

EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白的模拟胃液消化稳定性分析

毛德倩¹ 王艳萍² 王倩² 杜克贺² 胡贻椿¹ 李敏¹ 杨晓光¹ 杨丽琛¹

1 中国疾病预防控制中心营养与健康所 国家卫生健康委微量元素营养重点实验室 北京 100050;

2 北京汇智泰康医药技术有限公司 北京 101111

摘要: 目的 研究 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) 蛋白和 膦丝菌素乙酰转移酶(phosphinothricina cetyltransferase, PAT) 蛋白在模拟胃液中的消化稳定性。方法 参照中华人民共和国国家标准(农业部 869 号公告-2-2007) 模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法中模拟胃液的配方, 在体外建立模拟胃液消化体系, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(dodecyl sulfate, sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 和蛋白印迹(Western blot), 分析 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白在模拟胃液中不同消化时间点的降解情况。结果 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白均在 15 s 内消化完全, SDS-PAGE 和 Western blot 蛋白免疫印迹均未检测到蛋白残留, EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白在模拟胃液中极易被消化。结论 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白经过胃液消化后, 不具有免疫原性。

关键词: EPSPS 蛋白 PAT 蛋白 模拟胃液 消化稳定性 转基因食品 食品安全

中图分类号: R155.51 TS201.6 Q556.9 R333.2

文献标志码: A

DOI: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2020.03.018

Digestive stability in simulated gastric fluid of EPSPS protein and PAT protein

Mao Deqian¹, Wang Yanping², Wang Qian², Du Kehe²,
Hu Yichun¹, Li Min¹, Yang Xiaoguang¹, Yang Lichen¹

1 Key Laboratory of Trace Element Nutrition of National Health Commission of the People's Republic of China, National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China;

2 iPhase Pharma Services Co., Ltd, Beijing 101111, China

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the digestive stability of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) protein and phosphinothricina cetyltransferase (PAT) protein in simulated gastric fluid. **METHODS** The component of simulated gastric fluid was based on the method of target protein digestive stability in simulative gastric and intestinal in national standard of the People's Republic of China (Published by the Ministry of Agriculture No. 869-2-2007). The test model of stability of different protein to digestion in Simulated Gastric Fluid was established by dodecyl sulfate,

基金项目: 抗虫抗除草剂转基因玉米食品安全评价研究(No. 2015ZX08013002-006)

作者简介: 毛德倩, 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 微量元素与营养, 转基因食品安全性评价, E-mail: maodq@nih.chinacdc.cn

通信作者: 杨丽琛, 女, 研究员, 研究方向: 微量元素与营养, E-mail: yanglc@nih.chinacdc.cn

sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot. The degradation of EPSPS protein and PAT protein in simulated gastric fluid at different digestion time points were analyzed. **RESULTS** The experiment showed that EPSPS protein and PAT protein were completely digested within 15 s in simulated gastric fluid , no any remain of protein was detected by SDS-PAGE and Western blot , indicating that EPSPS protein and PAT protein were easily digested in the simulated gastric. **CONCLUSION** EPSPS protein and PAT protein do not have immunogenicity after digestion with simulated gastric fluid.

KEY WORDS: EPSPS protein , PAT protein , simulated gastric fluid (SGF) , digestive stability , genetically modified food , food safety

抗除草剂是农作物品种改良的重要内容 ,利用转基因技术培育抗除草剂作物 ,可以利用除草剂有效控制田间杂草 ,减少农药使用量 ,降低生产成本 ,保护环境。同时 ,转基因抗性农作物的种植可以降低农药的使用 ,减少杂草造成的损失^[1]。

5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase , EPSPS) 是细菌、真菌、藻类、高等植物体内芳香族氨基酸(包括色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸) 生物合成过程中一个关键酶。草甘膦可以和 EPSPS 结合 ,导致 EPSPS 的活性受到抑制 ,从而阻断了芳香族氨基酸和一些芳香化合物的生物合成 ,最终扰乱生物体正常的氮代谢使其死亡^[2]。由于草甘膦对作物和杂草不具有选择性 ,因此常对作物产生一定的毒害作用。EPSPS 基因的转入 ,由于抗性植株中 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate , EPSP) 合成酶的过量表达 ,不仅解除了草甘膦的结合限制 ,而且有足够的酶活性满足生物合成代谢的需要 ,从而维持了植物正常的生理代谢活动^[3]。bar 基因是抗除草剂基因 ,编码膦丝菌素乙酰转移酶 (phosphinothricina cetyltransferase , PAT)。PAT 蛋白能使除草剂草丁膦脱毒 ,从而使转 bar 基因的作物具有抗除草剂的性状^[4]。

转基因作物的环境安全性及食用安全性评价越来越受到人们的关注 ,其中最受关注的便是食用安全性问题。转基因作物中所表达的外源蛋白大部分是受体作物中所没有的蛋白质 ,食用转基因作物有可能对人体产生包括致敏性在内的一些不良反应^[5]。虽然关于食物致敏的机制还不是十分清楚 ,但大部分食物蛋白质是通过胃肠道途径引发致敏反应^[6-8]。体外模拟消化实验即是基于致敏蛋白耐消化这一特点发展出来的一种过敏评估方法 ,现已被许多国家以及一些国际组织规定为转基因作物中新表达外源蛋白致敏性评价的

必选实验项目^[5]。因此 ,对转基因作物中新表达的外源蛋白进行体外模拟消化实验对评价转基因作物的致敏性有着重要的理论意义和科学价值。

本研究考察了从转 EPSPS 基因和 bar 基因的转基因大豆种子中分离纯化得到的 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白在模拟胃液中的消化稳定性 ,为探讨携带 EPSPS 基因和 bar 基因的转基因作物对人体的潜在致敏性奠定理论基础 ,同时也为评价其食用安全性提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 材料 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白由北京大北农生物技术有限公司提供。

1.1.2 试剂 α -酪蛋白、大豆胰蛋白酶抑制剂 ,购自 Sigma-Aldrich 公司;胃蛋白酶购自 Worthington Biochemical 公司;CP4/EPSPS 一抗、FY06321(PAT/pat) 一抗购自上海佑隆生物科技有限公司;碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗购自三鹰生物科技有限公司;碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗购自北京博奥龙免疫技术有限公司;所有溶液均使用实验室自制超纯水配制。

1.1.3 仪器 实验室纯水制备系统(RO-150) ,北京至信科合科技有限公司; pH 计(FE20-K) ,Mettler Toledo 公司;恒温水浴锅(DK-98-I) ,天津泰斯特仪器有限公司;蛋白电泳(EPS-300) 及转膜系统(VE-486) ,上海天能科技有限公司。

1.2 溶液的配制

1.2.1 模拟胃消化液(simulated gastric fluid , SGF) 称取 0.202 g 氯化钠(NaCl) 和 85 mg 胃蛋白酶 ,加入 70 mL 超纯水 ,加 730 μ L 盐酸 ,调至 pH 1.15 ,加水定容至 100 mL。临用前配制。

1.2.2 酪蛋白 称取 50 mg 酪蛋白 ,溶解于 10 mL 超纯水中 ,混匀 ,浓度均为 5 g/L。取 4 mL 上述溶液 ,加 6 mL 超纯水 ,混匀 ,浓度均为 2 g/L。

1.2.3 大豆胰蛋白酶抑制剂 (soybean trypsin inhibitor, STI) 称取 20 mg 大豆胰蛋白酶抑制剂,溶解于 4 mL 超纯水中,混匀,浓度均为 5 g/L。

1.3 模拟胃液消化稳定性试验

模拟胃液蛋白质消化试验参照中华人民共和国国家标准(农业部 869 号公告-2-2007)^[9] 模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法进行。

1.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (dodecyl sulfate sodium salt-Polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE)

取消化蛋白样品于 100 °C 煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清点样,每孔 15 μL。电泳条件为:5% 浓缩胶,12% 分离胶;80 V 电泳 20 min后,120 V 电泳 90 min。电泳结束后取出凝胶,进行染色、脱色。每个样品各进行 3 次重复试验。

1.5 蛋白印迹(Western blot)分析

SDS-PAGE 电泳结束后,80 V 电压条件下转膜 120 min。转膜结束后,用 TBS 漂洗 PVDF 膜 3 次,加入封闭液,45 r/min 摇床上室温孵育 1 h。倒掉封闭液,加入用封闭液 1:2000 倍稀释的一抗 4 °C 过夜。倒掉一抗工作液,用 TBST 室温洗涤 3 次,每次 5 min。加入 1:10000 倍稀释的二抗(PAT)或 1:20000(EPSPS),室温孵育 1 h。倒掉二抗工作液,用 TBST 室温洗涤 3 次,每次 5 min。最后加入显色液室温下显色,直到条带清晰,倒掉显色液,加入超纯水终止反应。每个样品各进行 3 次重复试验。

2 结果

2.1 模拟胃液消化体系确认结果

由图 1 可见,消化稳定蛋白对照大豆胰蛋白酶抑制剂(20 kDa)在 60 min 内稳定,未被消化;消化不稳定蛋白对照酪蛋白(38 kDa)在模拟胃液即时(0 s)消化完全(图 2)。结果表明,该体外模拟胃液消化体系稳定且有效。

2.2 EPSPS 蛋白的模拟胃消化液结果

由图 3 可见,EPSPS 蛋白在体外模拟胃液消化过程中,在 0~15 s 内 SDS-PAGE 和 western blot 均无 EPSPS 蛋白残留。表明,EPSPS 蛋白在模拟胃液中不稳定,在 0~15 s 内消化完全。

2.3 PAT 蛋白的模拟胃消化液结果

由图 4 可见,PAT 蛋白在体外模拟胃液消化过程中,在 0~15 s 内 SDS-PAGE 和 Western blot 均无蛋白残留。表明,PAT 蛋白在模拟胃液中不稳定,在 0~15 s 内消化完全。

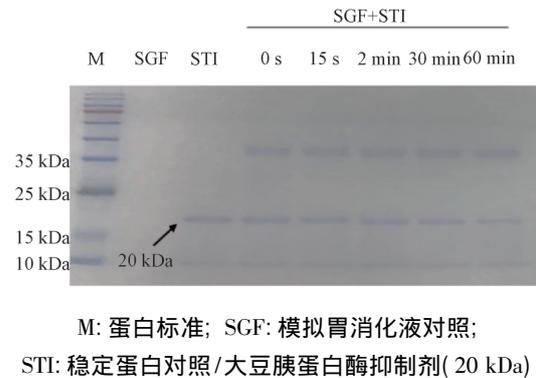


图 1 消化稳定蛋白在模拟胃液中的稳定性

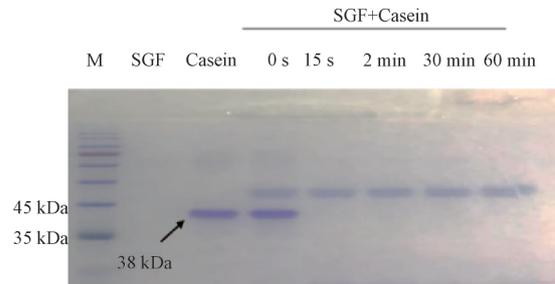
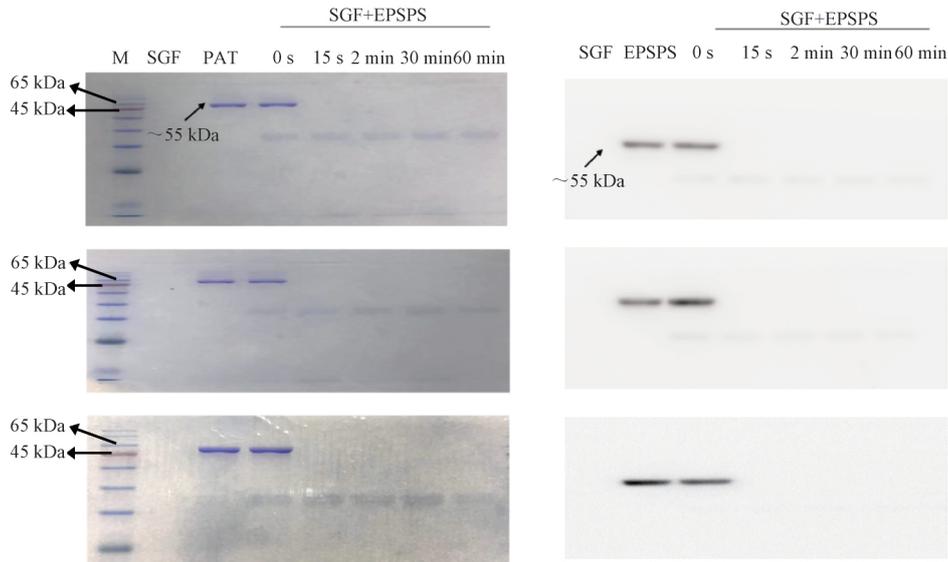


图 2 消化不稳定蛋白在模拟胃液中的稳定性

3 讨论

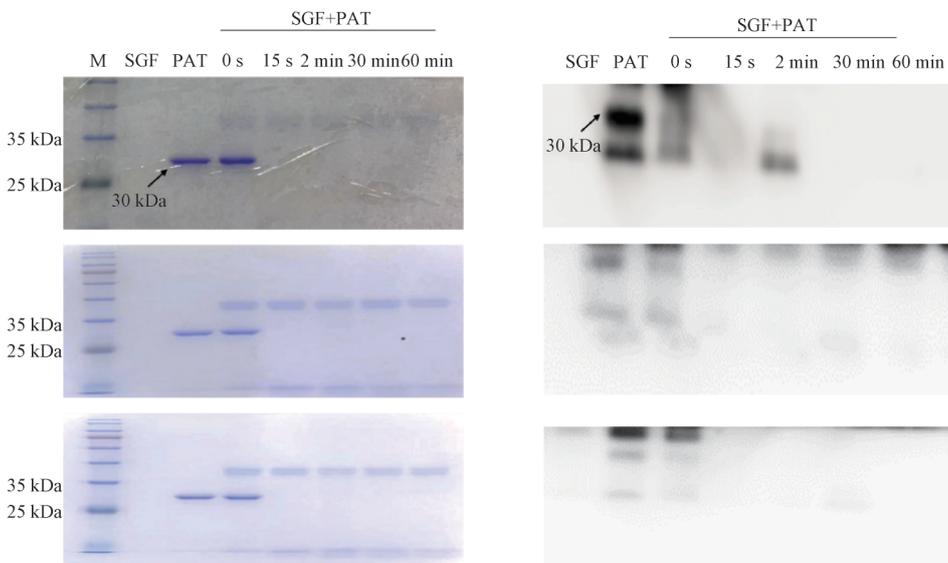
2001 年联合国粮食和农业组织/世界卫生组织 (FAO/WHO) 公布了转基因食品潜在致敏性评估策略:(1) 亲本作物和基因来源的历史;(2) 氨基酸序列同源性分析;(3) 特异血清学试验;(4) 消化稳定性试验和动物模型试验。其中对转基因食品中的外源蛋白(来源于非致敏源且与致敏蛋白无序列同源性的)必须进行模拟胃液消化实验,不能被胃蛋白酶降解的蛋白质或降解片段大于 3.5 kDa 的蛋白质可能是致敏蛋白^[10]。因此,转基因产品中外源基因表达蛋白在模拟胃肠环境中的消化稳定性结果,可以间接反映外源蛋白的致敏可能性,同时也可作为转基因产品食用安全性评价的理论依据。

自 1996 年 ASTWOOD 等^[11] 首次将胃蛋白酶体外消化方法用于评价食物致敏源的消化稳定性以来,模拟胃肠液消化稳定性实验一直是外源蛋白质,尤其是通过基因工程转入传统食品中并进行表达的蛋白质致敏性评价的重要部分。到目前为止,已有多种转基因作物的目标或标记基因的表达蛋白进行了体外模拟胃肠液消化稳定性的分析,如转 *HJC-1* 和 *G6-EPSPS* 基因抗虫耐草甘膦水稻^[1],转 *AM79 EPSPS* 基因的玉米^[5],转 *Bt* 基因玉米的 *Cry1Ic* 蛋白^[12],转 *Cry1Ab/Cry2Aj* 和



M: 蛋白标准; SGF: 模拟胃消化液对照; 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶: EPSPS 蛋白(55 kDa)

图 3 EPSPS 蛋白的消化稳定性



M: 蛋白标准; SGF: 模拟胃消化液对照; PAT: 脞丝菌素乙酰转移酶蛋白(30 kDa)

图 4 PAT 蛋白的消化稳定性

G10evo (*EPSPS*) 基因“双抗 12-5”玉米的重组蛋白^[13], PMI 蛋白^[14]、HPT 蛋白^[15]、转植酸酶基因玉米^[16]等,为预测外源蛋白的免疫原性提供了参考依据。

本研究从转 *EPSPS* 基因和 *bar* 基因的转基因大豆种子中分离纯化得到 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白后,在体外建立了模拟胃液的消化体系,进行了 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白的模拟胃液消化稳定性实验,结果发现 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白均在模拟胃液中不稳定,易被降解,均在 15 s 内消化完全,SDS-PAGE 和 Western blot 均无 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白的残留。

对 EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白进行消化稳定性实验后,这两种蛋白均会以小肽或氨基酸的形式

存在,而这些物质在人体内仅能够作为膳食来源的营养物质。除了花粉蛋白,其他所有免疫原性蛋白对消化酶具有极高的稳定性,因此蛋白质的稳定性可以被认为是预测蛋白质免疫原性的重要参考数据^[11]。蛋白质经过胃蛋白酶消化后形成小于 3.5 kDa 的小肽和氨基酸,则被认为几乎不可能具有免疫原性^[17]。根据以上研究进展,可以初步判断,EPSPS 蛋白和 PAT 蛋白经过胃液消化后,不具有免疫原性。

参考文献

- [1] 张力,王静,王晓军,等. 转 HJC-1 和 G6-EPSPS 基因抗虫耐草甘膦水稻表达蛋白在模拟胃肠环境中的稳定性研究[J]. 环境与健康杂志, 2012

- (12): 1074-1076.
- [2] 赵浩含, 王建华, 刘允军. CP4-EPSPS 蛋白的模拟胃肠液消化稳定性分析[J]. 生物技术, 2017(2): 84-89.
- [3] 谢树章, 杨小艳, 林清, 等. 抗草甘膦转基因玉米研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(3): 36-41.
- [4] 刘洪艳, 弭晓菊, 崔继哲. *bar* 基因、PAT 蛋白和草丁膦的特性与安全性[J]. 生态学杂志, 2007, 26(6): 938-942.
- [5] 王玉, 王建华, 刘允军. AM79 EPSPS 蛋白的体外模拟胃肠液消化稳定性研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 176-181.
- [6] LEHRER S B, HORNER W E, REESE G, et al. Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36(6): 553-564.
- [7] MILLS E N C, MADSEN C, SHEWRY P R, et al. Food allergens of plant origin: their molecular and evolutionary relationships[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003, 14(4): 145-156.
- [8] BANNON G A. What makes a food protein an allergen[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2004, 4(1): 43-46.
- [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/OL]. [2007-06-11]. http://www.biosafety.gov.cn/bzgf/201601/t20160112_324786.html.
- [10] WHO. FAO/WHO Expert consultation on allergenicity of food derived from biotechnology [R]. Geneva: WHO, 2001: 12-13.
- [11] ASTWOOD J D, LEACH J N, FUCHS R L. Stability of food allergens to digestion *in vitro* [J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(10): 1269-1273.
- [12] 李欣竹, 耿丽丽, 高继国, 等. CryIIe 蛋白的模拟胃肠液消化稳定性及热稳定性分析[J]. 生物技术通报, 2015, 31(11): 214-221.
- [13] 赵岩, 王静, 刘洪亮, 等. 转 Cry1Ab/Cry2Aj 和 G10evo(EPSPS) 基因“双抗 12-5”玉米外源基因重组蛋白的消化稳定性研究[J]. 实用预防医学, 2017, 24(1): 19-22.
- [14] PRIVALLE L S. Phosphomannose isomerase, a novel plant selection system: potential allergenicity assessment[J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 964: 129-138.
- [15] LU Y, XU W, KANG A, et al. Prokaryotic expression and allergenicity assessment of hygromycin B phosphotransferase protein derived from genetically modified plants [J]. J Food Sci, 2007, 72(7): 228-232.
- [16] 杨文竹, 蒲凌奎, 张琪, 等. 转植酸酶基因玉米中植酸酶蛋白在模拟消化液中的稳定性研究[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(S1): 86-89.
- [17] FU T J, ABBOTT U R, HATZOS C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluids: comparative study [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(24): 7154-7160.

收稿日期: 2019-10-14

(上接第 452 页)

- [15] Institute of Medicine of the National Academies. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D [M]. Washington DC: Institute of Medicine of the National Academies, 2010.
- [16] LEFEVRE M L. Screening for vitamin D deficiency in adults: U. S. preventive services task force recommendation statement [J]. Ann Int Med, 2015, 162(2): 133.
- [17] 高玲娟, 陈晨. 25-羟基维生素 D 检测试剂盒的性能验证[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(21): 3640-3642.
- [18] 云春风. 检测 25(OH) D 浓度的方法学比较及中国孕妇、青少年维生素 D 营养现状分析[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2015.
- [19] KNOX S, HARRIS J, CALTON L, et al. A simple automated solid-phase extraction procedure for measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ and D₂ by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Ann Clin Biochem, 2009, 46(3): 226-230.
- [20] 毛旭东, 吴彦, 盛宏光, 等. 液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)和酶联免疫法(ELISA)对体内 25(OH) D₃ 水平的测定[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(6): 584-586.
- [21] ROTH H J, GAYK H S, WEBER H, et al. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference [J]. Ann Clin Biochem, 2008, 45(2): 153-159.
- [22] FRASER W D, MILAN A M. Vitamin D assays: past and present debates, difficulties, and development [J]. Calcified Tissue Int, 2013, 92(2): 118-127.
- [23] HERRMANN M, HARWOOD T, PARRY O G, et al. A new quantitative LC tandem mass spectrometry assay for serum 25-hydroxy vitamin D [J]. Steroids, 2010, 75(13-14): 1106-1112.

收稿日期: 2019-11-14