

论著

转基因食品胰蛋白酶抑制剂活性的测定

王国栋 王 竹 杨晶明 韩军花 杨月欣

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 通过测定转基因食品的胰蛋白酶抑制剂活性,为建立转基因食品营养评价标准提供数据。方法 首先通过探讨胰蛋白酶-底物-胰蛋白酶抑制剂的剂量反应关系,建立转基因食品胰蛋白酶抑制剂活性测定的最佳反应体系,并以此为基础分析了部分转基因玉米、大豆的胰蛋白酶抑制剂活性及与亲本食品的差别。结果 所检转基因食品胰蛋白酶抑制剂活性大多与亲本食品差别不大,尽管个别产品出现胰蛋白酶抑制剂活性增高或降低现象,但都在可接受范围。结论 在规范检测技术前提下加强对非转基因食品基础数据建设对制定转基因食品营养评价标准十分必要。

关键词:转基因;食品;基因修饰;胰蛋白酶抑制剂;营养评价

Determination of Trypsin Inhibitor Activity in Genetically Modified Foods

WANG Guo-dong, WANG Zhu, YANG Jing-ming, HAN Jun-hua, YANG Yue-xin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: **Objective** To accumulate data of trypsin inhibitor activity in genetically modified (GM) foods, in order to assess nutrition of GM foods. **Method** After studied the dose response relationships among trypsin (TP)-substrate-trypsin inhibitor (TI), an optimal reaction system was set up. Then, TI activities in GM samples including corns and soybeans were determined in comparison with their non-transgenic counterparts. **Results** Statistically significant differences in TI activity were not identified for most GM samples except two. But in regard to TI physiological significance and distribution in normal foods, the difference presented in the 2 samples was considered as acceptable. **Conclusion** More cautious in attitude should be taken when evaluate GM nutrition and safety, and it is necessary to strengthen basic data construction for transgenic foods on the premise of uniform analytical techniques.

Key words: Transgenes; Food, Genetically Modified; Trypsin Inhibitor; Nutrition Assessment

转基因食品 (genetically modified food, GM) 的食用安全性及对营养价值的影响已成为人们关注的重要问题,分析及检测其营养成分、抗营养成分及非预期成分是转基因食品营养与安全评价中的重要内容。胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor, TI) 是天然存在于植物性食品中的酶抑制剂,当人体摄入含有高活性胰蛋白酶抑制剂的食物后可干扰蛋白质的吸收利用。由于 TI 以种子中含量较高,因此对转基因谷物、大豆、菜籽等食品进行评估时, TI 活性是检测内容之一。本研究针对 TI 检测方法的技术问题进行了研究,并在遵循“实质等同性原则”^[1]基础上分析了部分转基因食品的 TI 活性,为转基因食品评价提供资料。

1 材料与方法

1.1 试剂

胰蛋白酶 (trypsin, TP) 分别购自 Sigma 公司,活性为 12 700 U/mg、8 750 U/mg; Difco 公司,活性为 2 500 U/mg。临用前 TP 用 1 mmol/L HCl 溶液配制成浓度分别为 0.02、0.05、0.10 和 0.20 mg/ml 的溶液,使 TP 酶活范围在 0~2 540 U/ml。

转基因食品包括大豆、玉米及其亲本对照,来自美国孟山都公司。胰蛋白酶抑制剂 (试剂, TI-R) 源自大豆制品,购自 Sigma 公司,1 mg 可以抑制 1.4 mg 活性为 10 000 U 的胰蛋白酶。

底物 Na-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯酰胺盐酸盐 (BAPNA) 来自 BioChemika 公司。临用前用 Tris 缓冲液配成 0.40 mg/ml 的底物溶液。

浸提液为 0.01 mol/L NaOH。反应终止液为 5 mol/L 冰乙酸。

1.2 胰蛋白酶抑制剂活性测定反应条件的确立

TI 的测定原理及方法基本参照 AACC 71-10 法^[2],即 TP 作用于反应底物 BAPNA,释放出黄色的

基金项目:国家科技部 973 课题 (2007CB109207)

作者简介:王国栋 男 主管技师

通讯作者:王 竹 女 副研究员

对硝基苯胺,在 410nm 波长有最大吸收峰;当有 TI 存在时,可以抑制这一反应,使最大吸收下降,其下降程度与 TI 活性呈正比。

1.2.1 TP 用量与底物的反应关系 取一套测试管,依次加入 2.0 ml 蒸馏水、2.0 ml 不同酶活浓度的 TP 溶液(0 ~ 2 540 U/ml)及 5 ml 底物溶液(BAPNA 0.40 mg/ml),于(37 ± 0.5) °C 水浴中准确反应 10 min,加 1.0 ml 5 mol/L 冰乙酸,终止反应后于 410 nm 下测定吸光度值。分析 TP 酶活浓度与 BAPNA 的反应关系,确立在底物含量固定的前提下最适 TP 用量。

1.2.2 TI 活性测定与 TP 用量的关系 1)以胰蛋白酶抑制剂溶液(TI-R, 0.02 mg/ml)作为待测液,观察不同 TP 用量对 TI 测定的影响。取系列测试管中分别加入 0.0、0.3、0.6、1.0 和 1.5 ml TI-R 溶液,加水调节总体积至 2.0 ml,按 1.2.1 步骤依次加入 2.0 ml 不同酶活浓度的 TP 溶液(0 ~ 875 U/ml)及底物,反应 10 min 后测定吸光度值;2)在 TP 用量固定的前提下观察 TI-R 浓度对测定结果的影响。以不同浓度 TI-R 溶液(0.01、0.02、0.05、0.10 mg/ml)为待测液,根据 1.2.1 确定的 TP 最适用量进行反应,观测吸光度值的变化,获得并分析反应抑制曲线。

1.3 转基因食品 TI 测定

样品粉碎后取 0.200 ~ 1.000 g 加入 50 ml 0.01 mol/L NaOH 电磁搅拌下浸提 3 h,定容过滤,必要时适当稀释。取浸提液 0.0 ml(非抑管)、0.3、0.6、1.0、1.5、2.0 ml 至试管中,按照已确立的条件完成反应。

1.4 结果表述

以不含 TI 的 0 管为非抑管,根据其吸光度值可计算反应体系中存在的 TP 活性(TU),即反应 10 min 后 410 nm 波长下吸光度值为 0.01 的倍数。和非抑管相比,其他测试管的吸光度值按每分钟降低 0.01 为 1 个胰蛋白酶抑制剂单位(TIU)进行计算,测定转基因食品的 TI 活性。

1.5 统计分析

转基因食品 TI 活性测定结果以($\bar{x} \pm s$)表示,与亲本食品间的差别采用 *t* test 进行统计学检验。TP、TI 反应曲线线性关系采用双变量相关分析,以 $P < 0.05$ 作为检验显著性水准,所有统计学分析采用 Excel 软件。

2 结果

2.1 TI 活性测定反应体系的确立

2.1.1 最适 TP 用量的确定 当反应体系中 BAPNA 含量固定时,TP 用量与 BAPNA 反应关系见图 1。可以看到,当 TP 用量在 0 ~ 500 U/ml 时,TP 与 BAPNA

反应充分,曲线呈现良好的直线线性关系;超过切点(875 U/ml)后,底物相对不足,使二者反应达到饱和状态,反应曲线进入平台。提示在底物浓度为 0.40 mg/ml 的条件下,TP 用量不宜超过 875 U/ml。

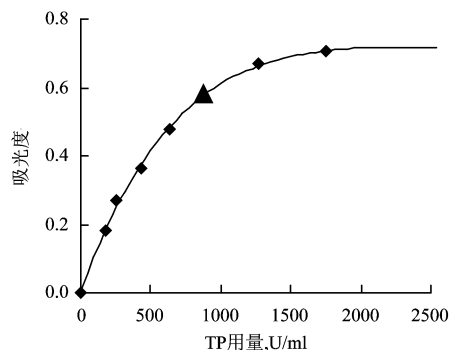


图 1 胰蛋白酶活性与 BAPNA 反应关系

2.1.2 TP 用量与 TI 活性测定的关系

从 TP 用量对 TI 活性测定的影响来看(图 2),当 TP 与底物反应充分时,在一定的 TP 用量范围内(175 ~ 437 U/ml),TI-R 起到了明显的抑制作用,尽管随 TP 用量升高非抑管及各测定管吸光度值升高,但 TI-R 抑制反应曲线变化趋势基本一致;但当 TP 用量继续升高时(> 635 U/ml),则 TI-R 抑制效果弱化,以致未见明显的吸光度值改变,这可能与相对于 TP 用量而言 TI-R 浓度或活性较低有关。

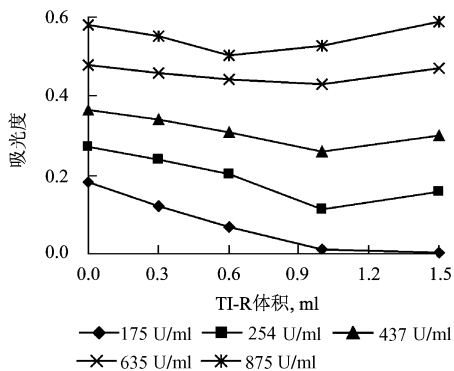


图 2 TP 用量对 TI 活性测定的影响

为此,本研究进一步观察在 TP 用量固定(500 U/ml)的条件下,不同浓度 TI-R 对 TP 的抑制反应及曲线关系(图 3)。结果发现,当 TI-R 浓度在 0.01 ~ 0.02 mg/ml 范围时,TI 抑制反应呈良好的等比例关系。当 TI-R 浓度较高时,则可过分抑制 TP 活性,使吸光度值快速下降(如图 3 TI-R 0.05、0.10 mg/ml 的抑制反应曲线),提示 TP 用量与 TI 浓度的适配性对 TI 活性测定起到重要作用。

2.2 转基因食品 TI 活性的测定

根据以上研究,在确定反应条件基础上,建立了典型的 TI 测定校正曲线(如图 4, $R^2 = 0.9992$, $P < 0.01$),并完成几种转基因食品及其亲本对照的 TI 活

性测定(见表 1)。结果发现,有两个转基因食品的 TI 活性与亲本食品的差异存在统计学意义($P < 0.05$)。

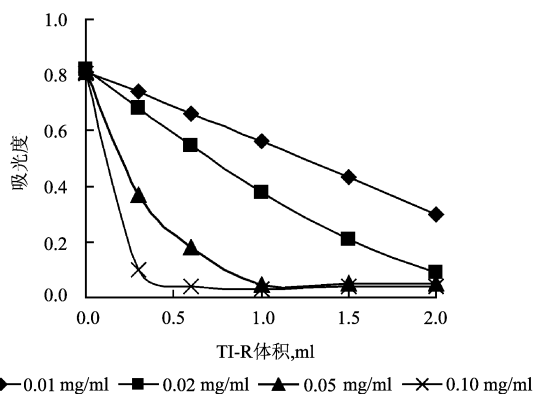


图 3 TI - R 浓度与抑制反应曲线的关系

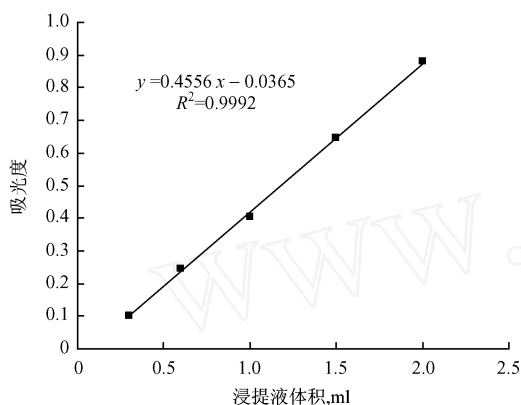


图 4 样品 TI 活性测定的校正曲线

表 1 8 种转基因食品胰蛋白酶抑制剂活性($\bar{x} \pm s, n = 6$)

名称	TIU/g		备注
	亲本食品	转基因食品	
玉米			
NK603	101 ±14	95 ±10	
GA21	111 ±15	129 ±19	
MON863	112 ±17	114 ±7	
MON810	129 ±17	127 ±13	
MON88017	686 ±10	578 ±52 ^a	
大豆			
抗农达 40 - 3 - 2	4374 ±320	4450 ±344	
MON89788	2594 ±51	3150 ±232 ^a	3517 ±148 ^b
豆粕	未检出	未检出	

注:1^a为同亲本食品相比, $P < 0.05$; 2^b为本地生产的非亲本普通食品和转基因食品相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 胰蛋白酶抑制剂活性的检测体系

胰蛋白酶抑制剂活性测定涉及到 TP - 底物 - TI 活性三者间“量”的平衡,因此在完成转基因食品 TI 活性测定之前,必须建立完善的反应体系,以获得准确、可信和重现性高的 TI 活性测定数据,为转基因食品与亲本食品的“同质”对比提供可靠资料。

由于 TP 试剂的来源、规格存在一定差异,因此在建立反应体系之前需对 TP 酶活、用量与底物浓度的适配性进行摸索,以满足在进一步的 TI 测定时有足够的潜力,既保证 TP 与底物 BAPNA 的反应强度,又避免因 TP 过量造成的反应不充分产生测定结果的假阴性。对 TI 浓度(活性)与 TP 用量关系的研究同样说明了二者的协调性。从图 2 和图 3 抑制反应曲线的斜率可以看出, TI 对胰蛋白酶的抑制强度并不随浓度升高呈等比例线性改变,当 TI 活性相对于 TP 用量过小时,不足以引起吸光度值的显著变化(如图 2 中 TP 875 U/ml 曲线);当 TI 活性过大时,吸光度值则大幅下降(如图 3 中 0.05 mg/ml 和 0.10 mg/ml 曲线);只有当 TI 活性与 TP 用量适当配比时才表现出良好的线性抑制反应关系,并可由此推算出使吸光度值降低 50% (50%抑制率)时样品含量。根据图 3 中 TI - R 0.01 mg/ml 和 0.02 mg/ml 的抑制反应曲线,计算 TI - R 的 50%抑制率为 0.016 mg/ml。有研究探讨不同来源的大豆 TI 对胰蛋白酶的抑制活性及其二级结构的组成差异,也同样发现了大豆 TI 对胰蛋白酶的抑制曲线分为急剧下降和缓慢下降两部分, TI 虽不改变胰蛋白酶的动力学常数(K_m),但随抑制剂浓度增加最大反应速度改变,提示 TI 对 TP 的抑制作用是一种非竞争性抑制作用^[3]。为严格控制 TP - 底物 - TI 三者之间的剂量反应关系,建议 TI 测定曲线中至少有 3 点的抑制率在 20% ~ 70% (和非抑制管吸光度值相比)之间^[4],并呈良好的线性关系,否则 TI 测定视为无效。

3.2 转基因食品 TI 活性

一般来讲,转基因食品营养评价原则上应遵循“实质等同”的判断标准,即转基因食品的营养价值应与亲本食品没有差别。但对于转基因食品营养评价毕竟不同于安全评价,尤其是当前不少转基因产品本身就是专门针对于改善食品营养价值而设计的,如提高油含量的大豆等,因此建立全面的转基因食品营养评价技术和方法以及恰当的判断标准是十分必要的。这个判断标准既应包括同亲本食品“含量”的差异,又应包括与其他同类产品相比其差异的可接受程度,以及对健康影响“意义”上的差异。就本研究检测的产品而言,MON88017 玉米转基因后 TI 活性显著低于亲本食品,由于 TI 被认为是影响蛋白质消化吸收的抗营养物质,这种“显著降低”应被认为“实质不等同”还是被理解为有益健康尚需深入讨论。对大豆产品 MON89788 而言,经转基因后 TI 活性虽然显著升高,但与同一产地出产的其他非亲本普通大豆的 TI 水平相比,仍处于“可接受”的水平;并且大豆经过高温加热处理或生产为豆粕之后

论著

牛初乳对免疫抑制小鼠免疫功能影响的研究

万忠晓 张 锋 耿 倩 张玉梅

(北京大学医学部营养与食品卫生学系,北京 100191)

摘 要:目的 探讨牛初乳对免疫抑制小鼠免疫功能的影响。方法 将 ICR 雌性小鼠随机分为五组:正常对照组,模型对照组和牛初乳低、中、高剂量组。观察不同剂量牛初乳对免疫抑制小鼠脾指数、胸腺指数、细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞吞噬功能及脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响。结果 三个剂量组的脾指数和胸腺指数显著低于正常对照组($P < 0.01$)。中、高剂量组脾脏 T 淋巴细胞增殖能力显著高于模型对照组($P < 0.01$)。三个剂量组溶血空斑数均显著高于模型对照组但低、高剂量组低于正常对照组($P < 0.01$)。三个剂量组校正后吞噬系数明显高于模型对照组及正常对照组($P < 0.01$)。中剂量组脾脏 T 淋巴细胞中 CD4+ 百分比显著高于模型对照组及正常对照组($P < 0.01$)。结论 牛初乳能够有效提高免疫抑制小鼠细胞免疫、体液免疫、单核-巨噬细胞吞噬功能和脾脏 CD4+ 百分比。

关键词:环磷酰胺;免疫;T 淋巴细胞;淋巴细胞亚群;初乳

Study of the Effect on The Immunological Function of Bovine Colostrum in Immunosuppressive Mice

WAN Zhong-xiao, ZHANG Feng, GENG Qian, ZHANG Yu-mei

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Health Science Center, Peking University, Beijing 100191, P. R. China)

Abstract: Objective To observe the effects of bovine colostrum (BC) on the immunological function in immunosuppressive mice. **Methods** Female ICR mice were randomly assigned into five groups: normal control group (NC), model control group (MC), low, medium, and high dosage BC groups (BL, BM, BH). Four weeks later, spleen and thymus were weighted, cell-mediated immune function, humoral immune function, phagocytic function of mononuclear phagocyte and the T cell subpopulation in spleen were assayed. **Results** The spleen and thymus index in BL, BM and BH were drastically decreased in comparison with NC ($P < 0.01$). The capacities of lymphocyte proliferation induced by ConA in BM and BH were obviously higher than those of MC ($P < 0.01$). The numbers of hemolytic plaques in all three BC groups were larger than those of MC ($P < 0.01$), yet the values in BL and BH were much smaller than NC ($P < 0.01$). All the BC groups' corrected phagocytic coefficient were drastically higher than MC and NC ($P < 0.01$). Lastly, the CD4+ T cell of spleen in BM were greatly higher than MC and NC ($P < 0.01$). **Conclusion** Bovine colostrum was efficaciously increase cellular immune level, antibody forming level and phagocytic function of mononuclear phagocyte and the decrease of CD4+ T cell in spleen inhibited by cyclophosphamide.

Key words: Cyclophosphamide; Immunity; T Lymphocytes; Lymphocyte Subsets; Colostrum

TI 可被有效灭活。因此,如何合理判断转基因食品 TI 活性的差异,需在统一分析方法基础上完善亲本食品或非转基因食品的基线调查,通过建立恰当的评估方法和程序,解决转基因食品“质”、“量”评价的技术问题。

参考文献

[1] 王锐,杨晓光. 国际组织和世界各国对转基因食品的管理[J].

卫生研究,2007,36(2):245-247.

[2] Approved methods of the american association of cereal chemists, 10th Edition. AACC Inc., MN, USA. 2003: Measurement of Trypsin Inhibitor Activity of Soy.

[3] 黄惠华,梁汉华,郭乾初,等. 两种大豆胰蛋白酶抑制剂的抑制活性及二级结构分析比较[J]. 食品科学,2005,26(3):46-49.

[4] NY/T1103.2-2006 转基因植物及其产品食用安全检测,抗营养因素第 2 部分:胰蛋白酶抑制剂的测定.

[收稿日期:2009-01-24]

中图分类号:R15;R151;Q55;Q78;TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2009)03-0232-04

基金项目:国家自然科学基金(30471449)

作者简介:万忠晓 女 硕士生

通讯作者:张玉梅 女 副教授