

日本囊对虾原肌球蛋白的原核表达、抗体制备以及组织表达分析

韩芳^{1,2}, 王志勇^{1,2}, 王晓清^{1*}

(1. 湖南农业大学动物科技学院, 湖南长沙 410128;

2. 集美大学水产学院, 福建厦门 361021)

摘要: 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。原肌球蛋白(tropomyosin, TPM)是食用虾蟹等甲壳动物引起过敏反应的主要致敏物质。研究从日本囊对虾肌肉组织中克隆了 *TPM* 基因, 进行了原核表达和蛋白质纯化, 并进一步制备了相应的抗体。Western-blotting 分析表明原肌球蛋白在日本囊对虾组织中普遍表达, 并且肌肉组织中表达量最高而鳃和皮肤组织中表达量最低。研究结果为对虾过敏性疾病的诊断和治疗以及脱敏食品开发等奠定了理论基础。

关键词: 日本囊对虾; 原肌球蛋白; 表达; 抗体制备; Western-blotting

中图分类号: Q 785; Q 786; S 917

文献标志码: A

随着生活水平不断提高, 人们对水产品(虾、蟹、鱼等)的消费与日俱增, 由此产生的过敏性疾病也随之增加。食物致敏是全球关注的公共卫生问题。约有 2% 的成年人和 6%~8% 的儿童患有食物过敏症^[1], 在 4 岁以后, 引起患者过敏的食物变应原逐渐以虾、蟹为主^[2]。研究表明原肌球蛋白是主要的致敏原, 引起的临床表现主要有恶心、呕吐、腹泻、皮疹、鼻炎、哮喘等, 严重的甚至危及生命^[3-4]。因此, 如何降低水产品的过敏性是目前食品安全领域的一项重要课题^[5]。

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)俗称花虾、斑节虾, 属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、对虾属, 是广盐种类, 盛产于咸淡水海区, 可开发养殖的区域非常辽阔。它耐受的温度和盐度范围都比较广, 是一种特优养殖品种。日本囊对虾肉质鲜美、个体大、花纹艳丽、离水后较长时间不会死亡, 有利于活虾的长途运销, 是我国南方和日本等国最常食用的水产食品之一。

本研究在前期 cDNA 序列的基础上, 构建了原肌球蛋白(tropomyosin, TPM)原核表达质粒, 并在大

肠杆菌中得到高效表达。纯化获得了大量目的蛋白并制备了鼠抗 tropomyosin 抗体, 并通过 Western-blotting 鉴定了 tropomyosin 在日本囊对虾中的组织表达谱, 为食用对虾的安全性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本囊对虾购自厦门第八市场, 体长(10±2) cm。成年雌性 BALB/c 小鼠由厦门大学医学动物实验中心提供。

1.2 实验方法

TPM 基因扩增 用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen, USA)提取日本囊对虾肌肉组织总 RNA, 逆转录成 cDNA, 根据日本囊对虾 TPM 的全长 cDNA 序列(GenBank 登录号 AB270630)的完整开放阅读框设计一对引物, 在 5'端和 3'端分别加入 *Bam*H / *Eco*R 酶切位点序列, 引物序列为上游引物 5'-TTAGGATCCATGGACGCCATCAAGAAG-3'; 下游引物 5'-GCGGAATGTAGCCAGACAGTTTCGC-3' [引物由生工生物工程(上海)有限公司合成]。以

收稿日期: 2011-11-09

修回日期: 2012-02-24

资助项目: 国家自然科学基金(30671605); 省教育厅水产动物遗传育种创新团队基金; 湖南农业大学优博基金

通讯作者: 王晓清, E-mail: wangxiao@hunau.net

对虾肌肉组织 cDNA 为模板, 扩增目的片段。PCR 扩增的条件为 94 °C 3 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 回收试剂盒(华舜, 上海)回收纯化。

表达载体构建 PCR 扩增得到的包含 TPM 完整开放读码框的目的片段, 用 *Bam*H 和 *Eco*R 进行双酶切后, 目的片段连接到载体 pGEX-4T-2-(Pharmacia)上(重组质粒命名为 pGEX-4T-2-TM), 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 小量制备质粒 DNA, 酶切检验后, 送上海英骏公司进行测序确认。

蛋白原核表达和 SDS-PAGE 小量制备重组质粒 DNA, 将重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3), 筛选阳性克隆。挑选阳性单克隆接种到 5 mL 含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基上, 37 °C 度培养 12 h。然后, 取上述菌液按 1:100 稀释度转接于 200 mL 培养基中, 37 °C、250 r/min 振荡培养, 至 OD₆₀₀ 达 0.7~1.0 时, 加入异丙基- β -D-硫代半苷(IPTG)至终浓度 0.25 mmol/L, 37 °C 继续振荡培养 6 h。5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, PBS 洗涤 3 次后, 适量菌体重悬于电泳上样缓冲液中, 煮沸 5 min, 在 12% SDS-PAGE 凝胶上电泳, 同时设转化空载体的 *E. coli* BL21 进行对照, 电泳结束后, 用 0.025% 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 进行显色观察^[6]。

重组蛋白诱导表达和 SDS-PAGE 将测序正确的重组质粒重新转化至大肠杆菌 BL21 中, 在含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基中, 37 °C 条件下 200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.7~1.0。加入异丙基- β -D-硫代半苷(IPTG)至终浓度 0.25 mmol/L, 37 °C 继续振荡培养 6 h。菌液 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。每 1.5 毫升的菌液所得的菌体沉淀用 100 μ L 的 TE 缓冲液悬浮并与 2 \times SDS 上样缓冲液相混, 煮沸 5 min, 在 12% SDS-PAGE 凝胶上电泳, 同时设转化空载体的 *E. coli* BL21 进行对照, 电泳结束后, 用 0.025% 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 进行显色观察。

目的蛋白的分离纯化 收集 IPTG 诱导后 6 h 的菌体, 离心洗涤, 冰浴条件下超声裂解细菌, 裂解液为含 1% Triton X-100 的冰冷 PBS, 超声时间 10 s, 间隔时间 10 s, 功率 200 W, 超声直至菌液清亮。4 °C 下 15 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液(含

GST-TP 融合蛋白)并与预处理的含 Glutathione Sepharose 4B 介质的亲和层析柱结合, 洗脱, 收集目的蛋白。

多克隆抗体的制备 将纯化的 TPM 与弗氏完全佐剂(Sigma)等体积混合, 对 10 只 6~8 周龄的 BALB/c 雌性小鼠进行腹腔注射免疫。初次免疫一周后, 改用不完全佐剂, 每周加强免疫 1 次, 连续 4 周。小鼠末次免疫 3 d 后断尾取血, 双向免疫扩散实验检测抗体效价, 免疫血清利用填装 Protein A 的柱子进行纯化, 纯化后的抗体分装于 -80 °C 保存备用^[7]。

Western-blotting 检测日本囊对虾 TPM 的组织特异性表达 蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶(溶于 TBST 中)封闭 1 h, 以 1:1 000 的比例加入抗日本囊对虾 TPM 的多克隆抗体, 与膜杂交反应 1 h, TBST 多次漂洗, 再加 HRP 标记的羊抗鼠二抗杂交 1 h, 经 TBST 漂洗后, 用 TMB 显色^[8]。

从日本囊对虾心脏、肠、肌肉、胃、肝胰腺、鳃和皮肤组织与蛋白裂解液(50 mmol/L Tris, 1.0 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% 去氧胆酸钠; 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂 cocktail)中提取总蛋白, 溶于蛋白质裂解液。采用 Bradford 方法定量蛋白质后, 每个组织取 1 mg 蛋白质上样, 在 10% SDS-PAGE 上进行电泳, 然后转移到 PVDF 膜上, 蛋白质印迹检测 TPM 在日本囊对虾各组织中的表达情况。实验经 3 次生物学重复。

2 结果

2.1 TPM 基因克隆及重组质粒鉴定

以日本囊对虾肌肉组织 cDNA 为模版, 用特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 经电泳检测得到 1 条 850 bp 左右的目的带(图 1-a), 与预测的大小一致。将 TPM 基因克隆到 pMD-18T 进行测序, 比对结果与已知序列完全一致。重新将 TPM 基因克隆到 pGEX-4T-2 表达载体上(重组质粒被命名为 TPM-pGEX-4T-2), 转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 挑取阳性转化菌培养后, 提取质粒进行双酶切检验(图 1-b), 再进一步经测序验证插入序列是正确的, 且没有出现移码。证实包含 TPM 完整编码区的 ORF 已经完整插入原核表达载体中。该基因编码的开放阅读框(ORF) 852 bp, 预测编码 284 个氨基酸, 本实验原核表达的 TPM 蛋白理论大小约为 36 ku。

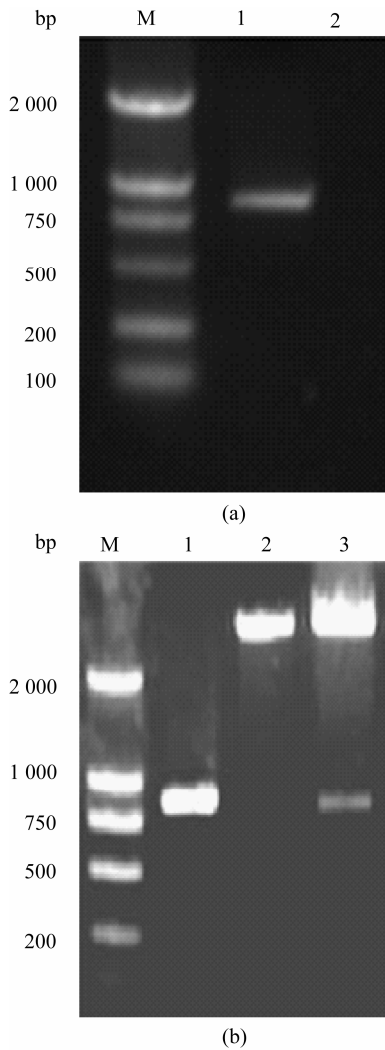


图 1 原肌球蛋白基因克隆

(a) PCR 扩增原肌球蛋白基因; M. DNA 分子量标准; 1. 原肌球蛋白扩增结果; 2. 阴性对照; (b) 重组质粒 pGEX-4T-2-TPM 双酶切鉴定, M. 分子量标准, 1. tropomyosin 基因 PCR 产物, 2. pGEX4T-2 双酶切, 3. pGEX-4T-2-TPM 双酶切。

Fig. 1 Cloning of the tropomyosin gene

(a) PCR amplification of tropomyosin gene; M. DNA Marker; 1. PCR product of tropomyosin; 2. negative control; (b) identification of recombinant plasmid pGEX-4T-2-TPM by double-digestion; M. DNA Marker; 1. PCR product of tropomyosin gene; 2. double-digested pGEX-4T-2; 3. double-digested pGEX4T-2-TPM.

2.2 日本囊对虾 TPM 融合蛋白的诱导表达、纯化

将重组菌株 pGEX-4T-2-TPM 转化 *E. coli* BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后在 61 ku 左右处出现一条非常明显的蛋白条带, 而在表达载体 PGEX-4T-2 诱导和不诱导及重组质粒不诱导的对照中皆看不出此带(图 2), 此带的大小与 TPM 蛋白(36 ku) 及与其融合的 GST 蛋白的分子量(25 ku)之和相符, 说明此基因插入表达载体 PGEX-4T-2 后在 *E. coli* 中获得了高效表达。超声波破碎菌, 高速离心后将

菌液上清经 Glutathione Sepharose 4B 纯化, 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 分析(图 2), 结果表明表达的 GST-TPM 融合蛋白在菌体内为可溶性表达。

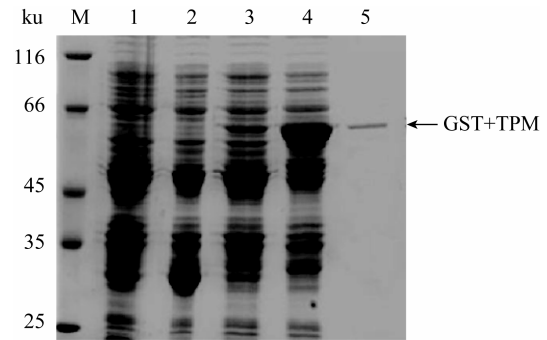


图 2 采用 SDS-PAGE 分析 TPM 融合蛋白的表达与纯化 M. 蛋白质 Marker; 1. 非重组菌未经 IPTG 诱导; 2. 非重组菌经 IPTG 诱导; 3. 重组菌未经 IPTG 诱导; 4. 重组菌经 IPTG 诱导; 5. 纯化的 GST-TPM 融合蛋白。

Fig. 2 Expression and purification of the recombinant TPM fusion protein by SDS-PAGE.

M. protein marker; 1. total proteins from control bacterium (vector only), non-induced; 2. total proteins from control bacterium (vector only), induced; 3. recombinant bacterium containing tropomyosin gene, induced; 4. recombinant bacterium containing tropomyosin gene, non-induced; 5. purified GST- TPM fusion protein.

2.3 抗日本囊对虾 TPM 多克隆抗体的制备及鉴定

纯化的重组表达的 TPM 用生理盐水调整其浓度, 以免疫前的小鼠血清作为阴性对照, TPM 免疫的小鼠血清做不同稀释后, 双向免疫扩散实验检测抗体效价达到 1 : 256 稀释度。

2.4 日本囊对虾 TPM 蛋白组织特异性表达分析

提取日本囊对虾的心脏、肠、肌肉、胃、肝胰腺、鳃和皮肤组织的蛋白质, 用制备的多克隆抗体进行 Western-blotting 分析, 检测 TPM 在日本囊对虾体内的表达情况。结果表明, TPM 在日本囊对虾的大多数组织表达, 其中在肌肉、心脏、胃、肝胰腺和肠中表达量较高, 而在鳃和皮肤等组织表达量较低(图 3)。

3 讨论

在我国, 食品过敏症状的发病率要高于发达国家, 但是国家食品安全部门仍没有制定具体法规, 这与我国食品过敏相关研究的相对滞后有很大关系^[9]。因此, 大力发展食品过敏原的研究已经成为食品安全领域的重要研究内容。在所有的致敏食物中, 以虾为代表的甲壳类动物是一类重要的致敏食品^[10], 致敏物质主要为原肌球蛋白^[5, 9, 11-12]。原肌球蛋白存在于一切脊椎动物和无脊椎动物中^[12], 分

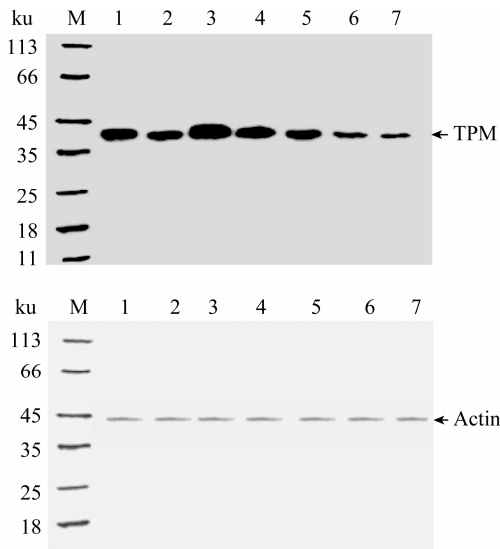


图3 Western-blotting 检测日本囊对虾不同组织中 TPM 的表达情况

M. 蛋白质 Marker; 1. 心; 2. 肠; 3. 肌肉; 4. 胃; 5. 肝胰腺; 6. 鳃; 7. 皮肤; Actin 为阴性对照。

Fig. 3 Expression of *M.japonicus* TPM in different tissues tested by Western-blotting

M. protein marker; 1. heart; 2. intestine; 3. muscle; 4. stomach; 5. hepatopancreas; 6. gill; 7. skin; Actin as negative control.

子量为 35~38 ku, 由两个多肽链组成, 含一个 α 螺旋和一个卷曲螺旋结构^[13]; 该蛋白质家族具有高度保守性, 并含多种亚型。过敏者与不同甲壳动物的原肌球蛋白有很高的交叉反应, 甚至与软体动物、尘螨和蟑螂等无脊椎动物的原肌球蛋白具有交叉反应^[14-16]。因此, 对虾类原肌球蛋白的研究, 对于食品致敏机理研究、致敏原分析和脱敏食品开发等都具有广泛的指导意义^[17]。研究发现, 虾类原肌球蛋白与脊椎动物原肌球蛋白不同的是经过胃蛋白酶消化后, 仍有大片段不能够被继续消化, 这可能是甲壳类动物原肌球蛋白能够致敏的原因^[15]。Reese 等^[18]突变原肌球蛋白的一个氨基酸后, 虽蛋白的二级结构不变, 但是致敏性下降了 90%以上, 为虾类原肌球蛋白的脱敏提供了思路。与国外相比, 国内对于虾类原肌球蛋白的研究相对较少, 顾可飞等^[19]利用辐照处理对虾过敏原, 并对处理后的蛋白作了抗原性和生化性质的检测。张在军等^[20]分别从河虾和海虾中分离纯化出过敏原组分。

本研究在前期获得日本囊对虾原肌球蛋白全长 cDNA 序列(GenBank 登录号 AB270630)的基础上, 通过 GST 融合蛋白原核表达体系有效表达了重组的原肌球蛋白, 并且分离纯化了可溶性的正

确表达产物。重组表达的原肌球蛋白, 可以用于过敏原因诊断和致敏蛋白的脱敏研究。采用亲和层析的方法对目的蛋白进行了纯化并免疫小鼠, 成功制备了抗原肌球蛋白的多克隆抗体。临床上很多皮肤病的发生与发展都与接触了过敏原有关。而临床上多数过敏性疾病的患者通常只是做缓解症状的治疗, 而没有找到引发过敏的真正原因, 因而也就做不到针对性的预防和治疗, 导致病情反复加重、迁延不愈。多克隆抗体研制的成功, 为对虾原肌球蛋白这种过敏源的检测、组织定位等提供了有用的工具。经常过敏的患者, 做一下过敏原筛查检测, 查清楚到底是接触性的、食入性的还是吸入性的过敏原引起的过敏反应, 以便从根本上解决问题。本研究采用制备的抗体, 首次在蛋白质水平上对原肌球蛋白在日本囊对虾体内不同组织的分布进行了研究。揭示了原肌球蛋白作为一种重要的蛋白成分, 存在于日本囊对虾的所有的检测组织中, 除在肌肉中高表达以外, 在心脏和胃这些富含肌肉的器官中表达量也颇高, 在肠和肝胰腺中的表达量次之, 而在鳃和皮肤组织中也检测到了明显的表达。

参考文献:

- [1] Burks A W. Childhood food allergy[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 1999, 19: 397-407.
- [2] 伍秋容. 广州地区不同年龄组过敏性疾病患者的致敏原分布特征分析[J]. *华南预防医学*, 2005(2): 60-61.
- [3] 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.
- [4] 吴凯威, 刘志刚. 红星梭子蟹变应原原肌球蛋白基因的克隆、表达及其免疫学鉴定[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(2): 298-303.
- [5] 黄园园, 刘光明, 周利巨, 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.
- [6] 韩芳, 王志勇. 对虾 Ran 基因的克隆表达与蛋白质 GTP 结合活性分析[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2010, 15(4): 241-247.
- [7] 韩芳, 王志勇, 巫旗生, 等. 白斑综合症病毒 *wsv477* 基因的克隆表达与实时分析[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(3): 344-348.
- [8] 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 译. 北京: 科学出版社, 2002.

- [9] 杜欣军, 张伟伟, 孙伟英, 等. 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因表达模式与重组表达[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 38–43.
- [10] Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, *et al.* Sarcoplasmic calcium-binding protein: Identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2008, 142(2): 91–98.
- [11] Daul C B, Slattey 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: 49–55.
- [12] Werner M T, Faese C K, Egaas E. Quantitative sandwich ELISA for the determination of tropomyosin from crustaceans in foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(20): 8025–8032.
- [13] Smillie I B. Structure and functions of tropomyosins from muscle and non-muscle sources[J]. Trends Biochemical Sciences, 1979, 4: 151–155.
- [14] Ayuso R, Reese G, Leong K S, *et al.* Molecular basis of arthropod cross reactivity: IgE-binding cross reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosin[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2002, 129(1): 38–48.
- [15] Mikita C P, Padlan E A. Why is there a greater incidence of allergy to the tropomyosin of certain animals than to that of others?[J]. Medical Hypotheses, 2007, 69(5): 1070–1078.
- [16] Wild L G, Lehrer S B. Fish and shellfish allergy[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2005, 59(1): 74–79.
- [17] Nakano S, Yoshinuma T, Yamada T. Reactivity of shrimp allergy related IgE antibodies to krill tropomyosin[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2008, 145(3): 175–181.
- [18] Reese G, Viebranz Z, Lenong K S M, *et al.* Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a1(tropomyosin)[J]. Journal of Immunology, 175(12): 8354–8364.
- [19] 顾可飞, 高美须, 李春红, 等. 辐照对虾过敏原生化性质的影响[J]. 核农学报, 2007, 21(2): 160–163.
- [20] 张在军, 向军俭. 河虾中主要过敏原组分鉴定及分离纯化[J]. 广东医学, 2006, 27(5): 650–651.

Prokaryotic expression, antibody preparation and tissue expression identification of tropomyosin in *Marsupenaeus japonicus*

HAN Fang^{1,2}, WANG Zhi-yong^{1,2}, WANG Xiao-qing^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China;

2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Food allergy is a representative human allergic disease, which is mainly caused by the protein in food. Up to date, however, there is only a few reports on aquatic food allergy. Tropomyosin (TPM) is the major allergen of eating seafood like shrimp and crab to cause hypersensitivity. In this investigation, a TPM gene was cloned from the muscle tissue of shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Then the TPM was expressed in *Escherichia coli* and purified. Subsequently the specific antibody was raised using the purified fusion protein (GST-TPM). As revealed by Western-blotting, the TPM was ubiquitously expressed in shrimp tissues and with the highest expression in the muscle and the lowest in gill and skin. These results have laid the foundation for the specific diagnosis and immunotherapy in shrimp hypersensitivity disease as well as the study on food desensitization.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*; tropomyosin; expression; antibody preparation; Western-blotting

Corresponding author: WANG Xiao-qing. E-mail: wangxiao@hunau.net