

转基因羊奶表达重组人溶菌酶的急性毒性及过敏性研究

吕超¹, 包琪¹, 邹世颖^{1,2}, 陈思媛¹, 贺晓云^{1,2*}, 黄昆仑^{1,2*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 农业部转基因生物食用安全监督检验测试中心(北京), 北京 100083)

摘要: **目的** 研究该转基因羊奶表达的重组人溶菌酶的急性毒性和过敏性, 确保食品安全。**方法** 通过小鼠经口急性毒性、体外模拟胃肠道消化和体外热稳定性试验进行研究。**结果** 小鼠经口急性毒性试验结果显示, 重组人溶菌酶对小鼠最大耐受剂量 > 5000 mg/kg.BW, 属实际无毒。体外模拟胃肠道消化试验结果显示, 重组人溶菌酶在模拟胃液中 2~30 min 内全部消化; 在模拟肠液中 15 s~2 min 内全部消化; 体外热稳定性试验结果显示, 重组人溶菌酶在 100℃ 加热 60 min 不会降解。**结论** 该重组人溶菌酶的毒性与过敏性风险较低, 可以安全应用于食品行业。

关键词: 人溶菌酶; 急性毒性; 致敏性; 模拟消化

Study on toxicity and allergy of lysozyme expressed in milk from transgenic goats

LV Chao¹, BAO Qi¹, ZOU Shi-Ying^{1,2}, CHEN Si-Yuan¹, HE Xiao-Yun^{1,2*}, HUANG Kun-Lun^{1,2*}

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Supervision & Testing Center for GMOs Food Safety, Ministry of Agriculture(Beijing), Beijing 100083, China)

ABSTRACT: Objective To ensure the food safety, this study was focused on the acute toxicity test and allergenicity assessment of lysozyme expressed in milk from transgenic goats and allergenicity assessment *in vitro*. **Methods** Oral acute toxicity test, thermal stability experiment and simulated gastrointestinal digestion experiment were put out to estimate the food safety of lysozyme. **Results** The oral acute toxicity test indicated the lysozyme protein caused no adverse effects in mice by intragastric infusion at a high dose of 5 g/kg.BW. The results of simulated gastrointestinal digestion experiment indicate that lysozyme was digested within 2~30 min in stimulated gastric fluid, and within 15 s~2 min in stimulated intestinal fluid. The thermal stability experiment showed that the lysozyme had stability after heating 60 min at 100℃. **Conclusion** The food safety evaluation of the lysozyme showed that it had little risk on allergenicity and toxicity, and it could be used in food industry safely.

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08011-005)

Fund: Supported by Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects of P.R. China grant (2014ZX08011-005).

*通讯作者: 贺晓云, 副教授, 主要研究方向为转基因生物安全。E-mail: raininghe@163.com;

黄昆仑, 教授, 主要研究方向为转基因生物安全。E-mail: hkl009@163.com.

*Corresponding author: HE Xiao-Yun, Associate Professor, Laboratory of Food Safety and Molecular Biology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing; The Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Organisms, Ministry of Agriculture, Beijing, No. 17 Tsinghua Donglu, Beijing 100083, China. E-mail: raininghe@163.com.

HUANG Kun-Lun, Professor, Laboratory of Food Safety and Molecular Biology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing; The Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Organisms, Ministry of Agriculture, Beijing, No. 17 Tsinghua Donglu, Beijing 100083, China. E-mail: hkl009@163.com.

KEY WORDS: human lysozyme; acute toxicity; allergenicity; simulated digestion

1 引言

溶菌酶(lysozyme, LYZ), 又称肽聚糖 N - 乙酰基胞壁酰水解酶或胞壁质酶, 由 Fleming 在 1922 年发现。溶菌酶是一种正电荷分子, 天然存在于禽蛋清和哺乳动物的分泌液, 如眼泪, 唾液和乳汁中^[1]。

人溶菌酶(hLYZ), 作为人内源性蛋白, 与人体有天然的相容性, 对人体不会产生不良反应, 且具有活性较高的优点。hLYZ 具有广谱的抗菌作用, 在食品方面有广泛应用^[2, 3], 如肉和干酪的防腐剂和婴儿食品添加剂等^[4-6]。然而, 由于来源的稀少, 从天然材料中提取 hLYZ 时, 工业化的生产难以进行, 而且提取材料来自不同人群或个体, 污染源众多, 安全性得不到保障, 更难以保证产品质量的稳定性。

通过转基因动物的乳汁分泌生产高价值的外源蛋白, 生产的蛋白具有修饰加工充分、生物活性完全、成本低、产量高、易扩大等优点。故利用乳腺生物反应器生产重组人溶菌酶具有更加广泛的应用前景。

为了验证转基因羊奶生产的重组人溶菌酶能够在食品中安全应用, 本研究从急性毒性和致敏性两个方面对转基因羊奶表达的人溶菌酶进行食用安全性评价。

2 材料和方法

2.1 仪器

分析天平: 上海越平科学仪器有限公司, FA1004; 恒温水浴锅: 德国 Huber 公司, 64479; 蛋白电泳装置: 美国伯乐公司, Mini-Protein Tetra Cell 165-8004; 凝胶成像仪: 美国 Upland 公司, GelDOC-It Imaging System。

2.2 主要试剂

2.2.1 模拟胃消化液

称取 0.2 g NaCl 和 0.32 g 胃蛋白酶(活性为 3300 U/mg, 购自 Sigma 公司), 加入 70 mL 重蒸馏水, 加入 730 μ L HCl, 再用 HCl 调 pH 至 1.2, 加水定容至 100 mL, 现用现配。

2.2.2 模拟肠消化液

称取 0.7 g KH_2PO_4 溶于 25 mL 重蒸馏水中, 振荡

使之完全溶解, 加入 19 mL 0.2 mol/L NaOH 溶液和 40 mL 重蒸馏水, 加入 1.0 g 胰酶(购自 Sigma 公司), 用 0.2 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.5, 加重蒸馏水定容至 100 mL。

2.2.3 酪蛋白溶液

分别称取 5 mg 和 2 mg 酪蛋白(购自 Sigma 公司), 定溶于 1 mL 重蒸馏水中, 混匀, 分别用于模拟胃液消化和模拟肠液消化实验。

2.2.4 大豆胰蛋白酶抑制剂溶液

分别称取 5 mg 和 2 mg 大豆胰蛋白酶抑制剂(购自 Sigma 公司), 定溶于 1 mL 重蒸馏水中, 混匀, 分别用于模拟胃液消化和模拟肠液消化实验。

2.3 材料

2.3.1 重组人溶菌酶(rhLYZ)

由上海杰隆生物工程股份有限公司提供的溶菌酶粉末, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。临用前采用生理盐水配制成 250 mg/mL 用于急性毒性试验; 采用超纯水配制成 5 mg/mL, 2 mg/mL 蛋白溶液用于模拟胃液消化试验和模拟肠液消化试验使用。

2.3.2 清洁级 CD-1 小鼠

36 只, 雌雄各半。雄性体重 20~22 g, 雌性体重 18~20 g。购自北京维通利华试验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK(京)2012-0001。

2.3.3 清洁级大小鼠维持饲料

符合 GB 14924-2010 中所列出的试验动物营养标准。购自北京科澳协力饲料有限公司, 合格证号 SCXK(京)2009-0012。

2.4 实验方法

2.4.1 急性毒性实验^[7]

本实验在农业部转基因生物食用安全监督检验检测中心(北京)SPF 级动物房中进行, 合格证号: SYXK(京)2010-0036。环境温度 20~24 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~70%, 12 h 人工照明/黑暗循环, 换气次数 15 次/h。

将动物按体重随机分成 3 组(CK, BSA, rhLYZ), 每组 12 只动物(雌雄各半), 同组同种性别动物每笼 6 只, 适应性喂养 3 天后开始正式试验。灌胃前过夜禁食 16 h, 自由饮水。根据体重以 0.2 mL/10g 灌胃量经口染毒, 灌胃完成 3 h 后给予饲料。

CK 组为空白对照组, 灌胃生理盐水; BSA 组为

蛋白对照组,灌胃 250 mg/mL 的牛血清白蛋白;rhLYZ 组为试验组,灌胃 250 mg/mL 的溶菌酶。给受试物后立即观察动物中毒与死亡情况,继续观察 14 天,记录动物毒性反应情况和死亡动物分布。记录初始体重、第 7 天体重、第 15 天体重。试验第 15 天,脱臼安乐处死动物并解剖观察记录大体病理学变化。采用 EXCEL 软件的 T-test 检验方法对数据进行统计分析,以 $P < 0.05$ 判定为显著性差异。数据以平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。

2.4.2 模拟消化实验^[7]

2.4.2.1 模拟胃液消化

(1)反应时间为 0 s 的模拟胃液消化试验

在 1.5 mL 离心管中加入 190 μ L 模拟胃消化液(SGF),37℃恒温水浴 5 min。加入 10 μ L 样品蛋白溶液或对照蛋白溶液(5 mg/mL),同时加入 70 μ L 0.2 mol/L NaHCO_3 溶液,漩涡振荡后,冰浴,加入 70 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

(2)反应时间为 15 s、2 min、30 min、60 min 的模拟胃液消化试验

在 10 mL 离心管中加入 1.9 mL 模拟胃消化液,37℃恒温水浴 5 min。加入 100 μ L 样品蛋白溶液或对照蛋白溶液(5 mg/mL),迅速漩涡振荡并快速置于 37℃水浴,准确记录时间,在每个反应时间点,迅速吸取反应液 200 μ L,加入 1.5 mL 离心管中(含有 70 μ L 0.2 mol/L NaHCO_3 溶液),冰浴,加入 70 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

(3)胃蛋白酶对照

在 1.5 mL 离心管中加入 190 μ L 模拟胃消化液,再加入 10 μ L 重蒸馏水和 70 μ L 0.2 mol/L NaHCO_3 溶液,漩涡振荡后,加入 70 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

(4)试样蛋白对照

在 1.5 mL 离心管中加入 190 μ L 不含胃蛋白酶的模拟胃缓冲液,再加入 10 μ L 样品蛋白或对照蛋白(5 mg/mL),同时加入 70 μ L 0.2 mol/L NaHCO_3 溶液,漩涡振荡后,加入 70 μ L 蛋白样品上样缓冲液,沸水浴 5 min,取出后冷却至室温备用。

2.4.2.2 模拟肠液消化

步骤同 2.4.2.1,稍有变动:(1)不加终止液;(2)上样缓冲液体积改为 50 μ L;(3)对照蛋白与样品蛋白浓

度为 2 mg/mL。

2.4.2.3 电泳检测

对照蛋白经 5%的浓缩胶和 12.5%的分离胶电泳。溶菌酶经 Tricine 小分子电泳,具体配方详见分子克隆第三版,恒压 120 V 进行电泳。将电泳后的凝胶浸泡于考马斯亮蓝染色液中 30 min 后进行脱色,凝胶成像仪拍照。

2.4.3 热稳定性实验^[8]

2.4.3.1 分别吸取 6 份均匀的样品溶液,每份 100 μ L,置于 1.5 mL 离心管中,盖紧管盖。

2.4.3.2 其中 1 份样品直接置于冰上,作为加热 0 min 样品。

2.4.3.3 另外 5 份样品同时放入 90℃水浴中,开始计时。在加热 5、10、15、30、60 min 时,各取出一份样品,迅速置于冰水混合物中冷却。

2.4.3.4 分别向 0 min 样品和加热不同时间点样品加入 2 $\times$ 样品缓冲液 100 μ L,于沸水中加热 5 min。

2.4.3.5 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,判断待测样品的热稳定性。

2.4.3.6 取出凝胶,置于凝胶成像仪上,使用凝胶图像分析系统照相。

3 结果与分析

3.1 毒性实验

3.1.1 急性毒性实验

对照组和试验组动物灌胃后均表现正常。CD-1 小鼠大剂量一次性灌胃溶菌酶 14 天后,未发现明显的中毒和死亡情况。

记录实验开始后第 7、15 天体重,从表 1 可见雄性溶菌酶组体重增量相比于 BSA 组和 CK 对照组都显著增加($P < 0.05$),雌性组溶菌酶组体重增量显著高于 BSA 组,但与 CK 组无差异。该溶菌酶对雄性动物体重影响明显,但未发现不良生理变化,具体作用还需进一步研究。

试验第 15 天,脱臼处死并解剖观察,小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸腺、卵巢/睾丸、胃肠道外观正常,无可见病变。

3.2 模拟消化实验

3.2.1 重组人溶菌酶在模拟胃液的消化情况

在模拟胃液消化试验中,不稳定对照酪蛋白在 2 min 内完全被消化(图 1-A),而稳定对照大豆胰蛋白

表 1 体重记录(g)
Table 1 Body weight of mice(g)

性别	组别	初始体重	第一周体重	第二周体重	体重增量
雄性	CK	20.8±1.1	28.4±3.0	28.9±3.2	8.16±2.6
	BSA	20.1±0.8	29.1±2.2	29.8±2.3	9.68±1.6
	rhLYZ	20.7±1.1	30.8±2.1	32.4±1.2 ^{ab}	11.7±0.3 ^{ab}
雌性	CK	18.1±0.5	21.8±0.7	23.7±1.7	5.6±1.7
	BSA	19.7±0.4	22.3±0.6	22.6±0.7	2.84±0.8
	rhLYZ	18.0±0.7	21.9±0.8	22.8±0.9	4.78±0.7 ^b

a: 试验组与 CK 空白对照组有显著性差异($P < 0.05$).
b: 试验组与 BSA 对照组有显著性差异($P < 0.05$).
rhLYZ: 重组人溶菌酶; BSA: 牛血清白蛋白
a: significant differences between CK and treatment group ($P < 0.05$).
b: significant differences between BSA group and treatment group ($P < 0.05$).
rhLYZ: recombination human lysozyme; BSA: Bovine serum albumin

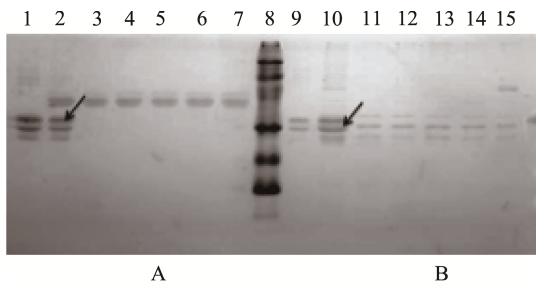


图 1 酪蛋白(Casein)模拟胃肠液消化试验结果
Fig. 1 Result of simulated gastrointestinal digestion of Casein

A: 酪蛋白模拟胃液消化: 1-7 为: 蛋白对照, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, 胃蛋白酶对照;
B: 酪蛋白模拟肠液消化: 9-15 为: 蛋白对照, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, 胰酶对照;
8: 低分子量标准蛋白, 从上到下依次是: 97.4 kD、66.2 kD、43 kD、31 kD、20 kD、14.4 kD。
A: stimulated gastric fluid digestion of Casein: from 1-7 are: Casein in control, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, pepsin in control;
B: stimulated intestinal fluid digestion of Casein: from 9-15 are: Casein in control, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, pancreatin in control;
8: low molecular weight protein marker, from top to bottom are: 97.4 kD、66.2 kD、43 kD、31 kD、20 kD、14.4 kD

酶抑制剂在 60 min 内不被消化(图 2-A), 证明模拟胃液消化试验体系工作正常。重组人溶菌酶在模拟胃液中于 2~30 min 内全部消化(图 3-A), 因此该蛋白在模拟胃液中可消化。

3.2.2 重组人溶菌酶在模拟肠液的消化情况

在模拟肠液消化试验中, 不稳定对照酪蛋白在 2 min 内完全被消化(图 1-B), 而稳定对照大豆胰蛋白

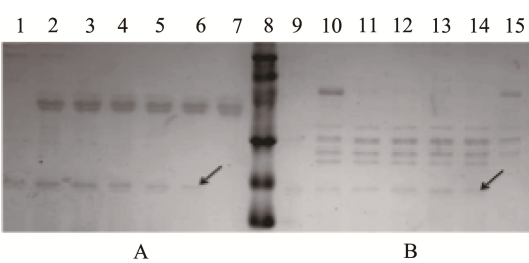


图 2 大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)模拟胃肠液消化试验结果
Fig. 2 Result of simulated gastrointestinal digestion of soybean trypsin inhibitor

A: STI 模拟胃液消化: 1-7 为: 蛋白对照, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, 胃蛋白酶对照
B: STI 模拟肠液消化: 9-15 为: 蛋白对照, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, 胰酶对照
8: 低分子量标准蛋白, 从上到下依次是: 97.4 kD、66.2 kD、43 kD、31 kD、20 kD、14.4 kD
A: stimulated gastric fluid digestion of soybean trypsin inhibitor: from 1-7 are: soybean trypsin inhibitor in control, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, pepsin in control
B: stimulated intestinal fluid digestion of soybean trypsin inhibitor: from 9-15 are: Casein in control, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, pancreatin in control
8: low molecular weight protein marker, from top to bottom are: 97.4 kD、66.2 kD、43 kD、31 kD、20 kD、14.4 kD

酶抑制剂在 60 min 内不被消化(图 2-B), 证明模拟肠液消化试验体系工作正常。重组人溶菌酶在模拟肠液中 15 s~2 min 内全部消化(图 3-B), 因此该蛋白在模拟肠液中易消化。

3.3 热稳定性实验

如图 4 所示, 将溶菌酶加热至 100 ℃持续 60 min, 蛋白条带没有明显减弱, 因此该蛋白对热很稳定。

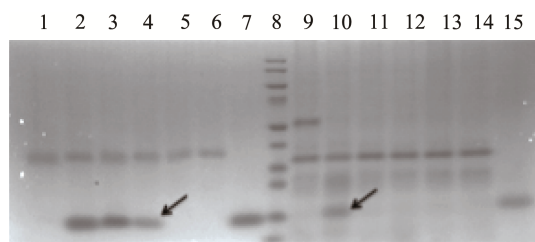


图 3 重组人溶菌酶模拟胃肠液消化试验结果

Fig. 3 Result of simulated gastrointestinal digestion of rhLYZ

A: 溶菌酶模拟胃液消化: 1-7 为: 胃蛋白酶对照, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, 蛋白对照

B: 溶菌酶模拟肠液消化: 9-15 为: 胰酶对照, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, 蛋白对照

8: 蛋白 marker 从上到下依次为: 170 kD, 130 kD, 100 kD, 70 kD, 55 kD, 40 kD, 35 kD, 25 kD, 15 kD, 10 kD

A: stimulated gastric fluid digestion of rhLYZ: from 1-7 are: pepsin in control, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, rhLYZ in control

B: stimulated intestinal fluid digestion of soybean trypsin inhibitor: from 9-15 are: pancreatin control, 0 s, 15 s, 2 min, 30 min, 60 min, rhLYZ in control

8: protein marker, from top to bottom are: 170 kD, 130 kD, 100 kD, 70 kD, 55 kD, 40 kD, 35 kD, 25 kD, 15 kD, 10 kD

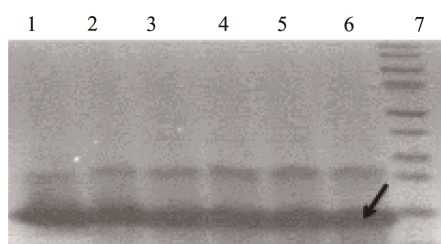


图 4 热稳定性实验电泳图

Fig. 4 Result of thermal stability experiment

1-6: 溶菌酶 100 °C 水浴分别加热: 0 s, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min

7: 蛋白 marker 从上到下依次为: 170 kD, 130 kD, 100 kD, 70 kD, 55 kD, 40 kD, 35 kD, 25 kD, 15 kD, 10 kD

1-6: rhLYZ was heated at 100 °C for 0 s, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min

7: protein marker, from top to bottom are: 170 kD, 130 kD, 100 kD, 70 kD, 55 kD, 40 kD, 35 kD, 25 kD, 15 kD, 10 kD

4 讨 论

利用转基因技术培育转基因动物已有 30 多年的历史, 利用转基因动物的乳腺生物反应器生产外源蛋白也有一定的发展前景。世界上第一个上市的转基因动物产品就是利用转基因山羊乳腺分泌的羊奶进行提取纯化, 用于治疗遗传性抗凝血酶缺乏症的 Atryn。任何转基因动物及其产品进入食物链之前都

必须经过严格的生物安全评价, 其中食用安全评价是其中重要的组成部分。

小鼠经口急性毒性是指小鼠一次(或 24 小时内多次)接触外来化合物之后所引起的中毒效应, 甚至引起死亡。通过经口急性毒性可以求出受试物对实验动物的致死剂量(通常以 LD_{50} 为主要参数), 可以用来初步估计该物质对人类毒害的危险性; 可以阐明受试物急性毒性的剂量 - 反应关系与中毒特征; 可以研究该物质在机体内的生物转运和生物转化过程及其动力学变化。它是转基因产品毒理学评价的基础研究。

转基因食品引起食物过敏的可能性也是人们关注的焦点之一, 特别是如果转入的蛋白质是新蛋白质时, 这些蛋白质极有可能是潜在食物过敏原。大多数过敏原都能抵抗胃酸和消化酶, 而普通的植物蛋白质和引入的蛋白质是很容易被消化的。食物中不稳定的过敏原, 在食用前煮熟或进行其他加工, 引起过敏的可能性就较小。通过模拟胃肠液消化试验和热稳定性试验可以初步测定该外源蛋白的过敏性。

本研究对转基因羊奶中表达的溶菌酶进行了急性毒性和致敏性实验, 旨在对其食用安全性进行探究。随着乳用动物基因工程技术的不断进步, 对其转基因产品进行的安全评价成为了重要的一环。

本研究中, 重组人溶菌酶对小鼠急性经口半数致死量 $LD_{50} > 5 \text{ g/kg.bw}$, 属于实际无毒; 在模拟胃肠液消化试验中, 该重组人溶菌酶在模拟胃液中 2~30 min 内被消化, 属于可消化蛋白, 在模拟肠液中 15 s~2 min 内被消化, 属于易消化蛋白; 在热稳定性试验中, 该重组人溶菌酶对热稳定, 100 °C 60 min 未发生裂解, 该蛋白对热稳定。对重组人溶菌酶进行的热稳定性实验和模拟消化实验, 可以一定程度上证明其不存在潜在致敏性。有研究表明, 在对溶菌酶做转基因和正常变异性的关系的评估时发现, 其蛋白图谱的变化是很自然的可变性的限制范围以内^[9]。而在转基因牛源性奶粉的外源蛋白表达安全性研究中, 也证明了其安全性^[10]。

食物过敏是一个全世界关注的公共卫生问题, 约 2% 的成年人和 6%~8% 的儿童患有食物过敏症^[11]。因此, 转基因食品中转入的外源蛋白是否具有潜在的致敏性从而增加了非过敏源食品的风险成为人们所关注的一个问题。由于目前对致敏机制了解的局限

性, 现有的方法只能为外源蛋白的致敏性评价提供有价值的信息, 但没有一项指标与待测蛋白的致敏反应有直接的联系, 即使得到阳性结果, 仍需进一步试验来证实新蛋白质的潜在致敏性^[12]。故也应继续探索动物致敏模型的建立方法和应用价值。

转基因食品安全评价是一项繁杂, 浩大的工程, 本次实验只是采用了安全评价体系中的几种方法进行了探究, 对转基因食品安全进行更加完整和科学的评价仍有很多工作要做。

参考文献

- [1] Jolles P, Jolles J. What's new in lysozyme research [J]. *Mol Cell Biochem*, 1984, 63:165–189.
- [2] 赖晓芳, 沈善瑞, 王炜军. 离子对萝卜中具有溶菌酶活性的几丁质结合蛋白活性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 12: 171–172.
Lai XF, Sheng RS, Wang WJ. The influence of ion on activity of chitin-binding protein of radish with lysozyme activity [J]. *Jiangsu Agri Sci*, 2012, 12: 171–172.
- [3] 费国琴, 李晓晖, 宁喜斌. 微生物溶菌酶酶学性质及抑菌特性研究[J]. *江苏农业科学*, 2012, 09: 286–287+289.
Fei GQ, Li XH, Ning XB. Study on enzymatic properties and antimicrobial activity of lysozyme [J]. *Jiangsu Agri Sci*, 2012, 09: 286–287+289.
- [4] Hughey VL, Wilger PA, Johnson EA. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 631–638.
- [5] Gill AO, Holley RA. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna [J]. *Food Prot*, 2000, 63: 1338–1346.
- [6] Proctor VA, Cunningham FE. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and pharmaceutical [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1988, 26: 359–395.
- [7] Cao B, He XY, Luo YB, *et al.* Safety assessment of the Dehydration responsive element binding (DREB) protein 4 expressed in *E. coli* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11): 4077–84.
- [8] Cao SS, He XY, Xu WT, *et al.* Safety assessment of Cry1C protein from genetically modified rice according to the national standards of PR China for a new food resource [J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2010, 58(3): 474–81.
- [9] Zhang R, Guo C, Sui S, *et al.* Comprehensive assessment of milk composition in transgenic cloned cattle [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49697.
- [10] Zhou C, Wang JW, Huang KL, *et al.* A 90-day safety study in Sprague-Dawley rats fed milk powder containing recombinant human lactoferrin (rhLF) derived from transgenic cloned cattle [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2011, 34(4): 359–68.
- [11] Sampson HA. Food hypersensitivity: manifestation, diagnosis, and natural history [J]. *Food Technol*, 1992, (5): 141–145.
- [12] 贾旭东. 转基因食品致敏性评价[J]. *毒理学杂志*, 2005, 19(2): 159–162.
Jia XD. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods [J]. *J Toxicol*, 2005, 19(2): 159–162.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



吕超, 本科生, 主要研究方向为食品营养与安全。
Email: neil.lv0119@gmail.com.



黄昆仑, 教授, 博导, 主要研究方向为转基因生物安全。
E-mail: hkl009@163.com



贺晓云, 副教授, 硕导, 主要研究方向为转基因生物安全。
E-mail: raininghe@163.com