

深 圳 市 农 业 地 方 标 准

DB440300/T 32.3—2007

农业转基因生物食用安全性检验 第 3 部分：致敏性检验

Edible safety determination of agriculture genetically modified organisms—
PartIII: Testing for allergenicity

2007-11-12 发布

2008-02-12 实施

深圳市质量技术监督局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 项目与程序	1
5 受体生物致敏性的检验	1
6 外源基因对受体生物致敏性影响的检验	3
附录A（规范性附录） 消化酶和热加工耐受性试验	9
附录B（规范性附录） SDS-PAGE凝胶电泳	10
B.1 凝胶制备	10
B.2 样品处理及上样	10
B.3 电泳	10
B.4 染色和脱色	11
参考文献	12

前 言

DB 440300/T 32-2007 《农业转基因生物食用安全性检验》分成五个部分：

- 第1部分：样品制备；
- 第2部分：毒性检验；
- 第3部分：致敏性检验；
- 第4部分：抗营养作用检验；
- 第5部分：非期望效应检验。

本部分为DB 440300/T 32的第3部分。

附录A、B为规范性附录。

本部分由深圳市农林渔业局和深圳市卫生局提出。

本部分由深圳市农林渔业局和深圳市卫生局负责解释。

本部分主要起草单位：深圳市农作物良种引进中心、深圳市疾病预防控制中心。

本部分主要起草人：周向阳 邓平建 侯红利 杨冬燕 刘晋 杨永存 王学林 杨小柯 李永红 吴水清
周鹏 杜忠

农业转基因生物食用安全性检验

第3部分：致敏性检验

1 范围

本部分规定了农业转基因生物致敏性检验的项目、程序和方法。
本部分适用于农业转基因生物致敏性的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

SZJG 23 农业转基因生物食用安全性要求和评价

DB 440300/T 32.1 农业转基因生物食用安全性检验 第1部分：样品制备

DB 440300/T 32.2 农业转基因生物食用安全性检验 第2部分：毒性检验

3 术语和定义

SZJG 23确立的术语和定义适用于本部分。

4 项目与程序

4.1 检验项目

4.1.1 受体生物致敏性。

4.1.2 外源基因对受体生物致敏性的影响。

4.2 检验程序

检验程序见图1。

5 受体生物致敏性的检验

5.1 资料性审查

5.1.1 申报资料审查

对待检的转基因生物的受体生物食用史、食用致敏记录及安全控制措施的资料进行审查，分析受体生物的致敏性及可能存在的天然生物致敏成分名称及分布状态、受体生物食用方法和加工方式对其所含致敏成分安全控制措施的作用和效果。

5.1.2 信息检索

应用国际通用的生物信息学数据库，检索受体生物的食用致敏记录及可能存在的天然生物致敏成分名称、分布状态、分子量、氨基酸序列、分子特性及相关基因序列。

注：通用生物信息学数据库的定义同 DB 440300/T 32.2 中 5.1.2 的注解。

5.1.3 结果判定

5.1.3.1 受体生物在国内或国外有长期食用史，可判定受体生物为传统农业生物。

- 5.1.3.2 受体生物在国内外均无食用史，或者仅在国外少数国家有食用史，或者仅在国内少数地区有食用史的生物，可判定受体生物为非传统农业生物。
- 5.1.3.3 受体生物为花生、大豆、小麦、坚果、鱼、贝类、奶牛（主要致敏源是牛奶）、家禽（主要致敏源是禽蛋）或数据库登录的含有天然生物致敏成分的其他生物，可判定受体生物有天然生物致敏成分。
- 5.1.3.4 受体生物为 5.1.3.3 所列的致敏生物以外的其他传统农业生物，可判定受体生物无天然生物致敏成分。
- 5.1.3.5 对于非传统农业生物的受体生物，需要进行动物致敏性试验。

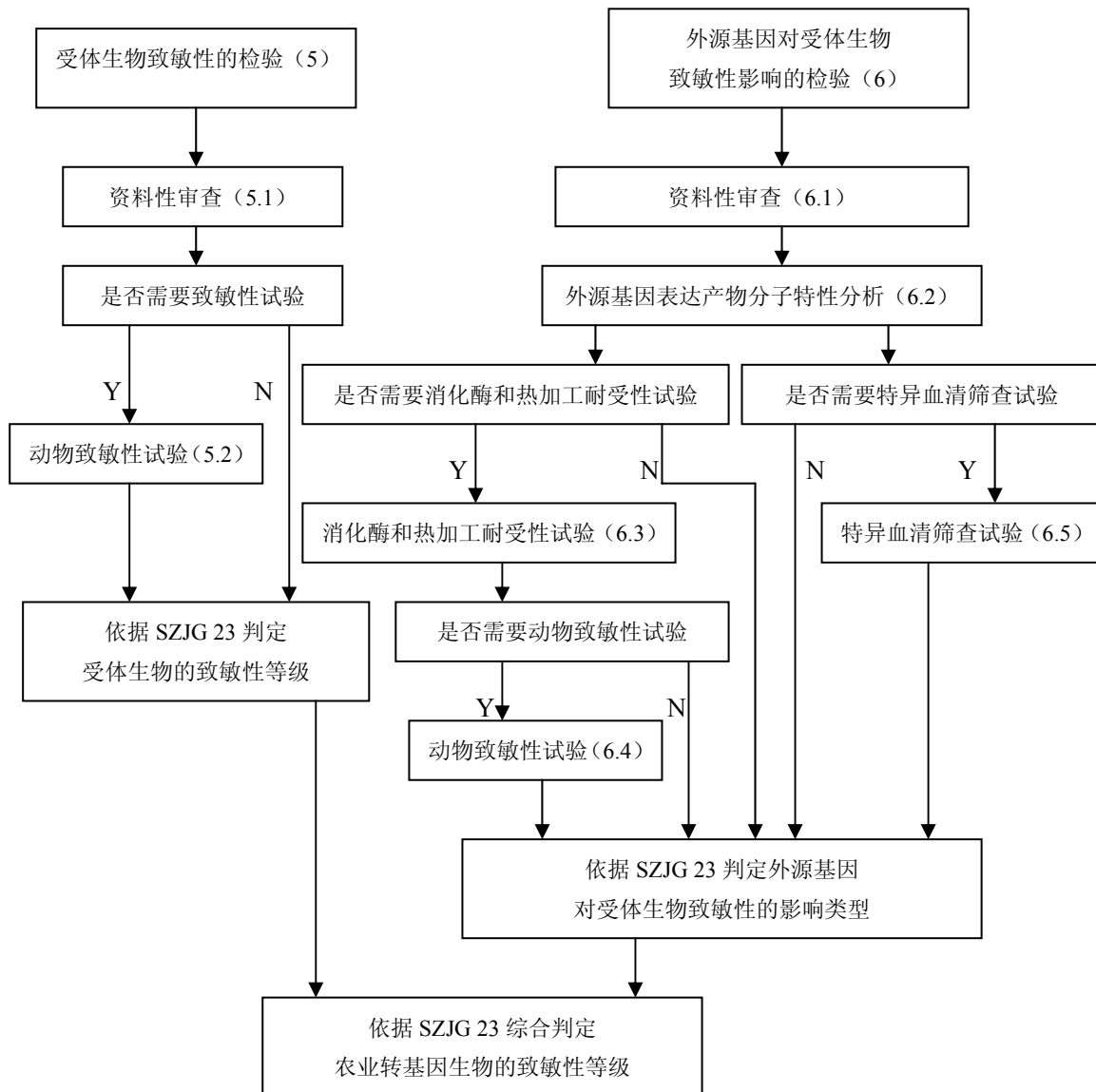


图 1 农业转基因生物致敏性检验程序

5.2 动物致敏性试验

5.2.1 原理

以 BN 大鼠为试验动物，采用腹腔注射的方法分别分次给予试验样品及对照样品，取血测定血浆组胺水平，并统计大鼠过敏反应级数和致敏率，判定试验样品致敏反应的强度。

5.2.2 试剂

组胺测定试剂盒、EDTA-2K 抗凝血剂、实验用水：按 GB/T 6682 规定执行。

5.2.3 材料

实验动物：6 周龄，雄性 BN 大鼠；试验样品：以受体生物的蛋白质提取物为试验样品，以卵清蛋白为阳性对照，以自来水为阴性对照。

5.2.4 仪器

电子天平（感量为 0.001 g）、恒温孵育装置、普通离心机、低温冷冻高速离心机、微型离心机、研钵及粉碎装置、低温冰箱、普通冰箱、旋涡震荡器、核酸蛋白分析仪和实验用水制备装置等。

5.2.5 样品蛋白质的提取制备

按 DB 440300/T 32.1 规定的方法制备样品蛋白质提取物。

5.2.6 受试物的配制

样品蛋白质提取物和卵清蛋白样品分别用水配成 1 mg/mL。

5.2.7 实验动物的分组

15 只 BN 大鼠随机分为 3 组，每组 5 只，分别为试验样品组、阳性对照组和阴性对照组。

5.2.8 实验动物给予受试物

按无菌操作，在试验第 1 天经腹腔注射，分别给予试验样品组、阳性对照组和阴性对照组以试验样品、阳性对照样品和阴性对照样品，每只 1 mL，第 7 天重复一次，观察 6 周。

5.2.9 测定组胺水平

取血：三组实验动物分别于第 0 天和第 42 天取血，加入 EDTA-2K 抗凝，离心分离血浆。

组胺测定：用组胺测定试剂盒，测定各血浆样品的组胺水平，具体方法参见试剂盒说明。

5.2.10 结果判定

5.2.10.1 试验样品组动物第 42 天与第 0 天血浆组胺水平无差异，阳性对照组与阴性对照组结果正常，可判定受体生物无致敏性。

5.2.10.2 试验样品组动物第 42 天比第 0 天血浆组胺水平显著升高，阳性对照组与阴性对照组结果正常，可判定受体生物有致敏性。

6 外源基因对受体生物致敏性影响的检验

6.1 资料性审查

6.1.1 申报资料审查

6.1.1.1 对待检的转基因生物的外源基因（包括目的基因、报告基因和标记基因）的序列、来源及改造等资料进行审查，分析外源基因的供体生物及食用史。

6.1.1.2 对待检的转基因生物的外源基因供体生物的食用致敏记录的资料进行审查，分析供体生物的致敏性及可能存在的天然生物致敏成分的名称及分布状态。

6.1.1.3 对待检的转基因生物的目的基因的设计功能等相关资料进行审查，分析目的基因导入受体生物基因组后，对受体生物中天然生物致敏成分预期产生的作用。

6.1.2 信息检索

6.1.2.1 检索外源基因供体生物在国内外食用时间、范围、方法等相关信息。

6.1.2.2 应用国际通用的生物信息学数据库（同 5.1.2），检索外源基因供体生物的致敏性及可能存在的天然生物致敏成分的名称、分布状态、分子量、氨基酸序列、分子特性及相关基因序列。

6.1.3 结果判定

6.1.3.1 外源基因的全序列来源于在国内或国外有长期食用史的生物，或者外源基因的全序列与国内外已批准应用于转基因生物的外源基因的序列相同，可判定外源基因的供体生物为传统农业生物；外源基因的全序列来源于在国内外均无食用史的生物，或者仅在国外少数国家有食用史，或者仅在国内少数地区有食用史的生物，可判定外源基因的供体生物为非传统农业生物。

6.1.3.2 外源基因的序列仅部分来源于传统农业生物，或者外源基因的序列来源于对生物原有基因的改造（包括 DNA 片段的拼接、碱基置换、碱基插入或碱基删除等），或者外源基因的全序列与国内外已批准应用于转基因生物的外源基因的序列不同，可判定外源基因的供体生物为非传统农业生物。

6.1.3.3 外源基因的全序列来源于花生、大豆、鱼、贝类、小麦、坚果、奶牛（主要致敏源是牛奶）、家禽（主要致敏源是禽蛋）或数据库登录的含有天然生物致敏成分的其他生物，可判定外源基因的供体生物有天然生物致敏成分；外源基因的全序列来源于本部分所列的致敏生物以外的其他生物，可判定供体生物无天然生物致敏成分。

6.1.3.4 目的基因的设计功能为消除或者降低受体生物中天然生物致敏成分，可判定目的基因的导入预期具有消除或者降低受体生物中天然生物致敏成分的作用；目的基因的设计功能与受体生物中天然生物致敏成分的存在种类或含量无关，可判定目的基因的导入不改变受体生物中天然生物致敏成分的种类或含量。

6.2 外源基因表达产物分子特性分析

6.2.1 序列同源性分析

6.2.1.1 搜索同源基因

根据外源基因核苷酸序列，应用 GenBank 的 Blast 功能搜索同源基因。

6.2.1.2 序列同源性分析

如有同源基因，获取同源基因的编号、名称及其表达产物的名称、分子量和氨基酸序列（不包含前导序列）；根据外源基因和同源基因表达产物的氨基酸顺序（不包含前导序列），按每 80 个氨基酸为一组，将表达产物分为若干个比较单位；应用 EMBL 中氨基酸序列同源性分析软件，对外源基因和同源基因的表达产物的氨基酸序列进行比对分析。

6.2.2 性状相似性分析

应用国际通用的生物信息学数据库（同 5.1.2），检索外源基因表达产物的分子大小、等电点、水溶性及糖基化等参数。

6.2.3 结果判定

6.2.3.1 未搜索到与外源基因的核苷酸序列有连续 18 个或者以上的核苷酸顺序相同的序列，可判定外源基因无同源基因；搜索到与外源基因的核苷酸序列有连续 18 个或者以上的核苷酸顺序相同的序列，可判定外源基因有同源基因。

6.2.3.2 外源基因与同源基因的表达产物每 80 个氨基酸中，有等于或者超过 35% 的氨基酸残基的顺序相同，或者有连续 6 个及以上的氨基酸顺序相同，可判定外源基因与同源基因的表达产物的氨基酸序列有同源性。

6.2.3.3 同源基因的表达产物为天然生物致敏成分，外源基因与同源基因的表达产物的氨基酸序列有同源性，可判定外源基因表达产物与天然生物致敏成分的氨基酸序列有同源性。

6.2.3.4 外源基因表达产物具有 10 kU~60 kU 的分子量、酸性等电点、水溶性、糖蛋白等一项或多项生物性状，可判定外源基因表达产物与天然生物致敏成分的分子性状有相似性。

6.2.3.5 对于供体生物为非传统农业生物，表达产物与天然生物致敏成分的氨基酸序列无同源性，但与天然生物致敏成分的分子性状有相似性的外源基因，需要进行消化酶和热加工耐受性试验。

6.2.3.6 对于供体生物为有天然生物致敏成分的传统农业生物，表达产物与天然生物致敏成分的氨基酸序列无同源性的外源基因，需要进行特异血清筛查试验。

6.3 消化酶和热加工耐受性试验

6.3.1 原理

外源基因表达产物分别经模拟配制的胃液、肠液的消化和热加工处理作用后，检验其分子结构的稳定性。对消化酶、热加工作用具有耐受性的表达产物，具有较高的致敏危险性。

6.3.2 常用试剂与仪器

常用试剂与仪器见附录A的表A.1。

6.3.3 材料

转基因生物新鲜样品、蛋白质分子量标准、1.5 mL~5 mL 离心管及滤芯吸头（10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L）。

6.3.4 样品制备

按 DB 440300/T 32.1 规定的方法制备蛋白质提取物；然后将蛋白质提取物分取 12 份，模拟胃液消化试验、模拟肠液消化试验和热加工处理试验各用 4 份，其中 2 份用作试验样品，2 份用作对照样品。以水代替样品进行提取为空白样品。

6.3.5 模拟胃液消化试验

6.3.5.1 蛋白质样品溶液的制备

用 ddH₂O 溶解样品蛋白质提取物，终浓度为 1.0 mg/mL。

6.3.5.2 试验样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入模拟胃液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min。然后加入试验样品的纯化蛋白质溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 消化 60 min。反应结束时，加入 0.168 mol/L Na₂CO₃ 25 μ L 终止反应。取 20 μ L 于干净 1.5 mL 离心管中，分别加 5 \times 凝胶上样缓冲液 5 μ L, 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min, 室温冷却, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μ L 上样。

6.3.5.3 对照样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入水 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min。然后加入对照样品的纯化蛋白质溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 消化 60 min。反应结束时，加入 0.168 mol/L Na₂CO₃ 25 μ L 终止反应。取 20 μ L 于干净 1.5 mL 离心管中，分别加 5 \times 凝胶上样缓冲液 5 μ L, 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min, 室温冷却, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μ L 上样。

6.3.5.4 空白样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入模拟胃液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min。然后加入空白提取物溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 消化 60 min。反应结束时，加入 0.168 mol/L Na₂CO₃ 25 μ L 终止反应。取 20 μ L 于干净 1.5 mL 离心管中，分别加 5 \times 凝胶上样缓冲液 5 μ L, 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min, 室温冷却, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μ L 上样。

6.3.5.5 SDS-PAGE 凝胶电泳

具体方法见附录 B。

6.3.5.6 结果判定

6.3.5.6.1 样品经模拟胃液消化处理后，其表达产物降解至不再出现相应的蛋白质条带，并且降解产物的分子量小于 3.5 kU，而对照样品仍出现相应的蛋白质条带，空白样品结果正常，可判定表达产物对胃蛋白酶无耐受性。

6.3.5.6.2 样品经模拟胃液消化处理后，其表达产物不发生降解，仍出现与对照样品相应的蛋白质条带，或者降解产物的分子量大于 3.5 kU，空白样品结果正常，可判定表达产物对胃蛋白酶有耐受性。

6.3.5.6.3 表达产物对胃蛋白酶有耐受性，需要进行动物致敏性试验。

6.3.6 模拟肠液消化试验

6.3.6.1 蛋白质样品溶液的制备

用 ddH₂O 溶解样品蛋白质提取物，终浓度为 1.0 mg/mL。

6.3.6.2 试验样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入模拟肠液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min。然后加入试验样品的纯化蛋白质溶液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 消化 60 min。反应结束时，加入 0.168 mol/L Na₂CO₃ 25 μ L 终止反应。取 20 μ L 于干净 1.5 mL 离心管中，分别加 5 \times 凝胶上样缓冲液 5 μ L, 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min, 室温冷却, 5000 r/min 离心 3 min, 取 15 μ L 上样。

6.3.6.3 对照样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入水 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min。然后加入对照样品的纯化蛋白质溶液

100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 60 min。反应结束时, 加入 0.168 mol/L Na_2CO_3 25 μL 终止反应。取 20 μL 于干净 1.5 mL 离心管中, 分别加 5 \times 凝胶上样缓冲液 5 μL , 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min, 室温冷却, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μL 上样。

6.3.6.4 空白样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入模拟胃液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。然后加入空白提取物溶液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 60 min。反应结束时, 加入 0.168 mol/L Na_2CO_3 25 μL 终止反应。取 20 μL 于干净 1.5 mL 离心管中, 分别加 5 \times 凝胶上样缓冲液 5 μL , 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min, 室温冷却, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μL 上样。

6.3.6.5 SDS-PAGE 凝胶电泳

按本部分 6.3.5.5 执行。

6.3.6.6 结果判定

6.3.6.6.1 样品经模拟肠液消化处理后, 其表达产物降解至不再出现相应的蛋白质条带, 并且降解产物的分子量小于 3.5 kU, 而对照样品仍出现相应的蛋白质条带, 空白样品结果正常, 可判定表达产物对肠蛋白酶无耐受性。

6.3.6.6.2 样品经模拟肠液消化处理后, 其表达产物不发生降解, 仍出现与对照样品相应的蛋白质条带, 或者降解产物的分子量大于 3.5 kU, 空白样品结果正常, 可判定表达产物对肠蛋白酶有耐受性。

6.3.6.6.3 表达产物对肠蛋白酶有耐受性, 需要进行动物致敏性试验。

6.3.7 热加工处理试验

6.3.7.1 蛋白质样品溶液的制备

用 ddH₂O 溶解样品蛋白质提取物, 终浓度为 1.0 mg/mL。

6.3.7.2 试验样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管加入试验样品的纯化蛋白质溶液 100 μL , 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 30 min, 室温冷却, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μL 上样。

6.3.7.3 对照样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入对照样品的纯化蛋白质溶液 100 μL , 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μL 上样。

6.3.7.4 空白样品的处理

在 1.5 mL 灭菌离心管中加入空白提取物溶液 100 μL , 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 60 min, 室温冷却, 5 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μL 上样。

6.3.7.5 SDS-PAGE 凝胶电泳

按本部分 6.3.5.5 执行。

6.3.7.6 结果判定

6.3.7.6.1 样品经热加工处理后, 其表达产物降解至不再出现相应的蛋白质条带, 并且降解产物的分子量小于 3.5 kU, 而对照样品仍出现相应的蛋白质条带, 空白样品结果正常, 可判定表达产物对热加工无耐受性。

6.3.7.6.2 样品经热加工处理后, 其表达产物不发生降解, 仍出现与对照样品相应的蛋白质条带, 或者降解产物的分子量大于 3.5 kU, 空白样品结果正常, 可判定表达产物对热加工有耐受性。

6.3.7.6.3 表达产物对热加工有耐受性, 需要进行动物致敏性试验。

6.4 动物致敏性试验

6.4.1 原理

同本部分 5.2.1。

6.4.2 试剂与仪器

试剂按本部分 5.2.2 执行。

仪器按本部分 5.2.4 执行。

6.4.3 材料

6.4.3.1 实验动物：6 周龄，雄性 BN 大鼠。

6.4.3.2 试验样品：以外源基因的表达产物为试验样品，以卵清蛋白（Sigma 公司）为阳性对照，以自来水为阴性对照。

6.4.4 表达产物的制备

按 DB 440300/T 32.1 规定的方法制备外源基因的表达产物，并鉴定制备产物与农业转基因生物中存在的同一表达产物具有相同的结构和活性。

6.4.5 受试物的配制

表达产物样品和卵清蛋白样品分别用水配成 1 mg/mL。

6.4.6 实验动物的分组

按本部分 5.2.7 执行。

6.4.7 实验动物给予受试物

按本部分 5.2.8 执行。

6.4.8 测定组胺水平

按本部分 5.2.9 执行。

6.4.9 结果判定

6.4.9.1 试验样品组动物第 42 天与第 0 天血浆组胺水平无差异，阳性对照组与阴性对照组结果正常，可判定外源基因的表达产物无致敏性。

6.4.9.2 试验样品组动物第 42 天比第 0 天血浆组胺水平显著升高，阳性对照组与阴性对照组结果正常，可判定外源基因的表达产物有致敏性。

6.5 特异血清筛查试验

6.5.1 原理

以对相应致敏供体生物有过敏史患者的血清为特异抗体，与试验样品的蛋白提取物进行免疫学反应，检测试验样品是否存在与致敏生物 IgE 抗体的交叉反应性，据此判定其致敏性。

6.5.2 试剂

按本标准 5.2.2 执行。

6.5.3 材料

转基因生物新鲜样品、相应供体生物新鲜样品及载玻片。

6.5.4 仪器

按本部分 5.2.4 执行。

6.5.5 特异血清的准备

6.5.5.1 特异血清分别采自对相应供体生物有过敏史的患者，在 4℃ 下保存。

6.5.5.2 以相应供体生物的蛋白提取物为抗原，按下述免疫学测定方法检测各特异血清反应的灵敏度。弃去反应灵敏度过低的血清。

6.5.5.3 使用前，用生理盐水对血清作适度的稀释，以使各血清的反应灵敏度较为接近。

6.5.5.4 试验中采用特异血清的数量与试验结果的置信水平相关。要求采用 8~24 份来自对相应供体生物有过敏史的不同患者的血清。

6.5.6 样品制备

6.5.6.1 样品蛋白质的提取制备

按 DB 440300/T 32.1 规定的方法制备样品蛋白质提取物。

6.5.6.2 纯化蛋白质样品溶液的制备

用 ddH₂O 溶解样品蛋白质提取物，终浓度为 1.0 mg/mL。

6.5.7 免疫学测定

6.5.7.1 按采用特异血清的份数，取相应数量的洁净载玻片，每一载玻片用蜡笔划分二等分。

6.5.7.2 各取特异血清 1 接种环置于玻片左端，各取生理盐水 1 接种环置于玻片右端（对照）。

6.5.7.3 用接种环取纯化蛋白质样品溶液少许，分别置于特异血清和生理盐水中，研磨乳化使均匀混浊。上下颠倒玻片数次，约 1 min~3 min 后观察结果。

6.5.7.4 结果判断

阳性：盐水对照侧呈现均匀混浊，特异血清侧明显凝集，表示试验样品与特异血清中 IgE 抗体有交叉免疫学反应。

阴性：盐水对照侧与特异血清侧均为混浊，不出现凝集，表示试验样品与特异血清中 IgE 抗体无交叉免疫学反应。

自凝：盐水对照侧与特异血清侧均出现凝集，表示实验结果异常。

6.5.8 结果判定

6.5.8.1 试验样品与特异血清中 IgE 抗体有交叉免疫学反应，可判定表达产物有与供体生物相关的致敏性。

6.5.8.2 当采用 8 份或 14 份特异血清进行测定时，试验样品与特异血清中 IgE 抗体无交叉免疫学反应，可判定表达产物无与供体生物的主要致敏原相关的致敏性（置信水平分别为 99%、99.9%）。

6.5.8.3 当采用 17 份或 24 份特异血清进行测定时，试验样品与特异血清中 IgE 抗体无交叉免疫学反应，可判定表达产物无与供体生物的次要致敏原相关的致敏性（置信水平分别为 95%、99%）。

附 录 A
(规范性附录)
消化酶和热加工耐受性试验

表 A.1 常用试剂及仪器

试剂名称	配置方法	仪器
模拟胃液	将 2.0 g NaCl, 3.2 g 胃蛋白酶, 7 mL 浓盐酸, ddH ₂ O 定容于 100 mL, pH 约为 1.2。胃蛋白酶活性 ≥ 2000 U/mg prot (中国药典测定方法)。	①小型垂直电泳装置、凝胶成像系统; ②电子天平(感量为 0.001g); ③恒温孵育装置、实验用水制备装置、100 °C 沸水浴; ④普通离心机, 低温冷冻高速离心机, 微型离心机; ⑤研钵及粉碎装置; ⑥低温冰箱, 普通冰箱; ⑦微量移液器(0.5 μL, 2 μL, 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL); ⑧超净工作台; ⑨摇床; ⑩核酸蛋白分析仪。
模拟肠液	6.8 g KH ₂ PO ₄ 溶于 250 mL ddH ₂ O, 振荡, 完全溶解后加 190 mL 0.2 mol/L NaOH 和 400 mL ddH ₂ O, 加胰蛋白酶 10.0 g, 混匀, 用 0.2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.5 ± 0.1, ddH ₂ O 定容于 100 mL。胰蛋白酶活性 ≥ 10000 U/mg prot (中国药典测定方法)。	
SDS-PAGE 凝胶电泳试剂	①30% 丙烯酰胺贮存液 [29% 丙烯酰胺, 1% N,N'-甲叉双丙烯酰胺, 用去离子水配制, 避光贮存于棕色瓶中, 4 °C 保存]; ②1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) 和 1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 缓冲液 [4 °C 保存]; ③10% SDS [用去离子水配制, 室温保存]; ④TEMED [原液使用, 4 °C 避光保存]; ⑤10% 过硫酸铵 [用去离子水配制, 4 °C 保存, 一周内使用]; ⑥电泳缓冲液 [25 mmol/L Tris 碱, 192 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS (pH 8.3), 用去离子水或蒸馏水配制, 室温保存]; ⑦样品缓冲液 [60 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 1.44 mmol/L β-巯基乙醇, 25% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, 用去离子水配制, 避光贮存于棕色瓶中, 4 °C 保存]; ⑧2.5% 硝酸银; ⑨考马斯亮蓝 G-250。	

注: 实验用水按 GB/T 6682 的规定执行。

附 录 B
(规范性附录)
SDS-PAGE 凝胶电泳

B.1 凝胶制备

根据所需凝胶浓度，按表 B.1 的比例配制分离胶溶液。

表 B.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶各成分用量 (mL)

成 分	分离胶浓度			
	6%	10%	15%	20%
H ₂ O	10.6	7.9	4.6	1.2
30%丙烯酰胺	4.0	6.7	10.0	13.4
1.5 mol/L Tris-HCl (pH8.8)	5.0	5.0	5.0	5.0
10%SDS	0.2	0.2	0.2	0.2
10%过硫酸铵	0.2	0.2	0.2	0.2
TEMED	0.016	0.008	0.008	0.008
合计	20	20	20	20

将玻璃板洗净，固定于电泳槽上，装配好电泳槽，将分离胶溶液平稳地注入两层玻璃板中，再在液面上覆盖一层去离子水或水饱和的异丁醇，以隔绝空气，静置直至凝胶形成。

待分离胶完全聚合，倒掉覆盖液体，用滤纸尽量吸干凝胶上端残存液体。如是异丁醇，需用少量去离子水洗净胶表面。

按表 B.2 的比例，配制浓缩胶溶液，以连续平稳的流速在分离胶上面注入浓缩胶溶液至玻板顶端，然后小心插入梳子，避免混入气泡，垂直放置于室温。

表 B.2 5% 浓缩胶各组分用量 (mL)

成 分	5	8	10	15
H ₂ O	3.4	5.5	6.8	10.2
30%丙烯酰胺	0.83	1.3	1.7	2.53
1.0 mol/L Tris-HCl (pH6.8)	0.63	1.0	1.25	1.88
10%SDS	0.05	0.08	0.1	0.15
10%过硫酸铵	0.05	0.08	0.1	0.15
TEMED	0.005	0.008	0.01	0.015

浓缩胶聚合约 30 min 后，取下梳子，将凝胶放入电泳槽中，上、下槽均加入 1×电泳缓冲液，上样前用电泳缓冲液冲洗梳孔，以除去未聚合的丙烯酰胺。

B.2 样品处理及上样

将试验样品、对照样品和空白样品分别与样品缓冲液以 1:1 的比例混合。离心 1 min，如果有大量蛋白质碎片则延长离心时间。用微量注射器按顺序上样，同时加蛋白质分子质量标准。

B.3 电泳

上槽接电源的负极，下槽接电源的正极，打开电源开关，调节电流 (20 mA~40 mA) 或电压 (开始时电压为 8 V/cm 凝胶，进入分离胶后，将电压调至 15 V/cm 凝胶)，以恒流或恒压方式电泳，直至溴酚蓝迁移到距凝胶下端约 1 cm 左右，关闭电源，停止电泳。

轻轻撬开两层玻璃，取出凝胶，切去浓缩胶，并切角以作记号。

B.4 染色和脱色

B.4.1 考马斯亮蓝染色

固定：50%乙醇，10%冰醋酸，至少固定 30 min。

染色：0.29 g 考马斯亮蓝 R-250 溶于 250 mL 下述脱色液中，染色 30 min。

脱色：25%乙醇（95%），8%冰醋酸，在摇床上缓慢振荡脱色，其间更换脱色液 3~4 次，直至背景脱净为止。

分析：将脱色后的凝胶置于凝胶成像系统进行分析。

B.4.2 银染色

固定：25%乙醇，10%冰醋酸，至少固定 30 min。

敏化：75 mL 乙醇，1.25 mL 25%戊二醛（用前加入），10 mL 5%硫代硫酸钠，17 g 醋酸钠，用去离子水溶解后稀释至 250 mL。浸泡 30 min。

漂洗：用去离子水洗涤 3 次，每次 5 min。

银染：25 mL 2.5%硝酸银，100 μ L 37%甲醛（用前加入），用去离子水稀释至 250 mL。染色 20 min。

漂洗：用去离子水洗涤 2 次，每次 1 min。

显色：6.25 g 碳酸钠，50 μ L 37%甲醛（用前加入），用去离子水溶解后稀释至 250 mL。显色 2 min~10 min。

终止：3.65 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，用去离子水溶解后稀释至 250 mL。终止 10 min。

漂洗：用去离子水洗涤 3 次，每次 5 min。

分析：将凝胶置于凝胶成像系统进行分析。

保存：25 mL 87%甘油用去离子水稀释至 250 mL，凝胶在其中浸泡 30 min 后，用干胶机干燥或简单地夹在两张事先浸湿的玻璃纸间，用固定夹封住，制成干胶片。

参考文献

- [1] FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, 22~25 January 2001. Rome: FAO/WHO, 2001
- [2] 吴永宁主编. 现代食品安全科学. 北京: 化学工业出版社. 2003: 545~548
- [3] 贾旭东, 李宁, 王伟等, 蛋白过敏性研究—BN 大鼠动物模型, 卫生研究, 2004, 33 (1): 63~65
- [4] 李英华, 董杰, 李建虹等, 外源蛋白在模拟胃肠环境中稳定性测定模型初探, 卫生研究, 2004, 33 (4): 433~436
- [5] 张卓然主编. 医学微生物实验学. 北京: 科学出版社. 1998: 16~17
- [6] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术 (第二版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 382-387
-