

## 论著

转 *GmDREB1* 基因抗旱小麦对大鼠肠道菌群的影响张敏<sup>1,2</sup>, 卓勤<sup>1</sup>, 宫照龙<sup>1</sup>, 朴建华<sup>1</sup>, 杨晓光<sup>1</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所 国家卫生计生委微量元素重点实验室, 北京 100050;

2. 北京市石景山区食品药品监督管理局, 北京 100043)

**摘要:**目的 通过动物试验观察转 *GmDREB1* 基因抗旱小麦对大鼠肠道菌群的细菌种类、数量的影响。方法 60 只 SD 大鼠按性别、体质量随机分为 3 组: 转基因小麦组 (A 组)、亲本小麦对照组 (B 组) 和 AIN-93 对照组 (C 组), 分别饲喂相应饲料 12 个月。无菌采集大鼠粪便样品, 用于五种常见菌群的分离培养计数及变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析。结果 喂养饲料后, A 组及 B 组雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌的数量均高于 C 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 试验前后, A 组及 B 组大鼠粪便中常见菌群数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); A 组与 B 组 DGGE 图谱的每条泳道的条带数目、多样性指数差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。聚类分析结果显示, A 组及 B 组样品的组间相似性较高, 未出现明显分支。结论 未发现转 *GmDREB1* 基因小麦对大鼠肠道菌群有不利影响。

**关键词:** 转基因小麦; *GmDREB1* 基因; 肠道菌群; 变性梯度凝胶电泳; 食品安全; 转基因食品

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2016)06-0695-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.06.003

Effect of genetically modified wheat with *GmDREB1* gene on intestinal microflora in SD rats

ZHANG Min, ZHUO Qin, GONG Zhao-long, PIAO Jian-hua, YANG Xiao-guang

(Key Laboratory of Trace Element Nutrition, National Health and Family Planning Commission, National Institute for Nutrition and Health Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of the genetically modified wheat harboring *GmDREB1* gene on intestinal microflora in sprague dawley (SD) rats. **Methods** Based on gender and weight, sixty SD rats were randomly divided into three groups: genetically modified (GM) wheat group (group A), non-GM wheat group (group B) and AIN-93 control group (group C). They were fed for 12 months. Feces samples were collected during the experiment period. Culture of fecal flora and denaturing gradient gel electrophoresis were used to investigate the bacterial profiles of the three groups. **Results** Compared with pre-experiment, the number of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* of group A and B increased significantly, which was significantly higher than those of group C ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences between group A and group B in the number of the five feces flora, bands and Shannon's index ( $P > 0.05$ ). UPGMA cluster analysis indicated that group A and group B showed a high degree of similarity. **Conclusion** It was concluded that the genetically modified wheat with *GmDREB1* gene had no detrimental effects on the intestinal microflora in SD rats.

**Key words:** Genetically modified wheat; *GmDREB1* gene; intestinal microflora; denaturing gradient gel electrophoresis; food safety; transgenic food

自 1983 年世界上首例转基因植物问世以来, 全球转基因生物产业发展迅速。根据国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 报告, 2015 年全球转基因作物种植面积达到 1.797 亿公顷, 从 1996 年的

170 万公顷增加了 100 多倍<sup>[1]</sup>。小麦作为世界上最重要的粮食作物之一, 其种植面积、总产量及总贸易额均在粮食作物的第一位, 中国、美国、印度为小麦的主产国。我国主要麦区如华北冬麦区、黄淮冬麦区、西北春麦区等均属于干旱和半干旱地区, 干旱严重制约着这些地区小麦的生产发展。改良农作物的抗旱性, 选育耐旱的农作物新品种已成为作物品种改良的重要课题。提高植物抗逆性的基因工程主要集中在两个方面: 一是导入抗逆相关的功能基因, 另一类是导入转录因子, 植物的耐旱、耐盐性大多属于多基因控制的性状, 导入单个功能基因

收稿日期: 2016-11-02

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2011ZX08011-005, No. 2014ZX08011-005)

作者简介: 张敏 女 硕士 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: sitong1998@126.com

通信作者: 宫照龙 男 副研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: gongzhaolong@163.com

虽然在一定程度上提高了植物的抗逆性,但提高幅度不大;转录因子能够与基因启动子区域中的顺式作用元件特异性结合,对信号传导及诱导下游抗逆相关的功能基因表达起关键作用<sup>[2]</sup>。Yamaguchi-Shinozaki等<sup>[3]</sup>在分析拟南芥 *rd29A* 基因的启动子中首次发现了序列的脱水应答元件(DRE, dehydration responsive element)核心序列,并检测到与DRE结合的蛋白质因子,即脱水应答元件结合蛋白(DREB, dehydration responsive element binding)转录因子。DREB类转录因子能够与抗逆基因启动子区域中的DRE顺式作用元件结合,参与干旱、高盐等胁迫应答反应,增强植物的抗逆性<sup>[4]</sup>。本研究选用的转基因抗旱小麦是利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法从大豆中分离了 *GmDREB1* 基因,通过基因枪法将 *GmDREB1* 基因导入了普通小麦而获得,有效地提高了小麦的抗逆性,减少逆境胁迫对小麦产生的影响,从而带来重要的经济效益和社会效益。

转基因食品的安全性评价是目前国内乃至国际关注热点,转基因生物的食用和饲用安全评价技术是转基因生物新品种培育重大专项的课题之一,研究内容集中在对有产业化前景的转基因生物开展食用和饲用安全评价;探索转基因生物安全评价新方法、新技术;研制技术标准和评价程序;建立完善食用和饲用安全评价体系等方面。本课题在“十二五”期间,在“十一五”研究的基础上继续深化基础性研究、探讨标准化管理体系,创新技术,进一步完善了转基因作物食用、饲用安全评价体系<sup>[5]</sup>;从营养学<sup>[6-7]</sup>、毒性<sup>[8-9]</sup>、致敏性<sup>[10-12]</sup>和非预期效应<sup>[13-14]</sup>等几个方面评价转基因食品的食用安全性。

消化道是机体与外界相通的重要器官,是动物健康的第一道防线,具有代谢、营养吸收、免疫等重要功能<sup>[15-16]</sup>。肠道微生态是动物消化系统的重要组成部分,肠道菌群与动物和人类身体健康和疾病存在着密切的联系<sup>[17-18]</sup>。传统的转基因食品安全评价动物试验主要集中在血尿分析、脏器系数、组织病理学检查等,而较少关注动物的肠道健康。对转基因食品进行肠道菌群评价可以为转基因生物的安全性提供新的证据。

一般情况下,肠道内的菌群不易获得,而粪便菌群变化能够代表肠道内的菌群变化。粪便作为机体的代谢废弃物,具有无损、动态、简单、快速和廉价的优势,可以做到多次、无损检测,粪便是研究机体肠道健康的首选材料<sup>[19]</sup>。本试验开展为期12个月的喂养试验,利用粪便菌群培养及变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术分析大鼠长期食用以最大量掺入转基因小麦的饲料对肠道菌群的影响,来检测转

基因小麦通过肠道所产生的可能非期望效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验小麦及饲料配制

本试验选用的转 *GmDREB1* 基因抗旱小麦 MG349(转 *GmDREB1* 基因抗旱小麦与梁春来等<sup>[8]</sup>开展免疫毒理学评价所选用的抗旱小麦 T349 为同一株系),利用 RT-PCR 方法从大豆中分离了 *GmDREB1* 基因(共 525 bp),选择山东省栽培品种济麦 19 作为转化受体,利用基因枪法将 *GmDREB1* 基因导入了普通小麦,获得了耐旱、耐盐性转基因小麦。转基因小麦 MG349 与亲本小麦济麦 19,由中国农业科学院作物科学研究所提供,种植于山东省济南市转基因试验基地的相邻实验田中,种植条件相同,于相同时间收获。

饲料由北京华卓康生物科技有限公司配制。3组饲料分别为转基因小麦组饲料、亲本小麦组饲料、AIN-93 对照组常规基础饲料。试验开始的前 13 周以满足大鼠生长发育所需的 AIN-93G 配方为参照配制饲料,13 周以后改用 AIN-93M 配方进行饲料配制<sup>[20]</sup>。根据小麦营养成分分析结果,以转基因小麦、亲本小麦中蛋白质的最大量掺入饲料为原则,蛋白不足的部分由酪蛋白补齐,其他营养成分扣除小麦中的添加量后按配方补齐。经计算生长期 A 组饲料中转基因小麦的添加量为 83.3%,B 组饲料中亲本小麦的添加量为 84.1%;维持期 A 组饲料中转基因小麦的添加量为 86.5%,B 组饲料中亲本小麦的添加量为 86.5%。

#### 1.1.2 实验动物分组与喂养

SPF 级初断乳(5 周龄)SD 大鼠,雌雄比例 1:1,体质量 60 ~ 80 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2012-0001],饲养于中国疾病预防控制中心动物实验室[许可证号:SYXK(京)2009-0032],室温 20 ~ 23 ℃,相对湿度为 40% ~ 60%,昼夜明暗交替时间 10/14 h。动物自购入给予常规基础饲料适应 1 周后,选取 60 只健康大鼠,按性别、体质量随机分为 3 组:转基因小麦组(A 组)、亲本小麦对照组(B 组)和 AIN-93 对照组(C 组),每组 20 只,雌雄各半,2 只一笼。饲相应的饲料,自由进食饮水。试验期限为 52 周。

#### 1.1.3 主要仪器与试剂

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、变形梯度凝胶电泳仪均购自美国 Bio-Rad,生物安全柜(美国 LABCONCO),恒温振荡器,恒温培养箱,厌氧罐,高压蒸汽灭菌器,台式小型离心机。

BBL 培养基、MRS 培养基、EMB 培养基、叠氮钠-结晶紫-七叶苷培养基、TSC 培养基均购自北京陆桥技术股份有限公司,PCR Marker[MD113,天根生化科技(北京)有限公司],DNA 提取试剂盒(美国 Mo-Bio),PCR Buffer、dNTP Mixture、*Taq* DNA 聚合酶均购自大连宝生物工程有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品采集与处理

常见菌群传统培养计数法:于试验第 0 天(给予大鼠试验饲料前)、第 14 天、第 52 周,分别无菌采集大鼠粪便(每只大鼠约收集 1.0 g 粪便)于 2 h 内检测。粪便置于已称重的装有玻璃珠的干燥灭菌试管中,再称重并计算出大鼠粪便重量,用 9 倍重量的灭菌稀释液加以稀释,在漩涡振荡器上震荡,充分混匀,制成均匀悬液,此为  $10^{-1}$  稀释液,再逐级进行 10 倍稀释至  $10^{-8}$ 。

变性梯度凝胶电泳法:每组每一性别随机选取 5 只大鼠,于试验第 13 周、第 52 周分别无菌采集大鼠粪便(每只大鼠约收集 1.0 g 粪便)。粪便置于 5 ml 灭菌冻存管中,并立刻置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.2.2 平板涂布培养与菌落计数

由高的稀释度开始选择 4 个适宜稀释度,用移液枪各吸取 20  $\mu\text{l}$ ,分别滴种至各选择性培养基,每个稀释度作两个平行,肠道菌群培养选用的培养基及培养条件见表 1。选取菌落清晰、分散良好的稀释度计数,然后折算成每克粪便所含细菌的数量(cfu/g):20  $\mu\text{l}$  平均菌落数  $\times 50 \mu\text{l} \times$  稀释倍数 = 菌落数/g(即:cfu/g)。

表 1 大鼠粪便菌群的培养方法

Table 1 Culture methods of fecal flora of SD rats

检测指标菌	培养基	培养条件
双歧杆菌	BBL 培养基	37 $^{\circ}\text{C}$ 、(48 $\pm$ 2)h 厌氧培养
乳杆菌	MRS 培养基	37 $^{\circ}\text{C}$ 、(48 $\pm$ 2)h 兼性厌氧培养
肠杆菌	EMB 培养基	37 $^{\circ}\text{C}$ 、(24 $\pm$ 2)h 培养
肠球菌	叠氮钠-结晶紫-七叶苷培养基	37 $^{\circ}\text{C}$ 、(48 $\pm$ 2)h 培养
产气荚膜梭菌	TSC 培养基	37 $^{\circ}\text{C}$ 、(24 $\pm$ 2)h 厌氧培养

### 1.2.3 粪便总 DNA 的提取

大鼠粪便微生物总 DNA 的提取采用试剂盒法,操作步骤按照产品说明书进行,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测粪便总 DNA 的提取效果。

### 1.2.4 细菌 16S rDNA V3 区片段的 PCR 扩增

将提取的粪便总 DNA 作为 PCR 反应模板,根据 16S rDNA V3 区的基因序列设计细菌特异性引物进行 PCR 扩增。引物由北京宝杰罗生物公司合成,引物序列如下:338F: 5'-ACTCCTACGGGA

GGCAGCAG-3';534R:5'-CGCCCCCGCGCGCGGGCGGCGGGCGGGGGCACGGGGGG(ATTACCGCG GTGCTGG)-3'。PCR 总反应体系为 50  $\mu\text{l}$ ,包括 5.0  $\mu\text{l}$  10  $\times$  PCR Buffer, 4.0  $\mu\text{l}$  dNTP Mixture (2.5 mmol/L),上、下游引物(20  $\mu\text{mol/L}$ )各 1.0  $\mu\text{l}$ ,1.0  $\mu\text{l}$  模板 DNA,0.5  $\mu\text{l}$  *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ),37.5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min(每个循环降低 0.1  $^{\circ}\text{C}$ ),72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min,循环 35 次;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳扩增产物,溴化乙锭染色,紫外光下观察扩增效果。

### 1.2.5 变性梯度凝胶电泳

DGGE 使用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为 10%,变性梯度为 40% ~ 60%,电泳条件为 65 V,16 h。电泳结束后,采用银染进行染色,显色后放入凝胶成像仪中观察、拍照,得到 DGGE 图谱。

## 1.3 统计学分析

将计算所得的每克粪便中的菌数,取对数后进行统计处理,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间差异用单因素方差分析的方法进行数据分析。各组试验前后五种肠道菌群的变化比较采用配对 *t* 检验。数据分析采用 SPSS 20.0 分析软件进行处理, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

用 Quantity One 凝胶分析软件对 DGGE 图谱进行分析。多样性分析的数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据分析采用 SPSS 20.0 分析软件进行处理。其中,丰富度(richness, S):DGGE 图谱每条泳道的条带数;多样性指数(Shannon's 指数,  $H'$ ):反映群落的多样性, $H' = -\sum P_i \times \ln P_i$ , $P_i$  为第 *i* 条带的吸光度与该泳道所有条带吸光度总和的比值<sup>[21]</sup>。使用 Quantity One 软件对 DGGE 条带数、条带位置及亮度信息进行数值化分析,获得数据矩阵,根据数据矩阵,利用非加权配对算数平均(UPGMA)法进行聚类分析,以分析样品相似性,相似性(%) = 相似性数值  $\times 100\%$ 。

## 2 结果

### 2.1 菌群传统培养计数法研究肠道菌群的变化

大鼠粪便主要菌群的计数结果见表 2。三次培养计数的结果中,产气荚膜梭菌的数量均较少,无法统计,故结果未给出。

#### 2.1.1 组间菌群数量的比较

试验前雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌、肠杆菌、肠球菌的数量各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。喂养试验饲料 14 天后,A、B 组雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌的数量均高

表2 各组大鼠粪便中四种菌群数量( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Number of normal flora from fresh dejection of rats in each group

菌种	组别	动物数 /只	第0天 /(log cfu/g)	第14天 /(log cfu/g)	第52周 /(log cfu/g)	14天与0天 比较P值	52周与14天 比较P值	52周与0天 比较P值	
双歧杆菌	雄性	A	10	9.97 ± 0.28	11.17 ± 0.18 <sup>2</sup>	10.65 ± 0.24 <sup>2</sup>	0.000*	0.001*	0.002*
		B	10	9.63 ± 0.26	11.17 ± 0.12 <sup>2</sup>	9.99 ± 0.63 <sup>2</sup>	0.000*	0.002*	0.181
		C	10	9.85 ± 0.28	9.45 ± 0.31	8.12 ± 0.26	0.153	0.000*	0.000*
	雌性	A	10	9.81 ± 0.23	11.04 ± 0.22 <sup>2</sup>	10.43 ± 0.61 <sup>2</sup>	0.000*	0.023*	0.008*
		B	10	9.70 ± 0.17	10.90 ± 0.28 <sup>2</sup>	9.51 ± 1.44	0.000*	0.032*	0.692
		C	10	9.59 ± 0.23	9.47 ± 0.46	8.60 ± 0.76	0.413	0.036*	0.005*
乳杆菌	雄性	A	10	9.91 ± 0.43	11.18 ± 0.20 <sup>2</sup>	10.78 ± 0.18 <sup>2</sup>	0.000*	0.000*	0.000*
		B	10	9.71 ± 0.26	11.09 ± 0.17 <sup>2</sup>	10.27 ± 0.57 <sup>2</sup>	0.000*	0.007*	0.056
		C	10	9.81 ± 0.41	9.50 ± 0.09	8.42 ± 0.46	0.129	0.001*	0.001*
	雌性	A	10	9.73 ± 0.32	11.06 ± 0.27 <sup>2</sup>	10.46 ± 0.77 <sup>2</sup>	0.000*	0.058	0.017*
		B	10	9.55 ± 0.29	10.89 ± 0.30 <sup>2</sup>	9.29 ± 1.62	0.000*	0.019*	0.685
		C	10	9.55 ± 0.27	9.31 ± 0.25	8.64 ± 0.72	0.064	0.031*	0.013*
肠杆菌	雄性	A	10	5.88 ± 0.55	6.50 ± 0.72	6.12 ± 0.93	0.092	0.557	0.694
		B	10	5.25 ± 0.60	6.17 ± 0.79	6.14 ± 0.60	0.009*	0.546	0.042*
		C	10	5.39 ± 0.69	6.81 ± 0.81	5.98 ± 0.96	0.003*	0.128	0.311
	雌性	A	10	5.24 ± 0.49	5.56 ± 1.02 <sup>1,2</sup>	6.03 ± 0.56	0.294	0.169	0.004*
		B	10	5.55 ± 0.58	6.83 ± 0.71	6.44 ± 1.10	0.001*	0.622	0.201
		C	10	5.39 ± 0.51	6.48 ± 0.99	5.91 ± 0.67	0.006*	0.131	0.689
肠球菌	雄性	A	10	5.91 ± 0.57	7.06 ± 0.53	6.29 ± 0.47	0.001*	0.008*	0.118
		B	10	5.45 ± 0.29	6.42 ± 0.58	5.85 ± 0.36	0.000*	0.004*	0.094
		C	10	5.93 ± 0.56	7.28 ± 0.42	6.08 ± 0.40	0.000*	0.001*	0.478
	雌性	A	10	5.57 ± 0.52	7.14 ± 0.54	5.47 ± 0.23	0.000*	0.000*	0.799
		B	10	5.66 ± 0.57	6.75 ± 0.38	5.60 ± 0.54	0.001*	0.003*	0.555
		C	10	5.81 ± 0.42	7.13 ± 0.47	5.90 ± 0.76	0.000*	0.005*	0.731

注:1 为与 B 组比较  $P < 0.05$ ; 2 为与 C 组比较  $P < 0.05$ ; \* 表示试验前后自身比较  $P < 0.05$

于 C 组, A 组雌性大鼠的粪便中肠杆菌数量低于 B、C 组, 均差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。喂养 52 周后, A 组雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌的数量均高于 C 组, B 组雄性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌的数量高于 C 组, 均差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 肠杆菌、肠球菌数量各组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

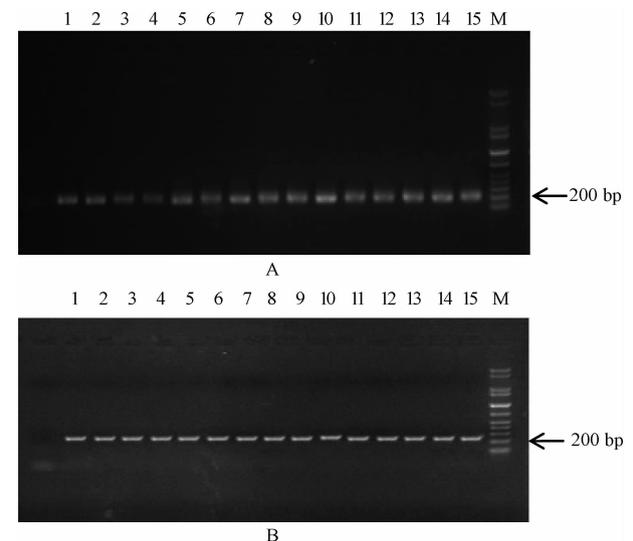
### 2.1.2 试验前后菌群数量的变化

喂养 14 天与试验前相比, A、B 组试验后雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌数量增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); B、C 组雄性、雌性大鼠粪便中肠杆菌数量及三组肠球菌数量的变化均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。喂养 52 周与喂养 14 天相比, 试验结束时雄性、雌性三组大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌数量均减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 雄性、雌性三组大鼠粪便中肠杆菌的数量变化差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。喂养 52 周与试验前相比, A 组雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳酸菌数量仍高于试验前, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); C 组雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳酸菌数量下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); B 组雄性大鼠粪便中双歧杆菌、乳酸菌数量高于试验前, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各组肠球菌数量与试验前相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

## 2.2 变性梯度凝胶电泳法研究肠道菌群变化

### 2.2.1 粪便菌群 16S rDNA V3 区片段的 PCR 扩增结果

以提取的转基因小麦组、亲本小麦组、AIN-93 对照组大鼠粪便菌群的总 DNA 为模板扩增出相应的 16S rDNA V3 片段(大小为 200 ~ 300 bp), 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 第 13 周 PCR 扩增电泳结果见图 1。所有大鼠的粪便样品均扩增出目的片段, 电泳泳道



注: A: 雄性大鼠; B: 雌性大鼠; 1 ~ 5: AIN-93 对照组; 6 ~ 10: 亲本小麦组; 11 ~ 15: 转基因小麦组; M: PCR Marker(自下而上)分别为: 100, 200, 300, 400, 500, 700, 1 000, 1 600, 2 000, 5 000, 8 000, 10 000 bp

图1 第13周大鼠粪便标本的PCR扩增结果

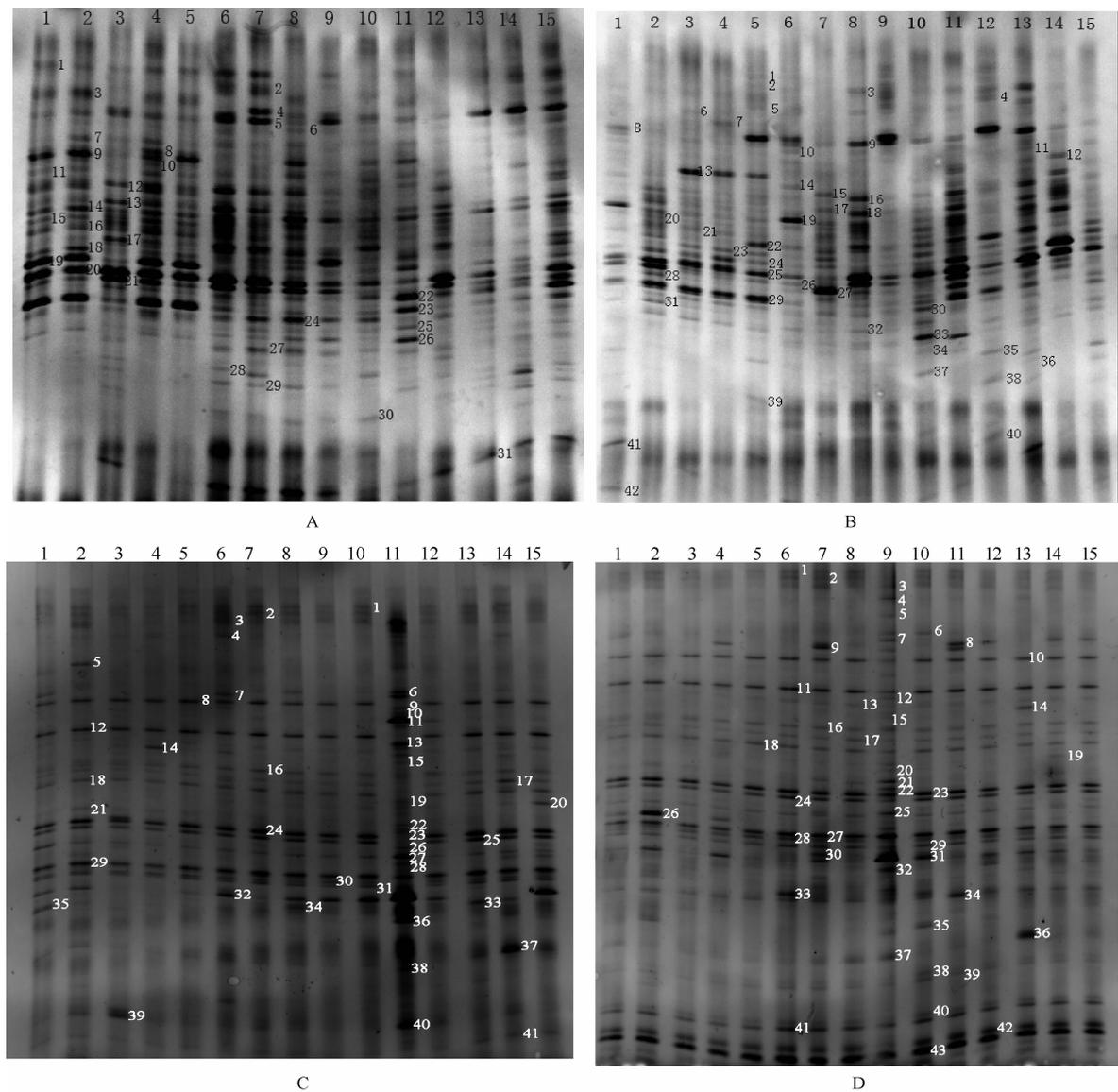
Figure 1 PCR products of 16S rDNA V3 region of rats at 13 weeks

内无任何非特异性条带, 条带较亮, 扩增效果良好。

### 2.2.2 DGGE 图谱分析

图 2 为第 13 周、第 52 周大鼠粪便总 DNA 的 DGGE 电泳结果, 图谱上不同的条带代表菌群的种类, 条带的灰度强弱反映了该条带所代表菌属的数

量的多少。第 13 周结果中, 雄性大鼠每条泳道条带数在 22~27 条之间, 雌性大鼠每条泳道的条带数范围为 20~25 条。第 52 周结果中, 雄性大鼠每条泳道条带数在 18~22 条之间, 雌性大鼠每条泳道的条带数范围为 25~30 条。



注: A: 第 13 周雄性大鼠; B: 第 13 周雌性大鼠; C: 第 52 周雄性大鼠; D: 第 52 周雌性大鼠; 1~5: AIN-93 对照组; 6~10: 亲本小麦组; 11~15: 转基因小麦组

图 2 大鼠粪便标本的 DGGE 图谱

Figure 2 DGGE profiles from fecal samples of rats

### 2.2.3 肠道菌群的多样性分析

由表 3 显示, 第 13 周 A 组雄性大鼠肠道菌群丰富度低于 B 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 雌性大鼠肠道菌群丰富度及多样性指数三组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。第 52 周 A 组雌性大鼠肠道菌群的多样性指数高于 C 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 雄性大鼠肠道菌群丰富度及多样性指数三组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 大鼠肠道菌群的多样性分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

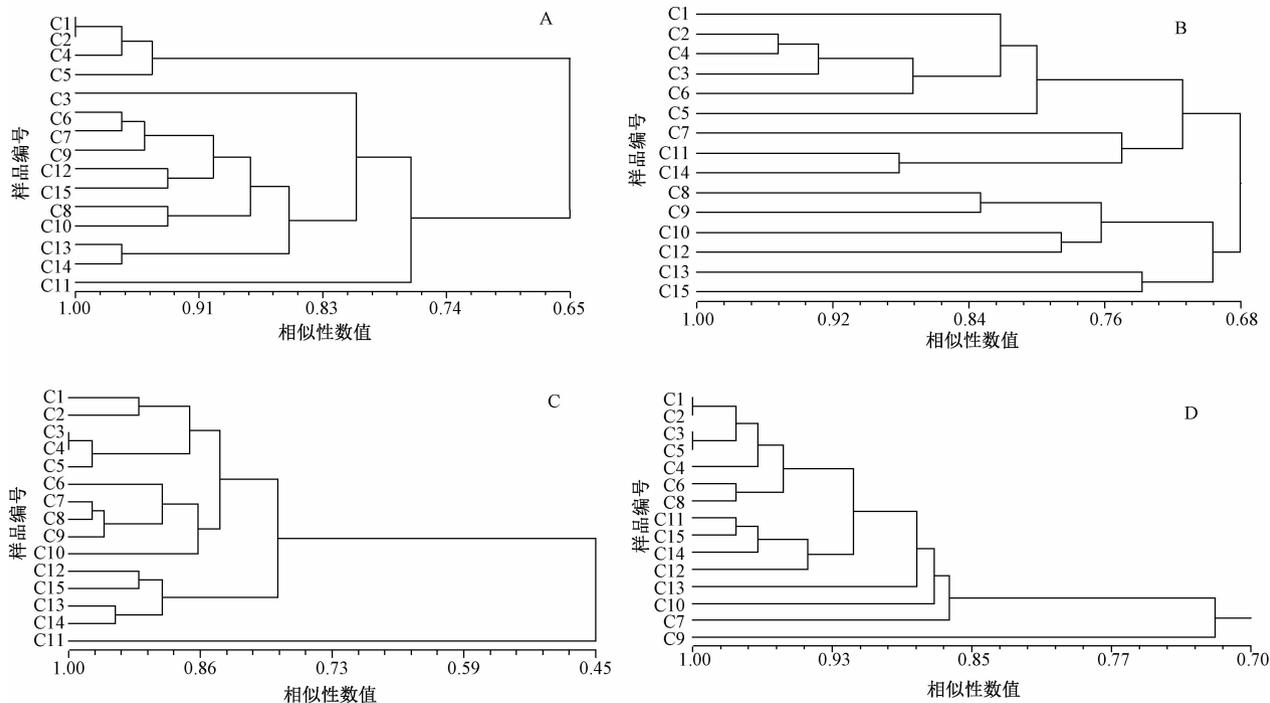
组别	第 13 周		第 52 周		
	丰富度(S)	多样性指数(H')	丰富度(S)	多样性指数(H')	
雄性	A	23.4 ± 1.5 <sup>1</sup>	2.764 ± 0.467	20.8 ± 1.0	4.290 ± 0.194
	B	26.2 ± 0.4	3.207 ± 0.148	18.2 ± 1.3	4.326 ± 0.190
	C	23.2 ± 2.2	2.845 ± 0.190	18.8 ± 1.6	3.993 ± 0.276
雌性	A	24.0 ± 3.9	3.375 ± 0.274	26.4 ± 1.1	4.227 ± 0.294 <sup>2</sup>
	B	21.2 ± 2.2	3.452 ± 0.146	27.8 ± 1.7	3.944 ± 0.176
	C	25.8 ± 2.4	3.212 ± 0.081	25.6 ± 0.5	3.578 ± 0.447

注: 1 为与 B 组比较  $P < 0.05$ ; 2 为与 C 组比较  $P < 0.05$

## 2.2.4 大鼠粪便菌群的聚类分析

图3是第13周和第52周雄性、雌性大鼠粪便标本 DGGE 图谱经 UPGMA 聚类分析的结果。第13周雄性大鼠粪便菌群的聚类分析结果出现两个分支, AIN-93 对照组除泳道 3 的粪便标本外, 组内谱带的相似性很高, 达到 93% 以上; 饲喂转基因小麦组及亲本小麦组大鼠粪便标本间的相似性较高(除泳道 11 的粪便标本外), 超过 85%, 组间未出现明显分支。第13周雌性大鼠粪便菌群的聚类分析结果较为复杂, 未因饲喂饲料的不同而出现明显的分

支, 不同处理组的标本间存在交叉, 各标本的相似性较高, 均在 68% 以上。第52周雄性大鼠粪便菌群的聚类分析结果显示, 不同处理组的组内谱带的相似性较高, 转基因小麦组、亲本小麦组、AIN-93 对照组标本的组内相似性分别高于 90%、86%、88%; 三组粪便标本的组间相似性高达 80%, 与组内相似性接近。第52周雌性大鼠粪便菌群的聚类分析结果与第13周雌性大鼠结果类似, 转基因小麦组与亲本小麦组的标本间存在交叉, 除泳道 9 的标本外, 各标本的相似性均在 88% 以上。



注: A: 第13周雄性大鼠; B: 第13周雌性大鼠; C: 第52周雄性大鼠; D: 第52周雌性大鼠; C1~C5: AIN-93 对照组, C6~C10: 亲本小麦组, C11~C15: 转基因小麦组

图3 大鼠粪便标本 DGGE 图谱聚类分析结果

Figure 3 Cluster analysis for similarity coefficients from fecal samples of rats

## 3 讨论

目前, 大鼠的 90 天喂养试验是最常用的评价转基因食品食用安全性的方法之一。初断乳的大鼠喂养 90 天后相当于大鼠的青春期, 这个时间长度不足以观察到转基因食品对动物的长期影响<sup>[22-23]</sup>。转基因食品商业化后可被不同年龄、性别、健康状况的人群长期甚至终生食用<sup>[24]</sup>, 为了保护人们免受转基因食品非期望效应的影响, 消除其对转基因食品的担心和疑虑, 得到更为科学、准确、有说服力的结论, 进行长期喂养试验是有必要的。本试验参照 AIN-93 配方, 以小麦中蛋白质的最大量掺入饲料为原则配制试验饲料, 可保证动物在全面营养的基础上最大程度的暴露于转基因小麦, 试验从大鼠断乳后即开始饲喂转基因饲料, 试验期限长达 12 个月,

和 90 天试验相比, 较大程度的评估转基因小麦的潜在风险。本试验设置了亲本小麦组和 AIN-93 对照组两个对照组。前者用来发现转入的外源基因可能带来的影响, 后者用来排除小麦自身成分对试验可能造成的影响。

随着动物个体的生长, 肠道内从没有外来微生物到微生物不断增多并达到平衡, 肠道内的微生物不断调节机体健康, 菌群的变化直接反映机体的健康状况<sup>[25]</sup>。动物肠道菌群的结构受年龄、日粮、环境、疾病等许多因素的影响。本试验培养的五种菌: 双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌、肠杆菌、产气荚膜梭菌是人类和动物肠道中的主要菌群, 具有一定的代表性和典型性, 可以初步反映肠道菌群的基本情况。YUAN 等<sup>[26]</sup>开展了用含转 T2A-1 水稻饲料喂养 SD 大鼠 90 天, 发现转基因组与非转基因组相

比,肠道中五种菌(大肠埃希菌,肠球菌,乳杆菌,双歧杆菌和产气荚膜梭菌)和总菌数量均差异无统计学意义。李鹏高等<sup>[27]</sup> 喂养 SD 大鼠转基因玉米 70 天,未发现其对肠道菌群的组成有明显影响。由本试验结果可见,喂养特殊饲料 14 天后,A、B 组雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌的数量均高于 C 组,且与试验前相比数量明显增加;此外,喂养 14 天后雄性、雌性大鼠粪便中三组肠杆菌、肠球菌数量均高于试验前,但增长幅度低于双歧杆菌和乳杆菌增加的幅度。喂养特殊饲料 14 天后 A、B 组雄性、雌性大鼠粪便中菌群数量的增高与饲料中掺入大量小麦有关,且 A、B 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。喂养 52 周后,A、B 组雄性、雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌的数量仍高于 C 组,但与喂养 14 天相比,三组大鼠的粪便中双歧杆菌、乳杆菌、肠球菌数量均减少;此外,与试验前相比,52 周各组大鼠粪便中肠球菌、肠杆菌数量与试验前差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),A、B 组雄性大鼠及 A 组雌性大鼠粪便中双歧杆菌、乳杆菌数量仍高于试验前,而 C 组的双歧杆菌、乳杆菌数目低于试验前,均差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),上述结果可能与年龄增长有关。

肠道中 95% 的微生物是厌氧菌,对氧和营养成分的需求十分严格,只有极少的肠道菌可以通过传统平板培养法被分离培养。传统的微生物培养耗时长,工作量大,需要分离、鉴定,具有一定的局限性。伴随着分子生物学技术的飞速发展,一些新的技术与方法在肠道微生态的研究中得到应用,其中变性梯度凝胶电泳(DGGE)是研究肠道菌群结构变化的一种较为有效的方法。Muyzer 等<sup>[28]</sup> 在 1993 年首次将 DGGE 技术应用于微生物群落结构研究中,并证明该技术在揭示微生物遗传多样性方面具有独特的优越性。近年来,多项研究利用 DGGE 技术评价了转基因食品对大鼠、小鼠、蜜蜂、鲤鱼、肉仔鸡等动物肠道菌群的影响,均未发现转基因食品对动物肠道菌群产生不良影响<sup>[29-33]</sup>。本试验采用 DGGE 法研究转基因小麦对大鼠肠道菌群的影响,主要分析饲喂转基因小麦饲料后大鼠肠道菌群总基因组的 16S rDNA V3 区的 PCR 产物在 DGGE 上的条带差异,从而非定向的评估可能出现的非预期结果。试验结果表明,第 13 周及第 52 周转基因小麦组与亲本小麦组 DGGE 图谱的条带数目、多样性指数差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。聚类分析结果表明,转基因小麦组及亲本小麦组样品的组间相似性较高,未出现明显分支,与前述研究结果<sup>[29-33]</sup> 一致。

综上所述,本试验采用传统菌群培养与 DGGE 分子生物学技术相结合的方法分析转基因小麦通过肠道产生的非期望效应。饲喂含转 *GmDREB1* 基因小麦的饲料 12 个月,试验结果未显示该转基因小麦对大鼠的肠道菌群有影响。

## 参考文献

- [1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops:2015 [EB/OL]. (2016-04-01) [2016-04-20]. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/51/>.
- [2] 高世庆,徐惠君,程宪国,等. 转大豆 *GmDREB* 基因增强小麦的耐旱及耐盐性[J]. 科学通报,2005,50(23):2617-2625.
- [3] Yamaguchi-Shinozaki K,Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. *Plant Cell*,1994,6(2):251-264.
- [4] Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, et al. A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer[J]. *Plant Cell Physiol*,2004,45(3):346-350.
- [5] 杨晓光. 转基因生物的食用和饲用安全评价技术[EB/OL]. (2013-11-15) [2016-10-20]. <http://www.nstrs.cn/xiangxiBG.aspx?ts=&id=35377&flag=1>.
- [6] 令狐丽琴,毛德倩,李敏,等. 含重组人乳铁蛋白乳粉蛋白质营养学评价[J]. 中国食品卫生杂志,2016,28(1):11-15.
- [7] 吴景欢,杨丽琛,朴建华,等. 营养改良型转基因作物的营养及特殊功效评价研究进展[J]. 卫生研究,2012,41(6):1033-1038.
- [8] 梁春来,李永宁,张晓鹏,等. 转 *GmDREB1* 基因抗旱小麦 T349 的免疫毒理学评价[J]. 中华预防医学杂志,2012,46(6):556-560.
- [9] 宫照龙,卓勤,张敏,等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂的大量纯化和急性毒性研究[J]. 卫生研究,2012,41(6):889-894.
- [10] 刘珊,汪会玲,冯晓莲,等. 重组人  $\alpha$ -乳清白蛋白潜在致敏性的生物信息学预测[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(3):210-213.
- [11] 孙拿拿,张倩男,王珊,等. BN 大鼠经口致敏动物模型研究[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(3):214-217.
- [12] 刘珊,陈惠芳,王小丹,等. 重组人乳铁蛋白致敏性的初步研究[J]. 中国食品卫生杂志,2013,25(2):107-112.
- [13] 张敏,卓勤,田园,等. 转入乳铁蛋白基因大米的慢性毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(6):517-522.
- [14] ZHANG M,ZHUO Q,TIAN Y, et al. Long-term toxicity study on transgenic rice with *Cry1Ac* and *scf* genes [J]. *Food Chem Toxicol*,2014,63(1):76-83.
- [15] Noverr M C,Huffnagle G B. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut[J]. *Trends Microbiol*,2004,12(12):562-568.
- [16] Laparra J M,Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals[J]. *Pharmacol Res*,2010,61(3):219-225.
- [17] Round J L,Mazmanian S K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease[J]. *Nature Reviews Immunology*,2009,9(5):313-323.

- [18] Mahida Y R, Rolfe V E. Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease[J]. *Clinical Science*,2004,107(4):331-341.
- [19] Cani P D, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability[J]. *Gut*,2009,58(8):1091-1103.
- [20] Reeves P G, Nielsen F H, Fahey G C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. *J Nutr*,1993,123(11):1939-1951.
- [21] Konstantinov S R, ZHU W Y, Williams B A, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA[J]. *FEMS Microbiol Ecol*,2003,43(2):225-235.
- [22] Vendômois J S, Cellier D, Vélot C, et al. Debate on GMOs health risks after statistical findings in regulatory tests[J]. *Int J Biol Sci*,2010,6(6):590-598.
- [23] Konstantinov S R, ZHU W Y, Williams B A, et al. How subchronic and chronic health effects can be neglected for GMOs, pesticides or chemicals[J]. *Int J Biol Sci*,2009,5(5):438-443.
- [24] Dona A, Arvanitoyannis I S. Health risks of genetically modified foods[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*,2009,49:164-175.
- [25] 元延芳,邹世颖,郎天琪,等.转基因生物对肠道微生物影响的研究进展[J]. *农业生物技术学报*,2014,22(12):1561-1566.
- [26] YUAN Y F, XU W T, HE X Y, et al. Effects of genetically modified T2A-1 rice on the GI health of rats after 90-day supplement[J]. *Scientific Reports*,2013(3):1962.
- [27] 李鹏高,甄亚平,卓勤,等.转基因玉米对大鼠肠道菌群的影响研究[J]. *毒理学杂志*,2015,29(5):327-330.
- [28] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,1993,59(3):695-700.
- [29] CAO S, HE X, XU W, et al. Safety assessment of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice T1c-19 in Sprague-Dawley rats from metabonomics and bacterial profile perspectives[J]. *IUBMB Life*,2012,64(3):242-250.
- [30] 姜玮瑜,代平礼,张永军,等.转 *Bt-cryIAc* 基因棉花对意大利蜜蜂肠道细菌群落的影响[J]. *应用与环境生物学报*,2010,16(2):211-215.
- [31] 徐志远.转 *CryIAc/sch* 基因糙米作为鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 日粮原料的安全性评价[D].北京:中国农业科学院,2011.
- [32] 秦海峰.转 *CryIAc/sch* 基因糙米作为肉仔鸡日粮原料的安全性评价[D].北京:中国农业科学院,2012.
- [33] 刘金,黄毅,孙艳波,等.转 *Bar* 基因稻谷对小鼠 (*Mus musculus*) 肠道菌群的作用研究[J]. *生命科学研究*,2015,19(5):415-421.

## · 请示批复 ·

## 总局办公厅关于种猪及晚阉猪肉生鲜肉品上市销售问题的复函

食药监办食监二函〔2016〕888号

福建省食品药品监督管理局:

你局《关于公母种猪及晚阉猪肉生鲜肉品是否可以上市销售问题的请示》(闽食药监食流〔2016〕168号)收悉。经商农业部,现函复如下:

一、我国种猪和商品猪采用相同的养殖模式,不存在因养殖方式差异导致质量安全水平差异的问题。种猪及晚阉猪肉不属于病害肉,农业部门未发现在质量安全方面与普通猪肉有明显区别。

二、目前,我国没有禁止屠宰和销售种猪及晚阉猪,生猪定点屠宰厂(场)屠宰的种猪及晚阉猪,应当在胴体和《肉品品质检验合格证》上标明相关信息。食品生产经营者采购猪肉时,应当索取并查验相应的检疫合格证明和肉品品质检验合格证明,采购种猪肉和晚阉猪肉,还应当查验猪胴体和《肉品品质检验合格证》上标明的相关信息。

三、按照国家标准《鲜、冻片猪肉》(GB 9959.1—2001)有关“公、母种猪及晚阉猪不得用于加工鲜、冻片猪肉”的规定,禁止销售加工为鲜、冻片猪肉形态的种猪肉和晚阉猪肉。

食品药品监管总局办公厅

二〇一六年十二月六日

(相关链接: <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1605/167137.html>)