

研究报告

利用血清筛选和模拟胃肠液消化稳定性试验评价植物源
重组人血清白蛋白潜在致敏性杨柳^{1,2}, 秦文¹, 王丽媛¹, 石丽丽¹, 沈蕊¹, 宫照龙¹, 卓勤¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050;

2. 扬州市疾病预防控制中心, 江苏 扬州 225000)

摘要:目的 利用血清筛选试验和模拟胃肠液消化稳定性试验, 探讨植物源重组人血清白蛋白(OsrHSA)是否具有潜在致敏性。方法 选择对虾、小麦、屋尘螨、鸡蛋、牛奶过敏, 特异性 IgE 抗体浓度大于 3.5 kUA/L 的患者血清 75 份和健康人血清 4 份, 利用酶联免疫吸附试验探讨 OsrHSA 能否与过敏血清中的过敏原特异性 IgE 抗体结合; 按照国家标准《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》进行 OsrHSA 的模拟胃肠液消化稳定性试验, 评估 OsrHSA 的消化稳定性。结果 有 3 份对牛奶过敏的血清与 OsrHSA 发生免疫交叉反应, 该蛋白与牛奶过敏原可能存在抗原交叉性; OsrHSA 在模拟胃肠液中 15 s 内即被消化完全, 表明该蛋白极易被消化。结论 OsrHSA 的潜在致敏性较低, 对牛奶过敏的人群需要慎重使用。

关键词:植物源重组人血清白蛋白; 致敏性评价; 血清筛选; 消化稳定性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2022)01-0034-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.01.007

Evaluation of the potential allergenicity of *Oryza sativa* recombinant human**serum albumin by serum screening and simulated gastrointestinal fluid digestion stability test**YANG Liu^{1,2}, QIN Wen¹, WANG Liyuan¹, SHI Lili¹, SHEN Shi¹, GONG Zhaolong¹, ZHUO Qin¹

(1. National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 2. Yangzhou Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Yangzhou 225000, China)

Abstract: Objective Using serum screening test and simulated gastrointestinal fluid digestion stability test to explore whether *Oryza sativa* recombinant human serum albumin (OsrHSA) has potential allergenicity. **Methods** In this study, 75 serum samples from patients with allergies to shrimp, wheat, house dust mites, eggs and milk, which containing specific IgE antibody concentrations greater than 3.5 kUA/L, as well as 4 healthy human serum samples were selected. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to investigate whether OsrHSA could bind to allergen-specific IgE antibodies in the serum. The digestive stability test of the simulated gastrointestinal fluid of OsrHSA protein was carried out in accordance with the national food safety standard, detection of genetically modified organisms and derived products-simulated gastrointestinal fluid digestion stability test. **Results** Three sera allergic to milk had immunological cross-reactions with OsrHSA, indicating that the protein might have antigenic intersection with milk allergens. OsrHSA was completely digested within 15 s in the simulated gastric and intestinal fluid, indicating that the protein was easily digested. **Conclusion** OsrHSA has low potential allergenicity and people who are allergic to milk needs consideration.

Key words: *Oryza sativa* recombinant human serum albumin; allergenicity assessment; serum screening; digestive stability

随着人们食物多样性的日益增加, 食物过敏性

疾病的发病率逐年增高, 据统计, 成人的患病率为 2%~5%, 儿童的发病率达 6%~8%^[1-3], 已经引起了全球人民的广泛关注, 世界卫生组织也将食物过敏列为 21 世纪全世界人民应重点研究、预防和控制疾病^[4], 引起食物过敏的成分主要是蛋白质, 尤其是利用基因重组技术使宿主植物产生的新蛋白质, 由于不了解其是否具有致敏性, 有可能会对人体产

收稿日期: 2021-05-19

基金项目: 转基因新品种培育重大专项(2016ZX08011-005)

作者简介: 杨柳 女 硕士生 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: Yang_lv@outlook.com

通信作者: 卓勤 女 研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: zhuoqin@nih.chinacdc.cn

生包括致敏性在内的毒效应,因此,需要对其食用安全性进行评价。

植物源重组人血清白蛋白(*Oryza sativa* recombinant human serum albumin, OsrHSA)是利用DNA重组技术,从水稻胚乳中提取纯化,拟作为血浆来源人血清白蛋白的重要替代品,用以解决我国人血清白蛋白供应短缺和有限人类捐赠者传播感染性疾病风险的问题。目前,该蛋白质已经完成了包括一般药理试验、急性毒性试验、长期毒性试验、药代动力学试验、生殖毒性试验、免疫毒性试验、依赖性试验等临床前研究^[5-6],证实了OsrHSA的药物安全性,为其进入临床试验奠定了基础,但还未对其进行完整的致敏性评价。

转基因作物的食用安全性是转基因作物安全性评价的重点内容,水稻作为世界公认的最重要的粮食作物,全球有一半以上的人口以水稻为主食,如今,水稻的种植面积在我国粮食作物中占1/4左右,产量更是超过了50%^[7]。为评价该转基因水稻混入非转基因水稻而被人体误食引发过敏反应的风险高低,参考2001年国际粮农组织/世界卫生组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, FAO/WHO)转基因食品致敏性评价判定树的内容,本课题组利用Balb/c小鼠模型对OsrHSA的致敏性进行了探讨^[8],为进一步研究其致敏性,本研究利用血清筛选试验和模拟胃肠液消化稳定性试验对OsrHSA的致敏性进行评价,为其食用安全性提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清来源

由广州医科大学附属第二医院和哈尔滨医科大学附属第二医院提供过敏患者血清75份,分别为鸡蛋过敏血清21份、牛奶过敏血清21份、虾过敏血清9份、屋尘螨过敏血清14份、小麦过敏血清10份;阴性对照血清4份。其中,过敏患者血清特异性IgE抗体浓度均大于3.5 kUA/L或大于Ⅲ级。

1.1.2 主要仪器与试剂

电泳仪和小型垂直电泳槽均购自美国Bio-Rad, UVP800凝胶成像系统(美国UVP),酶标仪(美国SpectraMax i3x),漩涡振荡器,恒温培养箱,电子天平,摇床,pH计。

OsrHSA(由相关研发单位提供),卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)、胃蛋白酶(3 500 U/mgPro)、胰酶、大豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean trypsin inhibitor, STI)、牛β-乳球蛋白(Bovine β-lactoglobulin, BLG)

均购自美国Sigma,纯化天然虾肌球蛋白(Purified natural shrimp tropomyosin, NA-STM, 美国INDOOR Biotechnologies),辣根过氧化物酶标记链霉亲和素、生物素化小鼠抗人IgE Fc段抗体、HRP-山羊抗小鼠IgG抗体均购自美国SouthernBiotech,山羊抗人血清白蛋白IgG抗体(美国Bethyl),单克隆小鼠抗人血清白蛋白IgG2b抗体、HRP-兔抗山羊IgG抗体均购自英国Abcam,牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、4×蛋白上样缓冲液(含巯基还原剂)、5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒、考马斯亮蓝蛋白快速染色液、DAB显色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司,低分子量蛋白质Marker购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 消化液及OsrHSA溶液配制

模拟胃消化液:称取0.1 g氯化钠和38 mg胃蛋白酶(3 500 U/mgPro),加入35 mL重蒸蒸馏水和365 μL盐酸,用盐酸调pH值至1.2后,加水定容至50 mL。平行配制不含胃蛋白酶的模拟胃消化液。

模拟肠消化液:称取磷酸二氢钾0.35 g,溶于12.5 mL重蒸蒸馏水,依次加入9.5 mL 0.2 mol/L氢氧化钠溶液、20 mL重蒸蒸馏水和0.5 g胰酶,混匀,用0.2 mol/L氢氧化钠溶液调pH值至7.5,加重蒸蒸馏水定容至50 mL。平行配置不含胰酶的模拟肠消化液。

样品OsrHSA溶液:配置浓度为5 g/L的OsrHSA溶液用于模拟胃液消化稳定性试验,配置浓度为2 g/L的OsrHSA溶液用于模拟肠液消化稳定性试验。

1.2.2 血清筛选试验

在96孔酶标板的反应孔中加入10 μg/mL OVA、NA-STM、OsrHSA溶液100 μL,其中OVA溶液4个孔(阳性对照),NA-STM溶液4个孔(阳性对照),OsrHSA溶液79个孔,包被缓冲液2个孔(空白对照),4℃孵育过夜。用PBST(含0.05% Tween-20)洗板3次,每孔加入200 μL 1% BSA/PBS封闭液,37℃封闭1 h,洗板3次。每孔加入100 μL过敏血清和阴性对照血清(1:5, 1% BSA/PBS稀释),OVA包被孔加对鸡蛋过敏血清,NA-STM包被孔加对虾过敏血清,OsrHSA包被孔加对鸡蛋、牛奶、虾、小麦、屋尘螨过敏的血清和阴性对照血清。37℃孵育1 h,洗板3次。每孔加入100 μL生物素化小鼠抗人IgE Fc抗体(1:6 000, PBS溶液稀释),37℃温育1 h,洗板3次。每孔加入100 μL辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(1:5 000, PBS溶液稀释),37℃

温育 1 h, 洗板 3 次。每孔加入 100 μL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (Tetramethylbenzidine, TMB) 显色液, 室温下避光显色 10 min, 加入 50 μL 终止液中止反应, 于 450 nm 读取吸光度 (OD) 值。以 OD 值等于阴性对照孔吸光度平均值的 2 倍为阳性阈值, 以大于阳性阈值的样品为阳性结果^[6]。

1.2.3 模拟胃肠液消化稳定性试验

按照农业部 869 号公告-2-2007《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》^[9] 进行对照蛋白和 OsrHSA 样品蛋白的模拟胃肠液消化稳定性试验。

1.2.4 SDS-PAGE

将 20 μL 不同消化时间的样品蛋白、蛋白酶对照、试样蛋白对照及蛋白 Marker 进行点样, 5% 浓缩胶、12% 分离胶, 以 90 V 恒压方式电泳至各指示剂条带迁移至凝胶下端约 1 cm 处, 取出凝胶, 进行染色、脱色, 用凝胶成像系统拍照保存。

1.2.5 蛋白印迹试验

模拟胃肠液 SDS-PAGE 结束后, 100 V 恒压条件下转膜 80 min, 将两块 PVDF 膜取下, 用 TBS 缓冲液洗膜 3 次, 1 min/次。加入 5% 脱脂奶粉 (TBST1 缓冲液稀释) 封闭液, 于 45 r/min 摇床上振荡 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。加入山羊抗人血清白蛋白 IgG 抗体 (1:1 200, 5% 脱脂奶粉稀释) 或单克隆小鼠抗人血清白蛋白 IgG2b 抗体 (1:3 500, 5% 脱脂奶粉稀释) 分别进行模拟胃液和模拟肠液的抗原抗体反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 于 45 r/min 摇床洗膜 3 次, 10 min/次。加入 HRP-兔抗山羊 IgG 抗体工作液 (1:6 000, TBST1 稀释) 或 HRP-山羊抗小鼠 IgG 抗体工作液 (1:4 000, TBST1 稀释), 于 45 r/min 摇床温育 1 h, 洗膜 3 次, 加入 DAB 显色液, 室温避光显色至出现清晰条带, 自来水冲洗 PVDF 膜终止染色, 用凝胶成像系统拍照保存。

2 结果

2.1 血清筛选试验结果

人血清酶联免疫吸附试验体系的检测结果显示, 空白对照孔 OD 值均 < 0.10, 阴性血清对照孔的 OD 值均 < 0.15, 且阳性对照血清孔 OD 值为阴性对照血清孔 OD 值平均值的 2 倍, 说明该试验体系正常, 阳性阈值为 0.199; 对鸡蛋、小麦、虾、屋尘螨等过敏血清与 OsrHSA 反应的 OD 值均小于阳性阈值, 对牛奶过敏血清组反应的均值为 0.147, 其中, 有 3 份牛奶过敏血清与 OsrHSA 反应的 OD 值大于阳性阈值, 血清编号分别是 23、38、42, 说明该蛋白质可能与牛奶过敏血清的特异性 IgE 发生交叉反应 (表 1)。

表 1 OsrHSA 与过敏血清酶联免疫吸附试验反应的 OD 值

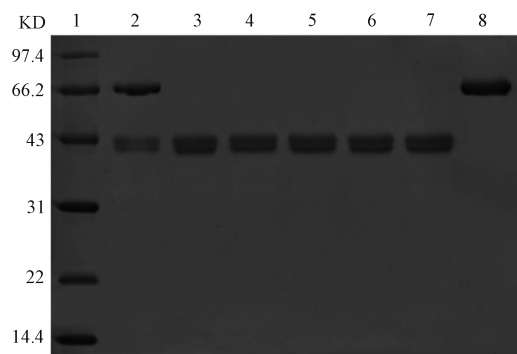
Table 1 OD value of enzyme linked immunosorbent assay reaction between OsrHSA and allergic serum

过敏血清	OD 值	过敏血清	OD 值
牛奶 23	0.232	虾	0.101 \pm 0.012*
牛奶 38	0.327	屋尘螨	0.134 \pm 0.012*
牛奶 42	0.427	小麦	0.104 \pm 0.010*
牛奶	0.147 \pm 0.081*	阴性血清	0.100 \pm 0.002*
鸡蛋	0.114 \pm 0.016*		

注: * 表示该组血清反应 OD 值的均值 \pm 标准差

2.2 模拟胃液消化稳定性试验结果

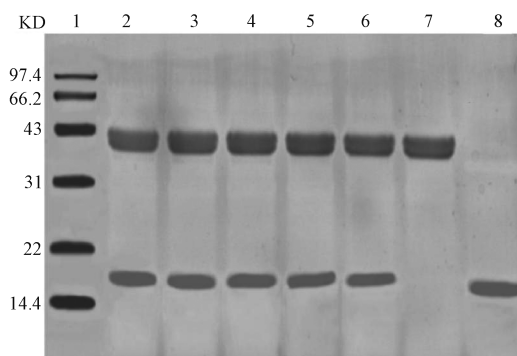
BSA 和 BLG 的电泳图谱显示, 在 15 s 时, 不稳定性对照蛋白 BSA 即被消化完全 (图 1), 而在 60 min 时, 仍可以看到清晰完整的稳定性对照蛋白 BLG 的蛋白条带 (图 2), 表明该试验体系正常; OsrHSA 的电泳图谱显示, 在 0 s 时能看到清晰完整的 OsrHSA 条带, 15 s 时蛋白条带完全消失 (图 3)。蛋白印迹图谱显示, 除 0 s 时的 OsrHSA 和蛋白对照样品外, 未检测到其他未被消化的 OsrHSA 蛋白质小片段 (图 4), 说明 OsrHSA 在胃液中极易被消化。



注: 1 为蛋白 Marker; 2~6 为 BSA 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min; 7 为胃蛋白酶对照样品; 8 为 BSA 蛋白对照 (不含胃蛋白酶的胃液处理的蛋白)

图 1 BSA 模拟胃液消化试验电泳图谱

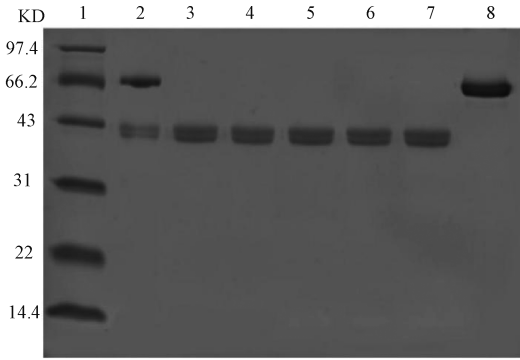
Figure 1 SDS-PAGE result of simulated gastric fluid digestion test of BSA



注: 1 为蛋白 Marker; 2~6 为 BLG 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min; 7 为胃蛋白酶对照样品; 8 为 BLG 蛋白对照 (不含胃蛋白酶的胃液处理的蛋白)

图 2 BLG 模拟胃液消化试验电泳图谱

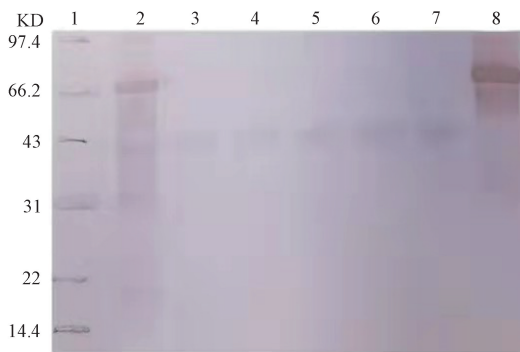
Figure 2 SDS-PAGE result of simulated gastric fluid digestion test of BLG



注:1为蛋白 Marker;2~6为 OsrHSA 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min;7为胃蛋白酶对照样品;8为 OsrHSA 蛋白对照(不含胃蛋白酶的胃液处理的蛋白)

图 3 OsrHSA 模拟胃液消化试验电泳图谱

Figure 3 SDS-PAGE result of simulated gastric fluid digestion test of OsrHSA



注:1为蛋白 Marker;2~6为 OsrHSA 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min;7为胃蛋白酶对照样品;8为 OsrHSA 蛋白对照(不含胃蛋白酶的胃液处理的蛋白)

图 4 OsrHSA 模拟胃液消化试验的蛋白印迹图谱

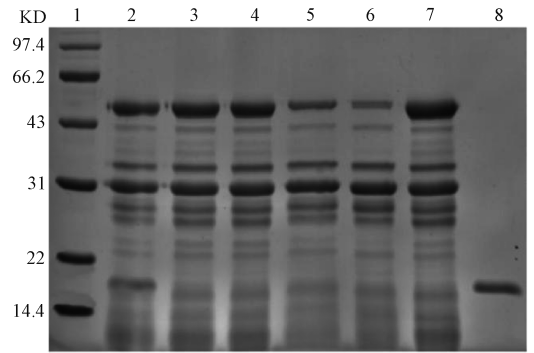
Figure 4 Western blot result of simulated gastric fluid digestion test of OsrHSA

2.3 模拟肠液消化稳定性试验结果

BLG 和 STI 的电泳图谱显示,在 15 s 时,不稳定对照蛋白 BLG 已被消化完全(图 5),而稳定对照蛋白 STI 在 60 min 时仍可以看到清晰完整的蛋白条带(图 6),表明该试验体系正常。电泳图谱显示,OsrHSA 在 15 s 内被消化完全(图 7),蛋白印迹试验进一步检测发现,15 s 时 OsrHSA 即被消化完全(图 8),说明 OsrHSA 在肠液中极易被消化。

3 讨论

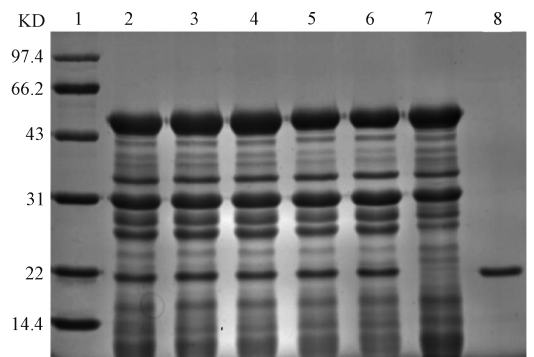
血清筛选试验是转基因产品外源蛋白致敏性评价决定树的重要组成部分,EBISAWA 等^[10]收集了对大豆过敏的儿童血清,利用血清筛选试验发现引起大豆过敏的主要致敏原是 Gly m 2S 白蛋白。其中,特异性血清筛选试验是判定基因表达产物是否具有致敏性的直接方法,而靶向血清筛选试验扩大了检测范围,其可信度主要取决于过敏血清的种



注:1为蛋白 Marker;2~6为 BLG 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min;7为胰蛋白酶对照样品;8为 BLG 蛋白对照(不含胰酶的肠液处理的蛋白)

图 5 BLG 模拟肠液消化试验电泳图谱

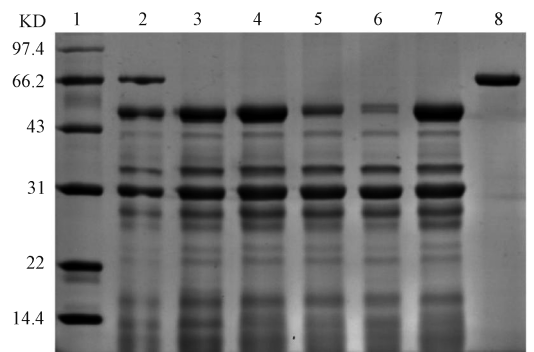
Figure 5 SDS-PAGE result of simulated intestinal fluid digestion test of BLG



注:1为蛋白 Marker;2~6为 STI 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min;7为胰蛋白酶对照样品;8为 STI 蛋白对照(不含胰酶的肠液处理的蛋白)

图 6 STI 模拟肠液消化试验电泳图谱

Figure 6 SDS-PAGE result of simulated intestinal fluid digestion test of STI

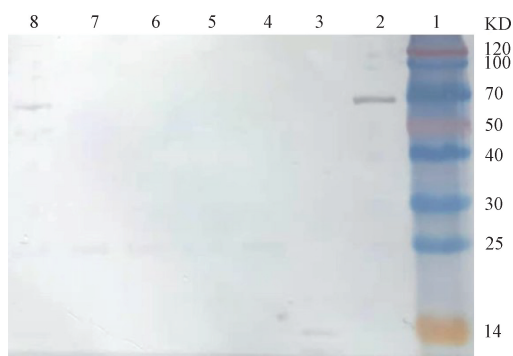


注:1为蛋白 Marker;2~6为 OsrHSA 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min;7为胰蛋白酶对照样品;8为 OsrHSA 蛋白对照(不含胰酶的肠液处理的蛋白)

图 7 OsrHSA 模拟肠液消化试验电泳图谱

Figure 7 SDS-PAGE result of simulated intestinal fluid digestion test of OsrHSA

类和数量,本研究选择特异性 IgE 抗体浓度大于 3.5 kUA/L,对鸡蛋、牛奶、小麦、虾和屋尘螨过敏的



注:1为蛋白 Marker;2~6为 OsrHSA 分别消化 0 s、15 s、2 min、30 min、60 min;7为胰蛋白酶对照样品;8为 OsrHSA 蛋白对照(不含胰酶的肠液处理的蛋白)

图8 OsrHSA 模拟肠液消化蛋白印迹图谱

Figure 8 Western blot result of simulated intestinal fluid digestion test of OsrHSA

人血清,根据 OsrHSA 蛋白与过敏患者血清 IgE 的结合能力判断该蛋白的潜在致敏,结果发现 OsrHSA 只与牛奶过敏血清出现交叉免疫反应,表明 OsrHSA 可能与牛奶过敏原具有相同的抗原表位,食用后可能诱发对牛奶过敏的人群发生过敏反应,因此,该类人群需要慎重使用。

食物过敏反应的发生与药物过敏和呼吸道过敏反应不同,致敏蛋白需要经过消化系统处理,因此,2001年FAO/WHO的联合专家咨询委员会提出:对转基因食品中的外源蛋白质必须进行模拟胃液消化试验。消化稳定性是指蛋白质在体外模拟胃肠液消化体系中的降解程度,通常情况下,天然的过敏原分子量较小,分子内含有较多的二硫键,结构较稳定,其进入人体后在胃肠系统中不易被各种消化酶消化降解,以完整的过敏原或过敏原片段的形式被小肠黏膜吸收入血,进而引起免疫反应。因此,利用模拟胃肠液消化稳定性试验可以间接判断蛋白的致敏性。

为进一步了解 OsrHSA 的致敏性,在血清筛选试验结果的基础上,本研究参考农业部 869 号公告-2-2007^[9]的方案,对 OsrHSA 的消化稳定性进行探索,除花粉蛋白外,大多数的过敏蛋白对胃肠消化酶具有较高的抗性^[11]。如果经消化酶消化后形成小于 3.5 kD 的小肽段和氨基酸,则认为该蛋白质基本不具有免疫原性,不会引起人体的过敏反应^[12],

结果表明 OsrHSA 在胃肠道中极易被消化,因此,其被吸收入血后,引起过敏反应的可能性较低,与 SHENG 等^[13]的研究结果相同。

综合以上的研究结果分析,在本研究条件下,OsrHSA 的潜在致敏性较低,但对牛奶过敏的人群需要慎重使用。

参考文献

- [1] SICHERER S H, SAMPSON H A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 133(2): 291-307.
- [2] BURKS A W, TANG M M, SICHERER S, et al. ICON: food allergy [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2012, 129(4): 906-920.
- [3] WERFEL T. Food allergy in adulthood [J]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 2016, 59(6): 737-744.
- [4] 杨林, 祝戎飞. 过敏性疾病研究新进展 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2019, 13(5): 424-432.
- [5] 武汉禾元顺利完成植物源重组人血清白蛋白临床前研究 [J]. *生物产业技术*, 2014(5): 68-69.
- [6] FU K, CHENG Q, LIU Z W, et al. Immunotoxicity assessment of rice-derived recombinant human serum albumin using human peripheral blood mononuclear cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104426.
- [7] 石荣华. 无公害水稻高产栽培技术 [J]. *写真地理*, 2020(3): 0202.
- [8] 杨柳, 陈晨, 韩超, 等. 植物源重组人血清白蛋白对 BALB/c 小鼠的致敏性评价 [J]. *卫生研究*, 2020, 49(3): 463-466.
- [9] 中华人民共和国农业部. 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: 农业部 869 号公告-2-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [10] EBISAWA M, BROSTEDT P, SJÖLANDER S, et al. Gly m 2S albumin is a major allergen with a high diagnostic value in soybean-allergic children [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2013, 132(4): 976-978.
- [11] XU W T, CAO S S, HE X Y, et al. Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(7): 1459-1465.
- [12] WHO. FAO/WHO expert consultation on allergenicity of food derived from biotechnology [R]. Geneva: WHO, 2001: 12-13.
- [13] SHENG Y, QI X Z, LIU Y F, et al. Subchronic toxicity study in vivo and allergenicity study in vitro for genetically modified rice that expresses pharmaceutical protein (human serum albumin) [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 72: 242-246.