



南极磷虾主要过敏原的分离纯化及性质研究

林娜¹, 马德蓉^{1,2}, 刘志东^{1*}, 倪玲¹, 段蕊², 张俊杰²

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

2. 江苏海洋大学 食品科学与工程学院, 江苏连云港 222005)

摘要: 为了探究南极磷虾致敏问题, 从南极磷虾中筛选、鉴定、分离纯化其主要过敏原, 并对过敏原的性质进行研究, 实验通过缓冲盐溶液提取南极磷虾蛋白; 采用 SDS-PAGE 和 Western blot (WB) 筛选南极磷虾过敏原; 使用高效液相色谱-串联质谱鉴定过敏蛋白; 通过等电点沉淀、硫酸铵盐析、阴离子交换柱层析分离纯化过敏原; 采用 SDS-PAGE 及 WB 分析南极磷虾主要过敏原的耐热性及对模拟胃肠液的消化稳定性。结果显示, 南极磷虾肌浆蛋白 (SP) 和肌原纤维蛋白 (MF) 电泳条带丰富且分子量范围广。南极磷虾蛋白与虾蟹过敏患者血清能发生免疫反应, 其中至少有 4 个蛋白条带发生了阳性反应; 免疫反应最强烈的蛋白分子量约为 35 ku, 能够被所有的患者血清识别, 经液质联用鉴定此过敏蛋白为南极磷虾原肌球蛋白 (TM)。硫酸铵分级盐析纯化 TM 的最佳饱和度为 50%; 分离纯化后得到了纯度较高的 TM, 其等电点为 4.4, 热稳定性好, 能与虾蟹过敏患者血清发生强烈的免疫反应。TM 随着模拟胃液消化时间的延长, 主条带分子量逐渐降低, 最后稳定在 33 ku 左右, 并且分子量为 15 和 12 ku 的降解片段含量逐渐增多且稳定存在; 这些降解条带仍然能与过敏患者血清发生较强的免疫反应。随着模拟肠液消化时间的延长, TM 原始片段逐渐减少直至消失, 最后完全降解成分子量更小的多肽; TM 经肠液消化后其降解产物免疫活性大大降低。研究表明, 南极磷虾中存在过敏原, TM 是其最主要的过敏原, 且具有免疫反应性。TM 还具备了过敏原的一般特性, 比如耐高温、耐胃蛋白酶消化、对胰蛋白酶消化部分稳定。研究结果对于阐明南极磷虾潜在致敏问题的预警和防控具有现实意义, 也为南极磷虾加工利用及过敏原消减技术构建提供基础信息。

关键词: 南极磷虾; 过敏原; 原肌球蛋白 (TM); 分离纯化; 免疫反应性; 消化稳定性

中图分类号: TS 254

文献标志码: A

南极磷虾 (*Euphausia superba*) 属于磷虾目 (Euphausiacea) 磷虾科 (Euphausiidae) 磷虾属 (*Euphausia*), 是一类生活在南极海域的浮游类甲壳动物, 生物资源量约为 1.25~7.50 亿 t, 被称为人类未来的“蛋白质仓库”^[1]。南极磷虾优良的营养价值, 巨大的生物资源量和良好的利用潜力赋予其广阔的开发前景。因此, 南极磷虾的食用安全性也受到了格

外关注, 特别是南极磷虾的致敏问题引起了研究人员和消费者的重视。

食物过敏是指机体摄入某种食物后产生的有害健康、可重复发生的特定免疫反应^[2], 过敏的主要症状表现为恶心、呕吐、腹泻等, 严重时甚至危及生命。FAO 指出的八大类过敏食物中, 虾、蟹等甲壳类水产品是引起亚洲地区食物过敏的主

收稿日期: 2021-12-15 修回日期: 2022-02-24

资助项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (32001624)

第一作者: 林娜 (照片), 从事水产品加工研究, E-mail: lina903368043@163.com

通信作者: 刘志东, 从事水产品加工研究, E-mail: zd-liu@hotmail.com



要来源。研究表明,甲壳类水产品过敏症的发生率在成年人中高达3%,鱼类过敏症在成年人中约占1%^[3],并且由于食用量较高,海鲜过敏在亚洲通常比在西方国家更普遍^[4-5]。目前,已经鉴定的甲壳类水产品中最主要的过敏原为原肌球蛋白(TM)和精氨酸激酶(AK)等,其中TM是甲壳类水产动物的主要过敏原,约占所有虾和蟹过敏原的80%^[6]。TM是一个分子量为34~38 ku的热稳定性蛋白,并且是一种氨基酸序列高度保守的蛋白质,在许多无脊椎动物中被认为是一种交叉反应的过敏原^[7]。AK也已经被证实是存在于无脊椎动物中的常见过敏原,在不同物种如虾、蟹、章鱼等中被发现^[8]。此外,一些新型的过敏原也在甲壳类水产动物中陆续被发现,如肌浆钙结合蛋白、肌钙蛋白C、血蓝蛋白和磷酸丙糖异构酶等^[9-10]。

Hoffman等^[11]首次报道了棕虾过敏原是分子量为36 ku的蛋白,开启了不同领域研究人员研究虾蟹类过敏原的序幕。有研究报道了^[12-13]凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等主要过敏原。傅玲琳等^[14]对中国明对虾中的主要过敏原TM进行了研究。刘光明等^[8,15]从中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)中分离获得了TM、AK等过敏原,并对这些过敏原进行了理化特性分析和致敏性评估。目前,国内外关于南极磷虾加工利用的研究更多集中在南极磷虾蛋白质、脂质、酶、虾青素,冻虾、虾粉及加工利用等方面^[16],关于南极磷虾安全性的研究主要集中在氟和砷等方面,而关于南极磷虾过敏原的研究报道很少。Motoyama等^[17]研究发现南极磷虾中存在TM过敏原,但是并未对其TM进行分离纯化和性质分析;Nakano等^[18]通过磷虾重组原肌球蛋白揭示了南极磷虾TM具有潜在的致敏性。国内,目前还未见对南极磷虾过敏原及其性质的报道。本实验以南极磷虾为研究对象,分离纯化、鉴定其主要过敏原并进行研究,这对于阐明南极磷虾潜在致敏问题的预警和防控具有现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南极磷虾2019年3—6月由辽宁远洋渔业有

限公司于南极南设得兰群岛海域捕获。捕获后的南极磷虾于1 h内冷冻并机器脱壳处理,脱壳后于-18℃贮藏至运回国内。通过冷链运输到达实验室,置于超低温冰箱储存备用(-78℃)。

阳性及阴性血清、HRP标记的羊抗人IgE二抗均购自重庆沃卡威生物技术有限公司;高灵敏度ECL发光试剂、蛋白预染marker、4xSDS PAGE上样缓冲液、SDS、Tris、甘氨酸、丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺30%溶液、考马斯亮蓝R-250、N,N,N',N'-四甲基乙二胺、10×TBST、PVDF膜、5x丽春红染色液、BCA蛋白质定量检测试剂盒、脱脂奶粉、DTT、IAA均购于生工生物工程股份有限公司;硝酸纤维素膜(上海碧云天生物技术有限公司)、PTFE针式滤器(上海安谱实验科技股份有限公司)、HiPrep DEAE FF16/10预装柱(GE公司)、猪胃蛋白酶(15000 U/mg)和胰蛋白酶(250 U/mg)均购自上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器设备

高速冷冻离心机(KUBOTA 6200,日本);真空冷冻干燥机(Labconco,美国FreeZone公司)、电子天平(德国Sartorius)、Bio-Rad电泳仪、Bio-Rad转膜装置、PHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂)、BSZ-100自动部份收集器(上海沪西分析仪器厂有限公司)、PRO250均质器(美国Pro Scientific公司)、蛋白纯化系统(AKTA pure 25,美国GE公司)、凝胶电泳成像系统(Tanon-5200Multi,上海天能)、多功能酶标仪(Spark 10M,帝肯贸易有限公司)、Easy nLC 1200纳升液相系统(美国热电公司)、质谱仪(Thermo Fisher Q Exactive系统,美国热电公司)。

1.3 南极磷虾蛋白的提取

蛋白的提取方法参考Yang等^[8]并作适当的修改。取去壳后的冷冻南极磷虾100 g溶于5倍体积预冷的Tris-HCl缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.0)并于冰浴下进行均质,然后在4℃、10000×g下离心20 min,得到的上清液即为肌浆蛋白(Sarco-plasmic protein, SP)。上述离心后的沉淀重新悬浮于10倍体积的1×PBS(Na₂HPO₄、KH₂PO₄、NaCl、KCl, pH 7.5)溶液中,于4℃、12000×g下离心20 min,重复这一步骤3次后,得到的沉淀溶于含0.1 mol/L NaCl的Tris-HCl(0.05 mol/L, pH 7.5)溶液中,然后用均质机于冰浴下低速搅拌,置于

冰箱中过夜浸提。次日,离心后得到的上清液即为肌原纤维蛋白(Myofibrillar protein, MF)。

1.4 SDS-PAGE 分析

对上述得到的南极磷虾蛋白进行 SDS-PAGE 分析,电泳参考 Brunelle 等^[19]的方法。

1.5 免疫印迹 (Western blot, WB)

免疫印迹分析参考陈亨莉等^[20]的方法并做修改。南极磷虾蛋白提取物经透析除盐、适当浓缩后进行 SDS-PAGE 分析,分离胶浓度为 12%,浓缩胶为 5%。电泳结束后将蛋白胶条转移至 0.45 μm 的 PVDF 膜上进行转膜。采用湿法转膜,于 100 V 恒压下转膜 1.5 h。转膜后将膜置于含 5% 脱脂牛奶的 1 \times TBST 中室温封闭 2 h。封闭后用 1 \times TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。然后加入虾蟹过敏患者的血清或正常人血清(血清稀释度为 1:5)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜进行抗原抗体反应。反应结束后洗膜,加入 HRP 标记的羊抗人 IgE (稀释度 1:2000)进行二抗结合反应,室温下于摇床上反应 1 h。最后使用 ECL 发光试剂对印迹膜进行显色。

1.6 过敏蛋白种类的鉴定

胶内酶切 对目的蛋白的电泳条带进行胶内酶切。考马斯亮蓝染色后的条带经双蒸水冲洗 3 遍,加入 150 μL 脱色液脱色,水洗 4 次,再依次用 300 μL 的 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液,50% 乙腈和 100% 乙腈洗涤胶条 2 次,最后使胶脱水至胶块变白。加入 50 μL 的 10 mmol/L DTT 溶液 56 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴还原 30 min,待温度降至室温后加入等体积的 50 mmol/L 的 IAA 溶液避光烷基化 15 min,再依次用 300 μL 的 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液,50% 乙腈和 100% 乙腈洗涤胶条 2 次,最后使胶脱水至胶块变白。加入 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蛋白质组学级胰蛋白酶 15~20 μL ,冰上充分吸涨变透明后,加入 50 mmol/L 的碳酸氢铵(含 10% 乙腈)溶液 30~40 μL 覆盖;37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化过夜。酶解后的上清液转移至另一新的 EP 管中,加入 100 μL 萃取液(67% 乙腈,含 2% 甲酸)于剩下的胶块中,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min,然后超声 15 min,离心、合并上清,再浓缩干燥,待做质谱分析。

LC-MS/MS 分析 酶切多肽样品经离心干燥后,重新溶解于 Nano-LC 流动相 A (0.1% 甲酸/水)中装瓶上样,进行在线 LC-MS/MS 分析。溶解后的样品以 2 μL 的体积上样到 C18 预柱上

(3 μm , 100 \AA),然后用 20 μL 体积冲洗脱盐。液相色谱为 Easy nLC 1200 纳升液相系统(Thermo Fisher, USA),样品在预柱上脱盐保留后再经分析柱分离,分析柱为 C18 反相色谱柱(Acclaim PepMap RSLC, 75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$, C18, 2 μm , 100 \AA),实验所用流动相梯度为 30 min 内流动相 B (80% 乙腈,0.1% 甲酸)由 5% 升高至 38%。质谱采用 Thermo Fisher Q Exactive 系统(Thermo Fisher, USA)结合纳升喷雾 Nano Flex 离子源(Thermo Fisher, USA),喷雾电压为 1.9 kV,离子传输管加热温度为 275 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱扫描方式为数据依赖采集模式(DDA, Data Dependent Analysis),一级质谱扫描分辨率为 70 000,扫描范围 350~2 000 m/z ,最大注入时间 100 ms。每次 DDA 循环下最多采集 20 个电荷为 2⁺到 5⁺的二级图谱,二级质谱离子最大注入时间为 50 ms。碰撞室能量(高能碰撞诱导解离, HCD)设定为 28 eV,适用于所有前体离子,动态排除设置为 25 s。

数据库检索与分析 质谱采集到的原始 raw 图谱文件,采用 PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc. Waterloo, Canada) 软件进行数据加工处理和检索分析。数据库为 NCBI 下载的南极磷虾和凡纳滨对虾蛋白数据库。检索参数设置如下:胰蛋白酶酶解,一级质谱质量容差为 10×10^{-6} ,二级质谱为 0.05 u。

1.7 过敏原原肌球蛋白(TM)的分离纯化

硫酸铵盐析 提取后的南极磷虾肌原纤维蛋白于 100 $^{\circ}\text{C}$ 下煮沸 15 min,冷却后离心取上清。上清液采用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 4.5^[21],4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h,然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 下离心 20 min。离心后得到的沉淀溶于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5) 中,搅拌混匀,用 1 mol/L 氢氧化钠调节溶液的 pH 至 7.5,随后进行硫酸铵盐析。

取 600 μL 上述蛋白溶液,分别逐滴加入 800 μL 不同饱和度(饱和度分别为 20%、30%、40%、50%、60%、70% 和 80%)的硫酸铵溶液,充分混匀后,冰浴放置 1 h;再逐滴加入 400 μL 的 100% 饱和度硫酸铵溶液,充分混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜静置。次日,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 下离心 20 min,分离上清和沉淀,沉淀溶于 20 μL 的 1 \times PBS 溶液,待电泳分析。

阴离子交换柱层析分离过敏原 南极磷虾肌原纤维蛋白经等电点沉淀、硫酸铵盐析后得到的沉淀溶于双蒸水,4 $^{\circ}\text{C}$ 下双蒸水透析 48 h,真空冷冻干燥。取冻干后的蛋白粉末适量溶于平

平衡缓冲液 20 mmol/L Tris-HCl (A1) 中, 样品混匀溶解后过 0.45 μm 的亲水 PTFE 针式滤器, 待上柱分析。用缓冲液 A1 以 5 mL/min 的流速平衡阴离子交换柱 HiPrep DEAE FF (16 μm \times 100 mm, 90 μm , 20 mL) 10 个柱体积, 然后上样, 缓冲液 A1 冲洗 10 个柱体积后开始用含 1 mol/L NaCl 的 20 mmol/L Tris-HCl 溶液 (B1) 洗脱蛋白。洗脱时的线性梯度为 0~100% B1, 洗脱 20 个柱体积。根据色谱峰的出现时间在线收集每个洗脱峰, 收集样品后进行透析、冻干、称重。

1.8 南极磷虾 TM 等电点测定及耐热性分析

等电点测定 南极磷虾 TM 等电点的测定参考董银卯等^[22]的方法。

耐热性分析 南极磷虾 TM 的热稳定性分析参考陈亨莉等^[20]的方法。

1.9 模拟胃肠液消化实验

模拟胃液消化 模拟胃液 (SGF) 的配制方法参考美国药典^[23]。配制好的 SGF 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下预热, 加入纯化后的 TM 至其终浓度为 0.5 g/L, 胃蛋白酶与 TM 的质量浓度比为 4 : 1, 反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴下进行。分别在反应时间 0、1、2、5、10、15、30 和 60 min 时取出 100 μL 消化液, 用 35 μL 的 0.2 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应。0 min 的样品是将含有胃蛋白酶的 SGF 先用 Na_2CO_3 终止液终止反应, 再加入蛋白底物。后续对 SGF 消化产物及对照进行 SDS-PAGE 和 WB 分析。

模拟肠液消化 模拟肠液 (SIF) 的配制方法参考美国药典^[23]。配制好的 SIF 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下预热, 加入纯化后的 TM 至其终浓度为 1 g/L, 胰蛋白酶与 TM 的质量浓度比为 1 : 440, 反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴下进行。分别在反应时间 0、1、5、15、30、60、120 和 240 min 时取出 100 μL 消化液, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 5 min 终止反应。0 min 的样品是将含有胰蛋白酶的 SIF 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热失活, 然后加入蛋白底物。后续对 SIF 消化产物及对照进行 SDS-PAGE 和 WB 分析。

2 结果

2.1 南极磷虾蛋白提取物的电泳分析

南极磷虾蛋白提取物分为两部分, 即肌浆蛋白 (SP) 和肌原纤维蛋白 (MF)。SP 中蛋白条带丰富, 分子量范围广, 最大分子量达到 200 ku 左右。

其中丰度最高的分子量为 43 ku (图 1 红色箭头标注)。MF 中蛋白条带也较多, 其中含量最丰富的分子量为 35 ku (图 1 红色箭头标注)。

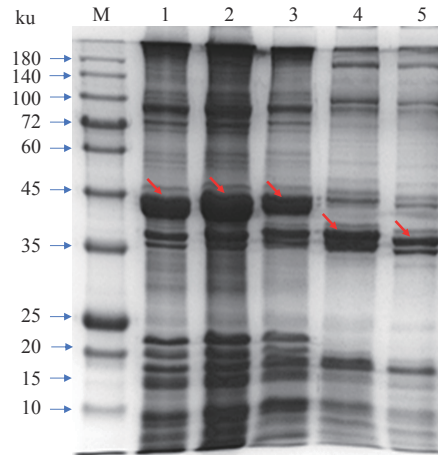


图 1 南极磷虾蛋白提取物的 SDS-PAGE 图

M. 蛋白预染 marker; 1, 2, 3. 肌浆蛋白 (SP), 不同的电泳上样量; 4, 5. 肌原纤维蛋白 (MF), 不同的电泳上样量

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of Antarctic krill protein

M. marker; 1, 2, and 3. SP; 4 and 5. MF

2.2 南极磷虾过敏原的鉴定

为了鉴定南极磷虾肌肉中的 IgE 结合蛋白, 以提取的南极磷虾蛋白为抗原, 虾蟹类过敏患者血清中的特异性 IgE 为抗体, 采用免疫印迹法进行过敏原鉴定。结果显示, 来自 6 个过敏患者的血清及其混合血清均能够与南极磷虾 SP 和 MF 发生免疫反应, 其中有超过 4 个蛋白条带发生了抗原抗体结合反应 (图 2)。免疫反应最强烈的蛋白条带大小约为 35 ku (图 2 红色矩形框所标注), 能够被所有的患者血清识别。正常阴性对照血清中未检测到 IgE 结合蛋白 (图 2 泳道 8)。推测分子量为 35 ku 左右的蛋白很可能是南极磷虾原肌球蛋白, 因为 TM 是已知的甲壳类水产动物的主要过敏原。

2.3 南极磷虾过敏蛋白的种类鉴定

为了明确南极磷虾过敏蛋白的种类, 采用液相色谱-串联质谱法对免疫印迹反应中的阳性蛋白条带进行一级结构鉴定。结果显示, 分子量为 35 ku 左右的过敏蛋白经鉴定为南极磷虾原肌球蛋白 (tropomyosin [*Euphausia superba*])。该鉴定蛋白的氨基酸覆盖率为 88%, 鉴定到的总肽段有 81 条, 其中原肌球蛋白特异性肽段有 76 条, 理论平均分子量为 32.6 ku (图 3)。另外, 分子量为 43 ku 左右的蛋白经鉴定为南极磷虾精氨酸激酶 (arginine

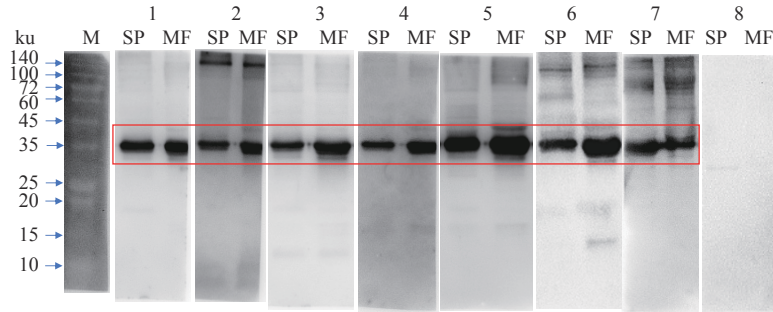


图2 免疫印迹法检测南极磷虾蛋白提取物对虾蟹过敏患者血清中 IgE 的反应性

M. 蛋白预染 marker; 泳道 1 到 7. 虾蟹过敏患者的血清 (1, PL24819; 2, PL23435; 3, PL27140; 4, PL21224; 5, PL25723; 6, PL24375; 7, 混合阳性血清); 8. 正常人的混合血清

Fig. 2 Reactivity of IgE in allergic patients' serum with Antarctic krill protein by Western blot

M. marker; 1. PL24819; 2. PL23435; 3. PL27140; 4. PL21224; 5. PL25723; 6. PL24375; 7. pooled positive serum; 8. pooled normal negative serum

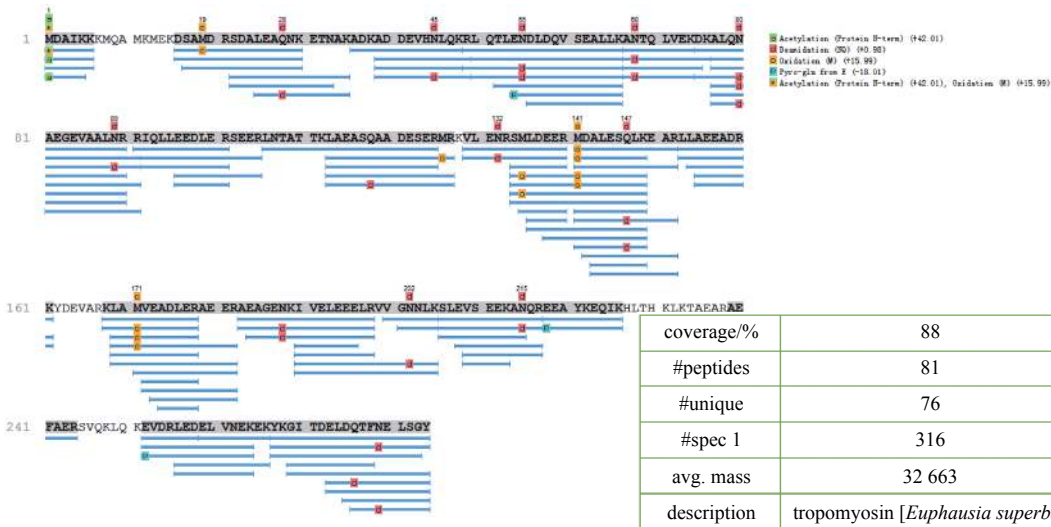


图3 南极磷虾原肌球蛋白的一级结构鉴定结果

TM 的氨基酸覆盖率图谱: 蓝色线条所标注的氨基酸序列为质谱所鉴定到的肽段与 NCBI 数据库中所匹配到的 TM 理论肽段, 不同颜色标记的氨基酸残基为多肽修饰; 嵌入表格: 氨基酸覆盖率 (coverage, %), 即鉴定到的有效多肽氨基酸数量占整个蛋白氨基酸的比值; 高置信度的有效多肽的数目 (#peptides); 特征肽数目 (#unique); 鉴定多肽对应的总匹配图谱数 (#spec 1); 蛋白质的平均质量数 (avg. Mass); 蛋白质在数据库中的详细信息描述 (description)

Fig. 3 Primary structure identification of tropomyosin from Antarctic krill

Amino acid coverage map of TM: the amino acid sequences marked by the blue line are the peptides identified by mass spectrometry and the TM theoretical peptides matched in NCBI database; the amino acid residues marked with different colors are peptides with modifications; Embedded table: coverage (%), the ratio of the number of effective peptides amino acids identified to the amino acids of the whole protein; #peptides, number of effective peptides with high confidence; #unique, number of specific peptides; #spec 1, the total number of matching mass spectra corresponding to the identified peptides; avg. mass, average mass of protein; description, detailed description of protein in database

kinase [*Euphausia superba*]), 理论平均分子量为 43.2 ku。免疫印迹结果 (图 2 泳道 5) 显示该蛋白在过敏患者 5 号中有明显的 IgE 结合反应, 说明精氨酸激酶可能是南极磷虾潜在的过敏原。

2.4 南极磷虾原肌球蛋白的分离纯化

通过分级硫酸铵沉淀法盐析南极磷虾 MF, 以确定硫酸铵的最佳饱和度。实验中向已煮沸且经等电点沉淀后的 MF 中加入不同饱和度的硫酸

铵, 待出现沉淀后, 静置一段时间, 然后再加入饱和的硫酸铵继续盐析。盐析后的蛋白溶液进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, 当硫酸铵的饱和度为 30%~35% 时, TM 的丰度较低; 当饱和度为 40%~45% 时, 得到的 MF 中蛋白条带较复杂, 杂条带增多, 不利于 TM 的纯化; 当饱和度为 50% 时, 杂条带较少, 高分子量和低分子量的蛋白均大大减少, TM 的丰度很高, 且精氨酸激酶的丰

度较小,有利于TM的纯化;当饱和度大于55%时,小分子量的杂蛋白开始增多,且TM的丰度开始降低。综合上述分析,当硫酸铵的饱和度接近50%时,相比较于盐析前的MF而言,TM的含量得到富集,杂蛋白大部分被去除,达到了纯化的目的(图4)。因此,可以得出50%的硫酸铵饱和度是南极磷虾TM分级盐析的最佳饱和度。

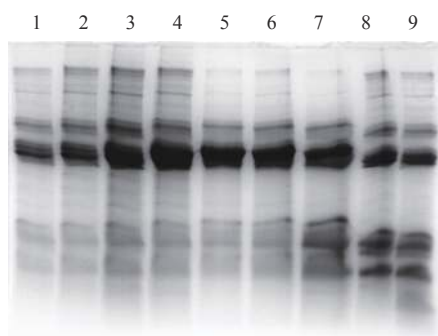


图4 不同饱和度硫酸铵盐析南极磷虾MF后沉淀的SDS-PAGE分析

泳道1到7的硫酸铵饱和度分别为:1.30%;2.35%;3.40%;4.45%;5.50%;6.55%;7.60%;8.未盐析的MF;9.酸沉后的MF

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the precipitation salting out with ammonium sulfate at different degrees of saturation from MF

Saturations of ammonium sulfate were: 1. 30%; 2. 35%; 3. 40%; 4. 45%; 5. 50%; 6. 55%; 7. 60%; 8. MF without salting out; 9. MF after acid precipitation

硫酸铵盐析后得到的蛋白沉淀经过透析、冻干后,溶于平衡缓冲液经弱阴离子交换柱层析,得到紫外吸收图谱(图5-a),峰2对应的蛋白经过手动收集、透析脱盐、冻干后,进行SDS-PAGE和WB分析,结果显示,第4泳道经过阴离子交换柱层析分离后,得到了单一的蛋白条带,根据条带的分子量得出此蛋白是TM(图5-b)。纯化后的TM进一步通过液相色谱-串联质谱验证其一级结构,结果显示只鉴定到一个蛋白,且该蛋白的氨基酸覆盖率为94%,证明经过本实验纯化后得到了纯度较高的单一蛋白组分南极磷虾TM。使用虾蟹过敏患者的混合血清对纯化后的TM进行免疫印迹反应,结果表明纯化后的TM与患者血清发生了特异性的免疫结合反应(图5-c),证明了南极磷虾过敏原TM纯化成功。

2.5 南极磷虾TM的等电点及耐热性

南极磷虾TM的等电点结果表明,当缓冲液体系的pH在4.4下,得到的蛋白质沉淀最多且最

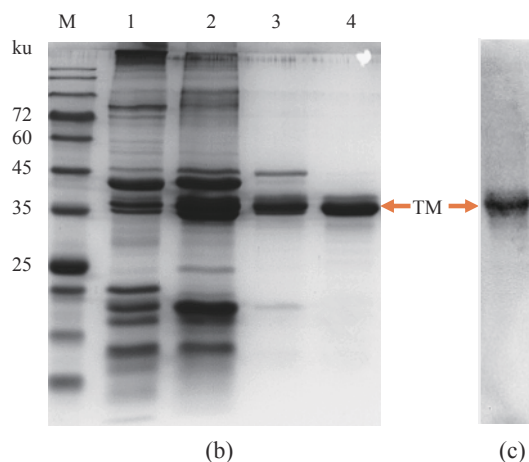
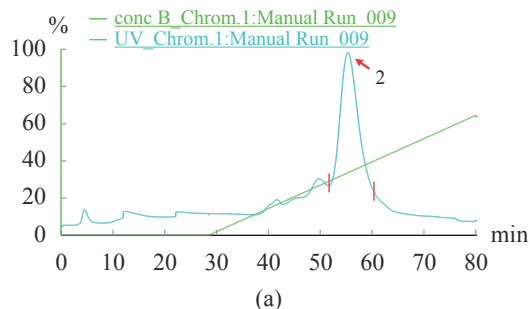


图5 南极磷虾TM的纯化

(a) 阴离子交换柱分离南极磷虾TM。峰2:TM; (b) 纯化前后南极磷虾蛋白及TM的SDS-PAGE分析。M, 蛋白预染 marker; 1.SP; 2.MF; 3.50%饱和度硫酸铵盐析MF后得到的沉淀; 4.阴离子交换柱纯化后得到的TM; (c) 纯化后TM与过敏患者混合血清的免疫印迹反应结果

Fig. 5 Purification of Antarctic krill TM

(a) Separation of TM by DEAE-Sepharose column: peak 2. TM; (b) SDS-PAGE analysis of Antarctic krill protein and TM before and after purification; M, marker; 1. SP; 2. MF; 3. precipitation salting out with 50% ammonium sulfate from MF; 4. TM purified by DEAE-Sepharose column; (c) Reactivity of IgE in allergic patients' serum with TM by Western blot

稳定,最终确定南极磷虾TM的等电点为4.4。

南极磷虾TM的耐热性结果表明,在整个加热过程中,蛋白条带不会发生降解,也没有形成多聚体形式,和4°C条件储存下的蛋白条带一致(图6),表明南极磷虾TM具有很高的热稳定性。

2.6 南极磷虾原肌球蛋白模拟胃肠消化稳定性

纯化后的南极磷虾TM模拟胃液消化,胃蛋白酶在0min消化时,TM条带保持完整(图7-a)。消化1min后,TM开始出现微弱的降解,但是主条带变化不明显;随着消化时间的延长,主条带分子量逐渐降低,最后稳定在33ku左右。消化5min后,降解条带增多,大约产生5个降解条带;当消化反应达到60min后,分子量33ku左右的

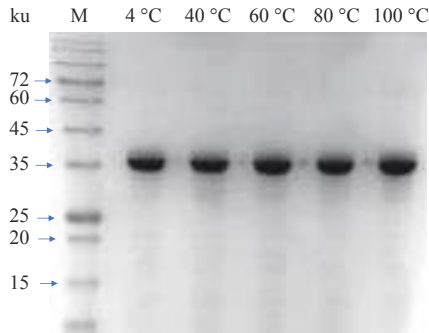


图 6 南极磷虾 TM 的热稳定性的 SDS-PAGE 图谱

M. 蛋白预染 marker; 对照温度。4 °C; 热处理温度。40 °C, 60 °C, 80 °C, 100 °C

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the thermal stability of Antarctic krill TM

M. protein marker; Control. 4 °C; Heat-treatment temperature. 40 °C, 60 °C, 80 °C and 100 °C

条带仍然大量存在, 并且分子量为 15 和 12 ku 的降解片段含量逐渐增多且稳定存在。此结果说明 TM 是一种耐胃蛋白酶消化的蛋白。与模拟胃液消化相比, 模拟肠液对 TM 消化的更加彻底, 降

解片段也更小 (图 7-b)。胰蛋白酶消化 1 min 后, TM 开始降解, 产生一些小分子蛋白, 且原始蛋白条带仍然大量存在, 比较明显的降解条带分子量分别为 33, 27, 20 和 12 ku; 随着肠液消化时间的延长, TM 原始条带逐渐减少, 产生的小片段含量逐渐增加; 当消化至 60 min 时, TM 原始条带消失, 分子量大于 10 ku 的降解片段含量减少; 当反应至 120 min 时, TM 完全降解成分子量更小的多肽, 电泳中未检测到。这说明 TM 对胰蛋白酶消化部分稳定。

为了验证模拟胃肠液消化后的南极磷虾 TM 降解产物是否仍然具有过敏性, 采用虾蟹过敏患者的混合血清对 TM 消化产物进行免疫印迹实验。结果显示经胃蛋白酶消化后, 南极磷虾 TM 降解条带仍然能与过敏患者血清发生免疫反应, 反应强度并未有明显的降低 (图 7-c), 特别是分子量为 33 ku 的条带仍然具有很强的免疫反应。经胰蛋白酶消化 60 min 后, TM 降解产物仅具有微弱的免疫活性 (图 7-d), 说明胰蛋白酶消化可以大大降低南极磷虾 TM 的过敏原性。

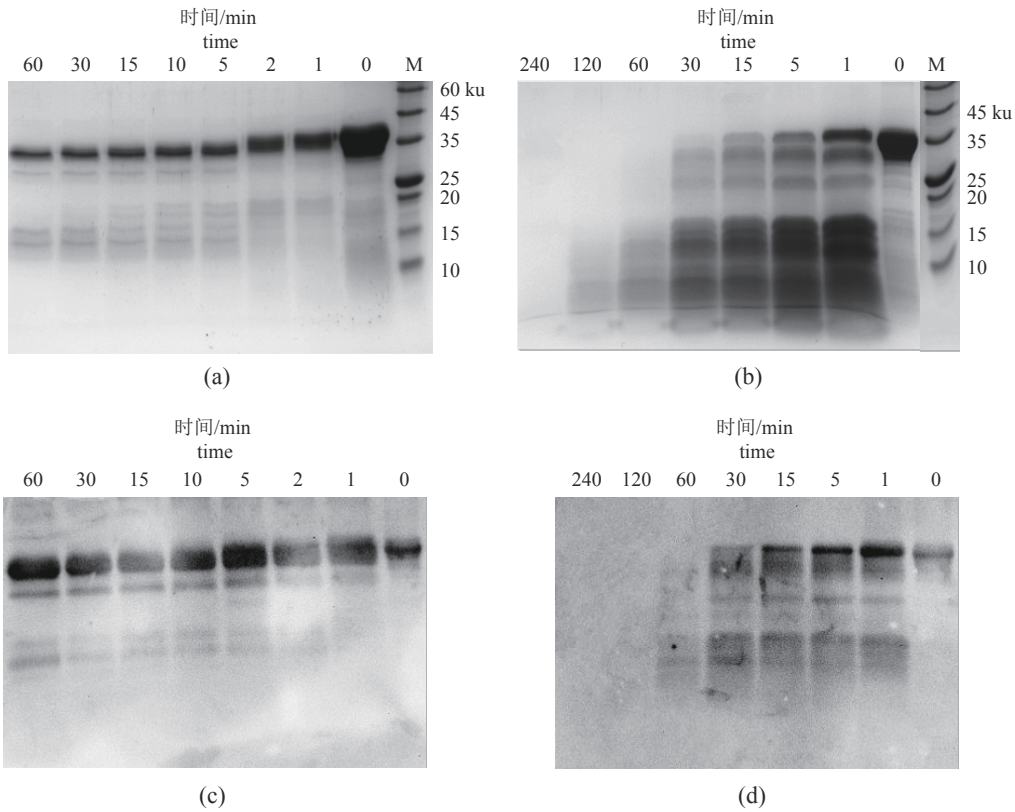


图 7 南极磷虾 TM 模拟胃肠液消化的稳定性分析

SDS-PAGE 分析: (a) 胃蛋白酶消化; (b) 胰蛋白酶消化; WB 分析: (c) 胃蛋白酶消化; (d) 胰蛋白酶消化

Fig. 7 Digestive stability analysis of Antarctic krill TM to SGF and SIF

SDS-PAGE analysis: (a) Pepsin digestion; (b) Trypsin digestion; Western blot analysis of (c) Pepsin digestion; (d) Trypsin digestion

3 讨论

食用海鲜后会易感人群发生过敏症状,甲壳类水产动物过敏是引起过敏反应的最常见原因之一。目前,关于南极磷虾过敏方面的研究报道极少。引起食物过敏的物质是过敏原,因此要想研究南极磷虾过敏问题首先必须鉴定其过敏原。目前,主要采用免疫印迹或斑点杂交方法确证过敏原,并结合质谱对其氨基酸组成与结构进行鉴定。甲壳类水产品中主要过敏原的鉴定和表征不仅有助于阐明甲壳动物间的交叉反应,而且有助于海产品过敏的诊断和治疗^[24]。TM是甲壳类动物的主要过敏原,是一种氨基酸序列高度保守的蛋白质,在许多无脊椎动物中被认为是一种交叉反应的过敏原^[7]。基于免疫交叉反应的原理,本实验采用虾蟹过敏患者的血清对南极磷虾蛋白提取物做免疫印迹反应,结合液相色谱-串联质谱鉴定结果,筛选出南极磷虾中的过敏原主要为TM。这个结果与Motoyama等^[17]研究结果一致,认为南极磷虾中存在TM过敏原,并通过构建分子进化树证明了南极磷虾的TM与十足目的TM不同,并且独立进化。Nakano等^[18]通过磷虾重组原肌球蛋白揭示了南极磷虾和日本对虾(*Penaeus japonicus*)、棘刺龙虾(*Palinurus elephas*)、红帝王蟹(*Paralithodes camtschaticus*)等TM在虾过敏相关IgE结合中具有交叉反应性,表明了南极磷虾TM具有潜在的致敏性。另外,本实验中发现甲壳类动物中另一种常见的过敏原AK与其中一个过敏患者的血清具有免疫反应,由于实验中虾蟹过敏患者血清数目有限,仅能说明AK可能是南极磷虾过敏原,仍需要后续更多的患者血清进行验证。

在研究过敏原的性质、生物体内的化学变化,以及多种抗体的制备时,往往需要纯度更高的过敏原。获得纯化、单一过敏原组分在研究加工方式对过敏原活性的影响、开发低致敏性海产品的食品加工技术中具有重要的意义。本研究通过等电点沉淀、硫酸铵盐析结合阴离子交换柱层析及质谱鉴定技术,分离纯化得到了纯度较高的南极磷虾TM。本实验对硫酸铵盐析时的饱和度进行了优化,发现当硫酸铵的饱和度为50%时,TM的含量得到富集,杂蛋白大部分被去除,达到了纯化的目的,因此最终确定50%的硫酸铵饱和度是南极磷虾TM分级盐析的最佳饱和度。对于不同的甲壳类水产品,其盐析TM所需要的硫酸铵饱和度不同,需要根据实验需要进行相应的优化

处理。例如锯缘青蟹肌肉中的过敏原TM和口虾蛄主要过敏原TM的纯化均需要进行40%~60%的硫酸铵盐析^[25-26];凡纳滨对虾TM在抽提液pH 6.5~7.5、硫酸铵饱和度为30%时,可以被有效地分离纯化^[27]。免疫印迹反应结果显示,纯化后的TM与虾蟹过敏患者的混合血清具有强烈的免疫反应,说明本实验成功得到了纯度较高的南极磷虾过敏原TM。目前,多种甲壳类水产动物的TM已经被纯化和鉴定。Motoyama等^[24]采用硫酸铵沉淀、等电点沉淀及反向色谱对6种甲壳类动物的肌肉蛋白进行分离纯化后得到6种甲壳类TM;蔡秋凤等^[25]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口虾蛄主要过敏原TM;王晓斐等^[28]通过免疫印迹、高效液相色谱法纯化了中国明对虾的主要过敏原TM;Shen等^[29]采用均质、硫酸铵盐析及DEAE-Sepharose层析柱从八爪鱼中分离纯化得到了TM并对其免疫活性进行了研究;Mei等^[30]采用等电点和硫酸铵沉淀法从细点圆趾蟹(*Ovalipes punctatus*)肌肉中分离纯化了其过敏原TM。也有研究人员采用重组蛋白来代替传统的分离纯化方法将获得的过敏蛋白,用于研究过敏原的性质及过敏机制研究等,即把某物种来源的过敏蛋白cDNA序列克隆后在大肠杆菌内表达,然后采用亲和层析柱纯化后得到重组过敏蛋白^[18,31]。但是细菌是原核生物,而甲壳类水产品是真核生物,其蛋白质表达系统存在差异,因此通过重组过敏蛋白研究过敏原的结构及致敏性,在一定程度上并不能与天然过敏原相比较,其构建的动物致敏模型也并不能完全模拟实际情况下的食物过敏,也就无法准确地探索其致敏机制。即使采用真核生物来表达过敏蛋白,也可能会得到一些天然过敏原的突变体,难以保证其结构功能满足研究需要^[32]。鉴于此,仍然需要大量天然提纯且具有高纯度及具有生理活性的过敏蛋白。

TM是一种高度稳定的 α -螺旋卷曲同源二聚体蛋白,其特殊形式的二级和三级结构赋予了TM结构的稳定性,因此能够承受高温和高压处理并保持其过敏性^[33]。本实验对纯化前后的TM进行了高温加热及煮沸处理,发现其电泳条带及WB反应结果并未受到影响,说明南极磷虾过敏原TM耐受高温,具备过敏原的一般理化特性。虽然TM具有高度的稳定性,但也有研究表明,在热处理后,黑虎虾TM与抗体的结合能力会增加^[34]。食物过敏原经过胃肠道消化后,其结构与

表位会产生变化, 致敏性也会随之改变。Astwood 等^[35]对几种常见的过敏蛋白进行了模拟胃液消化实验, 发现过敏蛋白经胃液消化后其致敏性稳定, 而非过敏蛋白在 15 s 内即被消化完全。但是也有研究证明食物过敏蛋白不一定比非过敏性蛋白更耐消化, 而且体外测定的模拟消化能力与蛋白过敏性之间没有明确的相关关系^[36]。纯化后的南极磷虾 TM 经过模拟胃液消化后, 其降解片段仍然具有很强的免疫活性, 说明 TM 对胃蛋白酶具有较高的消化稳定性。而经过模拟肠液消化后, 其免疫活性大大降低, 说明南极磷虾 TM 不耐受胰蛋白酶消化, 肠液消化可以起到消减其致敏性的作用。黄园园等^[26]对锯缘青蟹主要过敏原 TM 进行了模拟胃液消化实验, 发现经胃液消化 60 min 后 TM 的降解产物仍然具有较强的免疫活性, 这与本研究结果相一致; 而经模拟肠液消化 180 min 后 TM 完全降解成小肽或氨基酸。黄天娇等^[37]采用不同烹饪方式对凡纳滨对虾进行处理后再进行体外模拟唾-胃-肠连续消化, 发现虾类 TM 免疫活性的降低主要发生在肠液消化阶段, 此结果与本研究中南极磷虾 TM 的模拟消化结果一致。

4 结论

本实验对南极磷虾潜在的过敏原进行了筛选、鉴定、分离和纯化, 证实了南极磷虾中确实存在过敏原, 并且 TM 是其最主要的过敏原。分析了纯化后南极磷虾 TM 的性质, 证明了南极磷虾 TM 能与虾蟹过敏患者血清的特异性 IgE 发生免疫结合反应, 具有免疫活性; 南极磷虾 TM 具有耐高温、耐胃蛋白酶消化、对胰蛋白酶消化部分稳定等过敏原的一般特性。本实验仅对南极磷虾 TM 做了部分性质研究, 包括等电点测定、耐热性、免疫活性和抗消化性能分析, 未来还需要通过细胞学方法和动物致敏模型对南极磷虾 TM 的致敏特性进行深入、系统的评价分析。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Nicol S, Foster J, Kawaguchi S. The fishery for Antarctic krill-recent developments[J]. *Fish and Fisheries*, 2012, 13: 30-40.
- [2] NIAID S. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the niaid-sponsored expert panel[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 126: 1-58.
- [3] Davis C M, Gupta R S, Aktas O N, *et al.* Clinical Management of seafood allergy[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology:In Practice*, 2020, 8(1): 37-44.
- [4] Lopata A L, Lehrer S B. New insights into seafood allergy[J]. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2009, 9(3): 270-277.
- [5] Moonesinghe H, Mackenzie H, Venter C, *et al.* Prevalence of fish and shellfish allergy: a systematic review[J]. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, 2016, 117(3): 264-272.
- [6] Jeoung B, 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]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1997, 100(2): 229-234.
- [7] DeWitt A M, Mattsson L, Lauer I, *et al.* 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[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2004, 48(5): 370-379.
- [8] Yang Y, Liu G Y, Yang H, *et al.* Crystal structure determination of *Scylla paramamosain* arginine kinase, an allergen that may cause cross-reactivity among invertebrates[J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 597-605.
- [9] Lee C H, Wu C C, Tyan Y C, *et al.* Identification of pyruvate kinase as a novel allergen in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by specific-IgE present in patients with shrimp allergy[J]. *Food Chemistry*, 2018, 258: 359-365.
- [10] Yang Y, Yan H F, Zhang Y X, *et al.* Expression and epitope identification of myosin light chain isoform 1, an allergen in *Procambarus clarkii*[J]. *Food Chemistry*, 2020, 317: 126422.
- [11] Hoffman D R, Day E D, Miller J S. The major heat stable allergen of shrimp[J]. *Annals of Allergy*, 1981, 47(1): 17-22.
- [12] 李振兴. 不同虾类的过敏原及其过敏原性[J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 281-284.
- Li Z X. Allergen and allergenicity of shrimp varieties[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 281-284 (in Chinese)

- Chinese).
- [13] 林洪, 郑礼娜, 李振兴, 等. 刀额新对虾主要过敏原蛋白的肽指纹图谱鉴定与分析[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2009, 39(5): 120-125.
Lin H, Zheng L N, Li Z X, *et al.* Identification of the Major Allergen in Sand Shrimp (*Metapenaeus ensis*) by MALDI-TOF-MS[J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(5): 120-125 (in Chinese).
- [14] Fu L, Wang J, Ni S, *et al.* Identification of allergenic epitopes and critical amino acids of major allergens in Chinese shrimp (*Penaeus chinensis*) by immunoinformatics coupled with competitive-binding strategy[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2018, 66(11): 2944-2953.
- [15] 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 Chemistry, 2008, 111: 998-1003.
- [16] Zhao Y Q, Zhang L, Tao J, *et al.* Eight antihypertensive peptides from the protein hydrolysate of Antarctic krill (*Euphausia superba*): isolation, identification, and activity evaluation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)[J]. Food Research International, 2019, 121: 197-204.
- [17] 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]. Marine Biotechnology, 2008, 10(6): 709-718.
- [18] Nakano S, Yoshinuma T, Yamada T. Reactivity of shrimp allergy-related IgE antibodies to krill tropomyosin[J]. International Archives of Allergy & Immunology, 2008, 145(3): 175-181.
- [19] Brunelle J L, Green R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)[J]. Methods in enzymology, 2014, 541: 151-159.
- [20] 陈亨莉, 曹敏杰, 蔡秋凤, 等. 克氏原螯虾新型过敏原血蓝蛋白的鉴定及性质研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 240-247.
Chen H L, Cao M J, Cai Q F, *et al.* Identification and Characterization of Hemocyanin, a Novel Allergen of *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(2): 240-247 (in Chinese).
- [21] Gamez C, Paz Zafra M, Sanz V, *et al.* Simulated gastrointestinal digestion reduces the allergic reactivity of shrimp extract proteins and tropomyosin[J]. Food Chemistry, 2015, 173(15): 475-481.
- [22] 董银卯, 冯明珠, 赵华, 等. 燕麦麸蛋白质等电点测定及其稀碱法提取工艺优化的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(3): 258-260.
Dong Y M, Feng M Z, Zhao H, *et al.* Study on the determination of the pI of oat bran protein and alkaline extraction of the oat bran protein by orthogonal design[J]. Food Science and Technology, 2007, 32(3): 258-260 (in Chinese).
- [23] US Pharmacopoeia, the National Formulary. Simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid, TS.[J]. In The United States Pharmacopoeia 23, The National Formulary 18, The United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD., 1995: 2052-2053.
- [24] Motoyama K, Suma Y, Ishizaki S, *et al.* Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(3): 985-991.
- [25] 蔡秋凤, 王锡昌, 刘光明, 等. 口虾蛄主要过敏原原肌球蛋白的免疫活性[J]. 水产学报, 2010, 34(3): 415-421.
Cai Q F, Wang X C, Liu G M, *et al.* Studies on the immunoreactivity of the major allergen tropomyosin in mantis shrimp (*Squilla oratoria*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(3): 415-421 (in Chinese).
- [26] 黄园园, 刘光明, 周利亘, 等. 蟹类主要过敏原的模拟肠胃液消化及其对过敏原活性的影响[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 15-22.
Huang Y Y, Liu G M, Zhou L G, *et al.* The simulated gastrointestinal digestion of major allergic source from mud crab and its effect on allergic source activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(4): 15-22 (in Chinese).
- [27] 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.
Fu L L, Fu S J, Wang Y B, *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).
- [28] 王晓斐, 李振兴, 林洪, 等. 中国对虾主要过敏原的鉴定及理化性质[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 273-278.

- Wang X F, Li Z X, Lin H, *et al.* Identification and properties of major allergen from Chinese shrimp, *Penaeus chinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(2): 273-278 (in Chinese).
- [29] 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.
- [30] Mei K, Li G, Zhang J, *et al.* Studying on the IgG binding capacity and conformation of tropomyosin in *Ovalipes punctatus* meat irradiated with electron beam[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2020, 168: 1-6.
- [31] Fan Y, Lam, Kui K, *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.
- [32] 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 Pac J Allergy Immunol*, 2016, 34(3): 229-235.
- [33] Kamath S D, Rahman A, Komoda T, *et al.* Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 4031-4039.
- [34] Kamath S D, Rahman A, Voskamp A, *et al.* Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: a comprehensive allergenomic approach[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(5): 1144-1155.
- [35] Astwood J D, Leach J N, Fuchs R L. Stability of food allergens to digestion *in vitro*[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(10): 1269-1273.
- [36] Fu T J, Abbott U R, Hatzos C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-A comparative study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 7154-7160.
- [37] 黄天娇, 王梦梦, 高永艳, 等. 不同烹饪方式及体外模拟消化对凡纳滨对虾主要过敏原肌球蛋白免疫活性的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(11): 2424-2430.
- Huang T J, Wang M M, Gao Y Y, *et al.* Effects of different cooking methods and *in vitro* simulated digestion on the immunoactivity of major allergen tropomyosin in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(11): 2424-2430 (in Chinese).

Isolation, purification and properties of Antarctic krill (*Euphausia superba*) major allergens

LIN Na¹, MA Derong^{1,2}, LIU Zhidong^{1*}, NI Ling¹, DUAN Rui², ZHANG Junjie²

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. Jiangsu Ocean University, School of Food Science and Engineering, Jiangsu, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Antarctic krill (*Euphausia superba*) is a type of crustacean living in Antarctic waters and is an important strategic marine living resource. Currently, the research on the safety of Antarctic krill is mainly focused on fluorine and arsenic, while the study on Antarctic krill sensitization is rarely reported. How to prevent and control the food allergy caused by Antarctic krill has become urgent work. In order to explore the sensitization problem of Antarctic krill, the main allergens were screened, identified, isolated and purified from Antarctic krill, and the properties of major allergens were studied. Antarctic krill proteins were extracted by salt buffer; Allergens were screened by SDS-PAGE and Western blot (WB); The primary structure of these allergic proteins were identified using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); Major allergens were separated and purified by isoelectric precipitation, ammonium sulfate salting out and anion exchange column chromatography. The heat resistance and the digestive stability of Antarctic krill major allergens to simulated gastrointestinal fluid were analyzed by SDS-PAGE and WB. Results showed that the protein bands of sarcoplasmic protein (SP) and myofibrillar protein (MF) extracted from Antarctic krill were rich and the range of the molecular weight (MW) was wide. Antarctic krill proteins could react with the serum IgE of shrimps/crabs allergic patients, and at least four proteins had positive reactions. The protein with the strongest immune reaction had a MW of about 35 ku and could be recognized by the serum of all allergic patients. This allergic protein was identified as Antarctic krill tropomyosin (TM) by LC-MS/MS. The optimum saturation of ammonium sulfate was 50% for the salting out Antarctic krill TM. After separation and purification, TM with high purity was obtained, which could have a strong immunoreactivity with the serum IgE of shrimps/crabs allergic patients. The measured isoelectric point of Antarctic krill TM was 4.4, and it had good thermal stability. With the extension of digestion time of simulated gastric fluid (SGF), MW of TM gradually decreased and finally stabilized at about 33 ku, and the abundance of degradation fragments with MW of 15 ku and 12 ku gradually increased and existed stably. These degradation bands could still have strong immunoreactivity with the serum IgE of allergic patients. With the extension of digestion time of simulated intestinal fluid (SIF), the original band of TM gradually decreased until disappeared, and finally completely degraded into smaller polypeptide. The immunoreactivity of TM degradation products was greatly reduced after digestion by SIF. The results obtained above indicate that there are allergens in Antarctic krill, and TM is the main allergen with immunoreactivity. TM also has the general characteristics of allergens, such as high temperature resistance, pepsin digestion resistance and partial stability of trypsin digestion.

Key words: *Euphausia superba*; allergens; tropomyosin (TM); isolation and purification; immunoreactivity; digestive stability

Corresponding author: LIU Zhidong. E-mail: zd-liu@hotmail.com

Funding project: National Natural Science Foundation of China (32001624)