ELISA^[17-18]、PCR^[19]

等方法。SDS-PAGE 电泳图谱(图 3)显示口虾蛄中 TM 的含量较低。为了证实该结果,采用抗中华绒螯蟹 TM 多克隆抗体以 ELISA 方法对 4 种甲壳类动物的 TM 进行定量比较。图 6 是以纯化的锯缘青蟹 TM 绘制的标准曲线。表 1 为通过 ELISA 方法测定根据标准曲线推算的 3 种甲壳类动物粗提物中 TM 的含量。其中,凡纳滨白对虾和锯缘青蟹 TM 含量较高,口虾蛄 TM 含量相对较少。需要指出的是,由于采用锯缘青蟹 TM 作标准曲线,因此,口虾蛄、凡纳滨白对虾和杂色蛤的真实 TM 含量可能与测量值有一定差异。但本实验的结果与 SDS-PAGE 的结果较为一致,能在一定程度上反映这 3 种甲壳类动物 TM 的相对含量。杂色蛤的 TM 因为与锯缘青蟹的 TM 同源性很低,难于用该方法测定,故未列出。

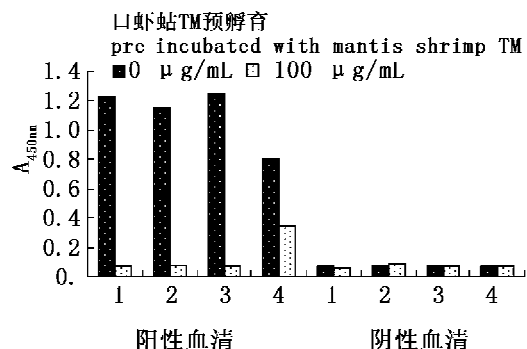


图5 不同甲壳类动物粗提物的抑制性 ELISA 实验

1. 口虾蛄; 2. 凡纳滨白对虾; 3. 锯缘青蟹; 4. 杂色蛤。

Fig. 5 Analysis of allergen cross-reactivity among different species of crustaceans by inhibition ELISA

1. mantis shrimp; 2. pacific white shrimp; 3. mud crab; 4. short necked clam.

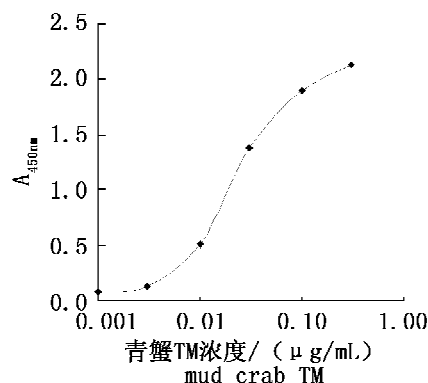


图6 以锯缘青蟹 TM 为标准蛋白制作的标准曲线

Fig. 6 Calibration curve made using purified mud crab TM

表 1 3 种甲壳类动物 TM 的含量
Tab.1 TM contents in 3 species of crustaceans

甲壳类动物 crustacea species	TM 含量(μg/g) TM content
口虾蛄 <i>S. oratoria</i>	17.07 ± 0.57
凡纳滨白对虾 <i>L. vannamei</i>	774.8 ± 110.0
锯缘青蟹 <i>S. serrata</i>	213.6 ± 66.4

根据肌肉粗提物 SDS-PAGE 电泳图谱以及免疫印迹实验结果推测,口虾蛄肌肉粗提物中可能含有较高的蛋白酶活性,从而导致 TM 产生部分分解。因此,我们对口虾蛄肌肉中蛋白酶活进行了检测,发现其中含有较高的丝氨酸蛋白酶和组织蛋白酶活性(结果另行报道)。因此,Motoyama 等^[11]报道的口虾蛄肌肉中 TM 含量极低,可能是由于其中的蛋白酶对 TM 产生了一定程度的降解所致。在本研究中,通过 ELISA 法定量得到口虾蛄肌肉中 TM 含量较低,而采用过敏患者血清检测粗提物致敏性时却发现口虾蛄粗提物的致敏性与凡纳滨白对虾及锯缘青蟹相当,这可能是由于蛋白酶酶解破坏了 TM 的部分 IgG 结合位点,但其 IgE 结合位点仍然保留。另外,Motoyama 等^[11]报道的口虾蛄粗提物 SDS-PAGE 图谱未能观察到 TM 条带,而李振兴等^[12]的 SDS-PAGE 图谱中 TM 条带清晰,无降解现象。本研究得到口虾蛄粗提物的电泳图谱介于二者之间,这可能是由于口虾蛄肌肉中降解 TM 的酶活力有一定的季节性,该推论有待进一步证实。

3 结论

通过免疫印迹法,利用过敏患者血清,确定了口虾蛄的主要过敏原为分子量约 36 ku 的蛋白。纯化的口虾蛄主要过敏原经免疫学性质分析表明,该蛋白为 TM。抑制性免疫印迹和抑制性 ELISA 实验表明口虾蛄 TM 与锯缘青蟹、凡纳滨白对虾等甲壳类动物具有较强的免疫交叉反应性。尽管口虾蛄肌肉中 TM 含量较青蟹和凡纳滨白对虾低,但仍具有较强的致敏性,因此建议对甲壳类动物过敏者慎食。

参考文献:

[1] Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. Mechanisms of type I food allergy[J]. Pharmacol Ther, 2006, 112(3): 787-798.
[2] Mills E N C, Breiteneder H. Food allergy and its

relevance to industrial food proteins[J]. Biotechnol Adv, 2005, 23(6): 409-414.
[3] 吕相征,刘秀梅,杨晓光. 健康人群食物过敏状况的初步调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 1-4.
[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]. J Immunol, 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]. Int Arch Allergy Immunol, 1994, 105(1): 49-55.
[6] 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]. J Allergy Clin Immunol, 1994, 94(5): 882-890.
[7] Leung P S, Chow W K, Duffey S, et al. IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen [J]. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98(5 Pt 1): 954-961.
[8] Leung P S, Chen Y C, Gershwin M E, et al. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen[J]. J Allergy Clin Immunol, 1998, 102(5): 847-852.
[9] Liang Y L, Cao M J, Su W J, et al. Identification and characterisation of the major allergen of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Food Chem, 2008, 111(4): 998-1003.
[10] Suma Y, Ishizaki S, Nagashima Y, et al. Comparative analysis of barnacle tropomyosin: Divergence from decapod tropomyosins and role as a potential allergen[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2007, 147(2): 230-236.
[11] Motoyama K, Suma Y, Ishizaki S, et al. Identification of tropomyosins as major allergens in antarctic krill and mantis shrimp and their amino acid sequence characteristics [J]. Mar Biotechnol (NY), 2008, 10(6): 709-718.
[12] 李振兴,林洪,李明华,等. 不同虾类的过敏原及其过敏原性[J]. 水产学报, 2006, 30(2): 281-284.
[13] Alonso R E, Zavala B B, Escoda J M. Mantis shrimp allergen [J]. J Investig Allergol Clin Immunol, 2006, 16(6): 394-396.

- [14] Shimakura K, Tonomura Y, Hamada Y, *et al.* Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion[J]. Food Chem, 2005, 91(2): 247–253.
- [15] 汪宁, 王锡昌, 蔡秋风, 等. 鱼类肌肉中过敏蛋白的检测与分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(2): 141–145.
- [16] Heffron J K, Moerland T S. Parvalbumin characterization from the euryhaline stingray *Dasyatis sabina*[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2008, 150(3): 339–346.
- [17] Jeoung B J, Reese G, Hauck P, *et al.* Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA [J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100(2): 229–234.
- [18] Faste C K, Plassen C. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods [J]. J Immunol Methods, 2008, 329(1–2): 45–55.
- [19] Sun M, Liang C, Gao H, *et al.* Detection of parvalbumin, a common fish allergen gene in food, by real-time polymerase chain reaction[J]. J AOAC Int, 2009, 92(1): 234–240.

Studies on the immunoreactivity of the major allergen tropomyosin in mantis shrimp (*Squilla oratoria*)

CAI Qiu-feng^{1,2,3}, WANG Xi-chang^{1*}, LIU Guang-ming^{2,3}, LUO Zhi-hu², CAO Min-jie^{2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. School of Biotechnology Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Crustacean is one of the eight kinds of allergen sources in coastal areas, which causes the IgE-mediated hypersensitive reactions with clinical manifestations including urticaria, angioedema, asthma, and even fatal anaphylaxis. Tropomyosin (TM) is the major allergen of decapod crustaceans with highly conserved amino acid sequences. The purpose of this study is to confirm whether TM is a major cross-reactive allergen in mantis shrimp (*Squilla oratoria*) which is taxonomically distinct from decapods and largely consumed as a delicacy in China. Quantification of TM in different species of crustaceans was also conducted. Muscle sample from mantis shrimp was homogenized with phosphate buffer to prepare heated extracts and separated by 12 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). A protein band with molecular mass of about 36 ku was detected by IgE-immunoblotting by all of the sera with crustacean allergy, suggesting it is the major allergen of mantis shrimp. This protein was further purified to homogeneity by acetone powder preparation, isoelectric point precipitation, ammonium sulfate fractionation (40% –60% saturation), and heat treatment. Purified protein was demonstrated to be TM by Western blot using polyclonal antibody against TM from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). Heated extracts from other crustaceans including mud crab (*Scylla serrata*), Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) and short necked clam (*Venerupis variegata*) were also prepared, and the cross-reactivity of TM from mantis shrimp with TMs from these crustaceans was confirmed by inhibition immunoblotting using polyclonal antibody against TM and inhibition ELISA using sera with crustacean allergy. Quantification by ELISA using polyclonal antibody against TM revealed that TM content in mantis shrimp muscle is much lower than that in Pacific white shrimp and mud crab muscle, which was about 45 times lower in mantis shrimp muscle than that in Pacific white shrimp muscle. However, its allergenicity seems equivalent to other decapod crustaceans as showed by inhibition ELISA using sera with crustacean allergy. This may be due to the degradation of TM in mantis shrimp by its endogenous serine proteinases and cathepsins which destroyed the IgG-binding epitope but not the IgE-binding epitopes. In conclusion, this study demonstrated that allergenicity of mantis shrimp is almost equivalent to decapods and TM is the major allergen in mantis shrimp with high cross-reactivity to decapod crustaceans.

Key words: mantis shrimp; tropomyosin; purification; cross-reactivity; quantification

Corresponding author: WANG Xi-chang. E-mail: xcwang@shou.edu.cn