

文章编号: 1674-5566(2024)02-0389-09

DOI: 10.12024/jsou.20230304124

## 甲壳类和贝类原肌球蛋白的广谱单克隆抗体制备与鉴定

陆佳达<sup>1,2,3</sup>, 栾宏伟<sup>1,2,3</sup>, 闫艺方<sup>1,2,3</sup>, 施文正<sup>1,2,3</sup>, 卢 瑛<sup>1,2,3</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)

**摘要:** 原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)被认为是甲壳类和贝类的主要过敏原,为了应对与日俱增的甲壳类和贝类过敏风险,以凡纳滨对虾的TM富集液为抗原免疫BALB/c小鼠,通过杂交瘤细胞融合技术筛选获得1株凡纳滨对虾过敏原TM的单克隆抗体细胞株2F8,并利用ELISA、Western blot、生物信息学等方法对2F8单抗进行免疫学特性分析,确定其效价、特异性、抗体亚型、结合区域,以TM的特异性单抗2F8和兔多抗构建双抗夹心胶体金试纸条分析单抗2F8的应用可行性。结果显示,单抗2F8的抗体亚型为IgG<sub>1</sub>型、效价为 $1.28 \times 10^5$ ,抗体与TM抗原的IC<sub>50</sub>值为20.21,亲和力高;纯化的单抗2F8可以特异性识别甲壳类、贝类和鱿鱼的主要过敏原TM,存在3个潜在的TM抗原结合区域AA<sub>0-31</sub>, AA<sub>38-43</sub>和AA<sub>58-67</sub>。制备的试纸条检测结果显示,该试纸条可在10 min内目测5 ng/mL的凡纳滨对虾TM(相当于12.5 μg/kg),且可用于甲壳类和贝类肌肉中TM的检测,研究表明所制备的2F8单抗亲和力高,可用于虾蟹贝和鱿鱼中的过敏原TM的鉴定与检测,具有较好的应用价值。本研究为过敏原TM的鉴定和检测提供了重要生物材料,也为今后TM的快速检测试剂盒开发提供了技术支持。

**关键词:** 原肌球蛋白; 单克隆抗体; 凡纳滨对虾; 甲壳类; 贝类

**中图分类号:** TS 254.1 **文献标志码:** A

随着人们对健康生活和饮食结构的重视,甲壳类和贝类水产品因其营养丰富、味道鲜美受到消费者的青睐。据2022年中国渔业年鉴统计,2021年全国水产品总产量为6 690.29万t,同比增长2.16%;其中,甲壳类和贝类产量为2 428.08万t,占总产量的36.44%。伴随着庞大的水产品消费市场,甲壳类和贝类水产品的过敏风险也在增加。在全球范围内,甲壳类和贝类过敏已经影响到总人口的0.5%~2.5%。原肌球蛋白(Tropomyosin, TM)是肌肉收缩过程中重要的调节蛋白质,但也是甲壳类和贝类的主要过敏原,分子量为34~39 ku;研究<sup>[1-2]</sup>发现甲壳类和贝类中的TM氨基酸序列具有高度保守性,经常发生交叉反应。而目前全球对于TM引起的甲壳类和贝类过敏尚无特效疗法,患者避免摄入过敏食物、减少过敏原的接触是最有效的防治方法。由于

皮肤接触或吸入烹饪和加工过程中产生的气溶蛋白同样会引发过敏<sup>[3-5]</sup>,为保障过敏患者的食用安全,除了必要的食品标签警示之外<sup>[5]</sup>,食品中过敏原成分的精准、特异性检测也非常重要<sup>[6]</sup>。

目前食品中过敏原的检测方法主要有免疫学分析法、质谱分析技术和基于基因的检测方法,其中免疫学分析是当前食品过敏原检测中应用最为广泛的一种方法,其检测原理主要是基于抗原抗体间的特异性反应。如酶联免疫吸附分析法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),通过抗原抗体间的特异性作用,再结合酶与底物间的显色反应,实现了过敏原的高灵敏、高特异性定量检测<sup>[7]</sup>。近年来,免疫印迹<sup>[8-9]</sup>、免疫层析法<sup>[10]</sup>及在此基础上发展起来的生物传感器<sup>[11]</sup>和蛋白质芯片<sup>[10]</sup>技术也应用于食物过敏原的检测。免疫学分析

收稿日期: 2023-03-23 修回日期: 2023-05-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32172324);国家重点研发计划项目(2019YFD0902003)

作者简介: 陆佳达(1998—),男,硕士研究生,研究方向为水产品过敏原。E-mail: Lisle1806195708@outlook.com

通信作者: 卢 瑛, E-mail: y-lu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

法的灵敏度和准确度通常取决于所用抗体的亲和力和特异性,因此,高亲和力和特异性的抗体是食品中过敏原的精准和痕量检测的前提所在。

为了获取甲壳类和贝类主要过敏原原肌球蛋白的特异性抗体,本研究以凡纳滨对虾的TM富集液为抗原免疫BALB/c小鼠,利用杂交瘤融合技术结合有限稀释法制备单克隆抗体,对纯化的TM单克隆抗体的效价和亚型、亲和力、抗原结合位点进行了分析,并以纯化的TM单抗和兔多抗构建了双抗夹心胶体金试纸条,探讨了所制备的单抗对TM的特异性检测应用可行性。本研究可为甲壳类和贝类主要过敏原TM的鉴定和检测提供生物材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

实验材料:500 g 克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)、口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、方形马珂蛤(*Mactra quadrangularis*)、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、寻氏肌蛤(*Musculus senhousi*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、巴沙鱼(*Pangasius bocourti*)、白鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)、中国枪乌贼(*Loligo chinensis*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)、猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉购自上海浦东新区古棕路菜市场;BALB/c小鼠购自上海捷思捷实验动物有限责任公司;兔抗TM多克隆抗体(TM-R2)为实验室前期制备;商品化单克隆抗体5C1购自江南大学。

主要试剂与仪器:RPMI1640培养液、胎牛血清购自Thermo Fisherscientific公司;HAT培养基、HT培养基、聚乙二醇、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自Sigma公司;非预染蛋白质Marker和预染蛋白质Marker购自美国Thermo Fisherscientific公司;TMB显色液、ECL显色液、HRP-羊抗兔IgG、HRP-羊抗鼠IgG购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PD-10脱盐柱、

Protein-G亲和层析柱购自英国GE Healthcare公司;其他试剂和药品(分析纯)购自中国国药集团化学试剂有限公司。AD500S-H均质机来自上海昂尼仪器仪表有限公司;Mini protean 4蛋白质电泳仪来自美国BIO-RAD公司;AE-8135半干式转膜仪来自日本ATTO公司;Z36HK高速冷冻离心机来自德国HermlmLe公司。

### 1.2 甲壳类和贝类主要过敏原原肌球蛋白的提取和富集

参照肖叶等<sup>[6]</sup>的方法,分别将克氏原螯虾、口虾蛄、刀额新对虾、斑节对虾、凡纳滨对虾、太平洋牡蛎、方形马珂蛤、菲律宾蛤仔、寻氏肌蛤、栉孔扇贝、缢蛏、三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、巴沙鱼、白鲢鱼、大西洋鳕鱼、中国枪乌贼、大西洋鲑、杂色鲍、猪、牛、鸡和羊肉的肌肉搅碎并加入冷丙酮,抽提至丙酮溶液呈无色状,将沉淀物低温风干并向其中加入含0.5 mmol/L DTT的磷酸盐-吐温缓冲液(Phosphate buffered saline-tween, PBST),匀浆煮沸并6 000 r/min离心35 min后向上清液中加入45%硫酸铵溶液,待硫酸铵全部溶解后6 000 r/min离心35 min收集沉淀。将沉淀用PBS溶解并透析48 h,得到TM富集液样品。

### 1.3 凡纳滨对虾原肌球蛋白的单克隆抗体制备

#### 1.3.1 小鼠免疫及杂交瘤细胞培养

参照张成赛等<sup>[12]</sup>的方法稍作修改。将5周龄的雌性BALB/c小鼠暂养一周后,每隔7 d取制备的TM(50 μg)与等体积的弗氏完全佐剂/弗氏不完全佐剂混匀乳化,对BALB/c小鼠(0.2 mL/只)进行腹腔注射。第一次免疫使用弗氏完全佐剂乳化,且与第2次免疫间隔14天,从第2次免疫开始均用弗氏不完全佐剂乳化,共免5次。免疫3 d后取血,通过间接ELISA测定血清效价,融合前3天进行尾部静脉加强免疫。加强免疫后处死小鼠取小鼠脾细胞;再与小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)利用无菌PEG1500进行细胞融合,并将融合后形成的杂交瘤细胞置于HAT培养基中,在37℃的5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,当细胞数量达到孔底面积2/3时,取细胞培养上清进行间接ELISA检测。

#### 1.3.2 阳性杂交瘤细胞株的筛选与克隆

利用间接ELISA的方法来筛选阳性杂交瘤细胞,一抗为融合细胞上清,稀释的免疫小鼠血清作为阳性对照,SP2/0细胞上清作为阴性对照,

检测结果为阳性的孔转入 24 孔板扩大培养后再进行克隆,待 24 孔板中的阳性孔长至孔底 3/4 时,利用有限稀释法将阳性杂交瘤细胞稀释并置于 HT 培养基中,在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞长至孔底 2/3 时,进行间接 ELISA 检测。将检测呈阳性的孔进行扩大培养然后第 2 次克隆。

### 1.3.3 单克隆抗体的大量制备与纯化

选取雌性 BALB/c 小鼠(5~6 周龄),饲养 7 d 后,腹腔注射 500 μL 不完全弗氏佐剂;将 1.5×10<sup>6</sup> TM 的特异性单克隆细胞株 2F8(2F8)注射到小鼠腹腔,待小鼠腹部发生明显肿胀时(7~12 d),采集腹水;腹水在 4 °C、3 000 r/min 离心 15 min 取上清,利用 PD-10 脱盐柱脱盐后,通过 Protein-G 亲和层析柱纯化单克隆抗体,置于 -80 °C 条件下保存,并通过间接 ELISA 法测定纯化抗体的效价。

### 1.4 SDS-PAGE 和免疫印记 Western blot

根据 LAEMMLI<sup>[7]</sup> 的方法进行 SDS-PAGE,其分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。电泳胶经考马斯亮蓝染色液染色,然后脱色至蛋白条带清晰。

Western blot 分析是将电泳胶在 200 mA 下转膜 20 min,转膜后置于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。用 PBST 洗涤 3 次后,将 2F8 单抗(20 ng/mL)或商品化单抗 5C1(1:20 000)作为一抗,羊抗鼠 HRP-IgG 抗体(1:2 500)作为二抗,洗涤后用 ECL 显色。

### 1.5 间接 ELISA

用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲溶液(pH 9.6)将 TM 稀释至 5 μg/mL 并加入 96 孔板中(100 μL/孔),4 °C 包被过夜。PBST 洗涤 3 次后加入 5% 脱脂奶粉(200 μL/孔),37 °C 孵育 2 h。加入 100 μL 的不同样品,37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次后加入 100 μL HRP-羊抗鼠 IgG(1:2 500)作为二抗,37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后加入 100 μL TMB 显色液反应 15 min,最后加入 50 μL 2 mol/L 的浓硫酸终止反应,在酶标仪上读取 450 nm 处 OD 值。

### 1.6 单克隆抗体的免疫学特性分析

#### 1.6.1 抗体效价及亚型测定

2F8 单抗的效价通过间接 ELISA 测定,首先通过棋盘滴定法将富集到的 TM 稀释为 20、10、5、1、0.1 μg/mL 包被于 96 孔板上,以梯度稀释的单抗为一抗,确定抗原最佳包被浓度。然后采用最

佳抗原包被浓度,以倍比稀释后的单抗作为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗,以 PBS 作为一抗的孔记为阴性对照(OD<sub>0</sub>),各实验孔记为 OD<sub>i</sub>,以 OD<sub>i</sub> / OD<sub>0</sub> ≥ 2.1 所对应的稀释比作为效价检测结果。抗体亚型则通过 IsoStrip™ 小鼠单克隆抗体分型试剂盒进行检测。

#### 1.6.2 相对亲和力分析

采用间接 ELISA 法分析 2F8 单抗与抗原间的相对亲和力,抗原浓度为 1 μg/mL,以 2F8 抗体浓度的对数为横坐标,以对应 OD<sub>450</sub> 为纵坐标作 ELISA 反应曲线,计算半数 OD 值对应的抗体浓度(IC<sub>50</sub>)作为抗体的相对亲和力。

#### 1.6.3 抗体的特异性及其与抗原的结合位点分析

利用 Western blot 分析抗体与 5 种虾、2 种蟹、7 种贝、4 种鱼、1 种鱿鱼以及猪、牛、羊、鸡的 TM 样品的特异性作用。进一步针对 2F8 可特异性识别的 11 种虾蟹贝类 TM,从 NCBI 数据库下载一级氨基酸序列并利用 Jalview 软件进行多序列比对、分析同源性,以确定 2F8 单抗与凡纳滨对虾 TM 的潜在结合位点,并通过 SWISS-MODEL 对凡纳滨对虾 TM 进行同源建模(PDB ID: 7utl.1.S 序列重叠率: 57.04%),通过 PyMol 软件进行渲染。

### 1.7 TM 的双抗夹心胶体金试纸条的构建和检测

免疫层析试纸条构建参考 LU 等<sup>[13]</sup> 的方法,以 PBS 稀释的 0.75 mg/mL 2F8 单抗作为 T 线包被物,0.3 mg/mL 的 HRP-羊抗兔 IgG 作为 C 线包被物构建试纸条。将兔多抗 TM-R2 与胶体金混合均匀形成的金纳米颗粒作为检测探针,将凡纳滨对虾 TM 用 PBS 稀释至 0、1、5、10、20、50、100、200、500、1 000、2 000 ng/mL 进行检测并读取 T 线灰度值,拟合线性曲线并计算定量检出限。然后将斑节对虾、刀额新对虾、梭子蟹、中华绒螯蟹、太平洋牡蛎、菲律宾蛤仔肌肉分别搅碎并加入冷丙酮,待沉淀物风干后加入含 0.5 mmol/L DTT 的 PBST,煮沸后将蛋白粗提液稀释并进行检测。

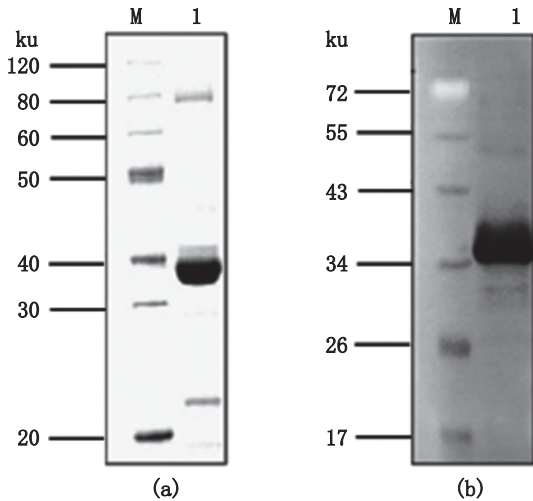
## 2 结果与讨论

### 2.1 凡纳滨对虾原肌球蛋白的提取和富集

图 1 为凡纳滨对虾蛋白富集液样品的



SDS-PAGE 图谱,可以明显看到,样品在 35 ku 附近处的蛋白条带很粗,研究<sup>[14]</sup>表明甲壳类和贝类的 TM 分子量为 32~38 ku, Western blot 结果显示该条带可以与 TM 的商品化单克隆抗体(5C1)发生特异性反应。因此,35 ku 附近处的蛋白被鉴定为凡纳滨对虾的过敏原 TM。



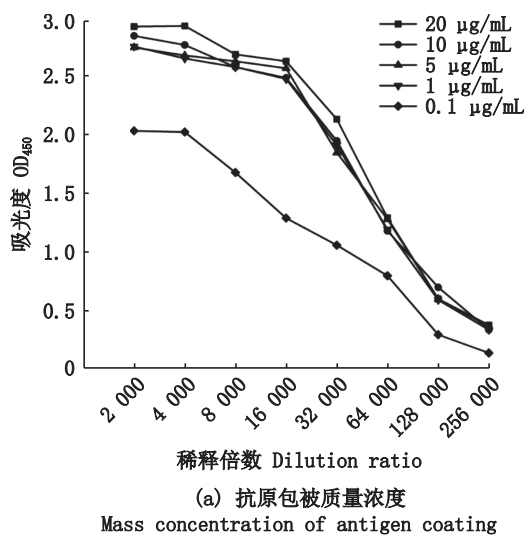
M. 标准物质;1. 凡纳滨对虾蛋白富集液。  
M. Marker;1. Protein enrichment solution of *Litopenaeus vannamei*.

图1 凡纳滨对虾蛋白富集样品的电泳(a)和免疫印迹(b)分析

Fig. 1 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of protein-enriched samples of *Litopenaeus vannamei*

## 2.2 单克隆抗体效价与亚型测定

采用间接 ELISA 分析 2F8 抗体效价,结果如图 2a 所示,当包被抗原为 20、10、5、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,稀



(a) 抗原包被质量浓度  
Mass concentration of antigen coating

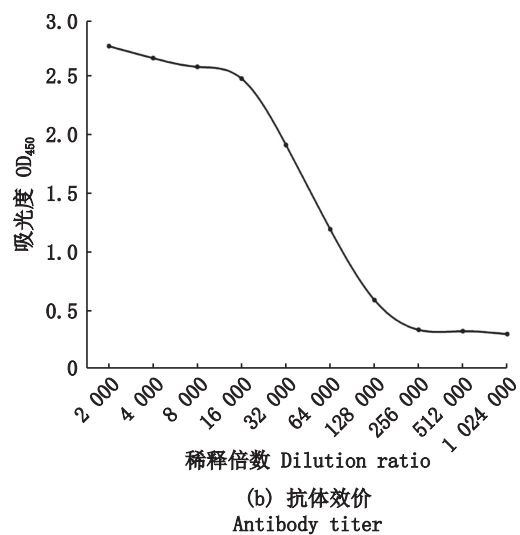
度稀释的单抗 2F8 的吸光度变化曲线非常接近,考虑到成本问题,故确定最佳抗原包被质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由图 2b 可见,随着抗体稀释倍数的增加,样本吸光度值下降。当阳性抗体的稀释倍数大于  $1.28 \times 10^5$  时,其信噪比小于 2.1 ( $P/N < 2.1$ ),因此,单抗 2F8 的效价定为  $1.28 \times 10^5$ 。本研究制备的 2F8 单克隆抗体效价高于黄建芳等<sup>[15]</sup>报道的河虾 TM 特异性单克隆抗体。IsoStrip 小鼠单克隆抗体分型鉴定结果显示 2F8 单克隆抗体亚型为  $\text{IgG}_1$  型。

## 2.3 抗体相对亲和力分析

高亲和力的抗体在较低浓度下即可与抗原形成牢固结合,能够有效提升后续免疫分析检测的灵敏度。结果如图 3 所示。单克隆抗体相对亲和力曲线为  $y=2.68-2.41/[1+(x/20.21)^{1.94}]$ ,  $R^2=0.9998$ ,经方程拟合得到  $\text{IC}_{50}$  值为 20.21。说明单抗在 20.21  $\text{ng}/\text{mL}$  即可与抗原形成牢固结合,亲和力较高,可用于 TM 的灵敏检测。

## 2.4 抗体的特异性与抗原结合位点分析

分别选择 5 种虾、2 种蟹、7 种贝、4 种鱼、1 种鱿鱼以及猪、牛、羊、鸡肉的 TM,以 2F8 单抗作为一抗进行 Western blot 分析。由图 4 可见,各种虾蟹贝类样品在 34 ku 附近处有明显的条带,表明 2F8 单抗与虾蟹贝类的 TM 有特异性反应;此外,我们发现 2F8 单抗与中国枪乌贼 TM 在 34~43 ku 处也出现了条带,而在鱼类中未发现反应条带,表明 2F8 单抗对鱼类的 TM 无特异性反应,但是对软体动物的鱿鱼 TM 有特异性反应。研究<sup>[16-20]</sup>



(b) 抗体效价  
Antibody titer

图2 抗原包被质量浓度及抗体效价的确定

Fig. 2 Determination of working mass concentration and valence of antigen

表明甲壳类TM与软体动物、昆虫、蠕虫和其他无脊椎动物的TM存在着交叉反应,这些物种的TM存在共有的抗原表位。由此可见,2F8单抗很可能是识别甲壳类、贝类和鱿鱼TM的共有抗原表位。

因此,我们进一步从NCBI库下载了11种与2F8单抗具有特异性结合的虾蟹贝类TM的一级氨基酸序列,通过同源性分析筛选2F8抗体的潜在抗原结合位点。如图5所示,发现了3个同源性较高的区域(AA<sub>0-31</sub>, AA<sub>38-43</sub>和AA<sub>58-67</sub>),与AYUSO等<sup>[21]</sup>和XU等<sup>[22]</sup>报道的凡纳滨对虾和斑节对虾TM的优势抗原表位一致。

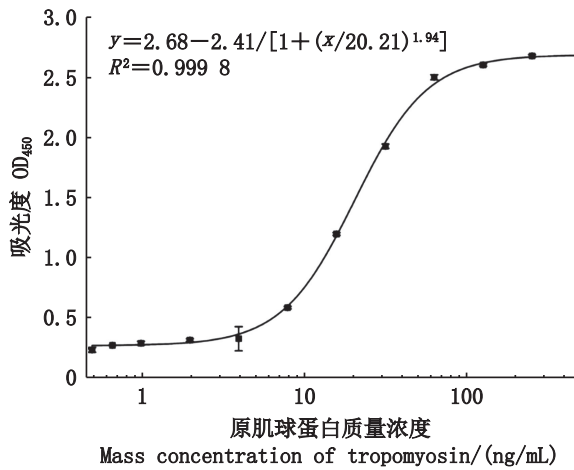


图3 单克隆抗体2F8的相对亲和力曲线

Fig. 3 Relative affinity curve of monoclonal antibody 2F8

### 2.5 基于双抗夹心胶体金试纸条的TM快速检测

为了评价所制备抗体的应用可行性,以TM的特异性单抗2F8为T线、兔多抗偶联的胶体金为检测探针构建了双抗夹心试纸条,对凡纳滨对虾的TM富集液的系列稀释样品进行检测,由图6a所示,制备的试纸条在10 min内可通过肉眼观测凡纳滨对虾5 ng/mL的TM(相当于12.5 μg/kg),另外以TM浓度为横坐标,T线灰度值会纵坐标得到拟合曲线为 $y=5.62x+468.28$ (图6b),定量检出限为3.95 ng/mL,相当于9.88 μg/kg。相比高红艳等<sup>[23]</sup>基于多克隆抗体制备的TM快速检测试纸条(10 ng/mL)具有更高的灵敏度。此外,对6种虾蟹贝的蛋白粗提液样品进行检测,10 min内肉眼观察到T线有明显的条带,表明该试纸条可以检测斑节对虾、刀额新对虾、梭子蟹、中华绒螯蟹、太平洋牡蛎、菲律宾蛤仔肌肉中的TM(图6c)。黄素文等<sup>[24]</sup>制备的过敏原快速检测试纸条仅针对虾类,基于2F8抗体制备的试纸条可用于甲壳类和贝类水产品中过敏原TM的检测,具有更好的应用前景。WANG等<sup>[25]</sup>针对甲壳类TM开发的量子点竞争性免疫层析试纸条,需要荧光读取设备才能实现检测,而本研究构建的双抗夹心试纸条可以通过单纯的肉眼观察检测甲壳类和贝类TM,无须专用设备,可以满足现场检测需求。综上,面对不断增长的甲壳类和贝类水产品过敏问题,本研究制备的2F8单

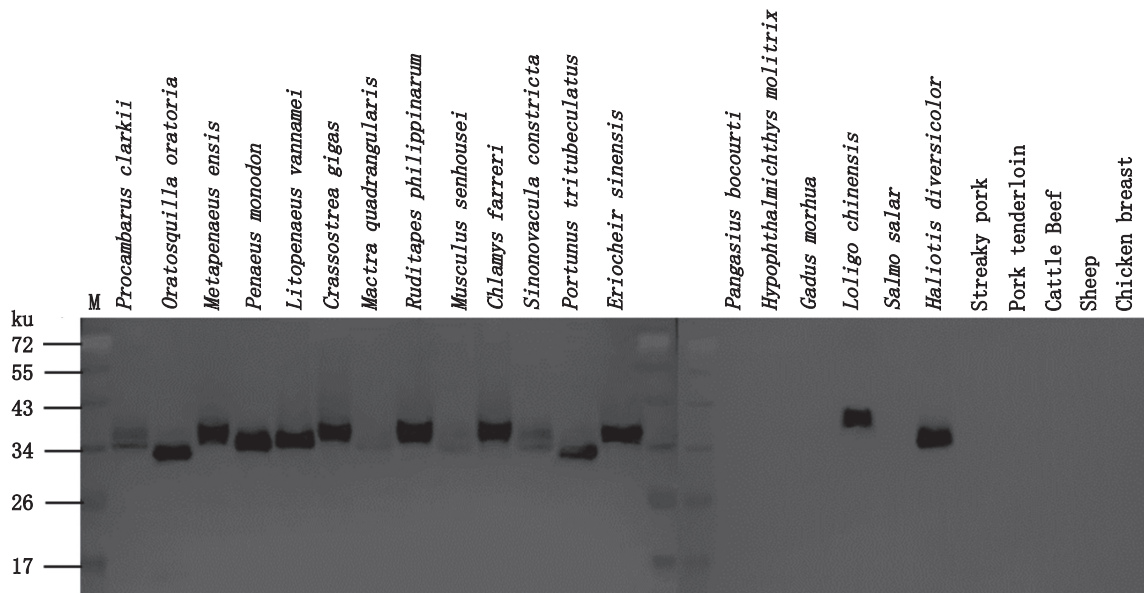


图4 单抗2F8与各种样品的Western blot分析

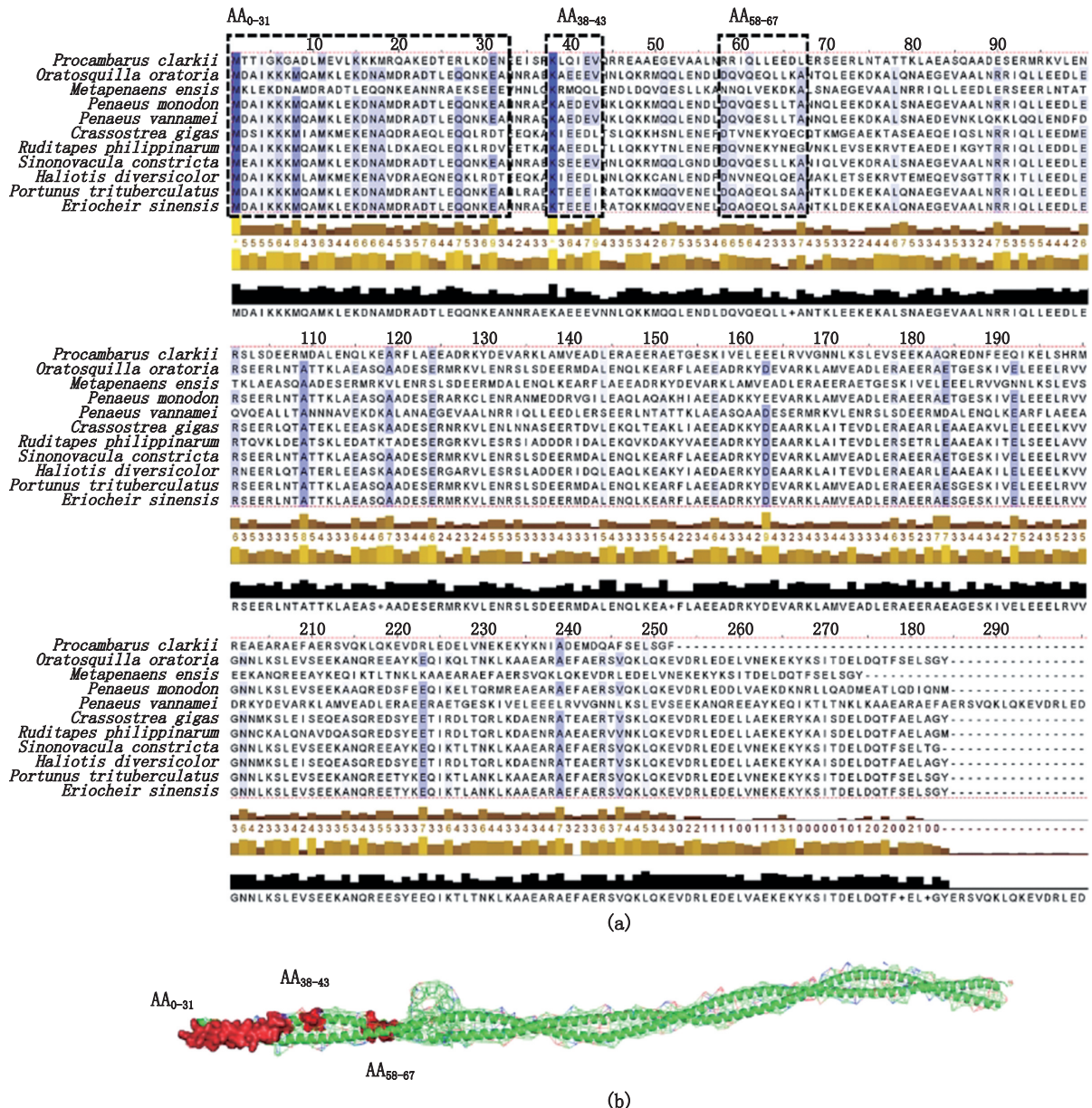
Fig. 4 Western blot analysis of monoclonal antibody 2F8 and various samples

克隆抗体对甲壳类、贝类和鱿鱼的TM具有高特异性和亲和力,所构建的试纸条可以快速检测甲壳类和贝类肌肉中的TM,具有灵敏度高、耗时短、操作简便特点,为甲壳类和贝类的TM过敏原的快速筛查和鉴定提供了基础材料,具有较强的应用价值和潜力。

### 3 结论

本研究通过杂交瘤细胞融合技术筛选获得1

株凡纳滨对虾过敏原TM的单克隆抗体细胞株2F8,该抗体效价高且可特异性识别甲壳类、贝类和鱿鱼的TM,存在3个潜在的TM结合区域(AA<sub>0-31</sub>, AA<sub>38-43</sub>和AA<sub>58-67</sub>),可在10 min内通过肉眼观测实现虾肉5 ng/mL TM(相当于12.5 μg/kg)的检测,且同时可用于甲壳类与贝类中TM的检测,具有较好的应用价值。本研究为甲壳类和贝类主要过敏原TM的鉴定和检测提供了材料基础。



红色区域代表抗原结合区域。  
The red area represents the antigen-binding area.

图5 11种虾蟹贝类的一级氨基酸序列比对(a)和2F8的潜在结合位点分析(b)

Fig. 5 Multiple sequence alignment of eleven species of shrimp, crab and shellfish (a) and potential binding sites analysis of 2F8 (b)



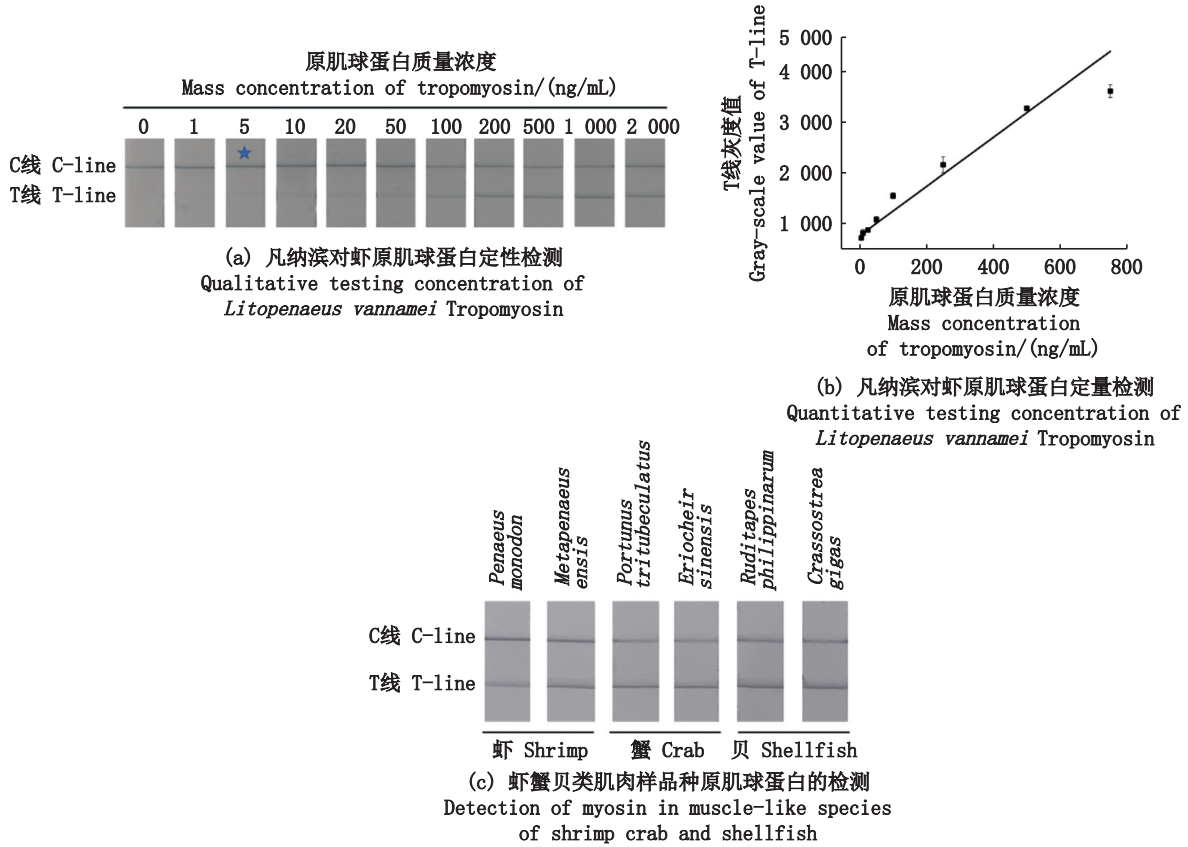


图 6 基于双抗夹心的胶体金免疫层析试纸条构建

Fig. 6 Construction of colloidal gold immunochromatographic test strips based on double antibody sandwich ELISA

参考文献:

[1] KHAN M U, AHMED I, LIN H, et al. Potential efficacy of processing technologies for mitigating crustacean allergenicity [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(17): 2807-2830.

[2] FU L L, WANG C, ZHU Y, et al. Seafood allergy: occurrence, mechanisms and measures [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 88: 80-92.

[3] SETH D, POOWUTIKUL P, PANSARE M, et al. Food allergy: a review [J]. *Pediatric Annals*, 2020, 49(1): e50-e58.

[4] PERKIN J E. Update on food allergy research [J]. *Topics in Clinical Nutrition*, 1994, 9(3): 22-32.

[5] HAN T J, HUAN F, LIU M, et al. IgE epitope analysis of sarcoplasmic-calcium-binding protein, a heat-resistant allergen in *Crassostrea angulata* [J]. *Food & Function*, 2021, 12(18): 8570-8582.

[6] 肖叶, 叶精勤, 李晓晨, 等. 植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)对过敏原原肌球蛋白免疫活性的消减作用 [J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 95-102.

XIAO Y, YE J Q, LI X C, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* on reducing the immunological activity of tropomyosin [J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 95-102.

[7] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.

[8] 蔡秋风, 曹敏杰, 刘光明, 等. 鲢鱼小清蛋白的分离纯化及其单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(8): 731-734, 738.

CAI Q F, CAO M J, LIU G M, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against silver carp parvalbumin [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2011, 27(8): 731-734, 738.

[9] SUBBA RAO P V, RAJAGOPAL D, GANESH K A. B- and T-cell epitopes of tropomyosin, the major shrimp allergen [J]. *Allergy*, 1998, 53(s46): 44-47.

[10] LU Y, OHSHIMA T, USHIO H, et al. Immunological characteristics of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(3): 1093-1099.

[11] VERDOLIVA A, PANNONE F, ROSSI M, et al. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 271(1/2): 77-88.

[12] 张成赛, 尹文林, 李明, 等. 大口黑鲈免疫球蛋白单克隆抗体的制备及初步应用 [J]. *水产科学*, 2022, 41(4): 670-675.

- ZHANG C S, YIN W L, LI M, et al. Preparation and application of immunoglobulin monoclonal antibody from largemouth bass *Micropterus salmoides* [J]. Fisheries Science, 2022, 41(4): 670-675.
- [13] LU Y K, XU D, LIU W Y, et al. A rapid tricolour immunochromatographic assay for simultaneous detection of tricaine and malachite green [J]. Biosensors, 2022, 12(7): 456.
- [14] ZHAO Y M, ZHANG Z Y, LI Z X, et al. Insight into the conformational and allergenicity alterations of shrimp tropomyosin induced by *Sargassum fusiforme* polyphenol [J]. Food Research International, 2023, 165: 112521.
- [15] 黄建芳, 王彩霞, 向军俭, 等. 凡纳滨对虾主要过敏原-原肌球蛋白单克隆抗体的制备及其过敏原表位分析 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28(9): 746-749.
- HUANG J F, WANG C X, XIANG J J, et al. Preparation of monoclonal antibodies against the major allergen of *Litopenaeus vannamei* and analysis of its allergenic epitopes [J]. Immunological Journal, 2012, 28(9): 746-749.
- [16] 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, 2022, 1-29, doi: 10.1080/10408398.2022.2135485.
- [17] 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.
- [18] DE MARCHI L, WANGORSCH A, ZOCCATELLI G. Allergens from edible insects: cross-reactivity and effects of processing [J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2021, 21(5): 35.
- [19] LAURCHAN P, E-KOBON T, SRISAPOOME P, et al. Molecular characterization and cross-allergenicity of tropomyosin from freshwater crustaceans [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(29): 8247-8256.
- [20] LAMARA MAHAMMED L, BELAID B, BERKANI L M, et al. Shrimp sensitization in house dust mite allergic patients: a single center experience [J]. World Allergy Organization Journal, 2022, 15(4): 100642.
- [21] AYUSO R, SÁNCHEZ-GARCIA S, PASCAL M, et al. Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2012, 42(2): 293-304.
- [22] 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.
- [23] 高红艳, 赵金龙, 王雅晴, 等. 甲壳类水产品主要过敏原原肌球蛋白胶体金免疫层析快速检测方法的建立及应用 [J]. 水产学报, 2022, 46(7): 1269-1281.
- GAO H Y, ZHAO J L, WANG Y Q, et al. Establishment and application of colloidal gold immunochromatographic method for rapid detection of major allergen tropomyosin in crustacean aquatic products [J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(7): 1269-1281.
- [24] 黄素文, 王建峰, 朱海, 等. 淡水小龙虾过敏原胶体金快速检测试纸条的研制 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(10): 1414-1417.
- HUANG S W, WANG J F, ZHU H, et al. Development of colloidal gold strip for rapid detection of the allergen in freshwater crayfish [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(10): 1414-1417.
- [25] WANG Y Q, LI Z X, LIN H, et al. Quantum-dot-based lateral flow immunoassay for the rapid detection of crustacean major allergen tropomyosin [J]. Food Control, 2019, 106: 106714.



## Preparation and characterization of universal monoclonal antibody specific for tropomyosin in crustacean and shellfish

LU Jiada<sup>1,2,3</sup>, LUAN Hongwei<sup>1,2,3</sup>, YAN Yifang<sup>1,2,3</sup>, SHI Wenzheng<sup>1,2,3</sup>, LU Ying<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Engineering Research Center of Aquatic Products Processing and Storage, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservative (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Tropomyosin (TM) is considered to be a major allergen of crustaceans and shellfish. To address the increasing risk of crustacean and shellfish allergy, in this study, TM enrichment from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was used as the immunogen of BALB/c mice. A monoclonal antibody (Mab) cell line 2F8 against TM allergen of *Litopenaeus vannamei* was obtained by hybridoma cell fusion technology. The immunological properties of Mab 2F8 including titer, specificity, antibody isotype and binding region were characterized using ELISA, Western Blot and bioinformatics. Moreover, its application feasibility was discussed using a sandwich colloidal gold test strips constructed by Mab 2F8 and rabbit polyclonal antibody specific for TM. ELISA and Western Blot results showed that the antibody subtype of Mab 2F8 was IgG1, with an antibody titer of  $1.28 \times 10^5$  and an  $IC_{50}$  value of 20.21, indicating a high affinity to TM. It was found that the purified Mab 2F8 had specific reaction with the TMs in crustaceans, shellfish and squid. Three potential binding regions in amino acid sequence AA<sub>0-31</sub>, AA<sub>38-43</sub> and AA<sub>58-67</sub> of TM were found according to bioinformatics analysis techniques. Detection results by test strips showed that 5 ng/mL TM (equivalent to 12.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of white prawn shrimp could be visually detected within 10 min, showing that the obtained Mab 2F8 could be used for the detection of TM in the muscle of crustaceans and shellfish. Our study indicated that the purified 2F8 Mab had high affinity and good application value, which could be used for identification and detection of allergen TM in shrimps, crabs, shellfish and squid. This study provides important biological materials for the identification or detection of allergen TM and technical support for the development of rapid detection kit of TM in the future.

**Key words:** tropomyosin; monoclonal antibody; *Litopenaeus vannamei*; crustacean; shellfish