

## 论著

转基因牛的重组人 $\alpha$ -乳清白蛋白的离体和体外消化稳定性研究张英<sup>1</sup>,刘珊<sup>2</sup>,徐海滨<sup>2</sup>,王小丹<sup>2</sup>,张立实<sup>1</sup>

(1. 四川大学华西医学中心公共卫生学院,四川 成都 610041;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**目的 通过测定转人 $\alpha$ -乳清白蛋白基因的克隆牛所表达的重组人 $\alpha$ -乳清白蛋白在模拟胃肠液及小型猪胃肠液中的消化时间,并与人 $\alpha$ -乳清白蛋白标准品在上述消化液中的消化时间相比较,判定该重组蛋白的消化稳定性,为其致敏性评价提供基础资料。方法 根据《转基因生物及其产品食用安全检测——模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法》消化人 $\alpha$ -乳清白蛋白标准品和重组人 $\alpha$ -乳清白蛋白,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白免疫印迹法(Western blotting)分析消化后的样品。结果 重组人 $\alpha$ -乳清白蛋白在模拟胃液中0 s即被完全消化,模拟肠液中10 min内完全消化,在小型猪胃液和肠液中均在20 min内被完全消化。虽然完全消化的时间存在差异,但均在20 min内。重组蛋白与人 $\alpha$ -乳清白蛋白标准品的消化稳定性相似。结论 重组人 $\alpha$ -乳清白蛋白在模拟胃肠液及小型猪胃肠液中均不具有消化稳定性。

**关键词:**  $\alpha$ -乳清白蛋白;消化稳定性;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳;蛋白免疫印迹法;致敏性

中图分类号:Q512.1;R446.62 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)03-0205-07

**The *in vitro* and *ex vivo* digestibility of human  $\alpha$ -lactalbumin derived from recombinant bovine**

Zhang Ying, Liu Shan, Xu Haibin, Wang Xiaodan, Zhang Lishi

(West China School of Public Health Sichuan University, Sichuan Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** To judge the stability and digestibility of human  $\alpha$ -lactalbumin derived from recombinant bovine. To compare the digestion time for the recombinant human  $\alpha$ -lactalbumin with that for standard human  $\alpha$ -lactalbumin in simulated gastric and intestinal fluid or in gastric and intestinal fluid extracted from miniature swine. This would provide basic materials for assessing the allergenicity of recombinant proteins. **Methods** The recombinant protein and human  $\alpha$ -lactalbumin standard substance were digested according to the national standard method *Food safety detection of genetically modified organisms and derived products—Method of target protein digestive stability in simulative gastric and intestinal fluid*. The samples after digestion were analyzed with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. **Results** The recombinant protein samples were digested completely within 0 s in simulated gastric fluid; 10 min in simulated intestinal fluid; and 20 min in gastric and intestinal fluid of miniature swine. The digestion time was all less than 20 min for recombinant protein samples, which was similar for human  $\alpha$ -lactalbumin standard substance, although some differences were existed. **Conclusion** There was no digestion resistance of the recombinant protein in simulated gastric and intestinal fluid or in gastric and intestinal fluid extracted from miniature swine.

**Key words:**  $\alpha$ -Lactalbumin; digestibility; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); western blotting; allergenicity

人乳所含蛋白质主要为酪蛋白和乳清蛋白,其中乳清蛋白约占50%~60%。 $\alpha$ -乳清白蛋白( $\alpha$ -lactalbumin, $\alpha$ -LA)是人乳清蛋白中含量最为丰富的物质,平均含量达到 $(2.44 \pm 0.64)$  g/L<sup>[1]</sup>,约占蛋白

质总量的42.4%<sup>[2]</sup>;牛乳中 $\alpha$ -LA含量相对较低,约为1.2 g/L<sup>[3]</sup>,仅占蛋白质总量的2%~5%<sup>[4]</sup>。

牛 $\alpha$ -LA与人 $\alpha$ -LA之间有74%的氨基酸残基相同,另外有6%的化学性质相似。尽管如此,牛 $\alpha$ -LA已被证实是牛乳中主要的致敏原之一( $\beta$ -乳球蛋白、 $\alpha$ -LA和牛血清白蛋白)<sup>[5,6]</sup>,可引起IgE介导的过敏反应。研究表明,牛 $\alpha$ -LA的主要抗原位点存在于第5至18个氨基酸构成的肽段,而这一区域正是和人 $\alpha$ -LA氨基酸序列差别最大的一部分<sup>[7]</sup>。

尽管牛 $\alpha$ -LA有潜在致敏性,诸多研究表明 $\alpha$ -

收稿日期:2010-11-15

基金项目:国家高科技研究发展计划(863计划)(2007AA100506)

作者简介:张英 女 硕士生 研究方向为食品毒理及保健食品功能性评价 E-mail:zhangying19850203@163.com

通信作者:徐海滨 男 研究员 E-mail:hbxu1231602@vip.sina.com

LA 具有多种重要生理功能,如使乳糖合成量增加、增加泌乳,改善睡眠、抗焦虑和提高认知能力, $\alpha$ -LA 的蛋白-脂质复合物活性形式还具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[8]</sup>。人  $\alpha$ -LA 同样具有这些生理功能,转人  $\alpha$ -LA 基因的动物生产的重组蛋白与牛  $\alpha$ -LA 相比因其高表达量更具推广价值。

虽然目前各种克隆技术(体细胞核移植技术、胚胎干细胞法等)日趋成熟,但对转基因动物产生的重组蛋白进行安全性评价在国际上还是一个崭新的领域,潜在致敏性是其中必需的评价内容。2001年联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)提出了《转基因食品的致敏性评价》,建议当转入基因来自于非已知致敏物种时对表达的重组蛋白的致敏性评价应集中在以下几个方面:重组蛋白与食物及环境中已知致敏原的序列同源性比较;筛查重组蛋白与基因来源相近物质的过敏病人血清是否会发生交叉反应;重组蛋白的胃蛋白酶抗性以及动物模型实验<sup>[9]</sup>。2003年食品法典委员会(CAC)制定的《转基因植物的安全性评价指南》中也强烈推荐在评价新表达蛋白的致敏性时采用胃蛋白酶抗性实验<sup>[10]</sup>。

本研究通过测定重组人  $\alpha$ -LA 在模拟胃肠液及小型猪胃肠液中的消化时间,并与人  $\alpha$ -LA 标准品在上述消化液中的消化时间相比较,判定重组蛋白的消化稳定性,为重组人  $\alpha$ -LA 的致敏性评价提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

重组  $\alpha$ -LA 由上海交通大学经仿生亲和纯化技术制得,电泳分析纯度达 95% 以上;人  $\alpha$ -LA 标准品、胃蛋白酶(酶活力为 3 200 U/mg 固体)和胰酶(满足 1995 年版《美国药典》标准)均购自 Sigma 公司;SDS-PAGE 所用的 NuPAGE 4% ~ 12% Bis-Tris 凝胶、LDS 上样缓冲液(4 ×)、标准蛋白(3.5 ~ 260 kDa)和 simply blue safe stain 染液均购自 Invitrogen 公司;重组人  $\alpha$ -LA 抗小鼠血清为本实验室按常规免疫方案免疫 Balb/C 小鼠并纯化所得;辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG(HRP-IgG)购自中杉生物工程公司;Western blotting 发光试剂购自 Santa Cruz 公司;硝酸纤维素膜(0.45  $\mu$ m)购自 Bio-Rad。电泳槽、电转移槽及凝胶成像系统均购自 Bio-Rad 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 小型猪胃肠液的获得

本实验所用的生理胃肠液来源于我国本土驯

化和培育的实验用近交系五指山小型猪。通过手术在成年(22 ~ 30 kg)雄性小型猪体内同时安置胃肠瘘管,其中胃瘘安置在胃大弯处,肠瘘安置在回肠远端。术后 14 d 稳定后,禁食 16 h 采集胃肠消化液。

#### 1.2.2 模拟胃肠液及小型猪胃肠液中的蛋白消化实验

以人  $\alpha$ -LA 标准品和重组人  $\alpha$ -LA 为试样蛋白,以模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)、模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF)和小型猪胃肠液作为消化液按照《转基因生物及其产品食用安全检测——模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法》<sup>[11]</sup>进行消化实验。

##### 1.2.2.1 模拟胃液缓冲液和模拟肠液缓冲液中的蛋白对照(泳道 2 和 3)

在 190  $\mu$ l 不含胃蛋白酶的模拟胃液缓冲液中加入 5 g/L 的试样蛋白 10  $\mu$ l,于 0 s 和 60 min 后加入 0.2 mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 70  $\mu$ l,混悬后立即加入 LDS 上样缓冲液中并于 70  $^{\circ}$ C 下加热 10 min,置于室温冷却。

模拟肠液缓冲液中蛋白对照实验同上,区别在于不加 NaHCO<sub>3</sub> 溶液。

该实验起到了蛋白的对照作用,可通过泳道 2、3 中的蛋白条带判断蛋白是否会在缓冲体系中 60 min 内自行降解。若在 2、3 泳道中未见自行降解现象,而在后面的 4 ~ 13 泳道中蛋白条带消失,则为酶消化的结果。

##### 1.2.2.2 模拟胃肠液和小型猪胃肠液中蛋白消化实验

在以小型猪胃液进行消化实验前需先测定其中是否具有酶活力及活力大小。以消化蛋白管方法测得小型猪胃液和 SGF 消化蛋白管的平均长度分别为 2.92 和 3.40 mm。胃蛋白酶活力 =  $16 \times$  平均消化长度<sup>2</sup>,其中,平均消化长度单位为 mm。因此小型猪胃液与 SGF 的胃蛋白酶活力之比约为 0.74:1。

##### 1.2.2.3 反应时间为 0 s 的蛋白消化实验(泳道 4)

将 190  $\mu$ l SGF 或小型猪胃液与 70  $\mu$ l 0.2 mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液同时加入反应管中,使 pH 值由原来的 1.2 变为弱碱性,胃蛋白酶失活,37  $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后加入 5 g/L 的试样蛋白溶液 10  $\mu$ l,漩涡振荡后立刻冰浴,约 10 min 后将反应液加入 LDS 上样缓冲液中并于 70  $^{\circ}$ C 下加热 10 min,置于室温冷却。

SIF 或小型猪肠液消化蛋白 0 s 方法同上,区别在于不加 NaHCO<sub>3</sub> 溶液且无需冰浴。

### 1.2.2.4 不同反应时间的蛋白消化实验(泳道5~13)

1.9 ml 的 SGF 或小型猪胃液在 37 °C 恒温水浴 5 min, 加入 5 g/L 的试样蛋白溶液 100  $\mu$ l, 混悬后立即计时。分别在每个时间点 15、30 s、1、2、5、10、20、30 和 60 min 迅速吸取 200  $\mu$ l 反应液加入到含有 70  $\mu$ l 0.2 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液的离心管中, 混悬后立即冰浴以终止反应。约 10 min 后将反应液加入到 LDS 上样缓冲液中并于 70 °C 下加热 10 min, 置于室温冷却。

SIF 或小型猪肠液消化蛋白方法同上, 区别在于不加 NaHCO<sub>3</sub> 溶液且无需冰浴。

### 1.2.2.5 消化体系中胃蛋白酶或胰蛋白酶对照(泳道14和15)

190  $\mu$ l 的 SGF 和体内胃液在 37 °C 水浴中分别于 0 s 和 60 min 加入 10  $\mu$ l 重蒸水和 70  $\mu$ l 0.2 mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液, 混悬后立刻加入 LDS 上样缓冲液并在 70 °C 加热 10 min 后置于室温冷却。

SIF 或小型猪肠液中胰蛋白酶对照方法同上, 区别在于不加 NaHCO<sub>3</sub> 溶液。

该实验起到了酶的对照作用, 可通过观察泳道 14 和 15 的条带有无变化来判断酶在缓冲液中的稳定性。4~13 孔的条带中除去酶条带以外的条带即为蛋白条带。

### 1.2.3 SDS-PAGE 和 Western blotting

将样品上样于 4%~12% 的 Bis-Tris 凝胶中, 在 80 V 电压下电泳 2 h, 用纯水洗胶 15 min, 染液染色 1 h, 染色后以纯水脱色 3 h, 待条带清晰后以凝胶成像系统拍照记录。

在 250 mA 的电流下经过 1.5 h 将凝胶中蛋白转移至硝酸纤维素膜, 以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入 1:1 000 纯化的抗血清, 4 °C 下以 50 r/min 左右的转速振荡过夜, 洗膜后加入 1:20 000 的 HRP-IgG, 室温下振荡 1 h, 再次洗膜后加入发光试剂, 于暗室中进行显影和定影, 待胶片干燥后以凝胶成像系统拍照记录。

## 2 结果与分析

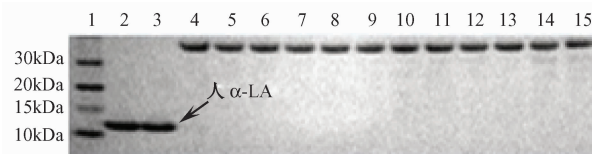
### 2.1 人 $\alpha$ -LA 标准品在 SGF 和小型猪胃液中消化实验

#### 2.1.1 SGF 中人 $\alpha$ -LA 标准品消化实验

图 1 显示分子量为 14 kDa 的人 $\alpha$ -LA 在 37 °C 的模拟胃液缓冲液中不会发生降解(泳道 2 和 3), 在 SGF 中消化 0 s(泳道 4) 即不能见蛋白条带。对图 1 的凝胶进行 Western blotting, 见图 2, 显色条带在 0 s(泳道 4) 处消失, 由此可判定人 $\alpha$ -LA 在 SGF

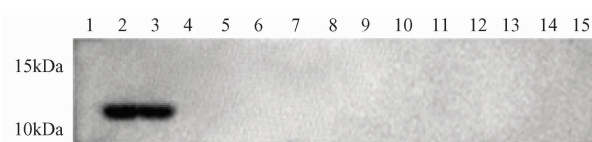
中“极易消化”。

图 2 显示的蛋白条带与 SDS-PAGE 图片中的相应条带相比更浓更粗, 这可能是由于凝胶中的微量蛋白转膜后与抗体结合, 显色灵敏度更高。



1:Marker;2,3:人 $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:人 $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化 0 s~60 min 后进行 SDS-PAGE 的结果;14,15:胃蛋白酶对照(0 s,60 min)

图 1 人 $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 1 SDS-PAGE for standard human  $\alpha$ -LA after digested in SGF

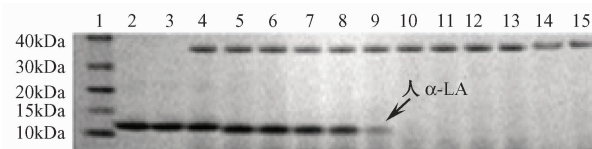


1:Marker;2,3:人 $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:人 $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化 0 s~60 min 后进行 SDS-PAGE 的结果;14,15:胃蛋白酶对照(0 s,60 min)

图 2 人 $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化后的 Western blotting  
Figure 2 Western blotting for standard human  $\alpha$ -LA after digested in SGF

### 2.1.2 小型猪胃液中人 $\alpha$ -LA 标准品消化实验

图 3 显示人 $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化 10 min(泳道 10) 后不能见蛋白条带。对图 3 的凝胶进行 Western blotting, 见图 4, 人 $\alpha$ -LA 的显色条带在 10 min(泳道 10) 处消失, 由此可判定人 $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中“可被消化”。



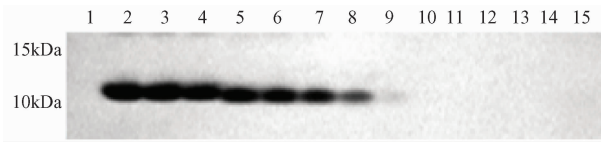
1:Marker;2,3:人 $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:人 $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:小型猪胃液中的胃蛋白酶对照(0 s,60 min)

图 3 人 $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 3 SDS-PAGE for standard human  $\alpha$ -LA after digested in gastric fluid of miniature swine

### 2.2 重组人 $\alpha$ -LA 在 SGF 和小型猪胃液中消化实验

#### 2.2.1 SGF 中重组人 $\alpha$ -LA 消化实验

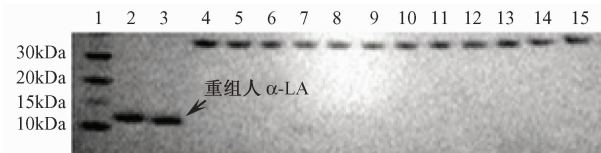
图 5 显示分子量为 14 kDa 的重组人 $\alpha$ -LA 在 37 °C 的模拟胃液缓冲液中不会发生降解(泳道 2 和 3), SGF 中消化 0 s(泳道 4) 即不能见蛋白条带。对图 5 的凝胶进行 Western blotting, 见图 6, 显色条带



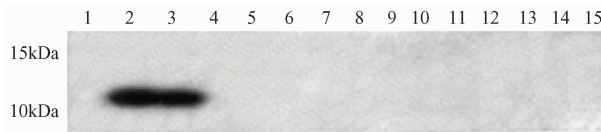
1:Marker;2,3:人  $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:人  $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:小型猪胃液中的胃蛋白酶对照(0 s,60 min)  
图4 人  $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化后的 Western blotting  
Figure 4 Western blotting for standard human  $\alpha$ -LA  
after digested in gastric fluid of miniature swine

在 0 s(泳道 4)处消失,由此可判定重组人  $\alpha$ -LA 在 SGF 中“极易消化”。

比较图 5 和图 4 可发现重组人  $\alpha$ -LA 与人  $\alpha$ -LA 标准品经电泳后在凝胶中所处的位置十分相似(即二者的分子量接近),这表明重组蛋白在基因重组的整个过程中很好地保持了原有特性。



1:Marker;2,3:重组人  $\alpha$ -LA 对照(0 s 和 60 min);  
4~13:重组人  $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:SGF 中的胃蛋白酶对照(0 s,60 min)  
图5 重组人  $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 5 SDS-PAGE for recombinant human  $\alpha$ -LA  
after digested in SGF



1:Marker;2,3:重组人  $\alpha$ -LA 对照(0 s 和 60 min);  
4~13:重组人  $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:SGF 中的胃蛋白酶对照(0 s,60 min)  
图6 重组人  $\alpha$ -LA 在 SGF 中消化后的 Western blotting  
Figure 6 Western blotting for recombinant human  $\alpha$ -LA after digested in SGF

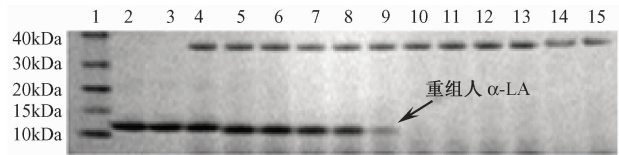
### 2.2.2 小型猪胃液中重组人 $\alpha$ -LA 消化实验

图 7 显示重组人  $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化 10 min(泳道 10)后不能见蛋白条带。对图 7 的凝胶进行 Western blotting,见图 8,重组人  $\alpha$ -LA 的显色条带在 20 min(泳道 11)处消失。结合 SDS-PAGE 和 Western blotting 图片可判定该蛋白在小型猪胃液中“可被消化”。

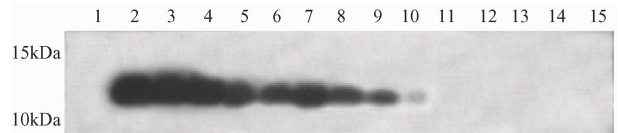
### 2.3 人 $\alpha$ -LA 标准品在 SIF 和小型猪肠液中消化实验

#### 2.3.1 SIF 中人 $\alpha$ -LA 标准品消化实验

图 9 显示人  $\alpha$ -LA 在 37  $^{\circ}$ C 的模拟肠液缓冲液

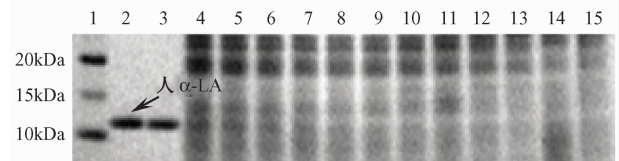


1:Marker;2,3:重组人  $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:重组人  $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:小型猪胃液中的胃蛋白酶对照(0 s,60 min)  
图7 重组人  $\alpha$ -LA 在猪胃液中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 7 SDS-PAGE for recombinant human  $\alpha$ -LA  
after digested in gastric fluid of miniature swine

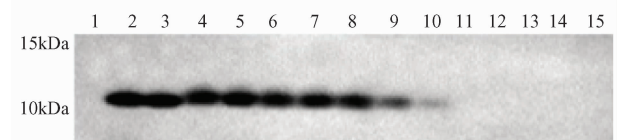


1:Marker;2,3:重组人  $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:重组人  $\alpha$ -LA 在小型猪胃液中消化 0 s~60 min 的结果;14,15:小型猪胃液中的胃蛋白酶对照(0 s,60 min)  
图8 重组人  $\alpha$ -LA 在猪胃液中消化后的 Western blotting  
Figure 8 Western blotting for recombinant human  $\alpha$ -LA  
after digested in gastric fluid of miniature swine

中未发生降解(泳道 2 和 3),在 SIF 中消化 2 min 时(泳道 8)即看不见条带。对图 9 的凝胶进行 Western blotting,见图 10,人  $\alpha$ -LA 的显色条带在 10 min(泳道 10)处消失。由此可判定人  $\alpha$ -LA 在 SIF 中“可被消化”。



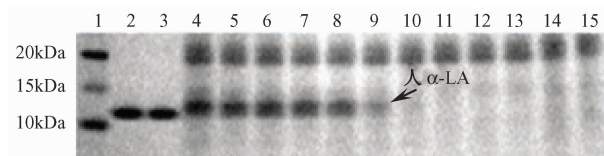
1:Marker;2,3:人  $\alpha$ -LA 标准品对照(0 s,60 min);  
4~13:人  $\alpha$ -LA 标准品在 SIF 中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:SIF 中的胰酶对照(0 s,60 min)  
图9 人  $\alpha$ -LA 在 SIF 中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 9 SDS-PAGE for standard human  $\alpha$ -LA  
after digested in SIF



1:Marker;2,3:人  $\alpha$ -LA 标准品对照(0 s,60 min);  
4~13:人  $\alpha$ -LA 标准品在 SIF 中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:SIF 中的胰酶对照(0 s,60 min)  
图10 人  $\alpha$ -LA 在 SIF 中消化后的 Western blotting  
Figure 10 Western blotting for standard human  $\alpha$ -LA after digested in SIF

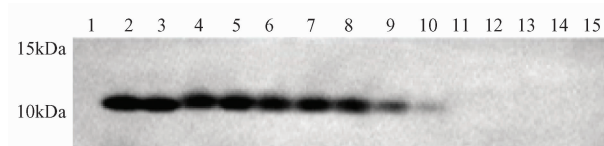
### 2.3.2 小型猪肠液中人 $\alpha$ -LA 标准品消化实验

图 11 显示人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中消化 10 min (泳道 10) 后已看不见蛋白带,对图 11 的凝胶进行 Western blotting, 见图 12, 人 $\alpha$ -LA 的显色条带在 20 min (泳道 11) 处消失, 结合 SDS-PAGE 和 Western blotting 图片可判定人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中“可被消化”。



1:Marker;2,3:人 $\alpha$ -LA 标准品对照(0 s,60 min);  
4~13:人 $\alpha$ -LA 标准品在小型猪肠液中消化 0 s~60 min 的结果;14,15:小型猪肠液中的胰酶对照(0 s,60 min)

图 11 人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 11 SDS-PAGE for standard human  $\alpha$ -LA after digested in intestinal fluid of miniature swine



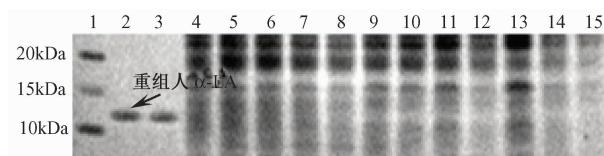
1:Marker;2,3:人 $\alpha$ -LA 标准品对照(0 s,60 min);  
4~13:人 $\alpha$ -LA 标准品在小型猪肠液中消化 0 s~60 min 的结果;14,15:小型猪肠液中的胰酶对照(0 s,60 min)

图 12 人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中消化后的 Western blotting  
Figure 12 Western blotting for standard human  $\alpha$ -LA after digested in intestinal fluid of miniature swine

## 2.4 重组人 $\alpha$ -LA 在 SIF 和小型猪肠液中消化实验

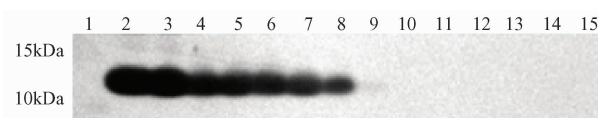
### 2.4.1 SIF 中重组人 $\alpha$ -LA 消化实验

图 13 显示重组人 $\alpha$ -LA 在 37 $^{\circ}$ C 的模拟肠液缓冲液中未发生降解(泳道 2 和 3),但由于胰酶所含的蛋白较多,条带复杂,且脱色不够彻底致使重组人 $\alpha$ -LA 在 SIF 中消化的蛋白条带被掩盖。对图 13 的凝胶进行 Western blotting, 见图 14, 显色条带在 10 min (泳道 10) 处消失。由此可判定重组人 $\alpha$ -LA 在 SIF 中“可被消化”。



1:Marker;2,3:重组人 $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:重组人 $\alpha$ -LA 在 SIF 中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15 为:SIF 中的胰酶对照(0 s,60 min)

图 13 重组人 $\alpha$ -LA 在 SIF 中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 13 SDS-PAGE for recombinant human  $\alpha$ -LA after digested in SIF

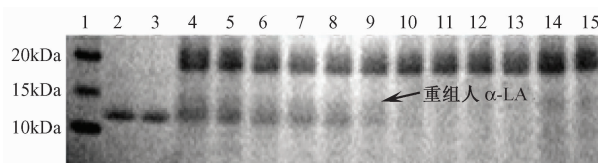


1:Marker;2,3:重组人 $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:重组人 $\alpha$ -LA 在 SIF 中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15 为:SIF 中的胰酶对照(0 s,60 min)

图 14 重组人 $\alpha$ -LA 在 SIF 中消化后的 Western blotting  
Figure 14 Western blotting for recombinant human  $\alpha$ -LA after digested in SIF

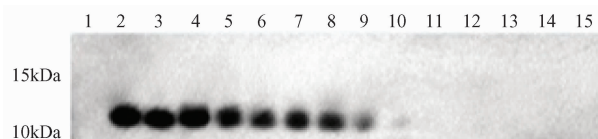
### 2.4.2 小型猪肠液中重组人 $\alpha$ -LA 消化实验

图 15 显示 $\alpha$ -LA 在体内肠液中消化 10 min (泳道 10) 后已看不见蛋白条带,对图 15 的凝胶进行 Western blotting, 见图 16,  $\alpha$ -LA 的显色条带在 20 min (泳道 11) 处消失, 结合 SDS-PAGE 和 Western blotting 图片可判定重组 $\alpha$ -LA 在体内肠液中“可被消化”。



1:Marker;2,3:重组人 $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:重组人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:小型猪肠液中的胰酶对照(0 s,60 min)

图 15 重组人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中消化后的 SDS-PAGE  
Figure 15 SDS-PAGE for recombinant human  $\alpha$ -LA after digested in intestinal fluid of miniature swine



1:Marker;2,3:重组人 $\alpha$ -LA 对照(0 s,60 min);  
4~13:重组人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中消化 0 s~60 min 的结果;  
14,15:小型猪肠液中的胰酶对照(0 s,60 min)

图 16 重组人 $\alpha$ -LA 在小型猪肠液中消化后的 Western blotting  
Figure 16 Western blotting for recombinant human  $\alpha$ -LA after digested in intestinal fluid of miniature swine

## 3 讨论

除了食物中可能存在的半抗原外,几乎所有的食物致敏原都是蛋白质。通常食物致敏原能耐受热处理、酸和胃肠消化液的消化,不能被消化的蛋白或者大于 3.5 kDa 的水解片段可在小肠粘膜吸收后产生致敏效应<sup>[8]</sup>。例如,具有致敏性的大豆 $\beta$ -伴球蛋白在 SGF 中可稳定存在 60 min 以上,而不具致敏性的食物蛋白(如菠菜核酮糖二磷酸盐羧化酶/氧化酶)在 SGF 中 15 s 即被完全消化<sup>[10]</sup>。

2007年农业部发布的《转基因生物及其产品食用安全检测——模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法》<sup>[11]</sup>是国内关于重组蛋白消化稳定性的最新标准,其中的实验方法和结果判定具有很大的参考价值。该方法中所用的模拟胃肠液模拟了体内消化液的主要成分和消化环境,简化了以体内胃肠液消化蛋白所需的收集胃肠液过程,但由于体内消化环境复杂,模拟胃肠液消化实验不可能完全反映该蛋白在体内消化的实际情况。例如体内胃液中除含有胃蛋白酶和盐酸外,还含有微量的内因子和粘液物质等;模拟胃肠液的pH值与真实的体内情况也可能存在细微的差别,这些都会影响模拟状态下的消化实验结果。目前的消化实验绝大多数都是以模拟胃肠液作为消化液,因此以小型猪胃肠液进行消化实验具有一定创新性。由于反映的是体内的真实情况,所得到的结果对于判定消化稳定性可能更具有参考意义。

由于文献报道 $\alpha$ -LA在模拟胃液中易被消化,而在模拟肠液中可被消化<sup>[12]</sup>,因此本实验在标准中规定时间点的基础上参考大部分文献方法增设了30 s、1、5、10和20 min时间点<sup>[13]</sup>,以便更好地了解重组蛋白在消化液中被完全消化的确切时间,使后面的比较分析过程更有说服力。

从实验结果来看,试样蛋白在小型猪胃液和肠液中被完全消化的时间均在20 min左右,而在SGF和SIF中的消化结果有一定差异,SGF在0 s即可将试样蛋白完全消化,而SIF却需要10 min。该差异可能主要是由于蛋白本身的特性(即人 $\alpha$ -LA更不耐胃蛋白酶消化)所致,此外,也可能与模拟胃肠液中酶的用量有关,即SGF和SIF难以完全模拟生理胃液和肠液。

试样蛋白在小型猪胃肠液中被完全消化的时间均比在模拟胃肠液中的时间长,这主要是由于小型猪胃肠液中酶活力与模拟胃肠液相比较弱(胃蛋白酶活力测定结果显示二者活力之比为0.74:1)。此外,在不同时段收集的胃肠液中酶活力可能也不尽相同,因此以不同时段的胃肠液消化试样蛋白可对蛋白的消化稳定性做出更准确的判断。本实验由于收集的胃肠液较少,仅够用于消化实验,因此未测定其中胰蛋白酶的活力,也不能对此开展进一步的研究,今后对这方面的研究将使结果更全面地反映体内消化的真实情况。

试样蛋白在SGF中完全消化的时间最短,0 s时即不能检测到蛋白存在,虽然理论上讲消化0 s即表示胃蛋白酶还没有开始消化过程,但由于加入 $\text{NaHCO}_3$ 升高pH值不一定能使胃蛋白酶彻底失活,

而冰浴使反应管内温度降低仍需要一定时间,这段时间内仍有少量的胃蛋白酶具有消化活性,继续消化试样蛋白,因此Western blotting图片在0 s时间点即不能见到试样蛋白条带是可能的。

重组人 $\alpha$ -LA与人 $\alpha$ -LA标准品经电泳后在凝胶中的位置十分接近,且在模拟胃肠液和小型猪胃肠液中被完全消化的时间相似,这表明表达的重组人 $\alpha$ -LA很好地保持了天然蛋白的分子量和消化稳定性等特性。从整个消化实验结果来看,重组人 $\alpha$ -LA在模拟胃肠液和小型猪胃肠液均可在20 min内被完全消化,不具有消化稳定性,这也从另一方面表明了重组人 $\alpha$ -LA的安全性。

酶消化实验是判定重组蛋白是否具有致敏性的一个重要因素,但基因来源物种致敏性分析、重组蛋白与已知致敏原的氨基酸序列同源性比较和认可的动物模型实验结果<sup>[14]</sup>。此外,热稳定性、食物中的实际含量和人群可能暴露量、体外血清IgE结合实验结果和糖基化分析等也是全面评价致敏性时需要考虑的因素<sup>[15]</sup>。尽管如此,消化稳定性实验仍是评价致敏性过程中重要的一环。综合实验结果可得出重组人 $\alpha$ -LA不具有消化稳定性的结论,上述其他因素需要今后进一步研究。

## 参考文献

- [1] JACKSON J G, JANSZEN D B, LÖNNERDAL B, et al. A multinational study of  $\alpha$ -lactalbumin concentration in human milk [J]. JNB, 2004,15(9):517-521.
- [2] 张岩春, 尤娟, 罗永康. 驴乳蛋白质组成及其与人乳和牛乳的比较[J]. 中国乳业, 2008,9:50-51.
- [3] CRUTTENDEN R G, BENNETT L E. Cow's milk allergy: A complex disorder[J]. J Am Coll Nutr, 2005,24(6):582-591.
- [4] LÖNNERDAL B, LIEN E L. Nutritional and physiological significance of alpha lactalbumin in infants [J]. Nutri Rev, 2003,61(9):295-305.
- [5] JÄRVINEN K M, CHATCHATEE P, BARDINA L, et al. IgE and IgG binding epitopes on  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in cow's milk[J]. Int Arch Allergy Imm, 2001,126:111-118.
- [6] WAL J M. Structure and function of milk allergens[J]. Allergy, 2001,56:35-38.
- [7] WAL J M. Cow's milk allergens [J]. Allergy, 1998, 53: 1013-1022.
- [8] SVENSSON M, HAKANSSON A, MOSSBERG A K, et al. Conversion of  $\alpha$ -lactalbumin to a protein inducing apoptosis[J]. PNAS, 2000,97(8):4221-4226.
- [9] FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods [EB/OL]. [2001-01-22]. <http://www.who.int/fsf/GMfood/Consultation Jan2001/report 20.pdf>.
- [10] CAC/GL. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants [EB/OL]. [2003-04-05]. [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10021/CXG\\_045e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10021/CXG_045e.pdf).

[11] 转基因生物及其产品食用安全检测模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法 [EB/OL]. [2007-06-11]. <http://www.biosafety.gov.cn/bzgf/200808/W020080827160170496278.pdf>.

[12] 王娟. 牛乳清蛋白加压凝胶消化性及其钙生物利用率的研究 [D]. 中国农业大学, 2008.

[13] HERMAN R A, WOOLHISER M M, LADICS G S, et al. Stability of a set of allergens and non-allergens in simulated gastric fluid[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2007, 58(2):125-141.

[14] MOON S, RANDALL K, LAURENT P, et al. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes [J]. *J Immunol*, 2002, 169:882-887.

[15] EPA. Transmittal of minutes of the FIFRA scientific advisory panel meeting held March 1-2, 2005; scientific issues associated with the human health assessment of the cry34Ab1 protein [EB/OL]. [2005-04-05]. <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2005/march/finalmar2005sapmtg>.

## 论著

# <sup>60</sup>Co γ 射线对猪肉中囊尾蚴的辐照杀灭效应

钟凯, 高翔, 计融

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

**摘要:**目的 揭示猪肉中囊尾蚴灭活率与辐照剂量的相关关系及最小杀灭剂量, 为制定相应辐照卫生规范提供科学依据。方法 以不同剂量<sup>60</sup>Co γ 射线处理感染囊尾蚴的猪肉, 并用新鲜猪胆汁孵化剥离出的囊尾蚴, 根据成活率计算校正灭活率。结果 辐照剂量与校正灭活率具有线性相关, D<sub>10</sub>值约为 3.8 kGy, 4.5 kGy 可完全杀灭囊尾蚴。结论 4.5 kGy γ 射线对猪肉中囊尾蚴有很好的杀灭效果。

**关键词:**囊尾蚴; γ 射线; 辐照; 校正灭活率

中图分类号: R144.1; O657.35; TS251.51 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)03-0211-04

## Inactivation effect of <sup>60</sup>Co gamma ray on cysticerci of *Taenia solium* in pork

Zhong Kai, Gao Xiang, Ji Rong

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

**Abstract: Objective** revealing the relationship between irradiation dose and inactivation ratio for cysticerci of *Taenia solium* in pork, determining the minimal dose for totally killing cysticerci and providing scientific evidence for setting up relevant hygienic standards of radiation. **Methods** After *Taenia solium* infected pork being treated with different irradiation doses; cysticerci were separated and incubated in fresh swine bile. The adjusted inactivation ratio was calculated according to the survival rate. **Results** There was a linear correlation between irradiation dose and adjusted inactivation ratio, the D<sub>10</sub> value was about 3.8 kGy, and a totally killing could be achieved by 4.5 kGy irradiation. **Conclusion** Irradiation at a dose of 4.5 kGy could be applied as the maximum dose to inactivate cysticerci of *Taenia solium* in pork processing.

**Key words:** Cysticerci of *Taenia solium*; γ ray; irradiation; adjusted inactivation ratio

猪囊尾蚴病是我国乃至全球分布较广、危害严重的寄生虫病, 是受到广泛关注的公共卫生问题之

一。据调查我国居民囊尾蚴病患率在 0.14% ~ 3.2% 之间, 估计全国感染者超过 300 万, 以东北、华北、河南、山东、广西等地居多<sup>[1]</sup>。阻断猪肉中囊尾蚴对人类的感染是预防和控制猪囊尾蚴病向人群扩散的最直接措施之一。而目前对猪囊尾蚴的控制大多依赖宰前和宰后检疫, 其主要手段是目测。只有当猪大量感染囊尾蚴时才能从宰前检疫中查

收稿日期: 2010-11-24

作者简介: 钟凯 男 助理研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: billyzhongkai@163.com

通信作者: 计融 男 研究员