

文章编号: 1000-5862(2012)04-0425-06

# 罗氏沼虾原肌球蛋白基因的克隆表达及变应原性鉴定

罗伟芝, 符春荣, 邬玉兰, 陈献雄, 刘志刚, 黄海珍\*

(深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 广东 深圳 518000)

**摘要:** 通过 NCBI 查找到罗氏沼虾原肌球蛋白的 mRNA, 根据其 CDS 区域设计特异引物, 通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)克隆出目的基因片段, 测序后将该片段克隆到原核表达载体 pET-28a 上, 转化到 *E. coli* BL21(DE3)和 *E. coli* Rosetta 后, 经异丙基- $\beta$ -D-硫代乳糖苷(IPTG)诱导表达, 用  $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析柱对重组变应原进行纯化. 采用免疫印迹检测其与对虾过敏患者血清的 IgE 结合活性. 对罗氏沼虾变应原进行了表达、鉴定及纯化, 成功地获得了具有变应原活性的重组罗氏沼虾原肌球蛋白, 为罗氏沼虾过敏性疾病的诊断、治疗奠定了基础.

**关键词:** 罗氏沼虾; 原肌球蛋白; 变应原; 克隆和表达  
**中图分类号:** Q 78      **文献标志码:** A

## 0 引言

近年来食品安全问题越来越突出, 食物过敏已经引起了人们的普遍关注<sup>[1-2]</sup>. 1995 年世界粮农组织(FAO)报告, 90%以上的食物过敏是由鸡蛋、牛奶、鱼、贝类海产品、大豆、花生、坚果类和小麦等 8 大类食物引起的. 在这 8 大类容易引起过敏反应的食物中, 虾类及其制品是很重要的一类<sup>[3-6]</sup>, 因此研究虾的致敏反应具有重要的实用价值. 目前, 国外许多学者对其当地甲壳类进行调查、抗原分析和纯化等工作, 发现虾类主要过敏原是存在于其肌肉组织的原肌球蛋白<sup>[7-14]</sup>. 国内许多学者也对我国的虾、蟹原肌球蛋白进行了克隆研究<sup>[15-16]</sup>. 而对于罗氏沼虾原肌球蛋白基因克隆方面的研究国内鲜见报道.

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)原产于印度太平洋地区, 生活在淡水或者咸淡水水域, 现主要在我国南方推广养殖, 尤以广东发展最快. 因此, 本实验选择在广东比较普遍的罗氏沼虾, 并对其原肌球蛋白基因进行克隆表达, 获得纯度较高的重组罗氏沼虾原肌球蛋白变应原. 重组过敏原应用于诊断和治疗过敏性疾病有着极大的优势, 它既可保持极高的纯度, 没有杂蛋白, 容易标准化, 以及没有

外源毒性物质和病原微生物污染, 而且, 目前体外实验及皮肤实验结果显示, 大部分的基因重组过敏原的过敏原活性与天然过敏原提取液相当, 而天然过敏原即使达到标准化也会因为含有多种非有效成分而影响诊断和疗效. 此外, 利用基因工程技术可以减少重组过敏原与 IgE 结合的抗原表位, 从而不被 IgE 识别, 同时又保留了相关的 T 细胞抗原决定簇, 仍然具有刺激 T 细胞的能力, 从而在减少发生不良反应的同时又不影响治疗效果. 因此, 获取过敏原的 cDNA, 并异源表达出有功能的重组过敏原被认为是诊断和治疗过敏性疾病的良好有效手段<sup>[15]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

罗氏沼虾购自广东省深圳市南山市场; RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司); AMV First Strand cDNA Synthesis Kit(美国 BBI 公司); 质粒小量抽提试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒(美国 OMEGA 公司); pET-28a(+)载体(美国 Novagen 公司); 大肠杆菌 *E. coli* Top10、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* Rosetta(本实验室保存); 蛋白电泳预染 Protein Maker(美国 MBI Fementas 公司); 内切酶及其他试剂均为 Takara 公司

收稿日期: 2012-04-10

基金项目: 国家自然科学基金(31101280, 81271950), 深圳市深港创新圈课题(CX Q2008026), 深圳市重点实验室组建项目(SW201110010)和深圳大学基础研究课题(201101)资助项目.

作者简介: 黄海珍(1976-), 女, 江西南昌人, 副研究员, 主要从事食物过敏原的检测和分子生物学研究.

产品.

## 1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank(登录号: GU369816)发表的罗氏沼虾原肌球蛋白的 cDNA 系列, 利用 GeneTool 软件设计其上下游引物:

上游引物: 5'CCGCATATGGACGCCATCAAG-AAGAAG3',

下游引物: 5'GGAGAATTCTTAGTAGCCAGACAGTTCGCTG3'.

1.2.2 总 RNA 的提取以及 RT-PCR 扩增、克隆和测序 取新鲜的罗氏沼虾的肌肉用液氮研磨后用 RNA 提取试剂盒进行总 RNA 的提取. 以提取的总 RNA 为模板, 按照反转录试剂盒的使用说明书进行 20  $\mu$ L 体系的反转录反应. 以反转录的产物为模板, 利用特异性合成的引物进行 PCR 反应, 程序为 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 接着 94  $^{\circ}$ C 30 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 运行 30 个循环, 然后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min 结束. 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 并切胶回收克隆产物, 然后将基因连接于 PMD18-T 载体上, 再将连接产物转化至大肠杆菌 *E.coli* Top10, 接着涂板培养过夜. 第 2 天挑取阳性单菌落进行 DNA 测序(由华大基因完成).

1.2.3 序列分析及同源性分析 将测序所得序列通过 GeneBank 进行序列比对, 同时推导其相应氨基酸序列. 利用在线程序 CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 将所得克隆与已知罗氏沼虾基因进行多序列比对, 分析其序列同源性.

1.2.4 原核表达载体的构建 将测序正确的目的基因与原核表达载体 pET-28a(+)分别用 *EcoR* I 和 *Nde* I 进行双酶切, 然后回收目的基因片段和载体的酶切片段, 将两者置于 16  $^{\circ}$ C 的水槽中连接过夜, 然后将连接产物转入 Top 10 菌中, 通过含有硫酸卡那霉素(KaNa)的 LB 平板进行筛选, 提取阳性菌落的质粒进行酶切鉴定, 然后送去测序(由华大基因完成).

1.2.5 重组罗氏沼虾原肌球蛋白的表达和纯化 阳性克隆经测序鉴定后转入大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)用于诱导表达. 挑取单菌落培养过夜, 按 5%比例接种于 1 000 mL LB 培养基(含卡那霉素 50  $\mu$ g/mL), 37  $^{\circ}$ C 培养至菌液的  $A_{600}$  达到 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达过夜. 离心收集菌体, 重悬于 50 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 7.5). 超声波破菌. 然后于 4  $^{\circ}$ C, 15 000 r/min 离心 15 min, 收集上清. 装好 Chelating Sepharose 柱, 按常规上  $\text{Ni}^{2+}$ 、用

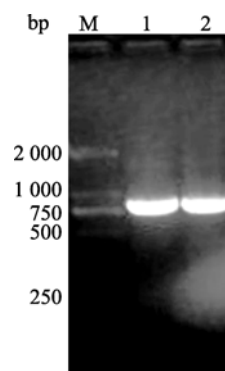
平衡缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.5)平衡层析柱, 上样品, 平衡至基线后, 用 300 mmol/L 咪唑洗脱, 收集洗脱峰, 对含目标蛋白的洗脱组分进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析.

1.2.6 重组罗氏沼虾原肌球蛋白变应原活性鉴定 重组罗氏沼虾 Tropomyosin 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后电转到硝酸纤维素膜上, 取下膜用 TBS 洗干净后, 用 3%牛血清白蛋白(BSA)4  $^{\circ}$ C 封闭过夜; 与 1:5 稀释的过敏病人阳性血清 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 加入经 TBST (TBS/0.05% Tween-20)稀释(1:2 000)生物素标记的抗人 IgE 抗体, 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 再加入经 TBST 稀释(1:2 000)的 HRP 标记的链霉亲和素, 37  $^{\circ}$ C 孵 1.5 h; 以上每个步骤进行完后都用 TBST 洗 3 次(5 min/次). 将膜放入新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)底物溶液中显色, 双蒸馏水洗涤终止显色反应, 观察结果.

## 2 结果

### 2.1 原肌球蛋白基因的 PCR 扩增

根据特异性引物进行 PCR, 扩增获得原肌球蛋白基因片段. 电泳显示在约 855 bp 处有一亮带, 大小与理论值相符合(见图 1). 回收 RT-PCR 产物并与 pMD18-T Vector 连接后, 转化 *E.coli* Top 10. 挑取阳性菌落进行测序鉴定.



Lane M: DNA Standard Markers(DL 2 000); Lane 1 and 2: RT-PCR Amplification.

图 1 RT-PCR 扩增结果

### 2.2 序列分析以及同源性比对

克隆得到的罗氏沼虾 tropomyosin 由 855 个碱基组成(含终止密码子), 编码 284 个氨基酸(见图 2). 将克隆所得的基因序列利用 NCBI 中的 BLAST 程序进行序列同源性分析. 结果显示:本实验所用材料罗氏

沼虾 tropomyosin 与已提交罗氏沼虾的 tropomyosin 同源率为 96%, 与中国对虾的 tropomyosin 为 92%, 与草虾的 tropomyosin 为 92%, 与淡水小龙虾的 tropomyosin 为 86%(见图 3)。

xia-trop	1	atggacgccatcaagaagaagatgcaggcgatgaagctcgagaaggacaacgccatggac	60
		M D A I K K K M Q A M K L E K D N A M D	
xia-trop	61	agggcggtactctcgagcagcagaacaaggaggccaacaacagggtgagaagctccgag	120
		R A D T L E Q Q N K E A N N R A E K S E	
xia-trop	121	gaggaggttttcagccttcagaagagatgcagcaacttgagaacgacctcgacagtgt	180
		E E V F S L Q K R M Q Q L E N D L D S V	
xia-trop	181	caggaagctttgctgaaggctaaccaatctcgaggagaaagacaaggctctctctaac	240
		Q E A L L K A N Q H L E E K D K A L S N	
xia-trop	241	gctgaggggtgaggtgcgcgtctcaaccgcgcacccagctccttgaggaagacctcgag	300
		A E G E V A A L N R R I Q L L E E D L E	
xia-trop	301	aggtctgaggaacgactcaacaccgcgccaccacgaagtgggtgagggcctccaggcagcc	360
		R S E E R L N T A T T K L A E A S Q A A	
xia-trop	361	gacgagtcgagcgtatgcgcaaggtactcgagaaccgctccctctcgatgaggagcgt	420
		D E S E R M R K V L E N R S L S D E E R	
xia-trop	421	atggatgcccttgagaaccaactgaaggaggccgctccttggtgaggaagccgacagg	480
		M D A L E N Q L K E A R F L A E E A D R	
xia-trop	481	aaatatgatgaggttgcgcgttaactggccatgggtgaagctgatcttgaggagctgag	540
		K Y D E V A R K L A M V E A D L E G A E	
xia-trop	541	gaacgcgcagaaactggtgaatcaaatcgtcgagcttgaggaagaattgcgcgtcgtt	600
		E R A E T G E S K I V E L E E E L R V V	
xia-trop	601	ggcaacaacttgagctctcttgaggtgtctgaagagaaggccaaccagcgtgaggaagct	660
		G N N L K S L E V S E E K A N Q R E E A	
xia-trop	661	tacaaggagcagattaagacactgaccaacaaactcaaggcggctgagggccgcgctgag	720
		Y K E Q I K T L T N K L K A A E A R A E	
xia-trop	721	ttgcagagagatctgtgcagaagctccagaagggtcgacaggctogaagacgaactg	780
		F A E R S V Q K L Q K E V D R L E D L	
xia-trop	781	gttaacgagaaggagaagtacaagtcattaccgatgagctcgaccagacattcagcgaa	840
		V N E K E K Y K S I T D E L D Q T F S E	
xia-trop	841	ctgtctggctactaa	855
		L S G Y *	

图 2 罗氏沼虾原肌球蛋白基因序列和氨基酸序列

xia-trop	MDAIKKKMQAMKLEKDNAMDRADTLEQQNKEANNRAEKSEEEVFSLQKRMQQLENDLDSV	60
GU369816	.....HN.....	60
GU233303	.....HN.....Q.	60
AY827100	.....HN.....Q.	60
FJ769183	.....T.....I...A....HN.....H.....Q.	60
xia-trop	QEALLKANQHLEEKDKALSNAEGEVAALNRRIQLLEEDLERSEERLNTATTKLAEASQAA	120
GU369816	.....	120
GU233303	..S....IQ.V.....	120
AY827100	..S....IQ.V.....	120
FJ769183	..S....TQ.....I.....	120
xia-trop	DESERMRKVLNRSLSDEERMDALENQLKEARFLAEEDRKYDEVARKLAMVEADLEGAE	180
GU369816	.....R..	180
GU233303	.....R..	180
AY827100	.....R..	180
FJ769183	.....R..	180
xia-trop	ERAETGESKIVELEELRVVGNLKSLEVSEEKANQREEAYKEQIKTLTNKLKAAEARAE	240
GU369816	.....	240
GU233303	.....	240
AY827100	.....	240
FJ769183	.....A.....	240
xia-trop	FAERSVQKLQKEVDRLEDELVNEKEKYKSITDELDTQTFSELSGY	284
GU369816	.....	284
GU233303	.....	284
AY827100	.....	284
FJ769183	.....T..	284

tropomyosin 推导的氨基酸序列与已知罗氏沼虾(GU369816)、中国对虾(GU233303)、草虾(AY827100)和淡水小龙虾(FJ769183)。

图 3 罗氏沼虾

### 2.3 构建罗氏沼虾原肌球蛋白重组质粒

提取阳性重组质粒, 用 *Nde* I 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定和琼脂糖凝胶电泳分析, 结果表明插入的片段约 855 bp, 与理论大小相符(见图4). 为使插入片段大小准确无误, 将阳性重组质粒送去测序鉴定.

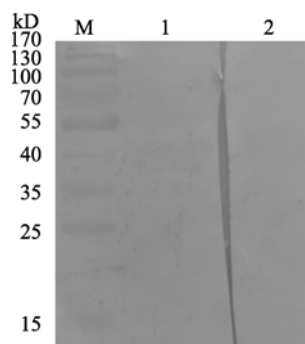
### 2.4 表达和纯化重组罗氏沼虾 tropomyosin 蛋白

将鉴定为阳性的重组表达质粒转入大肠杆菌 *E.coli* BL21 (DE3) 进行诱导表达. 37 °C 经 IPTG 诱导过夜获得重组的蛋白, SDS-PAGE 电泳分析显示在相对分子质量 38 kD 左右处有外源蛋白表达条带出现. 重组 tropomyosin 蛋白经由  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱的紫外检测, 用 300 mmol/L 的咪唑洗脱时, 可观察到尖锐的峰形出现, 收集目的蛋白峰, 经 SDS-PAGE 检测鉴定, 获得了高丰度和高纯度的目的蛋白(见图 5).

### 2.5 IgE 结合活性鉴定

用重组表达产物进行 SDS-PAGE, 经电转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 以 20 份鱼虾过敏患者的血清

作为一抗, 进行 Western-blotting, 印迹结果显示在大约 38 kD 处有一明显的条带(见图 6), 表明 tropomyosin 具有良好的 IgE 结合活性. 此外, 阴性对照无反应.



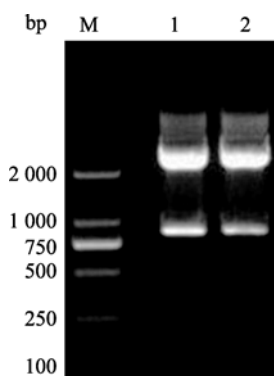
M: Maker; 1: 阳性对照, 2: 阴性对照.

图 6 免疫印迹分析重组变应原

## 3 讨论

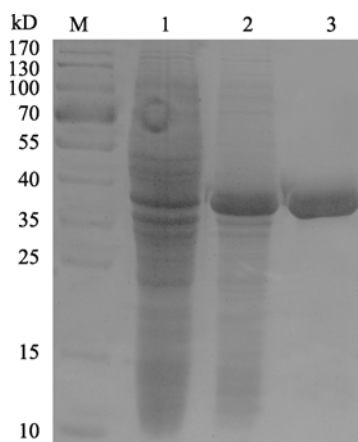
虾类食品营养丰富, 但同时也是高致敏性食物之一, 可引起各种速发型超敏反应症状, 如荨麻疹、风疹、喉痉挛、哮喘等, 甚至可能危及生命<sup>[17]</sup>. 研究资料显示, 引发食物过敏反应<sup>[18-19]</sup>的食用性的甲壳类(如虾、蟹、龙虾、螯虾等), 其主要变应原是肌肉蛋白原肌球蛋白(Tropomyosin)<sup>[20-21]</sup>.

本实验采用分子克隆的方法, 通过设计特异性引物, 成功将目的基因连接到 pMD-18T 载体上, 经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切及测序均表明已经成功克隆了正确的目的基因片段. 另外, 构建了重组质粒 tropomyosin/pET-28a(+), 将其转化入 *E.coli* BL21 (DE3)和 *E.coli* Rosatta 表达菌株, 经 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳, 可以看到诱导前跟诱导后有明显区别, 诱导后的蛋白电泳图上在相对分子质量大约 38 kD 处有一条粗大明显的条带, 而诱导前没有, 表明已经成功表达了目的蛋白. 目的蛋白大量表达之后, 经诱导、离心, 得菌体, 然后将菌体超声破碎之后离心, 上清和沉淀分别电泳鉴定, 结果表明, 在上清中含有目的蛋白条带, 证明此 tropomyosin 蛋白是可溶性蛋白. 通过亲和层析, 得到纯度较高的目的蛋白, 利用鱼、虾过敏的病人血清进行 Western-blotting, 结果显示, 重组的 tropomyosin 能够与过敏病人的血清中的 IgE 结合, 表明重组变应原具有良好的免疫原性. 本实验使用生物信息学的方法, 利用各种虾 tropomyosin 高度保守



M: DNA marker; 1、2: 重组质粒的酶切产物.

图 4 重组质粒双酶切鉴定



M: Maker; 1: 诱导前, 2: 诱导后, 3: 纯化后.

图 5 罗氏沼虾 tropomyosin 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

的区域设计并合成特异性引物,成功克隆出一个新的罗氏沼虾 tropomyosin 基因,此基因由 855 个碱基(含终止子)组成,编码 284 个氨基酸.通过对其编码的蛋白质氨基酸序列和其他已知种类的虾的 tropomyosin 进行同源性分析,发现具有较高的同源性,提示不同种类的虾的变应原具有一定的同源性.同时发现,本实验所得到的罗氏沼虾的 tropomyosin 与数据库中另一罗氏沼虾的 tropomyosin 只有 96% 的同源性,而非 100%,可能是由于地域差异所致,提示不同地区的同一变应原可能具有一定的区域特色;也可能是因为该品种在人为改良和区域驯化等选择进化的过程中形成的;而基因上的差异可能会导致其编码的蛋白质的抗原性存在一定的差异,因此在临床上应该尽量使用具有我国区域特色的变应原进行免疫诊断和治疗.

此外,本实验所采用的大肠杆菌是常用的原核生物表达系统,其具有很多优点,遗传背景清楚、易于操作、转化,表达效率很高,能够快速大量地产生重组蛋白.而使用基因重组技术于体外大量表达出具有抗原性的重组变应原是过敏性疾病和脱敏疫苗研制的重要途径.目前,国内对罗氏沼虾的重组变应原的研究还不够深入,故无论是改进现有免疫诊断所用的粗抗原,从而提高检测的特异性和敏感性,还是研制过敏性疾病疫苗,构建罗氏沼虾主要变应原 tropomyosin 的高效表达基因,制备出高纯度的变应原都是非常必要的.本实验构建了罗氏沼虾的高效原核表达载体,且表达、纯化了罗氏沼虾的主要变应原 tropomyosin,同时还证明了重组 tropomyosin 具有与特异 IgE 结合的免疫学特性,这将为罗氏沼虾过敏性疾病的特异性诊断以及进一步的实验研究奠定基础.

## 4 参考文献

- [1] 闫浩, 邬玉兰, 夏立新, 等. 牛乳主要过敏原  $\alpha$ -乳白蛋白基因的克隆及其原核表达载体的构建 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2010, 34(3): 244-248.
- [2] 易海涛, 刘志刚, 闫浩, 等. 花生过敏 Arah202 的克隆、表达及免疫学鉴定 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2010, 34(5): 531-535.
- [3] Bock S A, Munoz Furlong A, Sampson H A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods [J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107(1): 191-193.

- [4] 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): 119-121.
- [5] Bowman T E, Abele L G. Classification of the recent crustacean. The biology of crustacea [M]. New York: Academic Press, 1982: 132-198.
- [6] Reese G, Ayuso R, Lehrer S B. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen [J]. Int Arch Allergy Immunol, 1999, 119(4): 247-58.
- [7] Arai Y, Sano Y, Ito K, et al. Food and food additives hypersensitivity in adult asthmatics. I. Skin scratch test with food allergens and food challenge in adult asthmatics [J]. Arerugi, 1998, 47(7): 658-66.
- [8] Leung P S, Chen Y C, Mykles D L, et al. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen [J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1998, 7(1): 12-20.
- [9] Daul C B, Morgan J E, Lehrer S B. Hypersensitivity reactions to crustacea and mollusk [J]. Clin Rev Allergy, 1993, 11: 201-222.
- [10] Goetz D W, Whisman B A. Occupational asthma in a seafood restaurant worker: cross-reactivity of shrimp and scallops [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000, 85(6): 461-466.
- [11] Henriksen O. Scientist net major shrimp allergen [J]. National Center for Research Resources Reporter, 1994, XVIII: 10-11.
- [12] 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.
- [13] Reese G, Jeoung B J, Daul C B, et al. Characterization of recombinant shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) [J]. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113(1/2/3): 240-242.
- [14] 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.
- [15] 詹政科, 刘志刚, 吉坤美. 口虾蛄原肌球蛋白基因表达及变应原性鉴定 [J]. 中国公共卫生, 2009, 25(4): 413-415.
- [16] 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): 296-303.
- [17] Arruda L K, Vailes L D, Mann B J, et al. Molecular cloning of a major cockroach (Blattella germanica) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic protease [J]. Biol Chem, 1995, 270(33): 19563-19568.
- [18] Arlian L G. Arthropod allergens and human [J]. Annu Rev Entmol, 2002, 47: 395-433.
- [19] Castillo R, Carrillo T, Blanco C, et al. Shellfish hypersensitivity:

- clinical and immunological characteristics [J]. *Allergol Immunopathol*, 1994, 22: 83-87.
- [20] Waring N P, Daul C B, de Shazo R D, et al. Hypersensitivity reactions to ingested crustacea: clinical evaluation and diagnostic studies in shrimp sensitive individuals [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1985, 76: 440-445.
- [21] Leung P S, Patrick S C, Chen Y C, et al. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1998, 102(5): 847-852.
- [22] 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: 49-55.

## The Cloning, Expression and Purification of Tropomyosin from *Haliotis discus* and Identification of Its Allergic Activity

LUO Wei-zhi, FU Chun-rong, WU Yu-lan, CHEN Xian-xiong, LIU Zhi-gang, HUANG Hai-zhen<sup>\*</sup>

(Allergy Reaction and Immunology Institute, Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518060, China)

**Abstract:** Bioinformatic method was used for the comparative analysis of numerous homologous animal food tropomyosin sequences. Conserved domains among the sequences were determined for degenerate primer design. The RT-PCR was applied to clone the full length allergen genes from *Macrobrachium rosenbergii* and the sequences were analyzed. The specific primers were designed. The complete coding cDNA sequence including the start and the stop codons of tropomyosin of *Macrobrachium rosenbergii* was subcloned into the expression vector pET 28a. Expression of the recombinant *Macrobrachium rosenbergii* tropomyosin was carried out in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and the purification of the recombinant protein was performed via affinity chromatography with  $\text{Ni}^{2+}$  coupled to sepharose. Protein from *E. coli* lysate and purified recombinant tropomyosin were analyzed by SDS-PAGE. IgE reactivity of recombinant *Macrobrachium rosenbergii* tropomyosin was investigated by Western-blotting. The recombinant *Macrobrachium rosenbergii* tropomyosin with good allergenicity in this study was obtained, which would be used as a base for further study on *Macrobrachium rosenbergii* related allergy.

**Key words:** *macrobrachium rosenbergii*; allergen; tropomyosin; cloning and expression

(责任编辑: 刘显亮)