

# 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因表达模式与重组表达

杜欣军 张伟伟 孙伟英 王硕\*

(食品营养与安全省部共建教育部重点实验室 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 300457)

**摘要** 根据相近物种的同类基因设计引物,从凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 肌肉组织中克隆获得原肌球蛋白基因(TPMS),长度为901 bp,其中包含长度为852 bp的完整开放阅读框,编码原肌球蛋白分子量为32.8 kDa;RT-PCR结果显示,原肌球蛋白在心、肝胰腺、胃、鳃、肠和肌肉组织中均有表达,在肌肉中表达量最高,在鳃中表达量最低;将原肌球蛋白基因构建原核重组表达载体 TPMS-pET30a,转化受体菌株 BL21(DE3)并利用 IPTG 诱导后能够大量表达,蛋白分子量为38.2 kDa;经优化,IPTG的最适诱导浓度为0.05 mmol/L,最适诱导时间为4h;经过亲和纯化后,能够得到纯度90%以上的重组表达蛋白。

**关键词** 凡纳滨对虾 过敏原 原肌球蛋白 表达

**中图分类号** Q17;Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)04-0038-06

## Expression pattern and recombinant expression of tropomyosin gene of *Litopenaeus vannamei*

DU Xin-jun ZHANG Wei-wei SUN Wei-ying WANG Shuo\*

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, Tianjin University of Science & Technology, 300457)

**ABSTRACT** A 901 bp fragment of tropomyosin gene (TPMS) was cloned from muscle of *Litopenaeus vannamei* using primers designed on the basis of homologous genes of other shrimps. A complete open reading frame of 852 bp coding a 32.8 kDa protein was found in the fragment. Results of RT-PCR indicated that the gene expressed in all examined tissues including heart, hepatopancreas, stomach, gills, intestine and muscle with different expressing levels. The strongest signal was found in muscle and the weakest signal was in gills. TPMS was sub-cloned into pET-30a and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). After induction of IPTG, a 38.2 kDa protein was largely expressed and formed inclusion bodies. Five hours inducing period and 0.05 mmol/L IPTG were the best conditions for recombinant expression. Recombinant expressed TPMS could be purified with His Bind Resin and the purity was higher than 90%.

**KEY WORDS** *Litopenaeus vannamei* Allergen Tropomyosin Expression

天津科技大学引进人才项目(20080410)资助

\* 通讯作者。E-mail: s. wang@tust. edu. cn, Tel: (022)60601430

收稿日期:2008-12-28;接受日期:2009-02-20

作者简介:杜欣军(1978-),男,博士,讲师。主要从事食品营养与安全研究。E-mail: xjdu@tust. edu. cn, Tel: (022)60601430

食物过敏已经成为一种重要的威胁人类健康的食品安全隐患(Barbi *et al.* 2008),美国食品药品监督管理局(FDA)和欧洲食品安全局(EFSA)都针对食品中的过敏原成分制定了相应的法规(Gendel *et al.* 2006; 王国防等 2007)。在我国,食品过敏症状的发病率要高于发达国家(吕相征等 2005),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。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(佟平等 2007; García-Orozco *et al.* 2007; Shiomi *et al.* 2008),致敏物质主要为原肌球蛋白(Tropomyosin)(Lehrer *et al.* 2003)。原肌球蛋白存在于一切脊椎动物和无脊椎动物中(Werner *et al.* 2007),并且具有较高的同源性。过敏者 IgE 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也具有交叉反应(Ayuso *et al.* 2002; Lehrer *et al.* 2003; Wild *et al.* 2005)。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。

近年来,国外对于虾类原肌球蛋白的研究主要包括:不同虾类原肌球蛋白的基因克隆与序列分析、原肌球蛋白的重组表达与致敏性及交叉反应分析、原肌球蛋白的致敏原因分析、原肌球蛋白的脱敏研究和原肌球蛋白的检测等方面。褐对虾 *Penaeus aztecus*、磷虾 *Euphausia superba*、口虾蛄 *Oratosquilla oratoria*、斑节对虾 *Penaeus monodon* 和日本对虾 *Penaeus japonicus* 的原肌球蛋白基因先后克隆得到,并对其基因及氨基酸序列进行了分析(Randow *et al.* 2006; Nagashima *et al.* 2008; Motoyama *et al.* 2007),其中褐对虾和磷虾的原肌球蛋白研究较多。研究表明,重组表达蛋白与天然蛋白具有同等的致敏性和交叉反应(Albrecht *et al.* 2008; Nakano *et al.* 2008)。Mikita 等(2007)的研究表明,与脊椎动物原肌球蛋白不同,虾类原肌球蛋白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。Reese 等(2005)利用点突变使原肌球蛋白的一个氨基酸发生改变,虽然没有改变蛋白的二级结构,但是致敏性却下降了 90%~98%,为虾类原肌球蛋白的脱敏提供了思路。Werner 等(2007)利用双抗夹心 ELISA 特异性检测甲壳类食品中的原肌球蛋白,检测限能够达到 1mg/kg。与国外相比,国内对于虾类原肌球蛋白的研究相对较少,张在军等(2006)和向军俭等(2006)分别从河虾和海虾中分离纯化出过敏原组分;顾可飞等(2007a, b)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。

目前为止,关于凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 原肌球蛋白的研究还未见报道。本研究利用分子克隆技术,从凡纳滨对虾中克隆到原肌球蛋白基因,并进行了重组表达,又利用亲和纯化系统获得纯度较高的表达产物,为原肌球蛋白的进一步研究奠定良好的基础;本研究还对该基因的表达模式作了研究,对虾类食品脱敏研究提供了有益指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

凡纳滨对虾购自天津海鲜市场。

#### 1.1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 Unizol 购自上海博星公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、高保真 Taq DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒和载体购自 Promega 公司;反转录系统购自 Invitrogen 公司;pET-30a 和感受态细胞购自 Novagen 公司;IPTG、异丙醇和乙醇为 BBI 公司产品;培养基购自 OXOID 公司;其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

利用 Unizol 提取凡纳滨对虾心、肝、胃、鳃、肠和肌肉总 RNA,具体步骤按照 Unizol 操作手册进行。

取总 RNA 5  $\mu\text{g}$ , 用以反转录第一链 cDNA。具体操作按照 Superscript III (Invitrogen) 提供方法进行。

### 1.2.2 原肌球蛋白基因克隆

从 NCBI 数据库中检索获得不同虾类原肌球蛋白基因, 比对不同基因序列, 设计引物 Tpms F1 (5' AACCGat $\text{atc}$ ATGGACGCCATCAAGAAGAAGA 3', 粗体为 *EcoR* V 酶切位点) 和 Tpms R1 (5' GAAG $\text{gaat}$ -tcGGCAGAACAGTTTGGAGC AGAG 3', 粗体为 *EcoR* I 酶切位点)。

取第一链 cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 基因特异性引物各 1  $\mu\text{l}$  进行 PCR, 其他试剂及用量参照高保真 Taq DNA 聚合酶说明进行, 总体积 25  $\mu\text{l}$ , PCR 条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 循环 35 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。扩增后电泳检测扩增结果, PCR 回收后, 连接至 pGEM-T-Easy 载体中进行测序, 并对测序结果进行分析, 测序单位为天津生物芯片技术有限责任公司。

### 1.2.3 原肌球蛋白表达模式

取不同组织 cDNA 各 1  $\mu\text{l}$ , 用基因特异性引物 Tpms F2 (5' ATGGACGCCATCAAGAAGAAGA 3') 和 Tpms R2 (5' GGCAGAACAGTTT GGAGCAGAG 3') 进行半定量 PCR, PCR 条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 循环 30 次。同时, 以相同条件扩增 Actin 作为内标。以上 PCR 重复 3 次, 用 BioRad Quantity one 图像分析系统对结果进行分析。

### 1.2.4 原肌球蛋白重组表达

(1) 重组表达载体构建。分别对克隆得到的原肌球蛋白基因和表达载体 pET-30a 进行 *EcoR* V 和 *EcoR* I 双酶切, PCR 回收后用 T4 连接酶进行连接, 转化感受态细胞 DH5 $\alpha$  并筛选阳性克隆, 扩增阳性克隆获得重组表达质粒。

(2) 重组表达。取重组表达质粒转化感受态细胞 BL21(DE3), 随机挑取 4 个克隆过夜培养, 1:10 转培养至对数生长期 (OD $_{600}$ =0.7~1.0), 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L 继续培养 5 h, SDS-PAGE 检测基因表达情况。

(3) 表达条件优化。重组表达菌液生长 OD $_{600}$  达到 0.7~1.0 时, 分别以 0.01、0.05、0.1、0.5 和 1 mmol/L IPTG 浓度进行诱导表达, 5 h 后 SDS-PAGE 检测表达情况; 利用最佳 IPTG 浓度进行诱导表达, 分别在诱导后 1、2、3、4 和 5 h 时取出相同体积的样品, SDS-PAGE 检测不同时间表达情况。

### 1.2.5 蛋白纯化

超声破碎诱导后菌体, 分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 检测重组表达蛋白是否形成包含体。利用 8 mol/L 脲对包含体进行变性和复性处理 (Kuhelj *et al.* 1995), 获得可溶性的蛋白, 将蛋白液高速离心并过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜后进行亲和纯化, 具体操作按照 His Bind Resin 提供步骤进行。SDS-PAGE 检测纯化后蛋白, 并利用 BioRad Quantity one 图像分析系统计算蛋白纯度。

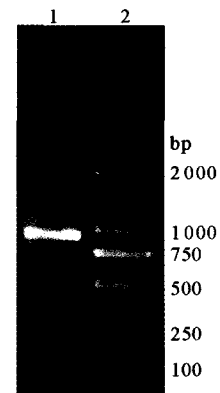
## 2 结果

### 2.1 基因克隆

利用基因特异性引物, 从凡纳滨对虾肌肉 cDNA 中克隆得到长度为 901 bp 的基因片段 (图 1), 经测序为原肌球蛋白基因, 且包含长度为 852 bp 的完整开放阅读框, 编码分子量为 32.8 kDa 的原肌球蛋白, 该蛋白由 284 个氨基酸组成, 其中 48~284 位氨基酸构成原肌球蛋白结构域 (图 2)。

### 2.2 半定量 PCR

利用基因特异性引物, 以凡纳滨对虾心、肝、胃、鳃、肠和肌肉 cDNA 为模板检测原肌球蛋白基因在不同器官中的表达模式。结果显示, 原肌球蛋白在所有检测组织中均有表达, 在含有肌肉组织的器



1: 原肌球蛋白扩增结果; 2: 分子量标记 DL2000

1: Tropomyosin gene amplified with gene specific primers; 2: Marker DL2000

图 1 PCR 扩增原肌球蛋白基因

Fig. 1 PCR amplification of tropomyosin gene

官中表达量较高,如心、胃和肌肉,其中肌肉中表达量最高;在肝和鳃中的表达量较低(图 3)。

### 2.3 重组表达条件优化

#### 2.3.1 IPTG 诱导浓度优化

为获得最佳表达条件,用不同浓度 IPTG 进行诱导表达,5 h 后 SDS-PAGE 检测表达情况,结果如图 4 所示。浓度为 0.05、0.1、0.5 和 1 mmol/L IPTG 诱导效果没有差异,而 0.01 mmol/L IPTG 诱导时表达量相对较低,因此 IPTG 最佳诱导浓度为 0.05 mmol/L。

#### 2.3.2 IPTG 诱导时间优化

利用 0.05 mmol/L IPTG 进行诱导表达,分别在诱导后不同时间取样检测。结果显示,在诱导后 4 h,重组表达蛋白量已经达到最大(图 5),因此最佳诱导时间为 4 h。

### 2.4 蛋白纯化

经检测重组表达蛋白为包含体形式,经变性和复性处理后,获得可溶性蛋白,经 His Bind Resin 纯化后,蛋白纯度达到 90% 以上(图 6)。

## 3 讨论

由于营养丰富、抗病力强和适应能力强等特点,凡纳滨对虾已经成为我国乃至世界范围内一种重要的水产养殖品种(龚艳清等 2004),随着人民生活水平的提高,凡纳滨对虾已经成为老百姓餐桌上的常见食品。与此同时,这一食品也带来了越来越严重的食品安全问题——致敏现象,并且过敏人群呈逐年递增的趋势(Motoyama *et al.* 2007)。现已证实其致敏物质主要为原肌球蛋白,由于这一蛋白普遍存在于动物中并且比较保守,所以对于凡纳滨对虾过敏的人群常对其他动物或食品产生交叉反应。因此,基于消费量大、过敏现象普遍和具有交叉反应等原因,选择凡纳滨对虾原肌球蛋白作为研究对象具有很好的代表性,并且具有较高的研究价值与实际意义。

原肌球蛋白作为一种重要蛋白成分,不只存在于肌肉组织中,几乎存在于动物的所有组织中。本研究也证实了这一点,通过 RT-PCR 证实这一过敏原蛋白存在于凡纳滨对虾所有的检测组织中,除在肌肉中高表达以外,在心脏这一富含肌肉的器官中表达量也颇高。在消化系统中的表达量

```

atggacgccatcaagaagaagatgcaggcgtgaagctggagaaggataaccgctggac 20
M D A I K K K M Q A M K L E K D N A M D
aggcggtaccctcgaacagcagaacaaggaggccaacaagggtgagaagagcgag 40
R A D T L E Q Q N K E A N N R A E K S E
gaggaggtcacaaccttcagaagaggatgcagcaacttgagaccgacttgaccaggtg 60
E E V H N L Q K R M Q Q L E N D L D Q V
caggaaaccttgctgaagcctaaccagcttgggagaagacaaagccctgtgtaac 80
Q E S L L K A N I Q L V E K D K A L S N
gctgagggcgagggtggccgctggaaccgccatccagctgctcaggagacgtggag 100
A E G E V A A L N R R I Q L L E E D L E
cgctcaggagcgcctcaaccgccaccaccaagctggctgagcctccaggccgcc 120
R S E E R L N T A T T K L A E A S O A A
gacgagtcgagcgcagcgaaggtgctcagaaaccgctccctgctccgagagggcgc 140
D E S B R M R K V L E N R S L S D E E R
atggagccctggagaaccagcctcaaggcctcattcctgctgaggaagccgacagg 160
M D A L E N Q L K E A R F L A E A D R
aaatacagagggttcccgtlaagctggccatggtggcagccgaccttgagcgtgtag 180
K Y D E V A R K L A M V E A D L E R A E
gagcgtgccgagactggtaatacaagatcctcagcctgaggaagagctcgtgctgit 200
E R A E T G E S K I V E L E E E L R V V
ggcaacaaccggaagtccttgaggctgctgaggagaaggccaaccagcgcgaggaagcc 220
G N N L K S L E V S E E K A N Q R E E A
tacaaggagcagattaagacacttaccacaagctgaagggcgcctgagggccctgctgag 240
Y K E Q I K T L T N K L K A A E A R A E
ttcgcgagaggtctgcaagctcagaaggtcagaggtcagacagcctggaagacagctg 260
F A E R S V Q K L Q K E V D R L E D E L
gttaacgaaaagaggaagtacaagctcattaccgacgagctggaccagactttcagcga 280
V N E K E K Y K S T I T D E L D Q T F S E
ctgctcgtctatataa
L S G Y * 284

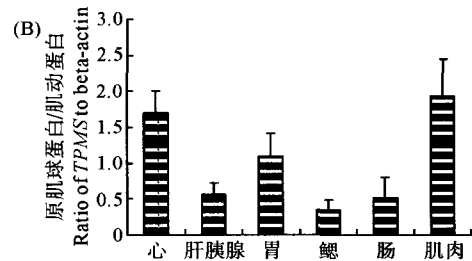
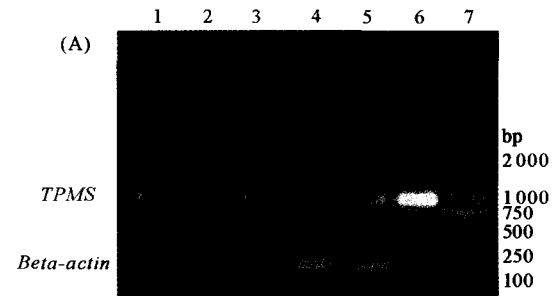
```

图中阴影部分表示原肌球蛋白结构域,右侧数字表示氨基酸序列长度  
The shaded amino acid sequence indicates the tropomyosin domain.

Numbers on the right indicate length of amino acid sequence

图 2 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因序列及氨基酸序列

Fig. 2 Complete cDNA sequence and deduced amino acid sequence of TPMS of *L. vannamei*

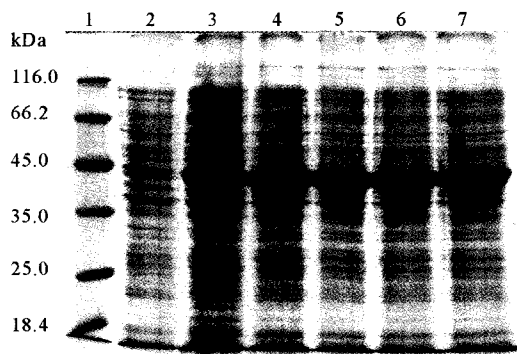


RT-PCR 检测原肌球蛋白在不同组织中的表达。(A) 琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 结果。1. 心; 2. 肝胰腺; 3. 胃; 4. 鳃; 5. 肠; 6. 肌肉; 7. 分子量标记 DL2000。(B) 根据 RT-PCR 结果所做柱形图

RT-PCR was used to examine the expression of tropomyosin gene in different tissues. (A) Agarose gel examination of RT-PCR results. 1. Heart; 2. Hepatopancreas; 3. Stomach; 4. Gills; 5. Intestine; 6. Muscle; 7. Marker DL2000. (B) Statistical analysis of tropomyosin gene expression in different tissues based on the results of RT-PCR

图 3 原肌球蛋白基因表达模式

Fig. 3 Expression pattern of tropomyosin gene



1. 标准蛋白; 2. IPTG 诱导前; 3-7. 分别用 0.01、0.05、0.1、0.5 和 1 mmol/L IPTG 诱导后

1. Protein standard; 2. *E. coli* with pET30a-TPMS without IPTG; 3-7. *E. coli* with pET30a-TPMS induced with 0.01、0.05、0.1、0.5 和 1 mmol/L IPTG

图 4 SDS-PAGE 检测不同浓度 IPTG 诱导结果

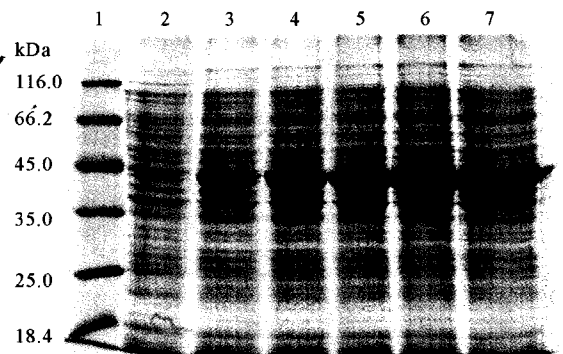
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant TPMS induced with different IPTG

次之,而在肝胰腺和鳃组织中也检测到了明显的表达。这一结果说明,除了肌肉这一主要的可食用部分以外,对虾的其他组织也会导致食用者的过敏现象,这对于虾类食品的脱敏加工具有重要的指导作用。

虽然原肌球蛋白在对虾肌肉中含量较高,但是通过纯化的方式获得大量纯度较高的蛋白,仍然需要复杂的过程。由于该蛋白不属于酶类,无法通过生物化学方法鉴别该蛋白所存在的分离组分,这给蛋白的纯化带来很大困难。另外,纯化后蛋白的纯度很难保证,如果其他蛋白混于其中,由于都为虾类来源的蛋白,会对该蛋白的进一步研究带来很多干扰。利用重组表达系统,这些问题可以得到很好的解决。利用重组表达系统的标签序列,可以很容易利用亲和纯化系统得到纯度较高的蛋白,即使纯度不是非常高,其中的杂蛋白也为细菌来源,不会或很少对蛋白的进一步研究造成干扰。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,通过制备其特异性抗体还可以用于食品中过敏原的检测。

## 参 考 文 献

- 王国政,徐彦渊. 2007. 食品过敏原的安全管理. 食品科学, 28(4): 355~359
- 向军俭,李小迪,王宏,邓宁,张在军,杨红宇. 2006. 过敏豚鼠模型的建立及海虾主要过敏原组分的纯化与鉴定. 食品科技, 6: 137~140
- 吕相征,刘秀梅,杨晓光. 2005. 健康人群食物过敏状况的初步调查. 中国食品卫生杂志, 17(2): 119~121
- 佟平,高金燕,陈红兵. 2007. 鸡蛋清中主要过敏原的研究进展. 食品科学, 28(8): 565~568
- 张在军,向军俭. 2006. 河虾中主要过敏原组分鉴定及分离纯化. 广东医学, 27(5): 650~651
- 顾可飞,高美须,李春红,李淑荣,潘家荣. 2007a. 辐照对虾过敏原生化性质的影响. 核农学报, 21(2): 160~163
- 顾可飞,高美须,李春红,潘家荣. 2007b. 辐照对虾过敏原抗原性的影响. 中国食品卫生杂志, 19(2): 102~105
- 龚艳清,陈信忠,黄印尧. 2004. 养殖凡纳滨对虾桃拉综合征病原的确认及其组织病理学观察. 海洋水产研究, 25(2): 18~23
- Albrecht, M., Alessandri, S., Conti, A., Reuter, A., Lauer, I., Vieths, S., and Reese, G. 2008. High level expression, purification and physico- and immunochemical characterisation of recombinant Pen a 1: A major allergen of shrimp. Mol. Nutr. Food Res. 52 Suppl 2: S186~195

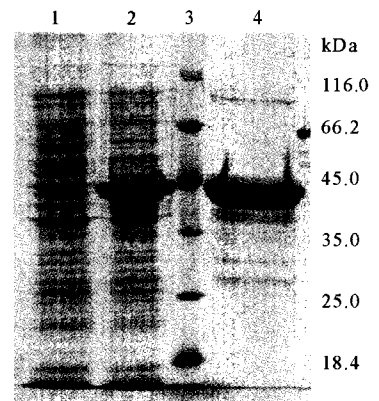


1. 标准蛋白; 2. IPTG 诱导前; 3-7. IPTG 诱导 1、2、3、4、5 h 结果

1. Protein standard; 2. *E. coli* with pET30a-TPMS without IPTG; 3-7. *E. coli* with pET30a-TPMS induced with IPTG for 1h, 2h, 3h, 4h, 5h

图 5 SDS-PAGE 检测 IPTG 诱导时间

Fig. 5 SDS-PAGE analysis periods induced with IPTG



1. IPTG 诱导前; 2. IPTG 诱导后; 3. 标准蛋白; 4. 纯化原肌球蛋白

1. *E. coli* with pET30a-TPMS without IPTG; 2. *E. coli* with pET30a-TPMS induced with IPTG; 3. Protein standard; 4. Purified recombinant TPMS

图 6 SDS-PAGE 检测纯化原肌球蛋白

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified TPMS

- Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S., Plante, M., and Lehrer, S. B. 2002. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129(1): 38~48
- Barbi, E., Berti, I., and Longo, G. 2008. Food allergy: From the loss of tolerance induced by exclusion diets to specific oral tolerance induction. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2(3): 212~214
- Garcia-Orozco, K. D., Aispuro-Hernández, E., Yepiz-Plascencia, G., Calder n-de-la-Barca, A. M., and Sotelo-Mundo, R. R. 2007. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 144(1):23~28
- Gendel, S. M., and Jenkins, J. A. 2006. Allergen sequence databases. *Mol. Nutr. Food Res.* 50(7): 633~637
- Kuhelj, R., Dolinar, M., Pungercar, J., and Turk, V. 1995. The preparation of catalytical active human cathepsin B from its precursor expression in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 229(2): 533~539
- Lehrer, S. B., Ayuso, R., and Reese, G. 2003. Seafood allergy and allergens; A review. *Mar. Biotechnol.* 5(4): 339~348
- Mikita, C. P., and Padlan, E. A. 2007. Why is there a greater incidence of allergy to the tropomyosin of certain animals than to that of others? *Medd. Hypotheses*, 69(5): 1 070~1 073
- Motoyama, K., Suma, Y., Ishizaki, S., Nagashima, Y., and Shiomi, K. 2007. Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans. *J. Agric. Food Chem.* 55(3): 985~991
- Motoyama, K., Suma, Y., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Lu, Y., Ushio, H., and Shiomi, K. 2008. Identification of tropomyosins as major allergens in antarctic krill and mantis shrimp and their amino acid sequence characteristics. *Mar. Biotechnol.* 10(6): 709~718
- Nakano, S., Yoshinuma, T., and Yamada, T. 2008. Reactivity of shrimp allergy-related IgE antibodies to krill tropomyosin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 145(3): 175~181
- Reese, G., Schick Tanz, S., Lauer, I., Randow, S., L tkopf, D., Vogel, L., Lehrer, S. B., and Vieths, S. 2006. Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Clin. Exp. Allergy*, 36(4): 517~524
- Reese, G., Vicbranz, J., Leong-Kee, S. M., Plante, M., Lauer, I., Randow, S., Moncin, M. S., Ayuso, R., Lehrer, S. B., and Vieths, S. 2005. Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *J. Immunol.* 175(12): 8 354~8 364
- Shiomi, K., Sato, Y., Hamamoto, S., Mita, H., and Shimakura, K. 2008. Sarcoplasmic calcium-binding protein; Identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 146(2): 91~98
- Werner, M. T., Faeste, C. K., and Egaas, E. 2007. Quantitative sandwich ELISA for the determination of tropomyosin from crustaceans in foods. *J. Agric. Food Chem.* 55(20): 8 025~8 032
- Wild, L. G., and Lehrer, S. B. 2005. Fish and shellfish allergy. *Curr. Allergy Asthma.* 59(1): 74~79