

凡纳滨对虾原肌球蛋白的异源重组表达

李言初^{1,2,3} 杨玉莹¹ 胡卫成⁴ 刘书成^{1,2,3,5} 魏 帅^{1,2,3,5}

(1. 广东海洋大学食品科技学院,广东 湛江 524088; 2. 广东省水产品加工与安全重点实验室,广东 湛江 524088;
3. 广东省海洋生物制品工程实验室,广东 湛江 524088; 4. 扬州大学基础医学院,江苏 扬州 225009;
5. 大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心,辽宁 大连 116034)

摘要:[目的]获得重组原肌球蛋白(tropomyosin, TM)。[方法]先从 National Center of Biotechnology Information(NCBI)数据库获得 TM 同源蛋白的基因序列,并据此设计特异性引物,再以凡纳滨对虾肉 cDNA 为模板,PCR 扩增并测序分析了凡纳滨对虾 TM 编码基因序列,最后利用大肠杆菌异源重组表达载体 pET29a,构建了凡纳滨对虾 TM 的原核重组表达体系。[结果]RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳后,条带清晰明亮、泳道无弥散区,cDNA 样品在 300 bp 左右有清晰条带,说明该研究成功提取了结构完整的凡纳滨对虾肉总 RNA 样品并反转录合成了 cDNA。PCR 结果表明,凡纳滨对虾 TM 编码基因在 900 bp 处有单一条带,基因序列 Blast 比对结果显示克隆的 TM 编码基因与已知凡纳滨对虾 TM 编码基因高度同源(99.77%)。该研究进一步构建了 TM 重组表达载体 pET29a-TM,SDS-PAGE 结果显示其在表达宿主菌中高效表达了目标蛋白,获得了相对分子质量约为 3.7×10^4 的可溶性重组 TM 蛋白条带。[结论]该研究克隆了凡纳滨对虾 TM 编码基因并构建其原核表达体系,高效地获得了可溶性重组 TM 蛋白。

关键词:原肌球蛋白;食物过敏;凡纳滨对虾;基因克隆;重组表达

Heterologous recombinant expression of tropomyosin from *Litopenaeus vannamei*

LI Yanchu^{1,2,3} YANG Yuying¹ HU Weicheng⁴ LIU Shucheng^{1,2,3,5} WEI Shuai^{1,2,3,5}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Safety, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 3. Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Zhanjiang, Guangdong 524088, China; 4. School of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 5. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

Abstract: [Objective] To obtain recombinant tropomyosin (TM). [Methods] In this study, the gene sequence of a TM homologous protein is obtained from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database, and specific primers are designed accordingly. Subsequently, using the cDNA of *Litopenaeus vannamei* meat as the template, the TM coding gene sequence of *L. vannamei* is amplified by PCR and sequenced. Finally, the prokaryotic recombinant expression system for *L. vannamei* TM is established using the *Escherichia coli* heterologous recombinant expression vector pET29a. [Results] After agarose gel electrophoresis (AGE) of the RNA samples, the band is clear and bright, with no diffusion observed in the lanes. The cDNA sample displays a clear band around 300 bp, indicating successful extraction of the total RNA samples from *L. vannamei* meat with intact structures and subsequent reverse transcription into cDNA. The PCR results indicate a single band at 900 bp for the TM coding gene of *L. vannamei*. BLAST analysis of the gene sequence shows that the TM

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:32272245);国家虾蟹产业技术体系(编号:CARS-48)

通信作者:魏帅(1986—),男,广东海洋大学教授,博士。E-mail: weishuaiws@126.com

收稿日期:2025-05-11 **改回日期:**2025-10-22

引用格式:李言初,杨玉莹,胡卫成,等. 凡纳滨对虾原肌球蛋白的异源重组表达[J]. 食品与机械,2025,41(11):1-8.

Citation:LI Yanchu, YANG Yuying, HU Weicheng, et al. Heterologous recombinant expression of tropomyosin from *Litopenaeus vannamei*[J]. Food & Machinery, 2025, 41(11): 1-8.

coding gene is highly homologous (99.77%) to the known TM coding gene of *L. vannamei*. This study further constructs the TM recombinant expression vector pET29a-TM. SDS-PAGE analysis confirms efficient expression of the target protein in the host strain, yielding a soluble recombinant TM protein band with a relative molecular weight of approximately 3.7×10^4 . [Conclusion] This study successfully clones the TM coding gene from *L. vannamei* and constructs its prokaryotic expression system, enabling the efficient production of soluble recombinant TM protein.

Keywords: tropomyosin; food allergy; *Litopenaeus vannamei*; gene cloning; recombinant expression

甲壳类动物是全球公认的优质蛋白来源,其含有人体必需的氨基酸和多不饱和脂肪酸等营养物质^[1-2]。然而,甲壳类动物是八大过敏原之一^[3],可引发一系列过敏反应,比如:呼吸道、消化道水肿,皮肤红疹,严重时会引发休克甚至死亡^[4]。在一般人群中,甲壳类动物过敏的患病率为0.5%~2.5%^[5]。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)作为水产养殖中产量较高的物种,近年来,其消费量占水产品总消费量的比重从19.8%上升至23.6%,随着消费量的增加,由其引起的过敏发生率也在增加^[6-7]。

凡纳滨对虾过敏原包括原肌球蛋白(tropomyosin, TM)、精氨酸激酶(arginine kinase, AK)、肌质钙结合蛋白(sarcoplasmic calcium-binding protein, SCP)等^[8]。其中, TM作为凡纳滨对虾的主要过敏原,是引起逾80%过敏现象的原因^[9]。TM是由两条相同的α-螺旋链互相缠绕组成的长丝状蛋白质,平均长度约为284个氨基酸残基,相对分子质量为 3.4×10^4 ~ 3.8×10^4 ^[10]。TM广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的肌肉组织中^[11],且具有高度同源性^[12],这导致了不同物种TM间产生交叉反应。因而, TM过敏在近几年受到广泛关注^[13]。

虾类过敏原的血清学诊断包括血清过敏原特异性IgE(sIgE)诊断、总IgE(tIgE)检测和成分解析诊断等方式^[14],多依靠天然过敏原产品来诊断和治疗过敏性疾病^[15]。由于普通的纯化方式难以获得高浓度过敏原蛋白,且提取的天然蛋白也有被其他过敏原污染的风险,提取过程繁琐,不同来源的过敏原在不同物种体内含量也各不相同^[16]。因此,重组过敏原目前被认为是过敏原诊断的基础,可以提高sIgE的准确性,同时提高诊断的准确性^[17]。目前,Nugraha等^[18]成功构建了太平洋牡蛎重组TM,但采用37℃诱导过夜的方法会导致重组蛋白生产效率低。Azemi等^[19]在37℃诱导4 h的条件下得到了榄绿青蟹重组TM,但重组TM大多集中于包涵体内,不利于后续变性以及复性的操作。研究拟以凡纳滨对虾TM编码基因为研究对象,通过构建其原核表达体系,并在大肠杆菌BL21菌株中37℃诱导表达3 h,在菌体破碎后的上清液中获得高浓度的重组TM蛋白,旨在为后续TM致敏性表位和致敏机制的研究提供材料支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜凡纳滨对虾(经冰猝死之后2 h内运送至实验

室);30尾/kg,湛江市湖光市场;

pET29a载体质粒、*E. coli* DH5α、*E. coli* BL21感受态细胞:扬州大学某实验室;

pMD18-T、2×Taq Master Mix:日本Takara公司;

限制性内切酶 *Nde* I、*Bam* H I:美国New England Biolabs(NEB)公司;

异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

Trizol:赛默飞世尔科技公司;

SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒、质粒DNA小量抽提试剂盒、DNA胶回收试剂盒等:生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

TGreat Expert 梯度聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪:OSE-GP-03/05型,天根生化科技(北京)有限公司;

琼脂糖水平电泳槽:DYCP-31DN型,北京六一生物科技有限公司;

垂直电泳槽:Mini-PROTEAN Tetra型,美国Bio-Rad公司;

台式冷冻高速离心机:5810R型,德国Eppendorf公司;

全自动数码凝胶成像分析系统:Tanon2500型,上海天能科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 TM同源基因分析及引物设计 在GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中检索凡纳滨对虾原肌球蛋白编码基因信息,基于GenBank中已公开的凡纳滨对虾TM基因序列(GenBank Nucleotide NO:EU410072.1)设计特异性引物。结合研究所用的载体pET29a多克隆位点上限制性内切酶信息,分别将限制性内切酶识别位点序列及保护碱基加入引物中,设计的TM基因上下游引物序列分别为:5'-CGCCCATATGCACCACCACCACCACCATGGACGCCATCAAGAAGAA-3';5'-GCGGGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTAGC CAGACAGTTGCTGA-3',其中由下划线标记的序列为限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Nde* I 的酶切位点。所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,并用无菌水溶解成0.01 mol/L溶液备用。

1.3.2 RNA 提取和反转录 RNA 提取参考 Zhou 等^[20]的方法。将鲜虾去头、去壳、去虾线后,用液氮研磨至虾肉变为白色。取约 50 mg 研磨后的样品加入 1.5 mL 离心管,加入 1 mL Trizol 试剂,按照 Trizol 说明书步骤提取虾肉总 RNA。之后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 样品质量。以经质量检测后的虾肉总 RNA 为模板,采用反转试剂盒并按说明书要求的反应体系和步骤反转录合成 cDNA。cDNA 经持家基因 GAPDH 扩增验证后于冰箱冻存,以备后续试验使用。

1.3.3 TM 编码基因克隆及序列分析 以新鲜虾尾肉 cDNA 为模板,按照近岸 Taq DNA 连接酶说明书构建 PCR 扩增体系(20 μL):上下游引物各 1 μL、cDNA 模板 1 μL、2 × Taq mix 10 μL、ddH₂O 7 μL,并按说明书要求设置以下反应条件进行扩增:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,维持 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

PCR 扩增产物经试剂盒纯化回收后进行 TA 克隆,将目的基因片段连接至 pMD18-T 载体,获得重组质粒 pMD18-T-TM。TA 克隆反应体系为(10 μL):Solution I 5 μL、pMD18-T 0.5 μL、PCR 回收产物 2 μL、ddH₂O 2.5 μL。经 16 °C,3 h 以上连接后,转化 DH5 α 感受态细胞。转化体系涂布 LB 氨苄抗性平板,37 °C 过夜,次日挑取单菌落,扩大培养后提取质粒,并用限制性内切酶酶切和琼脂糖凝胶电泳验证阳性转化子。挑选阳性转化子寄送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

1.3.4 重组表达载体 pET-29a-TM 构建 重组质粒构建参考田阳等^[21]的方法并略作修改。使用 Nde I 和 Bam H I 酶切重组质粒 pMD18-T-TM 和 pET29a 载体。酶切体系(50 μL):质粒 20 μL、10×r Cut Smart 缓冲液 5 μL、Nde I 1 μL、Bam H I 1 μL、ddH₂O 23 μL,反应条件:37 °C,2 h。酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒回收获得带有相同黏性末端的线性化载体和目标基因片段。再经连接反应构建重组表达载体 pET-29a-TM。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,抗性筛选和验证后获得阳性重组表达载体,再转化入 *E. coli* BL21 感受态细胞中,构建 TM 重组表达工程菌,超低温冰箱保存备用。

1.3.5 凡纳滨对虾重组 TM 蛋白诱导表达及纯化 重组 TM 诱导与纯化参考刘甫^[22]的方法并略作修改。用含卡那霉素 50 μg/mL 的 LB 平板划线并过夜培养,活化 TM 重组表达工程菌。挑取单菌落至含卡那霉素的 3 mL 液体 LB 培养基中,37 °C 过夜。加入 1 mL 种子液至 100 mL 液体 LB 培养基中,37 °C、200 r/min 振荡培养至 OD_{600 nm} 约为 0.4,加入终浓度为 100 μmol/L 的诱导剂 IPTG,37 °C、200 r/min 继续振荡培养约 3 h。12 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,PBS 缓冲液重悬菌体后进行超声破碎。细菌裂解液经 12 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液,按说明书步

骤,过镍柱纯化目标重组蛋白。十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)探究重组 TM 诱导表达及纯化情况。

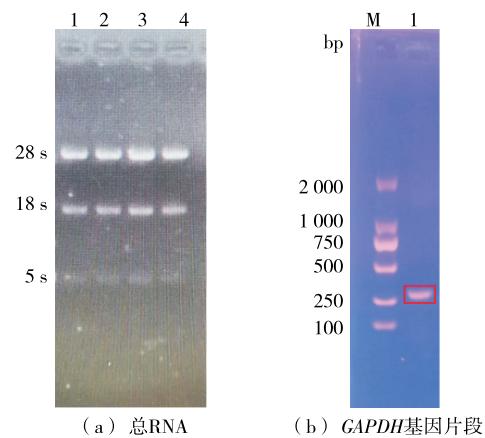
1.3.6 数据处理 所有琼脂糖凝胶电泳图均由 Tanon MP VER.4.00 拍摄软件拍摄,灰度调整由 Image Calculator 1.8.0 软件处理。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾总 RNA 提取与反转录

采用 Trizol 法提取了凡纳滨对虾尾肉总 RNA,如图 1(a)所示,RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳后,条带清晰明亮、泳道无弥散区,28s RNA 亮度约为 18s RNA 的 2 倍,5s RNA 条带较浅。一般动物的 RNA 包括 mRNA、rRNA、tRNA 和小 RNA,根据相对分子质量的不同,rRNA 又分为 28s、18s 和 5s 的 rRNA^[23]。rRNA 的含量占总 RNA 的 90% 以上,mRNA 只占 1%~2%,tRNA 和小 RNA 由于相对分子质量太小,难以在凝胶电泳中产生明亮的条带,所以凝胶电泳的结果上只能看到 rRNA 的 3 条带^[23]。如果 3 条带清晰完整,则说明提取的 RNA 结构完整,无蛋白和 DNA 污染。该结果表明 RNA 样品质量良好,可以进行后续的反转录试验。

以虾尾肉总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA,并通过 PCR 扩增 GAPDH 基因片段,以验证反转录合成的 cDNA 质量。如图 1(b)所示,以该 cDNA 为模板,PCR 扩增获得了一条约 300 bp 的清晰条带,与 GAPDH 基因片段的理论长度 299 bp 相符,表明合成的 cDNA 质量可靠,能够满足后续 TM 基因片段的 PCR 扩增和克隆需求。



1~3. 不同凡纳滨对虾肉 4. 总 RNA 样品阳性对照 M. DL2000 DNA Marker 1. GAPDH 基因片段的 PCR 扩增产物

图 1 凡纳滨对虾肉总 RNA 和 GAPDH 基因片段琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 AGE of total RNA and GAPDH gene fragment of *L. vannamei* meat

2.2 TM 基因片段 PCR 扩增

基于 GenBank 数据库中已公开的凡纳滨对虾 TM 蛋白编码基因序列设计了 PCR 引物，并以虾尾肉 cDNA 为模板进行了目标 TM 基因片段的 PCR 扩增。如图 2 所示，PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，在约 900 bp 处出现清晰且单一的 DNA 条带。这与骆叶晴等^[24]研究得到长度为 855 bp 的开放阅读框不同，推测是由于该 PCR 产物中额外添加了保护碱基和酶切位点等序列，因此其片段大小与 GenBank 数据库中已知凡纳滨对虾 TM 编码基因相符。据此，推测该 PCR 产物为凡纳滨对虾 TM 基因片段，可进行后续的纯化以及 TA 克隆和测序分析。

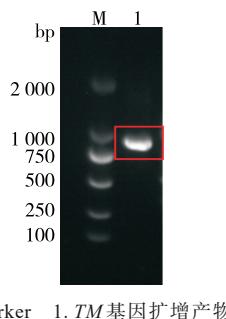
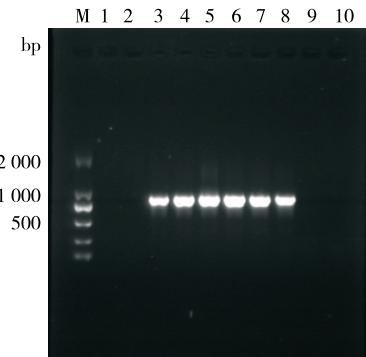


图 2 凡纳滨对虾 TM 编码基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 AGE of PCR product of TM encoding gene of *L. vannamei*

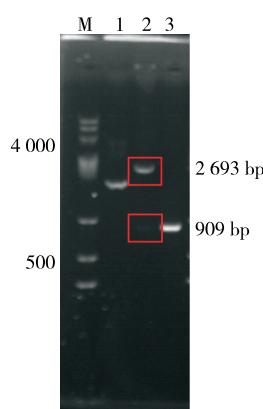
2.3 TM 基因片段的 TA 克隆及序列分析

选择合适的表达载体有助于目标蛋白质的成功表达与纯化，周鹰等^[25]在构建重组 Der p 23 时选择直接与 pET28a(+)载体相连，减少了试验步骤，但会存在转化效率不高的问题。此研究先利用商业化的 T 载体 pMD18-T 对 PCR 扩增产物进行了 TA 及测序分析，在确定目的基因片段 PCR 扩增产物及其具体序列的同时提高转化效率，有利于后续目的基因与 pET-29a 的重组表达。TA 克隆转化子菌落 PCR 结果（图 3）显示，随机挑取的 10 个转化子中，有 6 个转化子成功扩增出了目的基因片段，推测为阳性转化子。从中挑取 1 个转化子，扩大培养提取重组质粒后进行进一步的酶切验证。如图 4 所示，该重组质粒双酶切后形成了与 T 载体和目的基因大小符合的两个条带，表明该转化子确为重组质粒 pMD18-T-TM 的阳性转化子。对该重组质粒的外源插入片段进行测序和比对分析，结果（图 5）表明，该片段序列与理论序列一致，该重组质粒的插入片段取出酶切位点等序列后为一个 894 bp 的开放阅读框 ORF，将该 ORF 序列提交 GenBank 进行 Blast 比对显示（表 1），其与已公开的凡纳滨对虾原肌球蛋白 TM 编码基因高度同源（99.77%），表明克隆的基因片段确为凡纳滨对虾 TM 蛋白编码基因，可用于下一步的原核重组表



M. DNA Marker 1~10. 随机选取的 10 个不同转化子样品
图 3 重组质粒 pMD18-T-TM 转化子目的基因片段菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

Figure 3 Colony PCR and AGE of gene fragments from recombinant pMD18-T-TM transformants



M. DNA Marker 1. pMD18-T-TM 质粒 2. pMD18-T-TM 质粒 双酶切产物 3. 目的基因片段

图 4 重组质粒经双酶切后的电泳图谱

Figure 4 Electrophoretogram of the recombinant plasmid after double enzyme digestion

达体系构建。

2.4 重组表达载体 pET-29a-TM 构建

随着重组蛋白应用日益广泛，蛋白重组表达技术的优化也成为研究热点。目前，已有关于花生致敏蛋白 Ara h1 重组技术的报道^[21]。但由于所带标签不同^[26]，选择的酶切位点不同^[27]，所结合的载体不同^[28]，制备的方法不同^[29]，表达的效率也不尽相同。Babiker 等^[30]利用大肠杆菌表达系统制备大豆中关键位点——Asn170 位点被糖基化的蛋白，但操作步骤较繁琐且制备较困难。Glenting 等^[31]利用乳杆菌制备花生过敏原 Ara h2 重组蛋白，在设计引物时加上 HIS 标签以 *Hind* III 和 *Bam* H I 作为酶切位点，使用镍柱进行纯化，纯化方式也相对简便。试验选择 *Nde* I 和 *Bam* H I 作为酶切位点，*Nde* I 与目标序列中包含的起始密码子序列重叠；*Bam* H I 是 pMD18-T 载体和

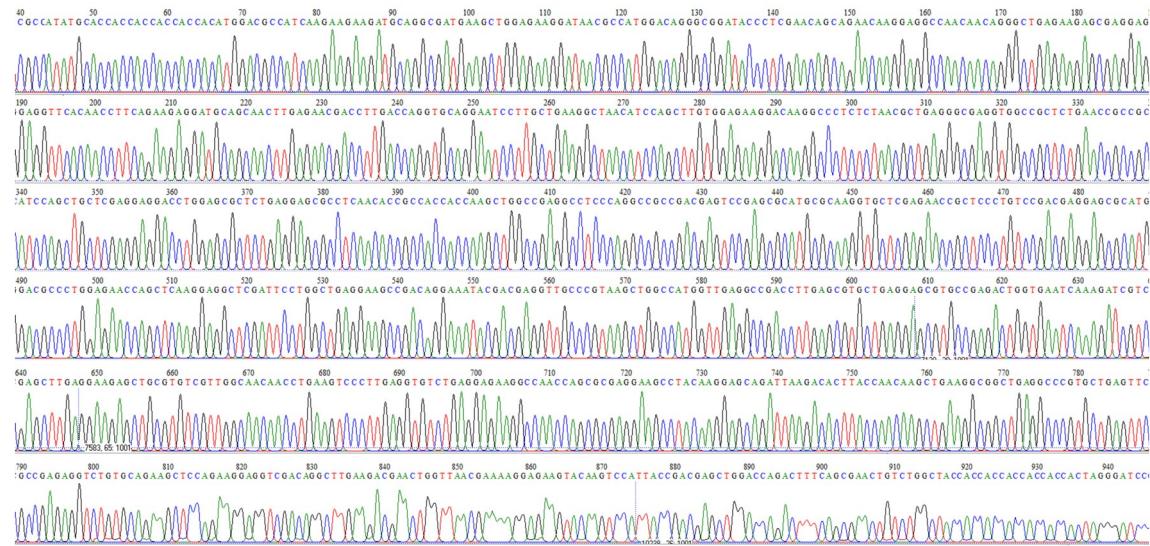


图5 TA克隆阳性转化子测序结果峰图

Figure 5 Peak graph for the sequencing of positive TA clones

表1 TM测序结果序列在NCBI上BLAST比对结果

Table 1 BLAST alignment for the TM sequence against NCBI database

描述	学名	最高得分	总得分	查询覆盖率/%	E值	序列同一性/%	序列长度/bp	登录号
PREDICTED: <i>Penaeus vannamei</i> tropomyosin <i>Penaeus vannamei</i> (LOC113820940), transcript variant X4, mRNA		1 578	1 578	96	0.0	99.77	2 219	XM_070119021.1
PREDICTED: <i>Penaeus vannamei</i> tropomyosin <i>Penaeus vannamei</i> (LOC113820940), transcript variant X6, mRNA		1 578	1 578	96	0.0	99.77	2 166	XM_070119023.1
PREDICTED: <i>Penaeus vannamei</i> tropomyosin <i>Penaeus vannamei</i> (LOC113820940), transcript variant X3, mRNA		1 578	1 578	96	0.0	99.77	2 221	XM_070119020.1
<i>Litopenaeus vannamei</i> Lit v 1 tropomyosin <i>Penaeus vannamei</i> mRNA, complete cds		1 578	1 578	96	0.0	99.77	1 274	EU410072.1
PREDICTED: <i>Penaeus vannamei</i> tropomyosin <i>Penaeus vannamei</i> (LOC113820940), transcript variant X1, mRNA		1 578	1 578	96	0.0	99.77	2 364	XM_027373336.2
PREDICTED: <i>Penaeus vannamei</i> tropomyosin <i>Penaeus vannamei</i> (LOC113820940), transcript variant X5, mRNA		1 578	1 578	96	0.0	99.77	2 205	XM_070119022.1
PREDICTED: <i>Penaeus vannamei</i> tropomyosin <i>Penaeus vannamei</i> (LOC113820940), transcript variant X2, mRNA		1 578	1 578	96	0.0	99.77	2 219	XM_027373337.2

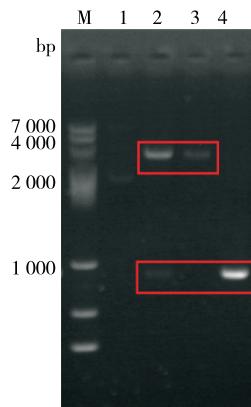
pET29a载体中都存在的酶切位点;*Nde* I 和 *Bam* H I 不存在于目的基因序列中,不会切割目的基因。酶切位点的选择为后续酶连和转化创造条件。

在确定了克隆的TM蛋白编码基因后,基于酶切/酶连的方法构建了TM重组表达载体pET29a-TM,并用双酶切对其进行验证。随机挑选一个转化子,经提质粒和双酶切产物琼脂糖凝胶电泳结果(图6)显示该重组质粒被切出了与载体和目的基因大小一致的2个条带,表明该转化子为阳性转化子,可用于后续的TM重组蛋白的诱导表达和纯化。

2.5 TM重组蛋白诱导表达及序列分析

在选择重组蛋白表达系统时,可以根据不同需求选择不同系统。比如,涉及生产重组蛋白时通常使用大肠杆菌表达系统,因为大肠杆菌表达系统能够用于高水平生产异源蛋白^[32]。大肠杆菌BL21及其衍生物由于缺乏外膜蛋白酶T(outer membrane protease T, OmpT)和长链蛋白酶,可以避免重组蛋白被降解,从而高效地生产可溶性蛋白^[33]。

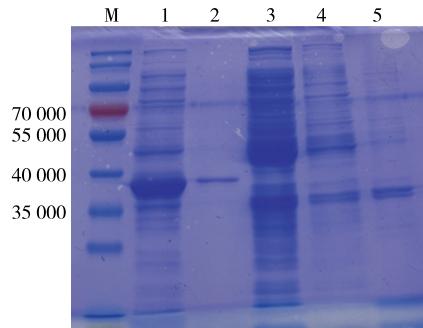
在成功构建重组表达载体pET-29a-TM之后,将其转化入 *E. coli* BL21 菌株感受态,并采用 IPTG 进行诱导表



M. DNA Marker 1. pET-29a-TM 重组质粒 2. pET-29a-TM 质粒双酶切产物 3. pET-29a 线性化载体 4. 目的基因片段

图 6 重组表达载体 pET29a-TM 构建及双酶切验证

Figure 6 Construction and validation of recombinant expression plasmid pET29a-TM by enzymatic digestion



M. 蛋白 Marker 1. IPTG 诱导的 pET29a-TM 菌体总蛋白 2. Ni 柱纯化的重组 TM 蛋白 3. 未诱导的 pET29a-TM 菌体总蛋白 4. IPTG 诱导的 pET29a 空载体对照菌总蛋白 5. 未诱导的 pET29a 空载体对照菌总蛋白

图 7 大肠杆菌诱导表达 TM 重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 7 SDS-PAGE of TM recombinant protein expressed in *E. coli*

达。如图 7 所示,重组表达菌株经 IPTG 诱导表达后,总蛋白中形成了一条浓厚的蛋白条带,大小为 $3.5 \times 10^4 \sim 4.0 \times 10^4$,而在空载体对照菌样品中未能形成该处的相似条带,故该条带应为重组蛋白条带,TM 重组蛋白在大肠杆菌中获得了成功表达。菌体经超声波破碎,离心之后上清过 Ni 柱纯化后,获得了一条单一的蛋白条带,且与目的重组蛋白大小一致,说明重组表达菌株在 37 °C 培养条件下,经 IPTG 诱导能正常表达可溶性的目的重组 TM 蛋白。

使用 bioedit 序列分析软件分析基于 TM 编码基因翻译的氨基酸序列,如图 8 所示,TM 重组蛋白理论等电点 pI 值为 5.09,相对分子质量为 3.46×10^4 。如图 9 所示,TM 的氨基酸残基中谷氨酸(Glu)、亮氨酸(Leu)、丙氨酸(Ala)

含量较高,与 Fu 等^[34]和 Xu 等^[35]在探究 TM 关键致敏氨基酸时的发现一致。色氨酸(Trp)和半胱氨酸(Cys)是促进树突状细胞成熟并释放过敏因子的关键氨基酸^[36],图 9 结果显示,TM 中不含有色氨酸(Trp)和半胱氨酸(Cys),说明 TM 致敏过程与树突状细胞的成熟无关。

Compute pI/Mw - Results

Theoretical pI/Mw (average)

Sequence:

```

10          20          30          40          50          60
MHHHHHHHMDA IKKKMQAMKL EKDNDMRAD TLEQQNKEAN NRAEKSEEEV HNLQKRMQQL

70          80          90          100         110         120
ENDLDQVQES LLKANIQLVE KDKALSNAEG EVAALNRRIQ LLEEDLERSE ERLNTATTKL

130         140         150         160         170         180
AEASQAADES ERMRKVLNRN SLSDEERMDA LENQLKEARF LAEEADRKYD EVARKLAMEV

190         200         210         220         230         240
ADLERAERA ETGESKIVEL EEELRVVGNN LKSLEVSEEK ANQREEAYKE QIKTLTNRKL

250         260         270         280         290
AAEAAEFAE RSVQKLQKEV DRLEDELVNE KEKYKSTIDE LDQTFSELSG YHHHHHH
  
```

Theoretical pI/Mw: 5.09 / 34626.37

图 8 重组 TM 氨基酸序列及其预测的理论等电点和相对分子质量

Figure 8 Recombinant TM amino acid sequence and its predicted theoretical PI and relative molecular weight

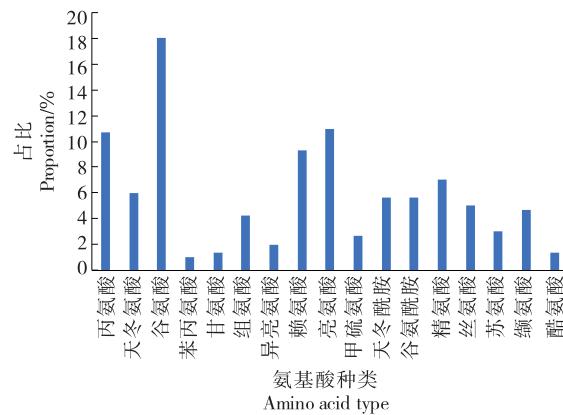


图 9 重组 TM 中氨基酸组成柱状图

Figure 9 Histogram for amino acid composition of recombinant TM

3 结论

该研究根据已知的凡纳滨对虾原肌球蛋白编码基因序列,合成了上下游引物,PCR 扩增了原肌球蛋白编码基因片段。基于 pET29a 表达载体构建了原肌球蛋白大肠杆菌异源表达体系,并成功实现了高浓度的原肌球蛋白重组蛋白可溶性诱导表达,缩短了诱导时间,提高了重组

原肌球蛋白生产效率。建立的凡纳滨对虾原肌球蛋白重组表达体系,可为对虾过敏分子诊断提供原料,对于进一步深入研究原肌球蛋白致敏机制具有重要的意义。但该研究对原肌球蛋白致敏的关键氨基酸仅作了初步探究,后续可通过转染、敲除等操作进一步确认原肌球蛋白致敏的关键氨基酸。

参考文献

- [1] XIE Y H, SHAO H M, HU X, et al. Characterization of systemic allergenicity of tropomyosin from shrimp (*Macrobrachium nipponense*) and anaphylactic reactions in digestive tract[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(7): 2 940-2 949.
- [2] LI X Y, HAN T, ZHENG S X, et al. Nutrition and functions of amino acids in aquatic crustaceans[J]. Advances in Experimental Medicina and Biology, 2021, 1 285: 169-198.
- [3] ZHAO J L, TIMIRA V, AHMED I, et al. Crustacean shellfish allergens: influence of food processing and their detection strategies[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(12): 3 794-3 822.
- [4] MUTHUKUMAR J, SELVASEKARAN P, LOKANADHAM M, et al. Food and food products associated with food allergy and food intolerance - an overview[J]. Food Research International, 2020, 138: 109780.
- [5] PRESTER L. Seafood allergy, toxicity, and intolerance: a review [J]. Journal of the American College of Nutrition, 2016, 35(3): 271-283.
- [6] NAIDU B C, MARILN XAVIER K A, SAHANA M D, et al. Temporal variability of microplastics in shrimp (*Litopenaeus vannamei*), feed, water and sediments of coastal and inland culture ponds[J]. Science of the Total Environment, 2025, 959: 178173.
- [7] CHUDOBA A, ŹEBROWSKA A, SYBILSKI A J. Tree nut allergy in children-what do we know? -a review[J]. Nutrients, 2024, 16(23): 3 978.
- [8] CHINNAPPAN R, ABDEL RAHAMN A, ALZABR R, et al. Aptameric biosensor for the sensitive detection of major shrimp allergen, tropomyosin[J]. Food Chemistry, 2020, 314: 126133.
- [9] ZHANG Z Y, LI X M, LI Z X, et al. Investigation of glycated shrimp tropomyosin as a hypoallergen for potential immunotherapy[J]. Food & Function, 2021, 12(6): 2 750-2 759.
- [10] ASTBURY W T, REED R, SPARK L C. An X-ray and electron microscope study of tropomyosin[J]. The Biochemical Journal, 1948, 43(2): 282-287.
- [11] HITCHCOCK-DEGREGORI S E, BARUA B. Tropomyosin structure, function, and interactions: a dynamic regulator[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2017, 82: 253-284.
- [12] CHENG J H, WANG H F, SUN D W. An overview of tropomyosin as an important seafood allergen: structure, cross-reactivity, epitopes, allergenicity, and processing modifications [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(1): 127-147.
- [13] RILEY T P, HELLMAN L M, GEE M H, et al. T cell receptor cross-reactivity expanded by dramatic peptide-MHC adaptability[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(10): 934-942.
- [14] HAMILTON R G, HEMMER W, NOPP A, et al. Advances in IgE testing for diagnosis of allergic disease[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: in Practice, 2020, 8(8): 2 495-2 504.
- [15] VALENTE R, KARAULOV A, NIEDERBERGER V, et al. Allergen extracts for in vivo diagnosis and treatment of allergy: is there a future? [J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice, 2018, 6(6): 1 845-1 855.
- [16] ROBERTS M A J. Recombinant DNA technology and DNA sequencing[J]. Essays in Biochemistry, 2019, 63(4): 457-468.
- [17] TREUDLER R, SIMON J C. Overview of component resolved diagnostics[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2013, 13 (1): 110-117.
- [18] NUGRAHA R, RUETHERS T, TAKI A C, et al. Recombinant tropomyosin from the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) for better diagnosis[J]. Foods, 2022, 11(3): 404.
- [19] AZEMI N F H, MISNAN R, KEONG B P, et al. Molecular and allergenic characterization of recombinant tropomyosin from mud crab *Scylla olivacea*[J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(10): 6 709-6 718.
- [20] ZHOU X, NIU Z Q, WU H F, et al. Novel β - γ' type lignans from cultivated *Notopterygium incisum* and their potential anti-inflammatory activity[J]. Industrial Crops and Products, 2025, 229: 120944.
- [21] 田阳, 饶欢, 薛文通. 花生致敏原 Ara h 1 的重组表达与纯化 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 20-28.
- [22] 刘甫. 过敏原原肌球蛋白的重组表达、纯化、鉴定及与 sIgE 的结合力分析[D]. 天津: 天津医科大学, 2021: 24-25.
- [23] LIU F. Recombinant expression, purification, identification of protomyosin and analysis of the ability of binding sIgE[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2021: 24-25.
- [24] 骆叶晴, 郑双艳, 孙耀斌, 等. 河虾过敏原原肌球蛋白的基因克隆与原核表达[J]. 食品科学, 2024, 45(13): 89-95.
- [25] LUO Y Q, ZHENG S Y, SUN Y B, et al. Gene cloning and prokaryotic expression of the allergen tropomyosin from *Macrobrachium nipponense*[J]. Food Science, 2024, 45(13): 89-95.

- [25] 周鹰, 吴美丽, 朱晗婷, 等. 过敏原Der p 23重组蛋白制备及其特异性IgE化学发光检测方法的建立[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(20): 2 491-2 494.
- ZHOU Y, WU M L, ZHU H T, et al. Preparation of recombinant protein Der p 23 and development of its specific IgE by chemiluminescence method[J]. Chinese Journal of Immunology, 2020, 36(20): 2 491-2 494.
- [26] 许萌萌, 黄萌萌, 王国栋, 等. 鸡NLRP3蛋白表达、多克隆抗体制备与初步应用[J]. 中国动物检疫, 2024, 41(7): 96-103.
- XU M M, HUANG M M, WANG G D, et al. Expression of chicken NLRP3 protein and preparation and application of its polyclonal antibodies[J]. China Animal Health Inspection, 2024, 41(7): 96-103.
- [27] 黄媛, 王艺磊, 张子平, 等. 日本囊对虾组织蛋白酶B基因的原核表达及纯化[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 86-92.
- HUANG Y, WANG Y L, ZHANG Z P, et al. Prokaryotic expression and purification of cathepsin B in shrimp, *Marsupenaeus japonicus*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(1): 86-92.
- [28] 颜龙飞, 张华, 肖钰薇, 等. 梨果实花青苷调控因子PyWRKY26蛋白表达分析[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2025, 48(2): 227-231.
- YAN L F, ZHANG H, XIAO Y W, et al. Expression analysis of anthocyanin transcription factor PyWRKY26 in pear fruits[J]. Journal of Hefei University of Technology (Natural Science), 2025, 48(2): 227-231.
- [29] 李响, 童婧莹, 张鑫薇, 等. 海藻酸钙固定化重组暗紫贝母PAL蛋白[J]. 中南农业科技, 2024, 45(7): 80-84.
- LI X, TONG J T, ZHANG X W, et al. Calcium alginate immobilized recombinant PAL protein of *Fritillifera* dark purple[J]. South-Central Agricultural Science and Technology, 2024, 45(7): 80-84.
- [30] BABIKER E E, AZAKAMI H, OGAWA T, et al. Immunological characterization of recombinant soy protein allergen produced by *Escherichia coli* expression system[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(2): 571-575.
- [31] GLENTING J, POULSEN L K, KATO K, et al. Production of recombinant peanut allergen Ara h 2 using *Lactococcus lactis* [J]. Microbial Cell Factories, 2007, 6(1): 28.
- [32] ROSANO G L, CECCARELLI E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 172.
- [33] HUI C Y, GUO Y, HE Q S, et al. *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides[J]. Microbiology and Immunology, 2010, 54 (8): 452-459.
- [34] FU L L, WANG J B, NI S Q, 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 and Food Chemistry, 2018, 66(11): 2 944-2 953.
- [35] XU L L, CHEN J, SUN L R, et al. Analysis of the allergenicity and B cell epitopes in tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and correlation to cross-reactivity based on epitopes with fish (*Larimichthys crocea*) and clam (*Ruditapes philippinarum*) [J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126763.
- [36] 郑雪明, 王浩, 印遇龙, 等. 氨基酸对食物过敏的调控机制研究进展[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(10): 2 079-2 084.
- ZHENG X Y, WANG H, YIN Y L, et al. Potential regulatory mechanism of amino acids on food allergy[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(10): 2 079-2 084.