

驴胎盘蛋白的组成分析

樊雨梅^{1,2}, 汝文文^{1,2}, 张建岭^{1,2}, 解晓^{1,2}, 廖峰^{1,2*}

(1. 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东东阿 252201; 2 东阿阿胶股份有限公司, 山东东阿 252201)

摘要 采用蛋白质传统分离技术结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF/MS)揭示驴胎盘蛋白质的性质和组成, 结果表明, 驴胎盘蛋白含量为(15.62±1.04)%, 等电点均匀分布酸性和碱性区域, 分子量主要集中在7~19、36~78 kD 2个区域。通过与马科蛋白图库进行对比, 检索出3 865种可识别的蛋白, 进一步对驴胎盘蛋白进行生物信息学分析, 发现驴胎盘蛋白主要参与了内质网蛋白质加工、ECM-受体相互作用、内质网应激反应等生物学过程, 为驴胎盘药理活性成分的筛选提供了理论基础。

关键词 驴胎盘; 基本特性; 蛋白质组分; 生物信息学

中图分类号 S822 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)11-0168-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.11.046

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis of the Composition in Protein from Donkey Placenta

FAN Yu-mei^{1,2}, RU Wen-wen^{1,2}, ZHANG Jian-ling^{1,2} et al (1. National Engineering Research Center for Gelatin-based Traditional Chinese Medicine, Dong'e, Shandong 252201; 2. Dong-E-E-Jiao Co., Ltd., Dong'e, Shandong 252201)

Abstract SDS-PAGE gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF/MS were used to reveal the properties and composition of protein in donkey placenta. The results showed that the protein content of the donkey placenta was (15.62±1.04)%, the isoelectric point was evenly distributed in the acidic and basic regions, and the molecular weight was mainly concentrated in the two regions of 7-19 and 36-78 kD. By comparing with the equine protein library, 3 865 identifiable proteins were retrieved, and further analysis of donkey placental proteins was performed. It was found that donkey placental proteins were mainly involved in biological processes such as protein processing in endoplasmic reticulum, ECM-receptor interaction and response to endoplasmic reticulum stress. It provided a theoretical basis for the screening of donkey placenta pharmacologically active ingredients.

Key words Donkey placenta; Basic properties; Protein fraction; Bioinformatics

动物来源药材是我国传统药物的重要组成部分, 胎盘作为传统中药, 经过长期的实践经验和现代科学研究证明, 胎盘及其提取物具有抗氧化^[1]、抗疲劳^[2-3]、延缓衰老^[4]、伤口愈合^[5]、调节皮肤炎症^[6]、调节免疫^[7]和改善肝损伤^[8-10]等作用。胎盘的生物活性与其所含有的化学成分密切相关^[11-13]。目前研究表明, 胎盘富含多种生物成分, 包括免疫球蛋白、胶原蛋白、激素、生长因子、细胞因子、氨基酸、酶及微量元素等^[12,14]。Togashi等^[12,15]研究发现, 人胎盘提取物的抗氧化活性与其所含的尿嘧啶、酪氨酸、苯丙氨酸有关。也有研究表明, 胎盘蛋白及多肽是胎盘发挥抗氧化、伤口愈合、抗衰老、抗疲劳、免疫调节等作用的物质基础^[12-14,16-17]。

近年来, 关于胎盘的研究国内外学者主要集中在胎盘的检测、动物胎盘功效成分的制备及其功效研究, 但蛋白质类成分的组成、鉴定研究较少。因此, 笔者以驴胎盘为研究对象, 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、二维电泳、圆二色谱和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF/TOF/MS)等技术手段揭示驴胎盘蛋白质的分子量分布、等电点、二级结构与组成, 为驴胎盘的深层次开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 驴胎盘, 山东天龙驴产业研究院; 乙腈、甲酸、甲醇, 均为质谱纯, 百灵威科技有限公司; 牛血清白蛋白、尿素、二硫苏糖醇, 北京索莱宝科技有限公司; Tris-base, 阿拉丁; PMSF, 碧云天; Bio-Lyte 3-10 buffer、Ready Strip IPG Strips、Modified Trypsin (Sequencing Grade, Promega)、SDS-PAGE 电泳 Maker、CGE 电泳 Maker, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 仪器与设备 全自动凯氏定氮仪(UDK159), 意大利 VELP 公司; SDS-PAGE 电泳仪(Mini Protean 3 Cell)、CGE 电泳仪(P/ACETM MDQ)、2-DE 电泳仪(Protean IEF cell), 美国 Bio-Rad 公司; 圆二色谱仪(MOS 450), 法国 Bio logic 公司; MALDI-TOF/TOF-MS(Orbitrap Fusion Lumos Tribrid)、多功能酶标仪(MULTISKAN GO), 美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理。 取新鲜驴胎盘样品, 用生理盐水冲洗干净, 并用手术器械去除筋膜和脐带。生理盐水浸泡并缓慢搅拌 5 min, 重复数次, 直至去除淤血。沥干水分后用液氮速冻, 并打成粉末。

准确称取 2 份 5 g 胎盘粉末, 对于分析用样品加入 50 mL 含 1 mmol/L PMSF 的 Western 和 IP 细胞裂解液, 对于纯化蛋白的样品加入 50 mL pH 8.0 含 100 mmol/L 氯化钠的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, 使用高速匀浆机在低温下匀浆, 匀浆程序为匀浆 30 s, 间隔 15 s。匀浆后离心去除沉淀, 上清液即为驴胎盘粗提液。

1.3.2 蛋白质特性的测定。

1.3.2.1 蛋白质含量测定。 采用 GB 5009.5—2016 中凯氏

基金项目 山东省泰山产业领军人才传统产业创新类项目(TSCY2017-0233)。

作者简介 樊雨梅(1992—), 女, 山西忻州人, 工程师, 硕士, 从事天然功效成分研究。* 通信作者, 高级工程师, 博士, 从事食品科学研究。

收稿日期 2020-10-15; **修回日期** 2020-11-03

定氮法^[18]测定驴胎盘中蛋白质的含量。

1.3.2.2 SDS-PAGE 电泳测定蛋白质分子量。方法参考文献^[19]。驴胎盘粗提液按体积 1:1 加入含二硫苏糖醇的 2 × Loading Buffer 缓冲液,沸水浴 5 min 后取出。上样量为 10 μL,浓缩胶质量分数为 5%,分离胶 12%。将凝胶扫描电子图谱保存,电泳所用的 marker 分子量在 7~207 kD。

1.3.2.3 毛细管凝胶电泳 (CGE) 分析蛋白质相对丰度。根据田兰等^[20]的方法稍作修改。毛细管规格为内径 100 μm,总长 31 cm,有效长度 20 cm,柱体温度 40 °C,电动进样,进样电压 -10 kV,进样时间 1 s,分离电压 -12.4 kV,紫外检测波长 280 nm,样品储存温度 30 °C。

1.3.2.4 二维电泳 (2-DE) 分析蛋白质等电点。根据 Wawrzykowski 等^[21]的方法,稍作修改。200 μL 驴胎盘粗提液与 800 μL 的水化液混匀,取 200 μL 加载到电泳池,准备完毕后,进行等点聚焦程序(表 1)。

表 1 7 cm 胶条的 IEF 程序
Table 1 IEF program for 7 cm latex

步骤 Step	电压 Voltage/V	升压方式 Boost method	时间 Time	目的 Purpose
水化 Hydration	—	—	12 h	被动水化
S1	250	缓慢	25 min	除盐
S2	1 000	快速	60 min	除盐
S3	4 000	线性	3 h	升压
S4	4 000	快速	24 000 Vh	聚焦
S5	500	快速	任意时间	保持

等电聚焦后立即进行胶条平衡。平衡分两步,每次 15 min,分别使用 5 mL 含 1% DTT 平衡液 1 和 5 mL 含 2.5% IAM 平衡液 2。平衡结束后进行第二向 SDS-PAGE 电泳。凝胶用考马斯亮蓝染色后,以脱色液脱去背景颜色,使用凝胶成像设备扫描成电子图片保存。

1.3.3 圆二色谱法检测蛋白质的二级结构。采用参考文献^[22]中的方法,略有改动。驴胎盘蛋白经 0.45 μm 微孔滤膜处理后在 190~250 nm 远紫外区进行扫描,超纯水作为空白。测定条件:0.1 cm 石英比色杯,温度 25 °C,光径 0.1 cm,带宽 1 nm,扫描速度 0.5 nm/s,用平均残基摩尔椭圆率 $[\theta]$ 表示 CD 光谱数据,单位 deg·cm²/dmol,并使用 SELCON3 程序估算蛋白质的二级结构(<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>),匹配方式为 Closest matching solution with all proteins。

1.3.4 蛋白质组成分析。驴胎盘经 SDS-PAGE 分离后,条带平均切成 6 份,移至 EP 管中。蛋白质的脱色酶切方法参考文献^[21],采用 MALDI-TOF/TOF-MS 分析。利用 Mascot 软件的 SwissPort 数据库进行搜索。检索分类(Taxonomy)为 *Equus caballus*,Mascot 检索 $P < 0.05$ 和 Mascot 得分 >41 分的结果被认为鉴定成功。

1.4 数据分析 每组数据均重复 3 次,用 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

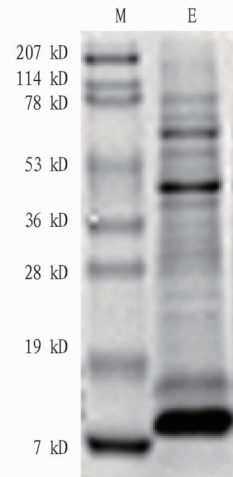
2 结果与分析

2.1 蛋白质的基本性质

2.1.1 蛋白质含量分析。用凯氏定氮法测定驴胎盘蛋白质

含量为 15.62%±1.04%,与唐文林^[23]报道的猪胎盘蛋白质含量为 14.67% 结果相似。

2.1.2 蛋白质分子量分布。驴胎盘蛋白电泳条带清晰(图 1),分子量均匀分布(7~207 kD),与人胎盘^[24]、猪胎盘^[14,23,25]、鹿胎盘^[26]、马胎盘^[27]、羊胎盘^[28]、牛胎盘^[29] 提取物的电泳图模式类似。由图 1 可知,驴胎盘蛋白中主要含有 8 条条带,主要分布于 7~19 和 36~78 kD。



注: M: marker; E: 驴胎盘

Note: M: Marker; E: Donkey placenta

图 1 驴胎盘 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of donkey placenta

2.1.3 不同分子量蛋白质丰度。胎盘蛋白分子量由低至高均匀分布(图 2),且出峰位置非常多,说明胎盘蛋白质种类较多,与前面 SDS-PAGE 结果一致。由图 2 可知,驴胎盘蛋白主要分布在 35~50 kD。

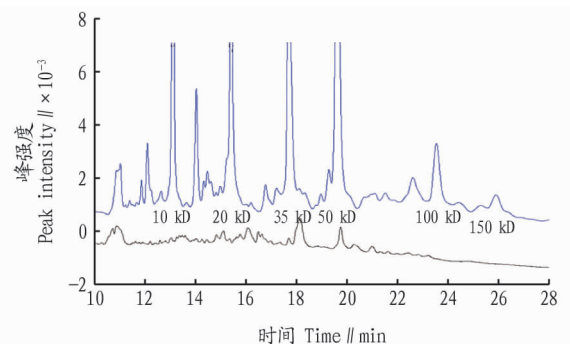


图 2 驴胎盘 GCE 结果

Fig. 2 GCE of donkey placenta

2.1.4 蛋白质等电点。驴胎盘蛋白的 2-DE 电泳结果如图 3 所示,水平方向为第一向固相 pH 梯度等点聚焦,垂直向为第二向垂直板 SDS-PAGE 电泳。驴胎盘蛋白等电点范围分布较广,在酸性和碱性范围内均有相应的等电点蛋白。

2.2 蛋白质二级结构分析 采用圆二色谱法分析驴胎盘蛋白质组分中的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲比例,结果发现,驴胎盘蛋白 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲的比例分别为 9.7%、41.2%、21.7% 和 32.1%,可见驴胎盘蛋白质的二级结构以无规则卷曲和 β -折叠为主,推测驴胎

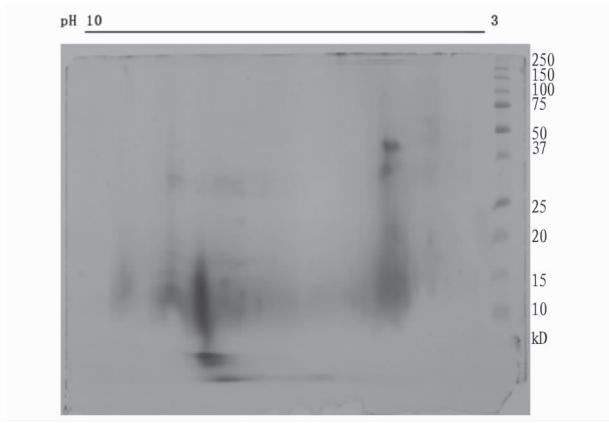


图3 驴胎盘2-DE电泳结果

Fig. 3 2-DE electrophoresis results of donkey placenta

盘蛋白富含缬氨酸和异亮氨酸。

2.3 蛋白质组成分析 利用 SDS-PAGE 结合 MALDI-TOF/TOF-MS 的方法, 总共鉴定出 3 865 种蛋白质, 其中有 301 种蛋白为未命名蛋白。鉴定的驴胎盘蛋白种类低于 Ner-Kluza 等^[29] 报道的 4 000 多种牛胎盘蛋白, 高于 Miao 等^[30] 报道的 1 198 种人胎盘蛋白和 Lee 等^[31] 报道的 945 种猪胎盘蛋白。鉴别出来的驴胎盘蛋白等电点和分子量的分布见图 4, 这与上面 GCE 揭示的驴胎盘蛋白分子量分布一致, 主要分布在 30~50 kD。

通过基因本体论 (gene ontology, GO) 法对驴胎盘蛋白质分别以其分子功能 (molecular function, MF)、生物学过程 (biological process, BP) 和细胞组成 (cell component, CC) 3 种方式进行归类, 揭示驴胎盘蛋白生物学功能, 结果见图 5。驴胎

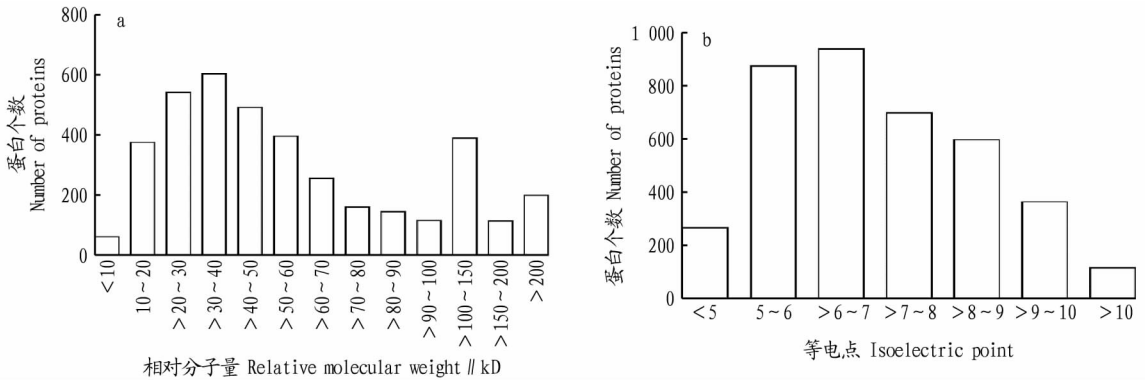


图4 识别出的驴胎盘蛋白在相对分子量(a)和等电点(b)上的分布

Fig. 4 The distribution of identified donkey placental protein in relative molecular weight(a) and isoelectric point(b)

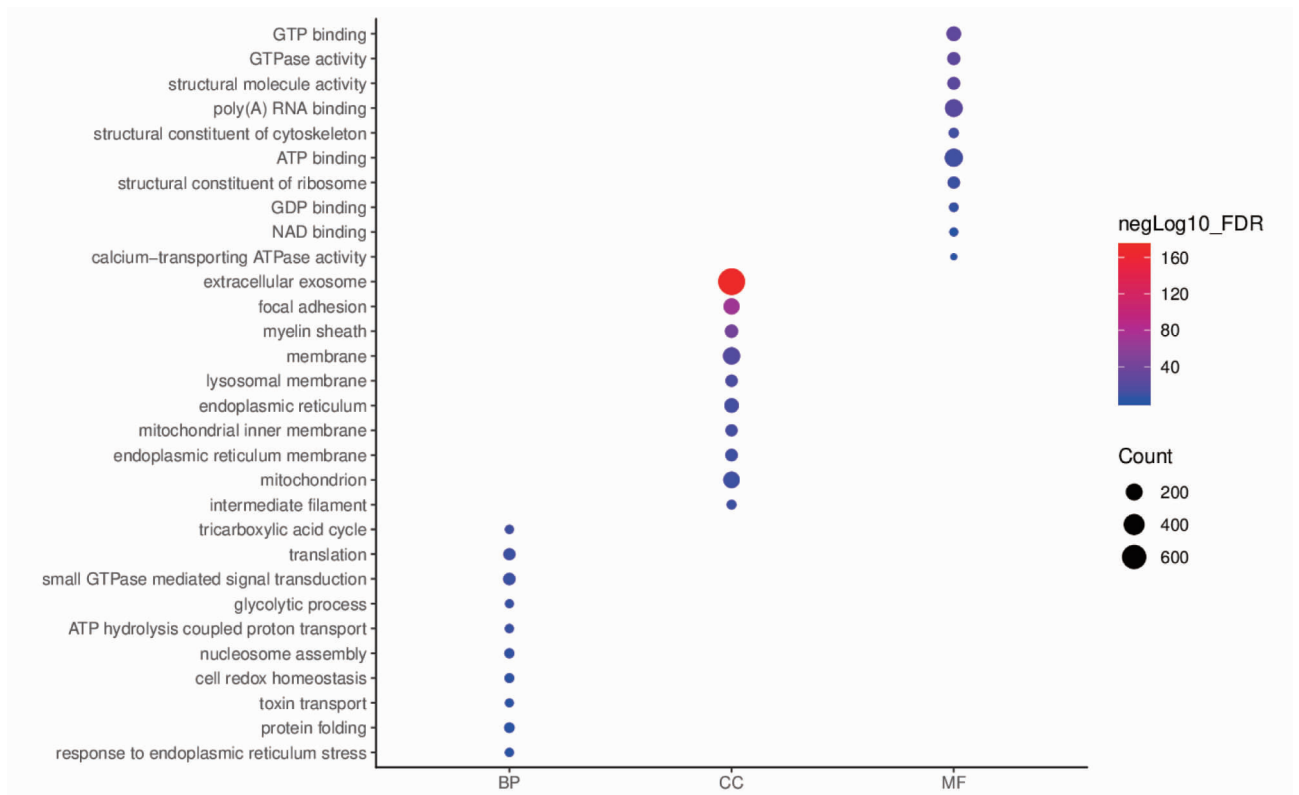


图5 识别出的驴胎盘蛋白的GO分类(前10)

Fig. 5 GO classification of the identified donkey placental protein(top 10)

盘蛋白参与的生物过程主要是三羧酸循环、翻译、小 GTP 酶介导的信号转导、糖酵解、ATP 水解耦合质子传输、核小体组装、细胞氧化还原稳态、毒素转运、蛋白折叠、内质网应激反应等。驴胎盘蛋白参与形成的细胞组成过程有细胞外泌体、黏着斑、髓鞘、细胞膜、溶酶体膜、内质网、线粒体内膜、内质网膜、线粒体及中间丝的构建等。驴胎盘蛋白参与蛋白质种类最丰富的分子功能为 GTP 结合、GTPase 活性、结构分子活性、聚(A)RNA 结合、细胞骨架的结构成分、ATP 结合、核糖体的结构成分、GDP 结合、NAD 结合、钙转运 ATP 酶活性等。

对驴胎盘蛋白进行 KEGG 通路分析,寻找驴胎盘蛋白集中的生物学信号通路,以期了解驴胎盘蛋白主要参与的生物信号通路,为后续驴胎盘蛋白功效研究提供依据。驴胎盘蛋白参与的 KEGG 信号通路主要有抗生素生物合成、碳代谢、吞噬体、糖酵解/糖异生、黏着斑、代谢途径、胞吞作用、TCA

循环、内质网蛋白质加工、ECM 受体相互作用、肌动蛋白细胞骨架调控、白细胞穿越内皮迁移、氧化磷酸化等。驴胎盘蛋白信号通路的富集结果为进一步深入了解驴胎盘蛋白可能的生物学意义,阐明驴胎盘提取物发挥伤口愈合、延缓衰老、抗皱和改善肝损伤等药理活性的机制提供新的途径和线索。

驴胎盘参与 ECM 受体相互作用信号通路的相关基因为 ECM 中的 collagen、fibronectin、THBS2 等和细胞膜上的整合素、CD44、syndecan、CD36、CD47,从另一角度证实了胎盘水溶性提取物治疗伤口愈合与整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 介导炎症因子调控纤连蛋白促进细胞的迁移和吞噬有关^[32]。已有研究表明,黏着斑、ECM 受体相互作用、肌动蛋白细胞骨架调控等信号通路中的调控因子在骨骼肌生长发育过程中发挥着重要的作用^[33],为驴胎盘促进骨骼肌成肌细胞增殖的作用机制和机理提供了新的途径和线索^[34]。

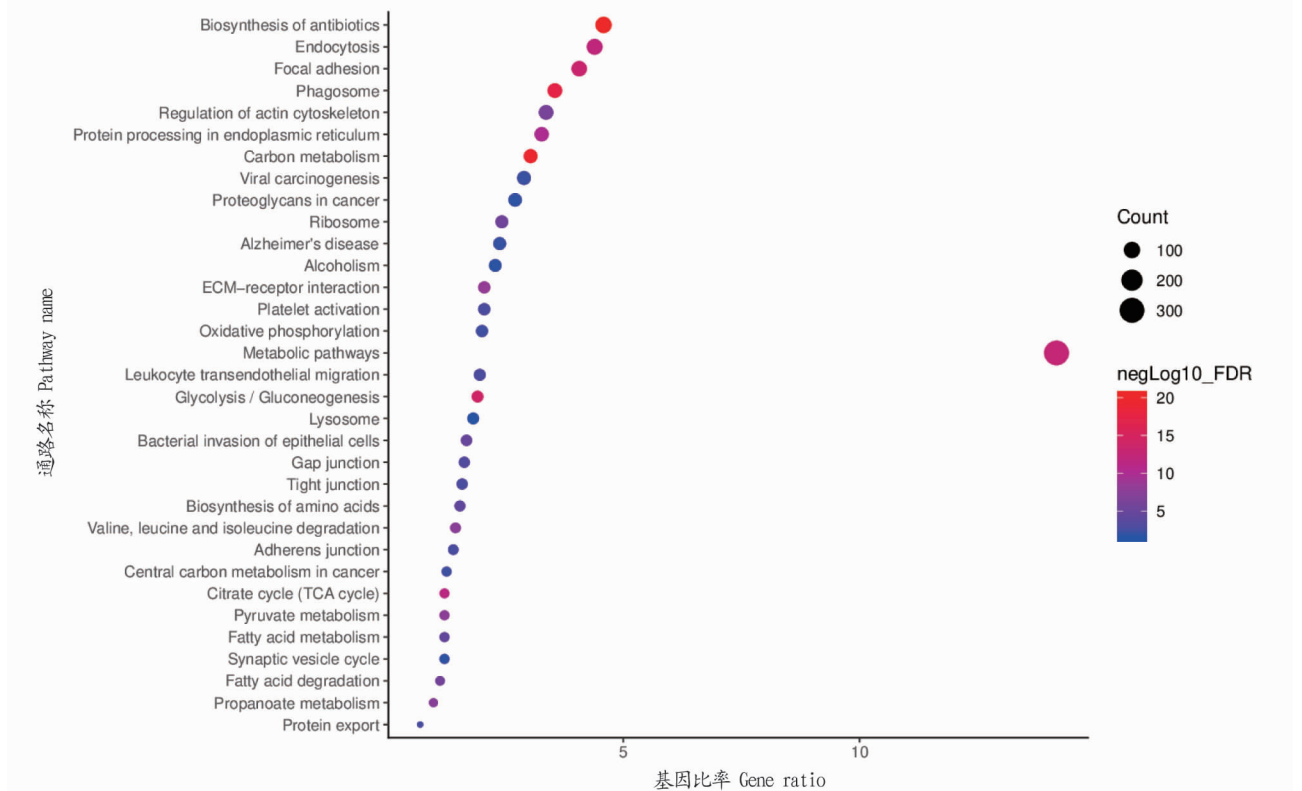


图6 识别出的驴胎盘蛋白的 KEGG 分类

Fig. 6 KEGG classification of identified donkey placental proteins

3 结论

该研究采用 SDS-PAGE 凝胶电泳、二维电泳、圆二色谱和 MALDI-TOF/TOF/MS 等手段揭示驴胎盘的性质与组成,结果表明,驴胎盘蛋白质的含量为 $15.62\% \pm 1.04\%$,等电点分布在酸性和碱性区域,分子量主要集中在 $7 \sim 19$ 和 $36 \sim 78$ kD 2 个区域;驴胎盘蛋白二级结构主要以 β -折叠和无规则卷曲为主。通过与马科蛋白图库进行对比,检索出 3 865 种可识别的蛋白。GO 分类和 KEGG 通路分析显示,驴胎盘蛋白主要富集在 GTP 结合、GTPase 活性、小 GTP 酶介导的信号转导、抗生素生物合成、糖酵解/糖异生、代谢途径、胞吞作用、TCA 循环、内质网蛋白质加工、ECM-受体相互作用等。

该研究为进一步探究与驴胎盘药理活性相关蛋白质组分、生物活性肽的开发提供数据支撑,明确驴胎盘蛋白成分发挥药理活性的机制提供了新的途径和线索。

参考文献

- [1] PARK S Y, PHARK S, LEE M, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a]pyrene-exposed rats[J]. *Placenta*, 2010, 31(10): 873-879.
- [2] LEE K K, CHOI W S, YUM K S, et al. Efficacy and safety of human placental extract solution on fatigue: A double-blind, randomized, placebo-controlled study[J]. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012, 2012: 1-6.
- [3] MULUYE R A, BIAN Y H, WANG L, et al. Placenta peptide can protect mitochondrial dysfunction through inhibiting ROS and TNF- α generation, by maintaining mitochondrial dynamic network and by increasing IL-6 level during chronic fatigue[J]. *Frontiers in pharmacology*, 2016, 7: 1-8.

- [4] YOSHIKAWA C, KOIKE K, TAKANO F, et al. Efficacy of porcine placental extract on wrinkle widths below the eye in climacteric women[J]. *Climacteric*, 2014, 17(4): 370-376.
- [5] SINGH N, BHATTACHARYA D. Biochemical and functional analysis of corticotropin releasing factor purified from an aqueous extract of human placenta used as wound healer[J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2017, 145: 298-306.
- [6] JASH A, KWON H K, SAHOO A, et al. Topical application of porcine placenta extract inhibits the progression of experimental contact hypersensitivity[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2011, 133(2): 654-662.
- [7] LEE K H, PARK H J, SEO H G, et al. Immune modulation effect of porcine placenta extracts in weaned the pig[J]. *Journal of animal science*, 2013, 91(5): 2405-2413.
- [8] YAMAUCHI A, KAMIYOSHI A, SAKURAI T, et al. Development of a mouse iron overload-induced liver injury model and evaluation of the beneficial effects of placenta extract on iron metabolism[J/OL]. *Heliyon*, 2019, 5(5) [2020-06-25]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01637>.
- [9] BAK D H, NA J, CHOI M J, et al. Anti-apoptotic effects of human placental hydrolysate against hepatocyte toxicity *in vivo* and *in vitro*[J]. *International journal of molecular medicine*, 2018, 42(5): 2569-2583.
- [10] JUNG J, LEE H J, LEE J M, et al. Placenta extract promote liver regeneration in CCl₄-injured liver rat model[J]. *International immunopharmacology*, 2011, 11(8): 976-984.
- [11] DE D, CHAKRABORTY P D, BHATTACHARYA D. Analysis of free and bound NADPH in aqueous extract of human placenta used as wound healer[J]. *Journal of chromatography B*, 2009, 877(24): 2435-2442.
- [12] TOGASHI S, TAKAHASHI N, IWAMA M, et al. Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract[J]. *Placenta*, 2002, 23(6): 497-502.
- [13] CHAKRABORTY P D, BHATTACHARYA D. Isolation of fibronectin type III like peptide from human placental extract used as wound healer[J]. *Journal of chromatography B*, 2005, 818(1): 67-73.
- [14] 李小梅. 猪胎盘冻干粉制备及功效考察[D]. 扬州: 扬州大学, 2016: 10-14, 34, 61, 71-78.
- [15] TOGASHI S I, TAKAHASHI N, KUBO Y, et al. Purification and identification of antioxidant substances in human-placenta extracts[J]. *Journal of health science*, 2000, 46(2): 117-125.
- [16] WANG L, SONG X B, CUI H T, et al. Antifatigue effects of peptide isolated from sheep placenta[J]. *Chinese herbal medicines*, 2018, 10(3): 279-284.
- [17] 房新平, 夏文水, 生庆海, 等. 多级色谱纯化牛胎盘免疫调节多肽及性质测定[J]. *北京化工大学学报(自然科学版)*, 2006, 33(6): 42-45.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 1-3.
- [19] 樊雨梅, 帖航, 解晓尧, 等. 驴乳蛋白的特性、结构与组成分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(12): 221-227.
- [20] 田兰, 马晓丽, 陈春雨, 等. 毛细管电泳法对乳及乳制品中乳源蛋白的研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(8): 108-111.
- [21] WAWRZYKOWSKI J, FRANCYZYK M, HOEDEMAKER M, et al. The comparison of protein map between retained and released bovine placenta[J]. *Research in veterinary science*, 2019, 125: 45-51.
- [22] 张岩春, 尤娟, 郑皓, 等. 驴乳的营养成分与功能特性[J]. *农产品加工(学刊)*, 2009(2): 71-72.
- [23] 唐文林. 猪胎盘综合利用工艺与应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 8, 19.
- [24] CENTLOW M, HANSSON S R, WELINDER C. Differential proteome analysis of the preeclamptic placenta using optimized protein extraction[J]. *Journal of biomedicine and biotechnology*, 2010, 2010: 1-9.
- [25] 高堯堯, 徐蓉蓉, 王冬东, 等. 猪胎盘蛋白的分离鉴定[J]. *中成药*, 2017, 39(8): 1651-1654.
- [26] 高赛. 鹿茸与鹿胎活性成分的提取及其抗衰老作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 27.
- [27] 王晓然. 马胎盘水溶性蛋白提取工艺及其保健功能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2013: 15.
- [28] 周国华. 家畜胎盘的制备及其生物活性的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006: 25.
- [29] NER-KLUZA J, WAWRZYKOWSKI J, FRANCYZYK M, et al. Identification of protein patterns in bovine placenta at early-mid pregnancy-Pilot studies[J]. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2019, 33(12): 1084-1090.
- [30] MIAO Z J, CHEN M, WU H, et al. Comparative proteomic profile of the human placenta in normal and fetal growth restriction subjects[J]. *Cellular physiology and biochemistry*, 2014, 34(5): 1701-1710.
- [31] LEE D G, NAM J, KIM S W, et al. Proteomic analysis of reproduction proteins involved in litter size from porcine placenta[J]. *Biochemistry & molecular biology*, 2015, 79(9): 1414-1421.
- [32] NATH S, BHATTACHARYA D. Cell adhesion by aqueous extract of human placenta used as wound healer[J]. *Indian journal of experimental biology*, 2007, 45(8): 732-738.
- [33] 马喜山. 猪骨骼肌发育相关基因的差异表达和多态性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011: 37.
- [34] 张宁, 边育红, 张嘉丽, 等. 羊胎盘对 L6 成肌细胞增殖能力和 ATP 浓度的影响[J]. *天津中医药大学学报*, 2018, 37(6): 488-493.

(上接第 150 页)

规要求在将任何潜在的新药供人类使用之前, 必须在动物中研究其安全性以定义安全的人类剂量^[8]。溶菌酶在医药、食品行业以及畜牧领域都有着比较广泛的应用^[9], 而转基因得到的重组人溶菌酶在投入应用之前, 则需要进行毒理学方面的试验, 为今后的应用提供试验支持。食品安全是指符合人体的营养需求, 且不会对人体健康造成急性、亚慢性和慢性危害^[10]。该研究通过大鼠和小鼠急性经口毒性试验, 结果表明, 重组人溶菌酶属于实际无毒蛋白; 重组人溶菌酶模拟胃肠液消化稳定性试验表明, 重组人溶菌酶在胃肠液中都可消化。

周兴华^[11]对转双反义分支酶基因大米的急性毒性试验研究表明, 转基因大米的 LD₅₀>21.50 g/kg, 试验期间, 动物状态良好, 无死亡和异常现象。因此, 转双反义分支酶基因大米属无毒级别。

根据《食品安全国家标准急性经口毒性试验》(GB 15193.3—2014)急性毒性(LD₅₀)分级标准, 大鼠和小鼠急性经口毒性试验表明, 重组人溶菌酶是一种实际无毒蛋白。模拟胃肠液消化稳定性试验结果表明, 重组人溶菌酶在模拟的胃液中可消化, 在模拟的肠液中极易消化, 初步说明重组人

溶菌酶无潜在的致敏性。

参考文献

- [1] 王佃亮. 重组人溶菌酶研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(9): 59-63.
- [2] ITO Y, YAMADA H, IMOTO T. Colorimetric assay for lysozyme using *Micrococcus luteus* labeled with a blue dye, Remazol brilliant blue R, as a substrate[J]. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 1992, 40(6): 1523-1526.
- [3] WANG C S, KLOER H U. Purification of human lysozyme from milk and pancreatic juice[J]. *Analytical biochemistry*, 1984, 139(1): 224-227.
- [4] TAKAI I, ODA O, SHINZATO T, et al. Effective method for purification of lysozyme from human urine[J]. *Journal of chromatography B: Biomedical applications*, 1996, 685(1): 21-25.
- [5] 李亭, 黄诗淇. 急性经口毒性试验方法研究进展[J]. *吉林化工学院学报*, 2019, 36(1): 11-14.
- [6] LAIBLE G, BROPHY B, KNIGHTON D, et al. Compositional analysis of dairy products derived from clones and cloned transgenic cattle[J]. *Theriogenology*, 2007, 67(1): 166-177.
- [7] 杨鹏华, 倪凤娥, 李宁. 利用转基因牛生产重组人乳铁蛋白研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(35): 15507-15509.
- [8] AL-AFIFI N A, ALABSI A M, BAKRI M M, et al. Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats[J]. *BMC complementary & alternative medicine*, 2018, 18: 1-14.
- [9] 宋娟. 溶菌酶的分离方法及进展[J]. *河南化工*, 2017, 34(7): 16-18.
- [10] 李州霞. 我国食品安全检测主要应用技术的现状及现状[J]. *食品界*, 2019(4): 24-25.
- [11] 周兴华. 两种转基因大米食用安全性的毒理学研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2012.