

锯缘青蟹(*Scylla serrata*)特异性过敏原的研究*

宋益银¹ 林 蕾² 苏秀榕¹ 王春琳¹ 张春丹¹

(1. “应用海洋生物技术”教育部重点实验室 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211;

2. 宁波大学医学院附属医院 宁波 315020)

提要 采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,对锯缘青蟹肌肉中可溶性蛋白质进行分离,以过敏患者阳性血清和正常人阴性血清作对照,通过 Western blot 鉴定出分子量为 14.3kDa 的蛋白为锯缘青蟹的特异性过敏原。然后用 Sephadex G75 凝胶过滤层析和 DEAE-52 离子交换层析纯化出该过敏原,再经 MALDI-TOF/TOF-MS 检测,利用 Blastz 在线分析。结果表明,锯缘青蟹特异性过敏原为血蓝蛋白亚基,经 Clustal W 分析该蛋白的多肽片段序列与可口美青蟹、邓杰内斯蟹、加州龙虾、艾氏真蟹的血蓝蛋白亚基序列有很高的同源性,经 Prosite 数据库检索后发现肽段 1 和肽段 2 有酪氨酸磷酸化位点和蛋白激酶 C 磷酸化位点,是过敏原参与机体反应的重要活性位点。

关键词 锯缘青蟹过敏原, SDS-PAGE, 蛋白免疫印迹, 层析, 质谱分析

中图分类号 TS254

食物过敏是一种涉及免疫机制的不良食物反应,食物过敏的临床症状范围从轻度不适到需要立即医疗干预的严重或威胁生命的反应不等。食物是由蛋白、碳水化合物和脂肪组成的。其中的糖蛋白是最主要的食物过敏原。具有过敏原性糖蛋白的分子量约为 10—67kDa。它们具有水溶性、突出的热稳定性并且耐酸、耐蛋白水解酶的消化(Lemanske *et al*, 1987)。据估计,食物过敏患病率在成人中约为 1%—3%,在儿童中为 4%—6%(Matthias, 2001)。尽管很多食物都具有潜在的抗原性,但食物过敏反应是由小部分食物引起的。研究结果显示:93%的食物变态反应由鸡蛋、花生、牛奶、大豆、坚果、鱼类、甲壳类和小麦等 8 种食物引起(Leslie *et al*, 2004)。甲壳纲类动物是目前国际公认的 8 大类食物过敏原之一。锯缘青蟹(*Scylla serrata*)属十足目、短尾次目、梭子蟹科、青蟹属,肉质细嫩、味美,除鲜食外,还可制作罐头。9—10 月份是锯缘青蟹的高产期,也是过敏人群最易发病的时候。本研究以 10 月份的锯缘青蟹为研究对象,利用过敏患者的血清鉴定出了锯缘青蟹的特异性过敏原,以期为今后的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

锯缘青蟹购于宁波水产大世界, PVDF 膜购于 Bio-Rad 公司, 羊抗人 IgE-HRP 购自 Sigma 公司, 蛋白质分子量标准品购于 TaKaRa 公司, Sephadex G-75 购于 Amersham 公司; DEAE-52 购于 Whatman 公司。

1.2 方法

1.2.1 粗提液制备及电泳分离 取锯缘青蟹蟹肉 5g, 加入 pH 7.4 的 PBS 20ml。匀浆后静置 2h。4、15000g 离心 30min, 取上清液再次离心, 将第二次离心的上清液储藏于-20 冰箱中备用。采用不连续电泳系统, 其中分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%(汪家政等, 2000)。将蛋白质样品稀释到 2mg/ml(蛋白质浓度采用 Bradford 法测定), 加样量为 20 μ l, 考马斯亮蓝 R-250 染色, Bio-Rad 凝胶成像系统拍照。

1.2.2 人血清的制备 从宁波大学医学院附属医院皮肤科收集到典型的锯缘青蟹过敏病例, 具有过敏病史, 临床上检测特异性 IgE 重度升高。将血清分离后作为阳性血清, -20 冻存备用。同时收集了正常

* 浙江省重大科研项目, 2004C12029 号; 浙江省教育厅重点项目, 20051701 号; 浙江省重中之重学科资助项目, XK0613040 号。
宋益银, 硕士研究生, E-mail: g06b08320109@email.nbu.edu.cn

通讯作者: 苏秀榕, 教授, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-17, 收修改稿日期: 2008-01-29

人的血清作为阴性血清。

1.2.3 蛋白免疫印迹 剪取两条与电泳凝胶相同大小的聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜), 用100%甲醇润湿, 用电转移缓冲液平衡, 用湿转法将蛋白转印到PVDF膜上。转印后将膜用TBST(含0.1% Tween20的Tris缓冲液)漂洗, 置于封闭液(含3%牛血清白蛋白的TBST)中过夜, 然后分别加入过敏患者血清和正常人血清, 37℃ 孵育2h, 用TBST充分洗涤后加入羊抗人IgE-HRP, 37℃ 孵育2h, 用TBST充分洗涤后, 加入底物TMB显色, 扫描。

1.2.4 斑点杂交(dot blotting) 将PVDF膜剪成1cm×1cm方格, 用100%甲醇润湿, 点2μl蛋白于每个方格的中间, 室温晾干。用TBST(含0.1% Tween20的Tris缓冲液)漂洗, 置于封闭液(含3%牛血清白蛋白的TBST)中过夜, 然后分别加入过敏患者血清和正常人血清, 37℃ 孵育2h, 用TBST充分洗涤后加入羊抗人IgE-HRP, 37℃ 孵育2h, 用TBST充分洗涤后, 加入底物TMB显色, 扫描。

1.2.5 过敏源的纯化 采用Sephadex G-75凝胶层析, 将凝胶经过预处理后装入柱子, 用0.01mol/L PBS(pH 7.4)缓冲液平衡凝胶柱, 流速为1ml/min, 用FPLC纯化系统自动收集并在280nm下检测蛋白质吸收峰。将同一吸收峰的液体超滤浓缩, 用斑点免疫印迹法检验各吸收峰的过敏活性强弱。

将具有免疫活性的物质收集后进行DEAE-52离子交换层析。PBS缓冲液平衡, 上样后用PBS缓冲液冲洗, 0—1mol/L NaCl溶液线性洗脱, 流速1ml/min。FPLC纯化系统自动收集并在280nm下检测, 用点免疫印迹法检验各吸收峰的过敏活性强弱。

1.2.6 质谱检测及分析 将层析所得蛋白超滤浓缩后, 进行SDS-PAGE(12%分离胶, 5%浓缩胶), 考马斯亮蓝G-250染色, 脱色, 将目的蛋白条带切成胶粒, 用含50%乙腈的50mmol/L碳酸氢铵溶液脱色20min, 移去其中的溶液, 重复两次。乙腈100μl浸泡10min, 去乙腈后37℃ 烘5—10min, 使胶完全干燥(Richard, 2006)。将干燥胶粒用胰蛋白酶水解后用4700串联飞行时间质谱仪进行质谱分析, 激光源为355nm波长的Nd:YAG激光器, 加速电压为20kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。PMF质量扫描范围为700—3500kDa, 且强度最大的5个峰进行串级质谱分析, 肌红蛋白(myoglobin)酶解肽段为外标校正。所得质谱图用NCBI数据库进行检索。

2 结果

2.1 蛋白的分离

蛋白粗提液经12% SDS-PAGE, 结果如图1所示, 锯缘青蟹蛋白分子量主要介于10—200kDa之间, 其中在14.3kDa、40kDa和70kDa左右的蛋白带宽、色深, 含量丰富。

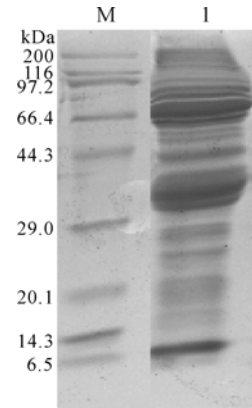


图1 锯缘青蟹蛋白粗提液的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 The SDS-PAGE profile of protein extracts from *S. serrata*
M: 蛋白质分子量标准; 1: 锯缘青蟹蛋白

2.2 免疫印迹

选用对锯缘青蟹过敏患者的阳性血清和正常人的阴性血清, 分别做Western Blot, 结果如图2所示, 在14.3kDa左右有明显的条带出现。而阴性血清并没有明显的条带出现。

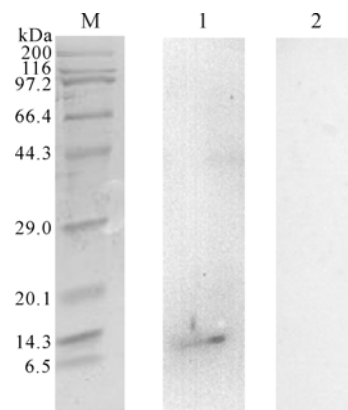


图2 锯缘青蟹蛋白粗提液的 Western Blot 图谱

Fig.2 The Western Blot profile of *S. serrata*
M: 蛋白质分子量标准; 1: 阳性血清; 2: 阴性血清

2.3 特异性抗原纯化

粗提液经Sephadex G-75凝胶层析, 以pH 7.4的PBS缓冲液1ml/min进行洗脱, 每个试管收集3ml, 在280nm下监测吸光值。共得到两个分离明显的洗

脱峰 和峰 ，多次层析的洗脱峰分别收集、浓缩进行检验。斑点杂交的结果显示峰 具有强的过敏活性。将有过敏活性的试管合并在一起，进行进一步的纯化。

将凝胶层析分离的峰 收集浓缩后，经 DEAE-52 离子交换柱层析，以 0.01mol/L PBS 缓冲液平衡，以 0—1mol/L NaCl 线性梯度洗脱，流速为 1ml/min，每个试管收集 3ml，在 280nm 下监测吸光值，共得到 3 个峰。其中峰 为未结合在离子交换柱上，直接被洗脱下来的，后两个峰 和 没有完全分开。斑点杂交的结果显示，峰 有较强的过敏活性。电泳结果显示，峰 中有目的蛋白片段(图 3)。

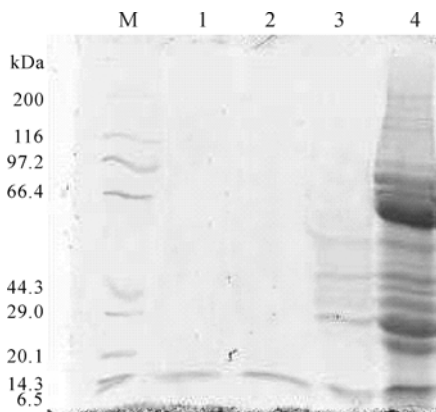


图 3 纯化后蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE analysis on purified protein
M: 蛋白质分子量标准; 1、2: 峰 ; 3: 峰 ; 4: 粗提液

2.4 质谱分析

目的蛋白片段经 MALDI-TOF/TOF-MS 分析后，所得结果用 GPS (Applied Biosystems)-MASCOT 进行数据库检索，所得结果见图 4、图 5。

从一级质谱图中选择强度较高的肽段进行串联质谱分析，选择 m/z 为 1207.63、1742.92、1784.98 所得的 MS/MS 谱图，经 Data Explorer 处理和 Mascot 软件得到序列分析结果，3 个肽段的氨基酸序列分别为：

肽段 1-(MS1207.63) :

NH₂-HWFSLFNTR;

肽段 2-(MS1742.92) :

NH₂-GESFFWVHHQLTVR;

肽段 3-(MS1784.98) NH₂-FALPPGVLEHFETATR.

2.5 同源性分析

根据图 5 中的血蓝蛋白亚基序列用 Clustal W 软件进行多序列比较，用 MEGA 3.1 软件 Neighbor-Joining(N-J)方法，构建的系统进化关系见图 6。

2.6 活性位点分析

通过 Prosite 研究发现肽段序列中共有两个位点：

酪蛋白激酶 磷酸化位点：

[ST] - x(2) - [DE]

[S or T : the phosphorylation site]

NH₂-hwfslfnTRGESffwvhhqltvr

蛋白激酶 C 磷酸化位点：

[ST] - x - [RK]

[S or T : the phosphorylation site]

NH₂-gesffwvhhqlTVR

3 讨论

3.1 过敏原的分离、纯化

锯缘青蟹蛋白质粗提液通过蛋白免疫印迹方法，发现分子量为 14.3kDa 的蛋白是特异性过敏原。Daul 等(1993, 1994)、Leung 等(1994)、Shanti 等(1993)鉴定出虾中的主要过敏原是分子量 36kDa 的原肌球蛋白，

1	MKLLLLCALV	AGASAWPNFG	MMADSPGGAS	NAQKQHDVNS	ILWKVVEEIR
51	DPHLKELSQS	FDPLSGHYDD	DGVAAKRLMK	ELNDHRLLEQ	KHWFSLFNTR
101	QREEALMLYD	VLEHSTDWET	FAGNAAYFRV	RMNEGEFVYA	IYAAV IHSPL
151	TEHVLPPLY	EVTPLHFTNS	EVIQAAYKAK	MTQTASKIKS	HFTGSKSNPE
201	QRVAYFGEDI	GMNTHHVTWH	LEFPFWDDSD	HENHHINRKG	ESFFWVHHQL
251	TVRFDAERLS	NYLDPVDELH	WDDMIHEGFA	PHTMYKGGY	FPSRPDQVNF
301	EDVDGVARVR	DMLILESRI	DAIAHGYPFTG	RDGSVISIRD	AHGIDILGVD
351	IESSTYSPNP	EYYSGLHNTA	HVMLGRQGD	HGKFALPPGV	LEHFETATRD
401	PAFFRLHKYM	DNIFREHKDS	LTPYTKDDLE	FSGISVDSL	ISNRLETHFE
451	DYEYSLINGV	DDTVDLVDP	ISTVVSRLTH	NDFKVKIGIT	NSQNHVFLAT
501	VRIFAWPKYD	NNHVEFSFNE	GRWNAIELAK	FWTKLNSGSN	I IERSSKDFG
551	VTVPDVPSFQ	TLMDMTDEAL	GSGSALHLED	YESGLGLPDR	FLLPKGKTEG
601	MDHFVVVFS	DGAKDAAVDG	LHESTYNYHY	GCHDGTYPDN	QPHGYPLDRR
651	VDDERIITGV	SNFKAVDVKV	YHVEDH		

图 4 纯化蛋白 MALDI-TOF/TOF-MS 鉴定结果

Fig.4 Identification of the purified protein by MALDI-TOF/TOF-MS
注：黑体部分为匹配到的多肽片段

登入号	分子量	得分值	描述结果
1. gi 7582388	77055	314	hemocyanin subunit 4 [Callinectes sapidus]
2. gi 57901145	77045	129	hemocyanin subunit 4 [Cancer magister]
3. gi 57901147	76976	108	hemocyanin subunit 5 [Cancer magister]
4. gi 122797	75826	102	Hemocyanin C chain
5. gi 478611	75826	102	hemocyanin chain c - California spiny lobster
6. gi 56728077	77184	98	hemocyanin subunit 6 [Cancer magister]
7. gi 33146279	357709	86	polyprotein [Turnip mosaic virus]
8. gi 56748935	74988	85	Hemocyanin subunit 2 (CaeSS2)
9. gi 114217195	357572	81	polyprotein [Turnip mosaic virus]
10. gi 21244827	101007	79	DNA polymerase I [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]

图 5 锯缘青蟹 14.3kDa 纯化蛋白生物信息学比较结果

Fig.5 Bioinformatic analysis on the purified 14.3kDa protein from *Scylla serrata*

之后又有人发现原肌球蛋白也是其它甲壳纲动物如龙虾、蟹中的主要过敏原(Leung *et al*, 1998a, b; Mykles *et al*, 1998)。而赵绮华等(2005)鉴定梭子蟹中主要致敏组分是 74.4kDa 和 48.7kDa, 次要致敏组分的分子量为 89.1kDa、33.7kDa 和 29.2kDa。Shiomi 等(2008)从斑节对虾中纯化出分子量为 20kDa 的蛋白质, 经氨基酸序列鉴定为肌浆钙离子结合蛋白。上述研究都表明甲壳纲动物含多种致敏组分, 随着技术的进步, 越来越多的过敏原被发现, 其分子量集中在 16—166kDa 之间。本研究中发现的锯缘青蟹 14.3kDa 特异性过敏原与以往的研究都不相同, 作者认为这可能与研究的蟹品种不同、受试者人群不同有关。

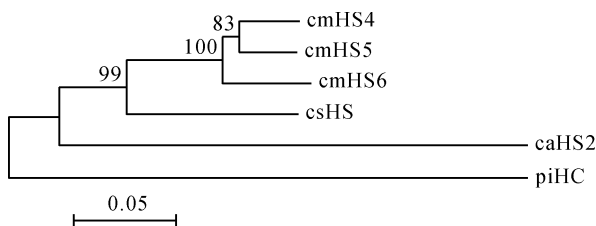


图 6 纯化蛋白系统进化树构建结果

Fig.6 The phylogenetic tree constructed by the purified protein

cmHS4: 血蓝蛋白亚基 4(邓杰内斯蟹 *Cancer magister*);
cmHS5: 血蓝蛋白亚基 5(邓杰内斯蟹); cmHS6: 血蓝蛋白亚基 5(邓杰内斯蟹); csHS: 血蓝蛋白亚基(可口美青蟹 *Callinectes sapidus*);
caHS2: 血蓝蛋白亚基 2(艾氏真蟹 *Carcinus aestuarii*);
piHC: 血蓝蛋白 C 链(加州龙虾 *Panulirus interruptus*)

3.2 质谱分析鉴定

纯化出的 14.3kDa 的蛋白为血蓝蛋白亚基, 相对分子量为 77.055kDa, 等电点为 5.26。质谱分析结果显示: 三条肽段序列与来自不同种属的血蓝蛋白进行多序列分析, 发现有很高的同源性, 结合活性位点分析, 得出肽段 1 和肽段 2 的两个活性位点, 分别为肽段 1 和肽段 2 之间的酪蛋白激酶 C 磷酸化位点(TRGE)和肽段 2 在 C 端的蛋白激酶 C 磷酸化位点(TVR), TRGE 和 TVR 在血蓝蛋白亚基中是高度保守的序列。血蓝蛋白系统进化分析结果可以看出, 血蓝蛋白的各个亚基之间进化关系接近, 不同种之间的同源性极高, 甚至达到 99%。

血蓝蛋白是节肢动物和软体动物的血淋巴中一种含氧时呈蓝色的物质。它分子为 75kDa, 其中第二域为 α 螺旋区, 整合一对 Cu⁻, 可结合一个 O₂; 下方为第三域, 由 β 折叠块构成并含有 Ca 离子(吕宝忠等, 2003)。本实验中纯化的过敏原片段大约为 14.3kDa

左右, 很可能为血蓝蛋白三级结构的其中一个域。目前还没有人报道甲壳纲动物的过敏原与血蓝蛋白的相似性。但 Chii 等(1996)从美洲大蠊(*Periplaneta americana*)中克隆出两个主要过敏原的 cDNA 序列, 编码成氨基酸序列后发现与节肢动物的血蓝蛋白氨基酸序列具有很高的相似性。Chapman 等(1998)也从美洲大蠊中发现过敏原 Per a 3 与血蓝蛋白具有很高的同源性。Weller 等(1985)将腹足纲血蓝蛋白免疫过敏性哮喘病人, 发现其中的 IgE 水平明显升高。可以看出血蓝蛋白可能是软体动物的过敏原之一, 目前还没有甲壳纲动物过敏原与血蓝蛋白的相关报道, 但是 Wu 等(1996)报道甲壳纲动物与软体动物具有交叉过敏原, 作者推断, 血蓝蛋白很可能也是甲壳纲动物的一种过敏原。

Lee 等(2007)通过分子克隆表达出莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的主要过敏原小白蛋白, 通过氨基酸序列分析其中有一个蛋白激酶 C 磷酸化位点和五个酪蛋白激酶 C 磷酸化位点。Chiou 等(2000)、Diraphat 等(2003)都在重组美洲大蠊的过敏原 Per a 1, 发现是一种跨膜蛋白, 其中有酪蛋白激酶 C 磷酸化位点, 主要进行线粒体能量转移。Katsumi 等(1999)研究显示组胺 H1 受体(H1R)的第三细胞内环有几个潜在的蛋白激酶 C 磷酸化位点, 并且发现组胺 H1 受体介导的信号级联放大作用被佛波酯诱导的蛋白激酶 C 所抑制。组胺是过敏原进入机体后与致敏靶细胞结合后释放的生物活性介质之一, 表明蛋白激酶 C 磷酸化位点和酪蛋白激酶 C 磷酸化位点很可能都是过敏原参与机体反应的重要活性位点。

综上所述, 肽指纹图谱、串联质谱及蛋白质数据库分析证明本文中分离纯化出的 14.3kDa 蛋白很可能是血蓝蛋白其中一域。本研究针对中锯缘青蟹过敏病人血清分离纯化出特异性过敏原, 经鉴定可能为血蓝蛋白亚基, 为进一步控制和预防蟹类等食物过敏以及探讨过敏性疾病更安全、有效的诊断和治疗方法提供理论基础。

参 考 文 献

- 吕宝忠, 杨 群, 2003. 血蓝蛋白分子的结构、分类及其在进化上的演变. 自然杂志, 25(3): 180—183
汪家政, 范 明, 2000. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 82
赵绮华, 赖 荷, 陈丽金等, 2005. 梭子蟹过敏原致敏组分的分析研究. 广西医学, 27(7): 980—981
Leslie C G, Paul A G, 2004, 顾瑞金译. 帕特森变态反应性疾病

- (Patterson's allergic diseases). 北京: 人民卫生出版社, 243
- Richard J S, 何大澄主译, 2006. 蛋白质与蛋白质组学实验指南(Proteins and proteomics: a laboratory manual). 北京: 化学工业出版社: 437—440
- Chapman M D, Vailes L D, Arruda L K *et al*, 1998. Source characterization and molecular structure of cockroach allergens. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 38(10): 842—845
- Chii H W, Mey F, Lee S C *et al*, 1996. Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(30): 17937—17943
- Chiou Y Y, Jen D W, Chii H W, 2000. Sequence analysis of the first complete cDNA clone encoding an American cockroach Per a 1 allergen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 6: 153—158
- Daul C B, Morgan J E, Lehrer S B, 1993. Hypersensitivity reactions to crustacea and mollusks. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 11(2): 201—222
- Daul C B, Slattery M, Reese G *et al*, 1994. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) as the muscle protein tropomyosin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 105: 49—55
- Diraphat P, Sookrung N, Chaicumpa W, 2003. Recombinant American cockroach component, Per a 1, reactive to IgE of allergic Thai patients. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 21(1): 11—20
- Katsumi F, Kazumi O, Kenji K *et al*, 1999. Identification of protein kinase C phosphorylation sites involved in phorbol ester-induced desensitization of the histamine H1 receptor. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 55: 735—742
- Lee S J, Ju C C, Chu S L *et al*, 2007. Molecular cloning, expression and phylogenetic analyses of parvalbumin in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(1): 51—61
- Lemanske R F Jr, Taylor S L, 1987. Standardized extracts foods. *Allergy*, 5:23—36
- Leung P S, Chu K H, Chow W K *et al*, 1994. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 92:837—845
- Leung P S, Chen Y C, Gershwin M R *et al*, 1998a. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102: 847—852
- Leung P S, Chen Y C, Mykles D L *et al*, 1998b. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7: 12—20
- Matthias Besler, 2001. Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, 20(11): 662—672
- Mykles D L, Cotton J L, Taniguchi H *et al*, 1998. Cloning of tropomyosins from lobster (*Homarus americanus*) striated muscles, fast and slow isoforms may be generated from the same transcript. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 19: 105—115
- Shanti K N, Martin B M, Nagpal S *et al*, 1993. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes. *Immunology*, 151: 5354—5363
- Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S *et al*, 2008. Sarcoplasmic calcium-binding protein: Identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 146(2): 91—98
- Weller F R, Kallenberg C G, Jansen H M *et al*, 1985. The primary immune response in bronchial asthma, a kinetic study of helix pomatia hemocyanin-specific IgE, IgE, IgA, and IgM antibody responses in patients with asthma and in matched controls. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76(1): 29—34
- Wu C H, Lee M F, Liao S C *et al*, 1996. Sequence analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. Homology with insect hemolymph proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30): 17937—17943

THE SPECIFIC ALLERGENS IN CRAB *SCYLLA SERRATA*

SONG Yi-Yin¹, LIN Lei², SU Xiu-Rong¹, WANG Chun-Lin¹, ZHANG Chun-Dan¹

(1. Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Affiliated Hospital of Medical School, Ningbo University, Ningbo, 315020)

Abstract To study the specific allergen in crab *Scylla serrata*, soluble protein from the muscle of *S. serrata* was extracted, and then separated by SDS-PAGE. With the positive and negative sera of anaphylactic patients, the special allergen was identified with the Western Blot, showing that the 14.3kDa was the specific allergen. The protein of 14.3kDa was then analyzed by gel filtration in ion exchange chromatography, and the MALDI-TOF/TOF-MS search on the Internet. The results indicate that the protein was hemocyanin subunit. Compared the peptide fragments from *S. serrata* and the hemocyanin subunit from *Callinectes sapidus*, *Cancer magister*, *Panulirus interruptus* and *Carcinus aestuarii* by Clustal W analysis, the protein of allergen from *S. serrata* was very similar to the hemocyanin subunit. Furthermore, prosite search showed that the peptide fragments contained casein kinase phosphorylation site and protein kinase C phosphorylation site. Both were the important active sites involved in allergic reaction.

Key words Specific allergen of *Scylla serrata*, SDS-PAGE, Western Blot, Chromatography, Mass spectrometry