

# 拟穴青蟹细丝蛋白 C 的生物信息学分析及重组表达

何欣蓉<sup>1,2,3</sup>, 杨 阳<sup>1,2,3</sup>, 张永霞<sup>1,2,3</sup>, 刘 红<sup>1,2,3</sup>, 曹敏杰<sup>1,2,3</sup>, 刘光明<sup>1,2,3</sup>

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021; 3. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 为了探讨抗原表位与细丝蛋白 C (filamin C, FLN c) 结构之间的构效关系, 对 FLN c 进行生物信息学分析及分段重组表达。生物信息学分析结果表明, FLN c 二级结构以  $\beta$  折叠及无规则卷曲为主, 确定其具有 9 个结构域, 三级结构呈免疫球蛋白样折叠, 具有典型的细丝蛋白家族特征。基于生物信息学分析, 将拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) FLN c 通过分段原核表达, 纯化出带有麦芽糖结合蛋白 (maltose binding protein, MBP) 标签的重组表达蛋白 rFLN c1 (AA: 1-335)、rFLN c2 (AA: 336-531)、rFLN c3 (AA: 532-847)。血清学分析结果显示, rFLN c2 与蟹类过敏患者血清 IgE 结合能力最强, 推测此区域含有大部分抗原表位。因此, 定位拟穴青蟹 FLN c 氨基酸 336-531 结构域为抗原表位优势区, rFLN c2 可用于 FLN c 的晶体学研究。

**[关键词]** 拟穴青蟹; 细丝蛋白 C; 生物信息学; 重组表达

**[中图分类号]** Q 816

## Bioinformatics Analysis and Recombinant Expression of Filamin C in *Scylla paramamosain*

HE Xinrong<sup>1,2,3</sup>, YANG Yang<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yongxia<sup>1,2,3</sup>, LIU Hong<sup>1,2,3</sup>,  
CAO Minjie<sup>1,2,3</sup>, LIU Guangming<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China;

3. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to explore the structure-activity relationship between the epitope and the structure of filamin C (FLN c), bioinformatics analysis and segmented recombinant expression of FLN c were performed. The results of bioinformatics analysis showed that the secondary structure of FLN c had 9 domains mainly with  $\beta$ -sheet and random coil. The tertiary structure was an immunoglobulin-like fold and had a typical filamin family characteristics. Based on bioinformatics analysis, the fragmented FLN c were expressed in *Escherichia coli*, and the recombinant protein rFLN c1 (AA: 1-335), rFLN c2 (AA: 336-531) and rFLN c3 (AA: 532-847) with maltose binding protein tag were purified. The results of serological analysis showed that rFLN c2 had the strongest binding ability to IgE in sera of crab allergy patients. It was speculated that this region contained most of the epitopes. So the amino acid 336-531 domain of *Scylla paramamosain* FLN c as the epitope predominant re-

**[收稿日期]** 2020-03-06

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (31871720, U1812403); 福建省科技计划项目 (2018N5009, 2018R0071); 海洋科研专项基金项目 (DY135-B2-07)

**[作者简介]** 何欣蓉 (1994—), 女, 硕士生, 从事食品生物技术方向研究。通信作者: 刘光明 (1972—), 男, 教授, 博士, 从事海洋分子生物学和食品科学方向研究。E-mail: gmlu@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

gion was mapped, indicating that rFLN c2 could be used for crystallographic research of FLN c.

**Keywords:** *Scylla paramamosain*; filamin C; bioinformatics analysis; recombinant expression

## 0 引言

蟹类作为一种营养价值高、肉质鲜美的水产品, 广受消费者喜爱。但是, 蟹类引起的食物过敏发病率却持续上升, 成为了人们广泛关注的食品安全问题之一<sup>[1]</sup>。目前, 拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 中已有多种致敏原被发现并鉴定<sup>[2-8]</sup>。细丝蛋白是 3 种肌动蛋白交联蛋白, 迄今已发现 3 种细丝蛋白亚型, 即细丝蛋白 A、细丝蛋白 B 和细丝蛋白 C (filamin C, FLN c)<sup>[9-12]</sup>。3 种亚型之间具有 60% ~ 80% 同源性, 仅两个铰链区差别较大。FLN c 在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 及拟穴青蟹中被分离鉴定为新型过敏原, 且在克氏原螯虾中, FLN c 与磷酸丙糖异构酶间具有免疫交叉反应<sup>[13]</sup>。FLN c 作为拟穴青蟹的新型致敏原, YANG 等<sup>[8]</sup>通过噬菌体展示技术淘选得到了 7 个线性表位及 6 个构象表位。目前, 抗原表位与 FLN c 结构之间构效关系不明确, 也未有相关晶体结构报道。天然 FLN c 纯化步骤繁琐, 成本较高, 得率较低, 使得相关研究难以深入。在无法获得蛋白质的情况下, 生物信息学分析<sup>[14-16]</sup>为蛋白质的理化性质及空间结构的分析提供了理论依据, 它把基因组 DNA 序列信息分析作为源头, 在获得蛋白质编码区的信息后进行蛋白质空间结构模拟和预测<sup>[17-18]</sup>。

蛋白质结构预测研究现状还不能完全满足实际需要, 真正地解决这一问题还得从蛋白质自身入手, 因此, 获得大量纯化的蛋白质显得尤为重要。原核表达能够短时间内获得基因表达产物, 而且所需的成本相对比较低廉, 方法简单, 可以表达的蛋白质也比较多。麦芽糖结合蛋白 (maltose binding protein, MBP) 标签可以促进蛋白质的可溶性和正确折叠, 增加蛋白质表达量和稳定性, 并且可实现简单亲和纯化, 弥补了原核表达常以包涵体形式表达而导致产物纯化困难和蛋白质稳定性差的缺陷<sup>[19-20]</sup>。但由于 FLN c 具有较大的相对分子质量 (90 ku), 利用原核表达系统获得正确折叠的蛋白质难度较大, 难以获得完整晶体, 使得 FLN c 结构解析相关研究进展缓慢。本文通过生物信息学分析确定拟穴青蟹 FLN c 分段重组表达的区域, 纯化鉴定出带有 MBP 标签的重组表达蛋白, 并进行 IgE 结合能力分析, 定位拟穴青蟹 FLN c 的抗原表位区域, 获得的分段表达蛋白也可用于晶体学研究, 并为过敏组分诊断提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

鲜活的拟穴青蟹购自厦门市集美新华都购物广场, 取蟹脚与蟹钳部分肌肉组织, 其中 80 g 用于纯化天然 FLN c, 100 mg 用于提取 RNA, 其余置于 -80 °C 保存备用。

甲壳类过敏患者血清 (编号分别为 982509、879857、859809、892787、739647、722791) 由厦门大学附属妇女儿童医院提供 (伦理审查编号: KY-2019-014), 所有血清分装后于 -30 °C 冰箱保存备用 (实验所用血清均为血清池)。SDS-PAGE 所用的标准蛋白购自 Fermentas 公司, Western-blotting 所用的预染标准蛋白购自 New England Biolab 公司, 硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司, 羊抗兔 HRP-IgG 购自 Dako 公司, 羊抗人 HRP-IgE 购自 KPL 公司, 牛血清白蛋白购自 Sigma 公司, 化学发光试剂购自 Alpha Innotech 公司, 兔抗拟穴青蟹 FLN c 多克隆抗体由本实验室制备, 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物信息学分析

利用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 在线服务器分析拟穴青蟹 FLN c 的二级结构; 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 及 NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 确定拟穴青蟹 FLN c 的结构域, 并于蛋白质数据库 (protein data bank, PDB, <http://www.rcsb.org/>) 中选择同源性较高的模板, 在 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 上进行同源建模, 并将输出的 PDB 模型在 PyMOL 软件上进行分析。预测结果中, 全球模型质量评估 (glob-

al model quality estimate, GMQE) 可信度范围为 0 ~ 1, 定性模型能量分析 (qualitative model energy analysis, QMEAN) 可信度范围为 -4 ~ 0。

### 1.2.2 拟穴青蟹总 RNA 提取和 RT-PCR 扩增目的基因片段

RNA 提取步骤参考总 RNA 提取试剂盒说明书进行, 检测提取的 RNA 浓度及纯度后, 将其在 -70 ℃ 保存备用。cDNA 按 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA 合成试剂盒说明书合成<sup>[21]</sup>。

### 1.2.3 拟穴青蟹 FLN c 引物设计及合成

根据 Genbank 中检索的拟穴青蟹 FLN c 基因序列 (编号 MK747241.1), 并结合生物信息学分析, 利用 Primer 5.0 软件设计分段表达引物, 确定 3 对 PCR 反应引物 (FLN c1、FLN c2、FLN c3) 及 3 对带有 *Sal* I / *Not* I 酶切位点及保护碱基的表达引物 (rFLN c1、rFLN c2、rFLN c3), 实验所用引物由上海铂瑞生物技术有限公司合成, 如表 1 所示。

表 1 FLN c 引物序列  
Tab.1 Primer sequences of FLN c

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	碱基数 Numbers of bases
FLN c-1F	ATGCCTTCCGAAAGTCAGACGT	23
FLN c-1R	TCGCCTGTCACCTTGACAGTGAA	23
FLN c-2F	GGCACCAACAGGCAGACAGAGAG	23
FLN c-2R	CTCACCCAGGGATGGAGTAATGTA	24
FLN c-3F	GCGAGGAAGGTGGAGCTGGC	20
FLN c-3R	GAACATATCCAGCTTGAATGGGGAC	25
rFLN c-1F	ACGCGTCGACATGCCTTCCGAAAGTCAGACGT	33
rFLN c-1R	ATTTGCGGCCGCCTATCGCCTGTCACCTTGACAGTGAA	38
rFLN c-2F	ACGCGTCGACGGCACCAACAGGCAGACAGAGAG	33
rFLN c-2R	ATTTGCGGCCGCCTACTCACCCAGGGATGGAGTAATGTA	39
rFLN c-3F	ACGCGTCGACGCGAGGAAGGTGGAGCTGGC	30
rFLN c-3R	ATTTGCGGCCGCCTAGAACATATCCAGCTTGAATGGGGAC	40

### 1.2.4 拟穴青蟹 FLN c 的重组表达

构建 FLN c 分段克隆载体 pEASY-T1-FLN c-1、pEASY-T1-FLN c-2、pEASY-T1-FLN c-3, 将测序正确的质粒、带有 MBP 标签及 6 个 His 标签的 V29H 载体质粒分别用 *Sal* I / *Not* I 双酶切处理, 用 T4 DNA 连接酶将目的基因片段与载体酶切产物于 16 ℃ 连接 18 h 以上, 并转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中。重组蛋白表达方法参考文献 [22], 收集所得全菌液、上清液及沉淀, 利用 SDS-PAGE (以空载体诱导物作为对照) 鉴定诱导表达结果。

### 1.2.5 重组蛋白的鉴定及纯化

Western-blotting 采用林江伟等<sup>[23]</sup>的方法, 以兔抗拟穴青蟹 FLN c 抗体 (1:50 000 稀释) 作为一抗孵育 2 h, 羊抗兔 HRP-IgG (1:2 000 稀释) 作为二抗孵育 1 h, 天然拟穴青蟹 FLN c 作为阳性对照, 化学发光法显色。将鉴定结果正确的阳性转化子大量表达, 由于重组蛋白带有 His 标签, 因此将破碎离心所得上清液上样于镍柱纯化, 收集目的蛋白后, 将咪唑缓冲液置换为 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。

### 1.2.6 重组蛋白的 IgE 结合活性分析

以蟹类过敏患者血清池 (1:4 稀释) 作为一抗, 羊抗人 HRP-IgE (1:2 000 稀释) 作为二抗, 利用 Western-blotting 分析重组蛋白与甲壳类过敏患者血清 IgE 结合情况, 阳性对照为天然拟穴青蟹 FLN c, 阴性对照为牛血清蛋白 (蛋白质质量浓度均为 0.5 g/L, 缓冲液浓度均为 20 mmol/L Tris-HCl)。以非过敏患者血清池作为对照组。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟穴青蟹 FLN c 的二级结构及结构域分析

通过分析拟穴青蟹天然 FLN c 一级结构, 利用在线分析软件对 FLN c 二级结构进行预测分析, 结果如图 1 所示。由图 1 可见, 拟穴青蟹 FLN c 的二级结构元件主要有  $\beta$ -折叠 (52.4%) 和无规则卷曲 (42.6%),  $\alpha$ -螺旋的含量极少。蛋白质结构域是在较大的蛋白质分子中, 由于多肽链上相邻的超二级结构紧密联系, 故形成两个或多个在空间上可以明显区别的局部区域。结构域是介于二级和三级结构之间的一种结构层次, 是蛋白质三级结构的基本结构单位。由于 FLN c 较大的分子质量, 难以确定抗原表位及关键氨基酸位置, 因此, 通过划分结构域来了解该蛋白质的三维结构。利用 SMART 及 NCBI Conserved Domain Search 确定拟穴青蟹 FLN c 的结构域组成分布情况, 结果如表 2 所示, 两种软件预测结构域分布相似, 因此可判断 FLN c 由 9 个结构域组成。

### 2.2 拟穴青蟹 FLN c 的三级结构分析

由于未有相关细丝蛋白完整晶体结构的报道, 因此在掌握蛋白质一级结构前提下, 可以利用 SWISS-MODEL 在线同源建模和 PyMOL 软件对三级模型进行分析。基于 FLN c 结构域的组成, 将 FLN c 分为 9 部分 (Domain 1 ~ 9), 在 PDB 中使用同源性较高的人 FLN a (ID: 2K7P、2K7Q、4P3W) 及人 FLN c (ID: 1V05) 的 X 射线晶体结构分别作为模板生成拟穴青蟹 FLN c 的同源模型结构。PyMOL 软件的输出图如图 2 所示。

表 2 FLN c 的结构域预测

Tab.2 Domain prediction of FLN c		
结构域	氨基酸位置 Amino acid position	
Domain	SMART	Conserved domain search
1	2-48	2-52
2	55-152	58-151
3	155-240	181-234
4	244-335	245-334
5	340-433	377-426
6	437-528	438-528
7	531-623	530-617
8	626-716	627-715
9	756-845	757-844

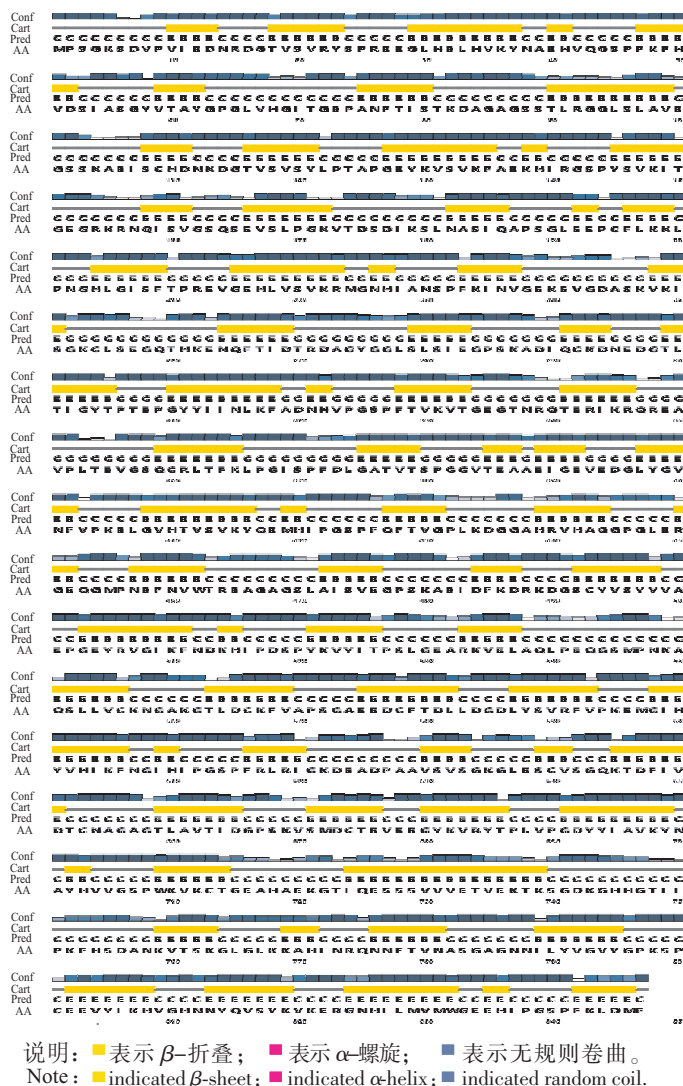


图 1 FLN c 二级结构分析

Fig.1 Analysis of the secondary structure of FLN c

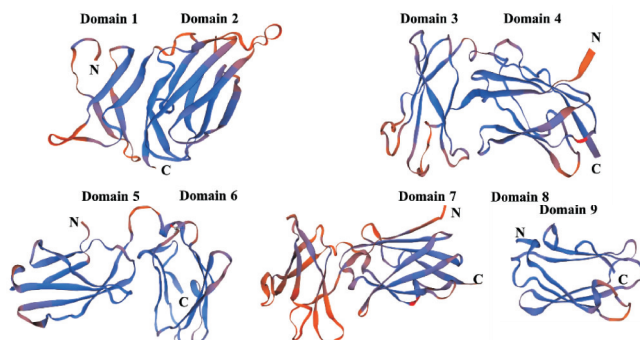


图 2 FLN c 三级结构预测

Fig.2 The prediction of the tertiary structure of FLN c

由图 2 可见, 拟穴青蟹 FLN c 的 3 部分的三级结构均是由首尾相连的结构域组成的单体, 每个单体由一个位于 N 末端的肌动蛋白结合域和一个由许多重复片段组成的 C 末端杆状结构域组成。杆状区的每一个重复序列由约 100 个残基组成, 形成免疫球蛋白样折叠, 具有典型的细丝蛋白家族特征。在 X 射线结构包含的区域中, 拟穴青蟹 FLN c 的核心结构域与模板氨基酸序列同一性, EMQE 与 QMEAN 可信度如表 3 所示, EMQE 可信度与 QMEAN 可信度均在理想范围内, 表明同源模型结构质量良好。

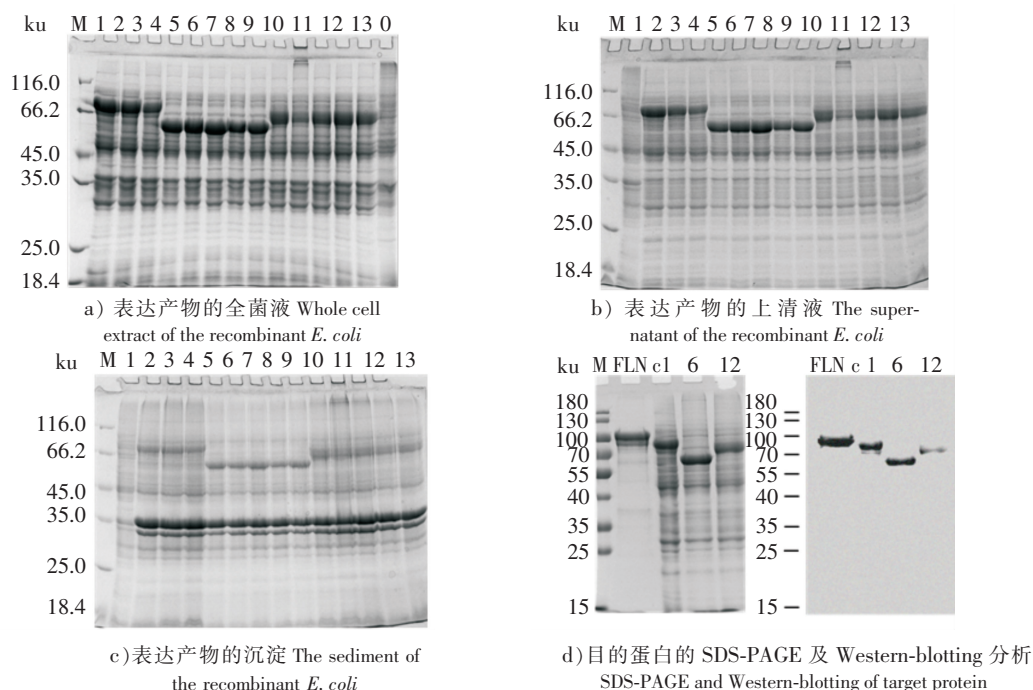
表 3 FLN c 的同源建模数据分析

Tab. 3 Analysis of FLN c homology modeling data

结构域 Domain	氨基酸位置 Amino acid position	模板 (ID) Template	序列同一性 Sequence identity/%	EMQE 可信度 EMQE credibility	QMEAN 可信度 QMEAN credibility
1, 2	1 - 152	2K7P	60.27	0.36	-0.10
3, 4	153 - 335	2K7Q	57.22	0.27	-1.68
5, 6	336 - 531	4P3W	66.08	0.75	-0.78
7, 8	532 - 720	2K7Q	37.64	0.43	-1.89
9	721 - 847	1V05	56.67	0.64	-0.68

### 2.3 拟穴青蟹 FLN c 的分段表达及产物鉴定

对 FLN c 一系列的生物信息学分析, 并根据氨基酸数目将 FLN c 分为 3 部分进行分段重组表达 (Domain 1~4、Domain 5~6、Domain 7~9), 定位 FLN c 抗原表位优势区。将测序正确的阳性转化子于 37 °C 诱导表达 4 h, 结果如图 3a 所示, 阳性转化子均可在上清液中表达, 表观相对分子质量分别为 77, 63, 75 ku。为了鉴定重组蛋白, 分别挑选表达量较高的 1、6、12 号阳性转化子的重组蛋白上清液与拟穴青蟹 FLN c 多克隆抗体结合, 结果如图 3b 所示, 重组蛋白上清液均能与抗体特异性结合, 说明表达的重组蛋白即为拟穴青蟹 rFLN c1、rFLN c2、rFLN c3。



说明: M—标准蛋白分子质量; 泳道 1~3—rFLN c1 的阳性转化子; 泳道 4~8—rFLN c2 的阳性转化子; 泳道 9~13—rFLN c3 的阳性转化子; 泳道 0—未加转化子的空载。

Note: M—Protein marker; lane 1-3—rFLN c1 positive transformants; lane 4-8—rFLN c2 positive transformants; lane 9-13—rFLN c3 positive transformants; lane 0—none transformants.

图 3 FLN c 的分段表达及产物鉴定

Fig.3 Segmented expression and identification of FLN c

## 2.4 表达蛋白的纯化及 IgE 结合活性分析

为了测定 FLN c 的分段表达产物致敏性差异, 定位抗原表位所在结构域, 将 rFLN c1、rFLN c2、rFLN c3 分别进行纯化, 并用蟹类过敏患者血清验证其 IgE 结合活性, 结果如图 4 所示。由图 4a、图 4b、图 4c、图 4d 可见, 重组蛋白均能用镍柱纯化后得到单一蛋白条带。纯化蛋白的血清学分析如图 4e 所示, 根据箭头分别指出的重组蛋白的免疫印迹可知, rFLN c2 的血清比 rFLN c1、rFLN c3 有较强的 IgE 结合能力, 即 rFLN c2 的致敏性最强, rFLN c1 的致敏性最弱, 而非过敏患者血清池与重组蛋白未发生反应 (见图 4f)。

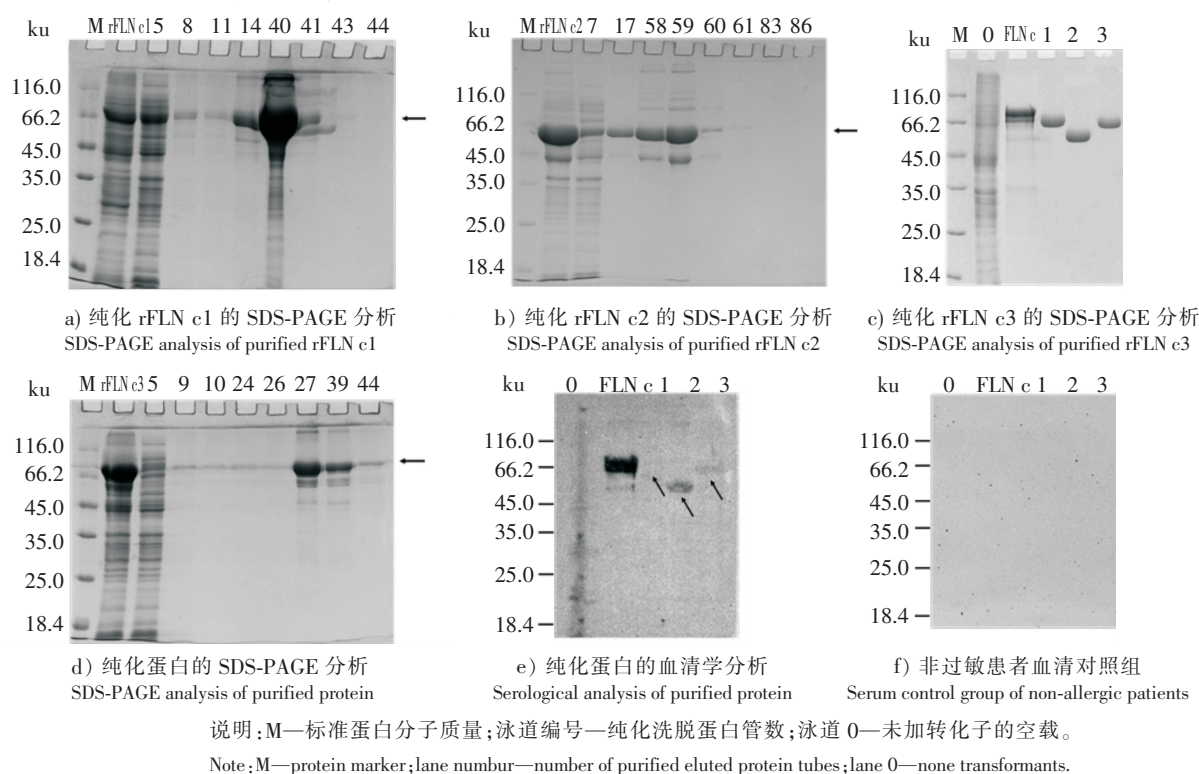


图 4 目的蛋白的纯化及致敏性分析

Fig.4 Purification and allergenicity analysis of target protein

## 3 讨论

本研究首先通过一系列生物信息学分析手段, 预测了拟穴青蟹 FLN c 的二级结构, 结果与克氏原螯虾天然 FLN c 二级结构相似。通过预测拟穴青蟹 FLN c 结构域组成, 发现其具有 9 个结构域。由于数据库缺乏细丝蛋白家族的完整晶体结构数据, 因此通过其结构域组成将拟穴青蟹 FLN c 以人 FLN a、FLN c 的不同结构域的晶体结构同源建模, 分别模拟了 FLN c 的空间结构。结果显示, 拟穴青蟹 FLN c 的模拟三级结构均是由首尾相连的结构域组成的单体, 结构相似且 Domain 1 与 Domain 2、Domain 3 与 Domain 4、Domain 5 与 Domain 6、Domain 7 与 Domain 8 之间紧密连接, 对 FLN c 的三维结构研究提供一定的理论参考。由于缺少甲壳类水产品 FLN c 相关模板, 利用人细丝蛋白家族作为模板与拟穴青蟹 FLN c 物种同源性差异较大, 导致难以精准预测拟穴青蟹 FLN c 的三级结构, 无法实现其抗原表位的定位<sup>[7,24]</sup>。然而, 天然 FLN c 热稳定性弱, 容易降解, 且较难通过原核表达使得重组 FLN c 正确折叠, 目前尚未得到适用于晶体学分析的蛋白质。

为了获得表达量大、可溶性强的 FLN c 重组蛋白, 通过其关键致敏区域定位抗原表位优势区, 基于 FLN c 空间结构预测等生物信息学分析, 并参考氨基酸组成数量, 将 FLN c 分为 Domain 1~4、Domain 5~6 及 Domain 7~9 等 3 部分, 对 FLN c 进行了分段重组表达。由于载体带有相对分子质量为

40 ku 的 MBP 融合蛋白, 使得重组蛋白 rFLN c1、rFLN c2、rFLN c3 的表达量及溶解性明显增强<sup>[19-20]</sup>, 表达于上清液中证明蛋白质的正确折叠, 同时导致目的蛋白的分子质量偏大。利用拟穴青蟹 FLN c 的多克隆抗体对目的蛋白鉴定, 结果表明, 特异性抗体均可识别目的蛋白, 其中 rFLN c3 的 IgG 结合能力较弱, 可能的原因是由于此结构域中 IgG 结合表位较少。另外, 为了避免载体中杂蛋白对重组蛋白致敏性的影响, 分别纯化得到了单一重组蛋白, 并且纯化方法简单, 得率高。血清学分析结果显示, rFLN c2 与蟹过敏患者血清 IgE 结合能力最强, 而之前所报道的抗原表位中 rFLN c1 含有 1 个线性表位及 1 个构象表位, rFLN c2 含有 3 个线性表位及 2 个构象表位, rFLN c3 含有 3 个线性表位及 3 个构象表位<sup>[8]</sup>。由于血液样本数量少, 可能导致未淘选得到所有表位, 且选用人体虱 FLN c 为模板, 使得到的表位信息存在偏差。由此推测, rFLN c2 可能含有更多表位, 并且在 FLN c 构象表位淘选过程中, 识别 rFLN c2 区域的构象表位的过敏患者血清 IgE 最多。综上, 推断氨基酸 336-531 结构域中的抗原表位是蟹类过敏患者血清主要识别的表位区域。此外, rFLN c2 与人 FLN a 空间结构的拟合度最高, 均为单体, 其分子质量较小且相关性质稳定, 容易获得晶体, 因此可以通过 rFLN c2 得到部分 FLN c 晶体, 从而推测出 FLN c 的完整晶体结构。

## 4 结论

本研究通过生物信息学分析, 预测了拟穴青蟹 FLN c 的高级结构, 利用原核表达获得了 rFLN c1、rFLN c2 和 rFLN c3, 血清学实验表明, 氨基酸 336-531 结构域可能是抗原表位优势区。另外, rFLN c2 可用于 FLN c 的晶体学研究, 为过敏组分诊断提供理论依据。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 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. DOI:10.1016/J.TIFS.2019.03.025.
- [2] LIU G Y, MEI X J, HU M J, et al. Analysis of the allergenic epitopes of tropomyosin from mud crab using phage display and site-directed mutagenesis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(34): 9127-9137. DOI:10.1021/ACS.JAFC.8B03466.
- [3] YANG Y, LIU G Y, YANG H, et al. Crystal structure determination of *Scylla paramamosain* arginine kinase, an allergen that may cause cross-reactivity among invertebrates [J]. Food Chemistry, 2019, 271: 597-605. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2018.08.003.
- [4] HU M J, LIU G Y, YANG Y, et al. Cloning, expression, and the effects of processing on sarcoplasmic calcium-binding protein: an important allergen in mud crab [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(30): 6247-6257. DOI:10.1021/ACS.JAFC.7B02381.
- [5] LI M S, XIA F, LIU M, et al. Cloning, expression, and epitope identification of myosin light chain 1: an allergen in mud crab [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(37): 10458-10469. DOI:10.1021/ACS.JAFC.9B04294.
- [6] 陈仲玮, 费丹霞, 杨阳, 等. 拟穴青蟹新型过敏原磷酸丙糖异构酶的鉴定分析 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2016, 21(6): 428-437.
- [7] XIA F, LI M S, LIU Q M, et al. Crystal structure analysis and conformational epitope mutation of triosephosphate isomerase, a mud crab allergen [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(46): 12918-12926.
- [8] YANG Y, HU M J, JIN T C, et al. A comprehensive analysis of the allergenicity and IgE epitopes of myosinogen allergens 472 in *Scylla paramamosain* [J]. Clin Exp Allergy, 2019, 49(1): 108-119. DOI:10.1111/CEA.13266.
- [9] BORCH J S, EISUM A S V, KRAG T, et al. Expanding the phenotype of filamin-C-related myofibrillar myopathy [J]. Clinical Neurology and Neurosurgery, 2019, 176: 30-33. DOI:10.1016/J.CLINURO.2018.11.013.
- [10] GEMELLI C, PRADA V, FIORILLO C, et al. A novel mutation in the N-terminal acting-binding domain of filamin C protein causing a distal myofibrillar myopathy [J]. Journal of the Neurological Sciences, 2019, 398: 75-78. DOI:10.

- 1016/J. JNS. 2019. 01. 019.
- [11] LIGHT S, SAGIT S, ITHYCHANDA S S, et al. The evolution of filamin-A protein domain repeat perspective [J]. Journal of Structural Biology, 2012, 179(3): 289-298.
- [12] MÉNDEZ-LÓPEZ L, HELLMAN U, IBARGUREN I, et al. Filamin isoforms in molluscan smooth muscle [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1824(12): 1334-1341.
- [13] YANG Y, ZHANG Y X, LIU M, et al. Triosephosphate isomerase and filamin C share common epitopes as novel allergens of *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(4): 950-963. DOI:10.1021/ACS.JAFC.6B04587.
- [14] ACOSTA P S S, SANTOS C O, BENEDÉ S, et al. Delineation of the olive pollen proteome and its allergenome unmasks cyclophilin as a relevant cross-reactive allergen [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 18(4): 3052-3066. DOI:10.1021/ACS.JPROTEOME.9B00167.
- [15] 周亭屹, 高新昌, 党亚丽, 等. 基于生物信息学技术的生物活性肽研究进展 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 335-340.
- [16] 刘泽先, 蔡煜东, 郭雪江, 等. 中国在翻译后修饰的生物信息学研究领域的进展与前瞻 [J]. 遗传, 2015, 37(7): 621-634.
- [17] SUN N, TEKUTYEVA L, WANG S, et al. A modified weight-of-evidence approach to evaluate the allergenic potential of food proteins [J]. Toxicology Research, 2015, 4(2): 476-485. DOI:10.1039/c4tx00211c.
- [18] WALKER M J, BURNS D T, ELLIOTT C T, et al. Is food allergen analysis flawed?: health and supply chain risks and a proposed framework to address urgent analytical needs [J]. Food Function, 2016, 141(1): 24-35. DOI:10.1039/c5an01457c.
- [19] JIN T C, CHUENCHORW, JIANG J S, et al. Design of an expression system to enhance MBP-mediated crystallization [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-11. DOI:10.1038/srep40991.
- [20] JIN T C, HUANG M, SMITH P, et al. Structure of the caspase-recruitment domain from a zebrafish guanylate-binding protein [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, 2013, 69: 855-860. DOI:10.1107/S1744309113015558.
- [21] GUO C, CAO M J, LIU G M, et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of a myofibril-bound serine proteinase from the skeletal muscle of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(4): 1510-1516. DOI:10.1021/JF062801C.
- [22] 梁银龙, 曹敏杰, 郭川, 等. 蟹类原肌球蛋白基因的克隆与表达 [J]. 水产学报, 2009, 33(1): 24-29.
- [23] 林江伟, 游洪燕, 沈海旺, 等. 克氏原螯虾原肌球蛋白的纯化及过敏原性分析 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2012, 17(3): 167-174.
- [24] 赵祥杰, 李琳, 杨荣玲, 等. 家蚕蛹糖水解酶 18 家族几丁质酶的抗原表位预测与结构分析 [J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 85-90.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)