

文章编号:1000-0615(2009)01-0024-06

蟹类原肌球蛋白基因的克隆与表达

梁银龙, 曹敏杰, 郭川, 苏文金, 张凌晶, 刘光明

(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,福建 厦门 361021)

摘要:通过分子生物学技术方法,分别克隆得到锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的原肌球蛋白基因序列。测序结果表明,三个基因的序列长度均为855 bp,编码284个氨基酸残基,三者氨基酸序列同源性为99.3%。三种蟹的原肌球蛋白基因序列与GenBank中其他甲壳类动物的原肌球蛋白具有很高的同源性。将锯缘青蟹的原肌球蛋白基因与pGEX-4T-3载体连接后,经IPTG诱导得到分子量约为61 ku的融合表达蛋白。通过与甲壳类过敏患者血清的免疫印迹反应,证实融合表达的原肌球蛋白具有过敏原性,表明原肌球蛋白是蟹类的主要过敏原之一。该融合蛋白有望用于甲壳类食物过敏诊断试剂的开发与应用。

关键词:锯缘青蟹;中华绒螯蟹;三疣梭子蟹;原肌球蛋白;过敏原;克隆;表达

中图分类号:Q 785; S 917

文献标识码:A

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,我国因食用水产食物而导致过敏发生的比率逐年增高^[2]。由于目前导致我国国民发生水产食物过敏的过敏原及其理化特性尚不完全明确,而临床诊治用的过敏原尚未标准化,常造成假阳性结果的出现,因此,加强水产食品过敏原的相关研究,可为水产食物过敏性疾病的鉴别诊断和预防治疗提供重要帮助。

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(tropomyosin, TM)^[3-4],TM蛋白的分子量约为36 ku,对热稳定,蛋白质保守性好,种间交叉反应明显^[5]。对褐对虾TM过敏位点的研究表明,该蛋白中有8个IgE结合位点,长度分别为5~14个氨基酸残基^[6-7];此外,最近有学者证明了精氨酸激酶也是甲壳类动物的过敏原之一,该蛋白的分子量约为40 ku^[8]。

相对而言,国内在水产食物过敏方面的研究报道较少。赵绮华等^[9]报道了梭子蟹主要过敏原为分子量48.7和74.4 ku的蛋白;李振兴等^[10-11]研究了虾类产品在不同加工过程中过敏原免疫活性的变化;喻海琼等^[12]从刀额新对虾中分离得到分子量为36和68 ku的过敏蛋白。但这些研究并未对这些过敏蛋白的性质进行有效的鉴定。

本文以我国产量较大的锯缘青蟹(*Scylla serrata*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)为对象,对三种蟹的TM序列进行克隆与比较分析,并对锯缘青蟹TM表达蛋白的致敏性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 原料

鲜活的锯缘青蟹、中华绒螯蟹和三疣梭子蟹购自厦门市集美菜市场。去壳后取肉,经液氮速冻后置于-80℃保存备用。

收稿日期:2007-12-04 修回日期:2008-04-08

资助项目:福建省自然科学基金资助(2006J0419);福建省科技计划重点项目资助(2006I0023, 2006F5064);集美大学创新团队基金资助(2006A002)

通讯作者:刘光明, Tel: 0592-6180378, E-mail: gmlu@jmu.edu.cn

1.2 实验材料与试剂

甲壳类过敏患者血清(PCI-6)及正常人血清由厦门市妇幼保健院和集美大学医疗中心提供,6位过敏患者均有典型的过敏病史,主要症状包括荨麻疹、哮喘、过敏性鼻炎等;5份正常人的血清混合作为阴性血清池。

兔抗锯缘青蟹 TM 多克隆抗体由本实验室制备。锯缘青蟹 TM 纯化步骤参考 Huang 等^[13]的方法,主要步骤有制备丙酮粉、等电点沉淀、硫酸铵盐析等。纯化的 TM 分别与福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂混合,免疫新西兰白兔,免疫四次后测量抗血清效价,采血。血清经 Protein A Sepharose 亲和层析柱纯化后得免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)即为兔抗锯缘青蟹 TM 多克隆抗体^[14]。

引物合成、序列测定由 Invitrogen 公司完成, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 BamH I, Not I 和 SDS-PAGE 标准蛋白购自 Fermentas 公司;核酸凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二次抗体购自 Pierce 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgE 抗体购自 KPL 公司;蛋白质标准分子量及琼脂糖购自 Bio-Rad 公司;免疫印迹用蛋白质标准分子量购自 New England Biolab 公司;谷胱甘肽琼脂糖凝胶 (glutathione sepharose 4B) 和 pGEX-4T-3 载体购自 GE 公司。

1.3 PCR 引物设计

依据 GenBank 报道的甲壳类动物 TM 序列 AF061783 和 DQ151457,以及构建谷胱甘肽转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 融合蛋白的要求选择表达载体 pGEX-4T-3,设计的 PCR 上游引物为 5'-CGCGGATCCATGGACGCCATCAAGAA GAAGATG-3;下游引物为 5'-AGGGCGGCCGCTTAATAGCCAGACAG TTCGCT-3;其中,划线部分分别为 BamH I 和 Not I 的酶切位点。

1.4 RT-PCR

以 Trizol 试剂提取蟹类肌肉总 RNA,用 Oligo(dT)₁₅ 引物进行常规 RT-PCR 合成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为预变性 94 °C, 3 min; 94 °C, 45 s; 57 °C, 45 s; 72 °C, 1

min,共进行 35 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物进行 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 pGEX-4T 重组质粒的构建与鉴定

BamH I 及 Not I 双酶切的 PCR 产物和 pGEX-4T-3 载体,以 T₄ DNA 连接酶在 16 °C 下进行连接并转化 JM109 感受态细胞,氨苄青霉素固体培养基 37 °C 隔夜培养后挑选单菌落,接菌扩增。从菌液中提取质粒 DNA 并作序列测定。

1.6 融合蛋白的诱导表达及纯化

将含有锯缘青蟹 TM 基因的转化细菌接种于 5 mL LB 培养基(Amp),37 °C 摇床培养 12 h 后,按 1 % 接种量转于 100 mL LB (Amp) 培养基。振荡培养并测定 600 nm 的吸光值,待 A₆₀₀ 达到 0.5~0.6 时,加入异丙基硫代半糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导,37 °C 继续振荡 2 h 后,12 000 r/min 离心 5 min,沉淀重悬于 PBS 缓冲液中,超声波破碎,离心取上清,采用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B (glutathione sepharose 4B) 进行亲和纯化。

1.7 Western-blotting 检测融合蛋白

将未经 IPTG 诱导的对照菌体样品和 IPTG 诱导表达的菌体样品分别经超声波破碎、SDS 处理后,进行聚丙烯酰胺电泳分析。电泳后以考马斯亮蓝染色检测蛋白表达水平或电转移至硝酸纤维素膜,用兔抗锯缘青蟹 TM 多克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为二抗验证表达蛋白;用人血清为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgE 抗体为二抗检测表达蛋白的过敏原性。

2 结果

2.1 PCR 扩增和表达载体的构建及鉴定

分别从三种蟹的腿部肌肉提取总 RNA,并以其为模板,用 TM 基因特异性引物进行 RT-PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,在分子量约为 850 bp 处呈现一条与预期产物大小相符的目标条带(图 1)。回收扩增产物,经酶切、连接、转化后对阳性克隆进行测序。测序结果证实所扩增片段均含 855 bp 的 TM 完整开放阅读框,编码 284 个氨基酸残基。三种蟹的 TM 序列均已登录 GenBank,登录号分别为锯缘青蟹,EF672351;中华绒螯蟹,EF471314;三疣梭子蟹,EF672352。

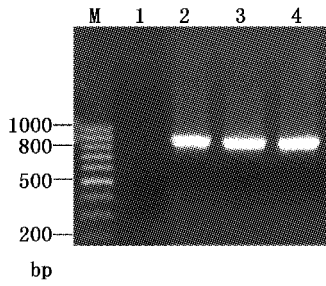


图1 三种蟹 TM 基因的 PCR 扩增

M: 100 bp DNA Marker; 1: 阴性对照(双蒸水); 2~4: 依次为锯缘青蟹、中华绒螯蟹和三疣梭子蟹的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR amplification of tropomyosin gene of the three crabs

M: 100 bp DNA Marker; 1: negative control (ddH₂O); 2-4: PCR amplification products of Mud crab, Chinese mitten crab and Japanese blue crab

2.2 TM 基因的同源性分析

将本实验得到的三种 TM 氨基酸序列与其他甲壳类动物的序列相比较,发现它们均有较高的同源性,其中锯缘青蟹与红星梭子蟹的氨基酸序列完全相同(图 2)。本研究所用的三种蟹的 TM 氨基酸序列同源性为 99.3%。通过将这三种蟹 TM 的氨基酸序列与褐对虾 TM 序列的 8 个 IgE 结合位点相比较,发现只有在第一个结合位点(43-55)中有 6 个氨基酸残基不一致,其他 7 个位点(88-101, 137-141, 144-151, 187-197, 249-259, 266-273, 273-281)均没有差异。

2.3 重组质粒在大肠杆菌中的表达

将经测序的锯缘青蟹 TM 重组质粒转化到

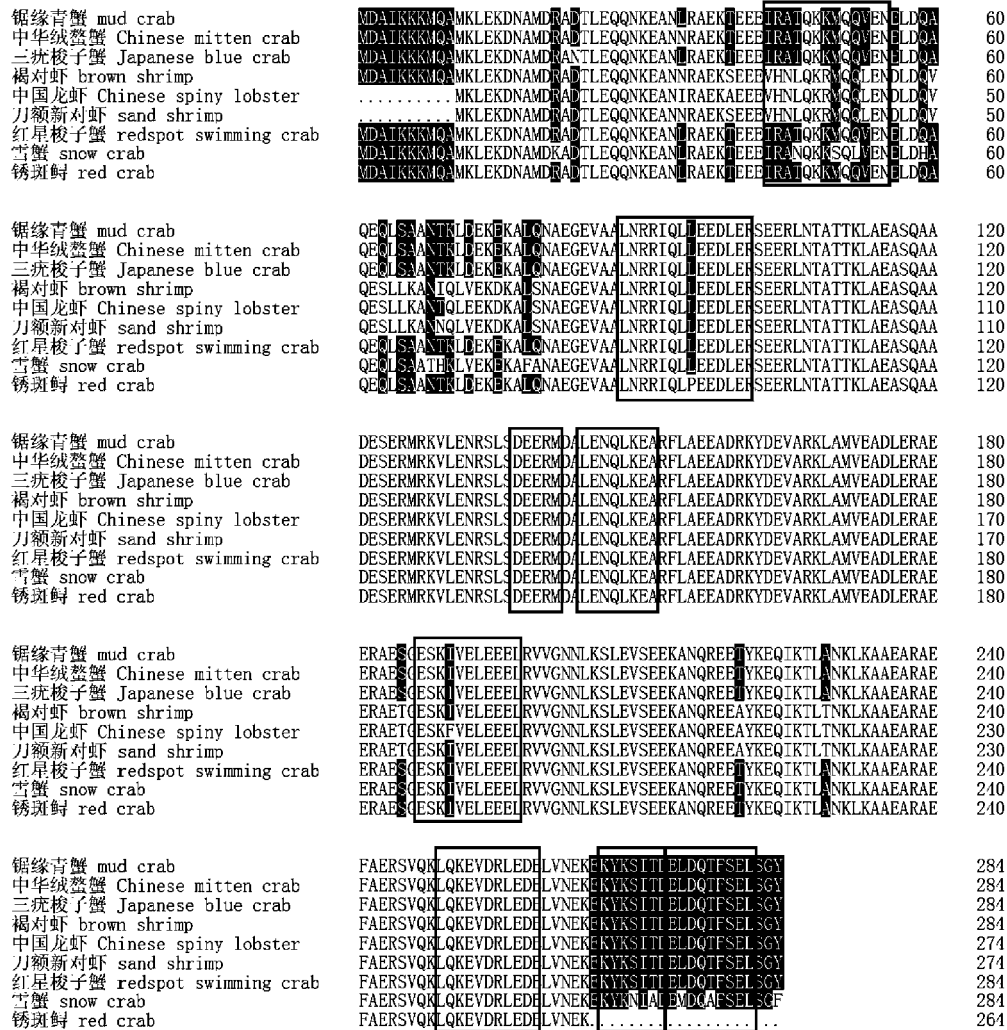


图2 甲壳类动物 TM 的氨基酸序列对比

Fig.2 Amino acid sequence alignment of crustacean tropomyosins

The crustacean names and their corresponding GenBank accession numbers are as follows: mud crab (*Scylla serrata*), EF672351; Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), EF471314; Japanese blue crab (*Portunus trituberculatus*), EF672352; brown shrimp (*Penaeus aztecus*), DQ151457; Chinese spiny lobster (*Panulirus stimpsoni*), AF030063; sand shrimp (*Metapenaeus ensis*), U08008; red spot swimming crab (*Portunus sanguinolentus*), EF143336; snow crab (*Chionoecetes opilio*), AB270634; red crab (*Carybdis feriatius*), AF061783; The IgE-binding epitopes proposed for the brown shrimp tropomyosin are boxed.

JM109 宿主菌中,经 1 mmol/L IPTG 在 37 °C 下诱导 2 h,可获得 TM 的高效表达。菌体经超声波破碎后离心得上清可溶部分,沉淀用 8 mol/L 尿素溶解,分别经 SDS-PAGE 后,从图 3-A 可知表达蛋白相对分子质量约为 61 ku(上清可溶部分),扣除 GST 标签蛋白(26 ku),得到目的蛋白 TM 的分子量约为 35 ku,该分子量与天然 TM 的分子量(34 ku)基本一致。通过谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 亲和纯化后得到单一条带(图 3-A,泳道 3)。为了进一步证明表达蛋白是 GST 融合的 TM,表达菌体蛋白经 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜,并以兔抗锯缘青蟹 TM 抗体为一次抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为二次抗体反应后以 DAB 显色,由图 3-B 可见,在分子量为 61 ku 处出现了清晰的杂交条带,结果表明此表达蛋白确实为 GST 融合的 TM。

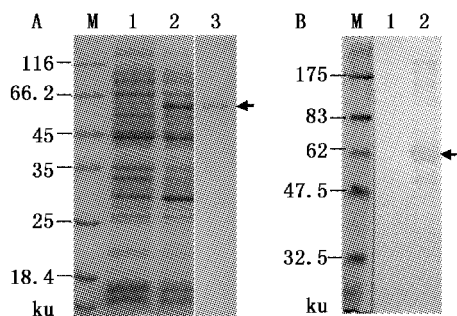


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

A: SDS-PAGE 的考马斯亮兰 R-250 染色结果. M: Protein marker; 1: 未经 IPTG 诱导的 TM-pGEX; 2: 经 IPTG 诱导的 TM-pGEX; 3: 纯化的 GST-TM

B: GST 融合表达的 TM 与兔抗锯缘青蟹 TM 抗体的 Western-blotting 分析.

M: Prestained protein marker; 1: 未经 IPTG 诱导的 TM-pGEX; 2: 经 IPTG 诱导的 TM-pGEX

Fig. 3 SDS-PAGE and Western-blot analysis of the expressed protein

A: SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue R-250 staining.

M: Protein marker; 1: TM-pGEX without IPTG induction; 2: TM-pGEX with IPTG induction(dissolved in PBS); 3: Purified GST-TM

B: Western-blot of recombinant fusion proteins reacted with rabbit anti-Mud crab tropomyosin polyclonal antibody.

M: Prestained protein marker; 1: TM-pGEX without IPTG induction; 2: TM-pGEX with IPTG induction (dissolved in PBS)

2.4 融合蛋白的 Western-blotting 分析

为了验证 TM 作为过敏蛋白的特征,将诱导表达的菌体总蛋白分别与甲壳类过敏患者血清及正常人血清进行 Western-blotting 分析。结果如图

4 所示,表达的融合蛋白与 6 例甲壳类过敏者血清(PCI-6)均在分子量为 61 ku 处出现了清晰的反应条带(泳道 1~6),反应率为 100%。据文献报道,当某蛋白与过敏者血清的反应率超过 50%时,为主要过敏原^[15]。而与正常人的混合阴性血清池没有反应条带出现(泳道 7)。GST 蛋白对照(由 pGEX-4T-3 空载体经 IPTG 诱导表达得到,并采用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 进行纯化)与 6 例甲壳类过敏者混合血清没有反应(泳道 8),说明表达的 GST 融合 TM 能与甲壳类过敏患者血清发生特异性免疫杂交反应,具有过敏原性,进一步证明 TM 是蟹类主要的过敏原。此外,部分菌体蛋白(分子量约为 83, 47, 32 和 30 ku 等)也有反应条带出现,推测这些菌体蛋白或为引起过敏患者交叉反应的过敏原,或为该融合 TM 蛋白的降解产物^[3],详细情况有待于进一步的研究。

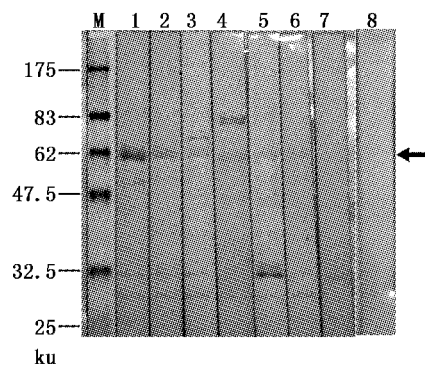


图 4 过敏患者血清检测 GST 重组 TM 蛋白

M: Prestained Protein Marker; 1-6: 甲壳类过敏患者血清(依次为 PCI-6); 7: 混合阴性血清池; 8: GST 对照. 箭头表示 GST-TM 的位置

Fig. 4 IgE reactivity of sera from subjects with crustacean allergy against GST-fusion TM

M: Prestained Protein Marker; 1-6: Sera from subjects with crustacean allergy (PCI-6, respectively); 7: Normal control sera; 8: GST control. Arrowhead indicates the position of GST-TM

3 讨论

国外学者早在 20 世纪七十年代就发现了鳕鱼的主要过敏原为小清蛋白^[16]。20 世纪九十年代后,陆续从不同的甲壳类动物中发现原肌球蛋白(TM)是其主要过敏原,通过对褐对虾 TM 抗原表位的研究,共发现了 8 个与过敏反应密切相关的肽片段^[6-7]。但是,对于蟹类过敏蛋白的相关研究报道却较少。基于此,本研究选取了在我国消费量较大的两种海水蟹(锯缘青蟹和三疣梭

子蟹)及一种淡水蟹(中华绒螯蟹)开展工作,期望对蟹类食品的过敏研究提供依据。

国内外的报道表明, TM 蛋白序列有高度的保守性,是包括甲壳类在内的无脊椎动物的主要过敏原。本文根据 TM 的保守区域设计了一对引物,分别克隆得到锯缘青蟹、中华绒螯蟹和三疣梭子蟹的 TM 序列。测序结果表明,三种 TM 的长度均为 855 bp,编码 284 个氨基酸残基,其核苷酸序列同源率为 93.2%。其中,锯缘青蟹和三疣梭子蟹的同源性达到 97.2%,三者氨基酸序列同源率为 99.3%。这三种蟹的 TM 与其他甲壳类动物 TM 的同源性也较高,通过与褐对虾 TM 的 8 个 IgE 结合位点作比较,显示其中的 7 个位点均没有差异,只有在第一个位点(43-55)中有 6 个氨基酸残基不一致,而三种虾(褐对虾、中国龙虾和刀额新对虾)在第一个位点则没有差异。除第一个位点(43-55)及个别残基(34,39,185,220,229)的差异外,虾类与蟹类的主要差别位于 56-79 区域,有 10 个氨基酸残基差异,这可以作为虾蟹 TM 的主要区别之一。不同甲壳类动物的 TM 在 8 个 IgE 结合位点的高同源性,证实了 TM 不仅是锯缘青蟹、中华绒螯蟹、三疣梭子蟹的特异性过敏原,同时也说明不同的甲壳类动物 TM 之间具有较高的免疫交叉反应性。

目前,我国关于蟹类过敏原组分的基础数据还较为缺乏,蟹类过敏原的诊断主要还是采用进口检测试剂盒,或者沿用传统的试验方法。而国产的变应原只是经脱脂后的粗浸液,成分较杂,其中包括主要、次要致敏组分和其他非特异性蛋白成分,并未进行标准化,临床效果较差,甚至发生严重的不良反应^[9]。因此研制出具有本地区甚至本国特色的标准化蟹过敏原,以提高体内和体外检测诊断的准确性,具有重要的现实意义。尽管通过从甲壳类动物中纯化天然蛋白 TM 也可作为抗原使用,由于 TM 是肌原纤维结构蛋白,需高盐浓度才能溶解,而高盐浓度溶解的抗原 TM 与 IgE 抗体的结合效果会产生负面影响,从而导致测定结果偏低等问题。此外,以天然 TM 蛋白作抗原还可能存在甲壳动物个体差异和纯化批次差异而造成的误差。本文通过构建 GST 融合表达载体,经 IPTG 诱导表达得到分子量约为 61 ku 的可溶性 GST 融合 TM。该蛋白能与抗锯缘青蟹 TM 多克隆抗体发生特异性杂交反应,证明其为

GST 融合的 TM。进一步研究发现,该蛋白与甲壳类过敏患者血清均能发生特异性杂交反应,而前导蛋白 GST 与过敏患者血清无特异性反应,表明 GST 融合表达的 TM 具有过敏原性。该融合表达蛋白可以采用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 进行亲和纯化,从而得到纯品,纯化过程简单易行,并可进行标准化生产。

值得指出的是,最近的研究还发现,除了 TM 外,甲壳类动物中还存在引起过敏反应的其它蛋白,如精氨酸激酶^[8]。但是,由于人种及物种的差异,在锯缘青蟹、中华绒螯蟹、三疣梭子蟹等国内消费量较大的蟹类中是否存在 TM 之外的易引起国人过敏的过敏原蛋白还有待进一步研究。

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]. *Mar Biotechnol*, 2003, 5: 339-348.
- [2] 胡光荣,高晓方,梅海豫,等. 食物过敏性哮喘 56 例分析 [J]. *临床军医杂志*, 2005, 33(1): 49-50.
- [3] Leung P S, Chen Y, Gershwin M R, et al. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102(5): 847-852.
- [4] 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.
- [5] 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): 954-961.
- [6] Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, et al. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding crossreactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 129: 38-48.
- [7] Ayuso R, Lehrer S B, Reese G. Identification of

- continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 127: 27-37.
- [8] Yu C J, Lin Y F, Chiang B L, *et al.* Proteomics and immunological analyses of a novel shrimp allergen, Pen m 2 [J]. *J Immunol*, 2003, 170: 445-453.
- [9] 赵绮华, 赖 荷, 陈丽金, 等. 梭子蟹过敏原致敏组分的分析研究 [J]. *广西医学*, 2005, 27(7): 980-981.
- [10] Li Z X, Lin H, Cao L M, *et al.* Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp [J]. *J Zhejiang Univ Science B*, 2006, 7(4): 251-256.
- [11] Li Z X, Lin H, Cao L M, *et al.* The influence of gamma irradiation on the allergenicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. *J Food Eng*, 2007, 79(3): 945-949.
- [12] 喻海琼, 刘志刚, 张 帆, 等. 刀额新对虾变应原的分离、鉴定与纯化 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(10): 1199-1201.
- [13] Huang M C, Ochiai Y. Fish fast skeletal muscle tropomyosins show species-specific thermal stability [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2005, 141B: 461-471.
- [14] 奥斯伯, 金斯顿, 塞德曼, 等(编). 精编分子生物学实验指南(第四版)[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 492-494.
- [15] Nordlee J A, Taylor S L, Townsend J A, *et al.* Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(11): 688-692.
- [16] Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod [J]. *Scand J Immunol*, 1975, 4(2): 203-208.

Cloning and expression of tropomyosins from crabs

LIANG Yin-long, CAO Min-jie, GUO Chuan,
SU Wen-jin, ZHANG Ling-jing, LIU Guang-ming

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

Abstract: Although tropomyosin (TM) is known as a major allergen of crustaceans, few study has been carried out on it in China. In this study, three tropomyosin genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from three species of crab (mud crab, *Scylla serrata*; Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*; Japanese blue crab, *Portunus trituberculatus*), respectively. Sequence analysis showed that all the three cloned DNA fragments had the open reading frame (ORF) of 855 bp, encoding proteins with 284 amino acid residues and molecular weight of approximately 34 ku. The three TMs revealed extremely high identity to TMs from other crustaceans. The tropomyosin of mud crab was further studied by recombining with the vector pGEX-4T-3, and over expressed in *E. coli* JM109. A major protein band with size of about 61 ku was observed on SDS-PAGE, which is close to the predicted molecular weight of the target fusion protein GST-TM. The expressed protein was water soluble and was further purified by GST affinity column. Western-blot analysis using both anti-mud crab TM polyclonal antibody and sera from subjects with crustacean allergy revealed positive reaction to the GST-TM fusion protein, strongly suggesting that the expressed protein is allergenic and can be used as a potential antigen for allergy diagnosis.

Key words: mud crab; Chinese mitten crab; Japanese blue crab; tropomyosin; allergen; cloning; expression