

Cry1Ie 基因大肠杆菌表达蛋白对小鼠血液生化 and 肠道菌群的影响

张小霞¹ 杨宝兰¹ 严卫星¹ 刘允军² 王国英² 徐海滨¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 2. 中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要:为检测大肠杆菌表达的 Cry1Ie 蛋白为模式蛋白对小鼠血液生化 and 肠道菌群的影响, 提供 Cry1Ie 基因的食用安全依据。将 72 只 ICR 小鼠分为 Cry1Ie 基因表达蛋白组 (以 833 μg/kg BW d⁻¹ 剂量喂饲小鼠 30 d)、小牛血清白蛋白对照组和空载体大肠杆菌菌液对照组, 观察小鼠体重、测定血液生化指标 (谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总蛋白、血清白蛋白、尿素氮、肌酐、甘油三酯、胆固醇、血糖) 和肠道菌群数量 (肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌)。Cry1Ie 基因表达蛋白组与大肠杆菌菌液对照组、小牛血清白蛋白对照组比较, 小鼠体重、血液生化指标和肠道菌群各指标的影响均未发现差异有显著性。实验结果显示在本实验条件下, Cry1Ie 基因表达蛋白未对动物健康产生影响。
关键词:蛋白质类; 大肠杆菌; 血液化学分析; 小鼠

Effects of Cry1Ie Protein Expressed in E. coli. on Biochemical Indicators and Flora of Intestinal Tract in Mice

ZHANG Xiao-xia, YANG Bao-lan, YAN Wei-xing, LIU Yun-jun, WANG Guo-ying, XU Hai-bin
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Cry1Ie expressed protein is used as a model protein to examine its effects on biochemical indicators and flora of intestinal tract in mice. 72 ICR mice were randomly divided into one experimental group and two control groups. The experimental group was treated with 833 μg/kg BW d⁻¹ Cry1Ie expressed protein. The two control groups were treated with solution of bovine serum albumin and culture solution of E. coli. with control plasmid without Cry1Ie, respectively. After 30 days, body weight, biochemical indicators (AST, ALT, TP, ALB, BUN, CRE, TRIG, CHOL, GLU) and numbers of flora of intestinal tract (enteric bacilli, enterococci, Bacillus bifidus, lactobacilli) were examined. There were no significant differences between experimental group and control groups in body weight, biochemical indicators and numbers of flora of intestinal tract. In the present study, the Cry1Ie expressed protein had no toxicity to experimental animals. These results offer basic information for safety evaluation of new transgenic Cry1Ie expressed food, and establish foundation for food safety assessment of exogenous proteins derived from modern biological technique.
Key word: Proteins; Escherichia coli; Blood Chemical Analysis; mice

速, 可同时检测大量样品。该方法拟申报国家标准检测方法。
本研究成功地制备出针对黄曲霉毒素 (B + G) 具有高亲合力、高特异性的单克隆抗体, 建立了检测食品中总黄曲霉毒素的间接竞争 ELISA 检测方法, 为开展全国性总黄曲霉毒素污染调查提供了技术支持。

参考文献

[1] GB/T 5009.23—2003. 食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定[S].

[2] 董志伟, 王炎. 抗体工程[M]. 第2版. 北京: 北京医科大学出版社, 2002. 280-282.
[3] 金冬雁, 黎孟枫, 主译. J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯, 著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1996. 880-887.
[4] 江涛, 王环宇, 高秀芬, 等. 赭曲霉毒素 A 单克隆杂交瘤细胞系的建立及特性[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 14-17.
[5] 江涛, 李凤琴, 王环宇, 等. 赭曲霉毒素 A 免疫学检测方法的研究[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(5): 556-559.

[收稿日期: 2006-03-22]

中图分类号: R15; R379; Q949.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2006)04-0292-05

基金项目: 国家科技部转基因专项(J00-C-003)
作者简介: 张小霞 女 硕士
通讯作者: 徐海滨 男 研究员 博士生导师

随着转基因作物商品化的发展,如何评价转基因食品的食用安全性成为国际学术界的热点和难点问题。Bt 杀虫蛋白基因来源于苏云金杆菌(即 Bt 杆菌),是天然存在于土壤中的革兰阳性菌^[1],在其芽孢形成过程中产生许多以结晶方式存在的蛋白质,这些蛋白质具有杀虫活性,Bt 杀虫蛋白按氨基酸序列的同源性可分为 45 大类 313 种。*Cry1Ie* 基因属于 Bt 杀虫蛋白家族,是我国科学家首次分离克隆出来的一种新的 *Cry1* 基因。

由经合组织提出的评价转基因食物的实质等同性原则获得了大多数国家和国际组织的认同。实质等同性侧重的是转基因食品与传统食品差异的比较,转入基因的蛋白表达产物的安全性评价是目前食品安全性评价的一个重要方面,由于蛋白质获得困难,直接用转基因植物分离的蛋白进行动物实验不现实。大肠杆菌表达系统是基因表达技术中发展最早、目前应用最广泛的经典表达系统^[2],此系统具有成本低、表达量高、表达产物容易纯化、稳定性好、抗污染能力强以及适用范围广等优点,本研究利用这一系统生产、纯化 *Cry1Ie* 基因表达蛋白进行小鼠喂养实验,初步了解 *Cry1Ie* 基因表达蛋白对动物生长、血生化和肠道菌群的影响,为转 *Cry1Ie* 基因玉米的食用安全性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 *Cry1Ie* 蛋白在中国农业大学农业与生物国家重点实验室制备,纯度达 90 %以上,所用大肠杆菌菌株 BL21、小牛血清白蛋白(BSA)及常用化学试剂均购自道普公司。

1.2 剂量设计 根据我国膳食调查,国人均为 100 g/d 玉米,按玉米中蛋白质的含量 10 %^[3]、*Cry1Ie* 基因表达蛋白占转基因玉米总蛋白的 $5 \times 10^{-5} \sim 10^{-6} \mu\text{g} / \text{kg}$ 计算^[4], *Cry1Ie* 基因表达蛋白大约总摄入量为 50 $\mu\text{g} / \text{d}$,以成人平均体重 60 kg 计算, *Cry1Ie* 基

因表达蛋白的摄入量为 833 $\text{ng} / \text{kg} \text{ BW} \text{ d}^{-1}$ 。安全系数以 1 000 计, *Cry1Ie* 基因表达蛋白设计剂量为 833 $\mu\text{g} / \text{kg} \text{ BW} \text{ d}^{-1}$,用蒸馏水配制所需浓度,BSA 配制浓度同 *Cry1Ie* 基因表达蛋白组,空载体大肠杆菌菌液用培养基原液。

1.3 实验分组和方法 72 只清洁级 ICR 小鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),雌、雄各半,体重 16 ~ 18 g,适应 3 d,随机分为 *Cry1Ie* 基因表达蛋白组、BSA 对照组和空载体大肠杆菌菌液对照组,每组 12 只。以 833 $\mu\text{g} / \text{kg} \text{ BW} \text{ d}^{-1}$ 剂量受试物给 *Cry1Ie* 基因表达蛋白和(BSA)对照组小鼠灌胃 30 d,小鼠灌胃量 20 $\text{ml} / \text{kg} \text{ BW}$,于实验开始 0 d 和实验结束第 30 天无菌取小鼠粪便,检测肠道菌群相关指标。动物自由饮食,观察动物生长情况,每周记录小鼠的体重,实验结束,离心收集血清,测定生化指标。

1.4 实验指标

- 1.4.1 一般状况观察 体重、活动状况。
- 1.4.2 生化指标 谷丙转氨酶(AST)、谷草转氨酶(ALT)、总蛋白(TP)、血清白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、甘油三酯(TRIG)、胆固醇(CHOL)、血糖(GLU)。
- 1.4.3 肠道菌群测定 肠杆菌、肠球菌、双歧杆菌、乳酸杆菌。

1.5 实验数据统计 采用 SPSS 软件进行统计分析,若各组方差不齐,采用单因素方差分析法(One-way - ANOVA),以 $\alpha = 0.05$ 作为显著性水平,采用 Dunnett 法进行各组织间的均数比较。

2 结果

2.1 一般情况观察 给予小鼠不同受试物灌胃 30 d,实验期间动物活动、生长正常。由表 1 可见, *Cry1Ie* 基因表达蛋白组与 BSA 对照组、空载体大肠杆菌菌液对照组比较,体重及体重增重无显著变化。

表 1 对小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

性别	组别	蛋白含量 ($\mu\text{g} / \text{kg}$)	动物数 (只)	始重 (g)	30 d 体重 (g)	增重 (g)
雄	大肠杆菌菌液对照组	-	12	18.2 $\pm$ 0.8	34.2 $\pm$ 3.0	16.0 $\pm$ 2.9
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	833	12	18.0 $\pm$ 0.8	35.8 $\pm$ 2.2	17.8 $\pm$ 2.3
	BSA 对照组	833	12	18.1 $\pm$ 0.8	36.5 $\pm$ 2.6	18.4 $\pm$ 2.5
雌	大肠杆菌菌液对照组	-	12	18.0 $\pm$ 0.8	26.9 $\pm$ 2.3	8.9 $\pm$ 2.0
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	833	12	18.2 $\pm$ 0.8	28.6 $\pm$ 2.3	10.3 $\pm$ 2.2
	BSA 对照组	833	12	18.0 $\pm$ 0.7	27.1 $\pm$ 2.2	9.0 $\pm$ 1.8

2.2 对小鼠血生化指标的影响 由表 2 可见,雌雄小鼠 *Cry1Ie* 基因表达蛋白组与 BSA 对照组、空载体大

肠杆菌菌液组的血生化指标各项指标(AST、ALT、TP、ALB、BUN、CRE、TRIG、CHOL、GLU)未见差异显著性。

表 2 对小鼠部分血生化的影响($\bar{x} \pm s$)						
性别	组别	动物数(只)	AST (U/L)	ALT (U/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)
雄	大肠杆菌菌液对照组	12	137.5 $\pm$ 28.2	40.4 $\pm$ 6.9	72.1 $\pm$ 4.6	38.2 $\pm$ 2.3
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	12	123.6 $\pm$ 24.5	39.7 $\pm$ 5.6	67.5 $\pm$ 2.2	37.2 $\pm$ 1.5
	BSA 对照组	12	112.7 $\pm$ 33.7	37.6 $\pm$ 7.2	67.2 $\pm$ 2.7	37.1 $\pm$ 1.1
雌	大肠杆菌菌液对照组	12	135.3 $\pm$ 35.8	34.6 $\pm$ 6.5	74.4 $\pm$ 4.0	41.2 $\pm$ 2.4
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	12	122.7 $\pm$ 25.6	31.9 $\pm$ 5.2	70.5 $\pm$ 4.2	40.5 $\pm$ 1.8
	BSA 对照组	12	129.7 $\pm$ 14.4	36.4 $\pm$ 6.8	70.5 $\pm$ 2.5	40.6 $\pm$ 1.6
性别	组别	BUN (mmol/L)	CRE (U/L)	TRIG (mmol/L)	CHOL (mmol/L)	GLU (mmol/L)
雄	大肠杆菌菌液对照组	9.52 $\pm$ 1.51	76.8 $\pm$ 6.6	1.99 $\pm$ 0.37	4.01 $\pm$ 0.59	8.99 $\pm$ 1.04
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	9.33 $\pm$ 0.99	70.9 $\pm$ 5.5	2.12 $\pm$ 0.63	4.22 $\pm$ 0.92	8.59 $\pm$ 0.79
	BSA 对照组	9.94 $\pm$ 1.03	70.0 $\pm$ 5.5	2.36 $\pm$ 0.53	4.56 $\pm$ 0.93	8.10 $\pm$ 1.39
雌	大肠杆菌菌液对照组	8.29 $\pm$ 1.09	74.9 $\pm$ 10.0	2.61 $\pm$ 0.66	3.79 $\pm$ 0.81	8.57 $\pm$ 1.12
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	8.86 $\pm$ 1.63	73.0 $\pm$ 9.3	2.55 $\pm$ 0.49	3.46 $\pm$ 0.49	8.22 $\pm$ 0.78
	BSA 对照组	8.89 $\pm$ 0.93	72.0 $\pm$ 8.9	2.57 $\pm$ 0.71	3.30 $\pm$ 0.32	8.40 $\pm$ 0.82

2.3 对小鼠肠道菌群的影响

由表 3、4 可见,雌雄

各组,实验前后自身比较,实验第 30 天 *Cry1Ie* 基因

表达蛋白组与大肠杆菌菌液对照组、BSA 对照组的

肠道条件致病菌菌群(肠杆菌、肠球菌)、肠道益生菌

菌群(双歧杆菌、乳酸杆菌)的数量均未见差异有显

著性。

表 3 对小鼠肠道条件致病菌群的影响($\bar{x} \pm s$)						
性别	组别	动物数(只)	肠杆菌(对数值)		肠球菌(对数值)	
			0 d	30 d	0 d	30 d
雄	大肠杆菌菌液对照组	12	6.74 $\pm$ 0.47	5.98 $\pm$ 0.60	5.28 $\pm$ 0.71	5.51 $\pm$ 0.46
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	12	6.21 $\pm$ 0.22	5.96 $\pm$ 0.32	5.59 $\pm$ 0.23	5.25 $\pm$ 0.15
	BSA 对照组	12	6.55 $\pm$ 0.43	5.95 $\pm$ 0.88	4.82 $\pm$ 0.63	5.70 $\pm$ 0.52
雌	大肠杆菌菌液对照组	12	6.08 $\pm$ 0.92	5.70 $\pm$ 0.54	5.08 $\pm$ 0.41	5.27 $\pm$ 0.65
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	12	6.61 $\pm$ 0.62	7.10 $\pm$ 0.98	5.32 $\pm$ 0.97	5.39 $\pm$ 0.72
	BSA 对照组	12	7.12 $\pm$ 0.95	7.24 $\pm$ 0.94	5.40 $\pm$ 0.46	4.84 $\pm$ 0.53

表 4 对小鼠肠道益生菌群的影响($\bar{x} \pm s$)						
性别	组别	动物数(只)	双歧杆菌(对数值)		乳酸杆菌(对数值)	
			0 d	30 d	0 d	30 d
雄	大肠杆菌菌液对照组	12	8.75 $\pm$ 0.39	8.96 $\pm$ 0.75	8.38 $\pm$ 0.36	8.41 $\pm$ 0.66
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	12	8.57 $\pm$ 0.50	8.51 $\pm$ 0.67	8.59 $\pm$ 0.45	7.84 $\pm$ 1.46
	BSA 对照组	12	8.41 $\pm$ 0.13	8.37 $\pm$ 0.33	8.35 $\pm$ 0.30	8.32 $\pm$ 0.58
雌	大肠杆菌菌液对照组	12	8.95 $\pm$ 0.59	8.93 $\pm$ 0.67	8.73 $\pm$ 0.69	8.82 $\pm$ 0.74
	<i>Cry1Ie</i> 表达蛋白组	12	8.35 $\pm$ 0.58	8.26 $\pm$ 0.26	8.27 $\pm$ 0.33	8.29 $\pm$ 0.49
	BSA 对照组	12	8.58 $\pm$ 0.42	8.18 $\pm$ 0.89	8.36 $\pm$ 0.44	8.30 $\pm$ 0.64

3 讨论

转基因食品的安全性评价是一个复杂的过程,目前开发的转基因食品安全性评价应着重从受体、载体、插入基因、供体、基因表达产物和全食品等方面加以考虑。诸多因素中非核酸物质(蛋白质)的安全性毒理学评价是所有评价的基础。实际研究中,由于直接从转基因植物中分离纯化出可以用于动物毒理学实验的外源表达蛋白非常困难,因此可以通过体外表达系统产生在生化、结构和功能上与转基

因植物食品中相同的表达产物,通过等同性比较即可进行后续的评价试验^[5]。在本研究前期研究中,确认了大肠杆菌表达系统生产的 *Cry1Ie* 蛋白与转基因玉米中表达的 *Cry1Ie* 蛋白具有等同性,奠定了 *Cry1Ie* 蛋白毒性研究的基础。选用大肠杆菌菌液为内对照、BSA 为外对照,目的是排除培养菌液对实验结果的干扰,获得 *Cry1Ie* 蛋白对动物健康一些潜在影响的资料。实验结果提示, *Cry1Ie* 蛋白的灌胃剂量在人体可能接触量的 1 000 倍情况下, *Cry1Ie* 基

缺铁性贫血大鼠模型建立和补充乳酸亚铁改善血红蛋白水平研究

汪会玲 孟 晶 潘丽莉 赖建强 荫士安
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘 要:为探讨缺铁性贫血大鼠模型建立及补充乳酸亚铁后大鼠生长发育和血红蛋白水平的变化,为相关研究提供参考数据,采用二级初断乳 Wistar 大鼠 25 只,体重 50~60 g,在二级动物房单笼饲低铁饲料 4 周,测定尾血血红蛋白(Hb),将 Hb 低于 100 g/L 的大鼠依血红蛋白水平随机分成缺铁对照组和补充铁组,每组 10 只。实验期为 4 周。缺铁大鼠和乳酸亚铁补充组大鼠的及其差值均有差异有非常显著性($P<0.0001$);缺铁性贫血大鼠肝脏重量和心脏重量低于补充乳酸亚铁组大鼠($P<0.0002$),而脾脏和肾脏重量高于补充乳酸亚铁组大鼠,两组脾脏重量差异有显著性($P<0.05$);缺铁性贫血大鼠的脾脏/体重与心脏/体重显著大于补充乳酸亚铁组大鼠($P<0.05$),补充乳酸亚铁组大鼠的肾脏/体重则大于缺铁性贫血大鼠($P=0.001$);缺铁对照组大鼠的血红蛋白含量非常显著低于补充乳酸亚铁组大鼠($P<0.0001$),而缺铁对照组大鼠的红细胞游离原卟啉含量非常显著高于补充乳酸亚铁组大鼠($P<0.0001$),缺铁组大鼠的白细胞数量是补充组的 3.4 倍,红细胞数量却仅为补充组的 33.9%。缺铁大鼠模型建立需要严格控制饲养条件,缺铁大鼠通过一定的代偿性增生改善机体适应缺铁和缺氧状况的能力有限,补充乳酸亚铁后可以有效地改善缺铁状况。

关键词:贫血; 缺铁性; 体重; 乳酸盐类; 血红蛋白类

因表达蛋白组与大肠杆菌菌液对照组、BSA 对照组比较,均未发现小鼠的体重、血液生化和肠道菌群各指标差异有显著性,未提示 *Cry1Ie* 基因表达蛋白对动物健康有影响。Noteborn 和 Kuiper 等对转 *Cry1A* 基因番茄进行了大鼠、小鼠全食品喂养实验,受试动物生长发育正常,未出现任何病理反应,90 d 喂养试验结果表明,受试动物的所有检测指标均处于正常范围之内^[6],说明 *Cry1Ie* 基因表达蛋白与 Bt 家族 Cry 蛋白的毒理学实验结果一致。本研究也探讨了 *Cry1Ie* 蛋白对小鼠肠道菌群的影响,结果表明 *Cry1Ie* 蛋白对肠球菌、肠杆菌等条件致病菌群和双歧杆菌、乳酸杆菌等益生菌群的数量均没有影响。

本研究为新的抗虫基因 *Cry1Ie* 表达蛋白的安全性评价积累了第一手的实验资料,并为摸索转基因食品中外来蛋白的食品安全性评价的方法奠定了一些基础,在新引入食品的蛋白质还缺乏安全食用的历史时,必要的急性经口毒性试验是其安全性评价的一个重要组成部分^[7],本研究由于样品的数量限制,未进行此实验。今后还将以 *Cry1Ie* 基因为模式蛋白,在外源蛋白质纯化的表达量、制备单克隆抗体、致敏性研究等方面继续开展工作,以获得比较完整的 *Cry1Ie* 蛋白毒性资料,同时进一步完善我国转

基因食品的安全性评价体系和规范。

参考文献

[1] Adams T B, Doull J D, Goodman J I, et al. The FEMA GRAS assessment of fufural used as a flavour ingredient[J]. Food Chem Toxicol, 1997, 35: 739-751.

[2] Hockney R C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli* [J]. Trends Biotechnol, 1994, 12(11): 456-463.

[3] 杨月欣,主编.中国食物成分表 2002[M].北京:北京大学医学部出版社,2002.

[4] 刘允军.人工改造的 *cry1Ac*、*cry1Ie* 基因在大肠杆菌、转基因烟草和玉米中的表达[D].中国农业大学博士论文集,2004.

[5] 中华人民共和国卫生部.转基因食品卫生管理办法[Z].

[6] Kuiper H A, Noteborn H P J M. Food safety assessment of transgenic insect-resistant Bt tomatoes[A]. OECD. OECD. Food Safety Evaluation[C]. Paris: OCED,1996. 50-57.

[7] WHO. Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of food components from plants derived by modern biotechnology[Z]. Report of a WHO Workshop. Geneva: WHO, 1995, 11.

[收稿日期:2006-02-20]

中图分类号:R15;Q343.1 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2006)04-0296-04

作者简介:汪会玲 女 实验师