

转基因大豆对硒的富集作用和形态分布研究

王丙涛¹, 王清龙², 赵琼晖^{1*}, 颜 治¹, 杨修斌¹

(1. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 深圳 518035;
2. 河南牧业经济学院, 郑州 450011)

摘要: **目的** 研究转基因大豆对硒的富集作用以及富集前后转基因大豆中硒的形态分布和形态转化。**方法** 采用电感耦合等离子体质谱分析转基因大豆富集前后硒的总量, 采用蛋白酶提取, 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱 (high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, HPLC-ICP-MS) 联用技术分析转基因大豆中的硒酸盐(selenate, SeVI)、亚硒酸盐(selenite, SeIV)、硒代蛋氨酸(selenomethionine, SeMet)和硒代胱氨酸(selenocystine, SeCys)等几种硒化合物。盆栽种植试验研究转基因大豆对硒的富集作用。通过对照试验, 考察大豆植株不同部位总硒含量变化和形态分布的转化情况。**结果** 转基因大豆对硒有较好的富集作用, 吸收的亚硒酸盐在大豆植株中部分转化成了硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸。**结论** 了解了转基因大豆的形态分布和转化情况, 可以更好地评估转基因大豆的食用安全风险并进行生物利用开发。**关键词:** 转基因大豆; 硒形态; 富集; 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法

Study on selenium enrichment of genetically modified soybean and selenium species distribution analysis

WANG Bing-Tao¹, WANG Qing-Long², ZHAO Qiong-Hui^{1*}, YAN Zhi¹, YANG Xiu-Bin¹

(1. Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R & D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China;
2. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450011, China)

ABSTRACT: Objective To study the selenium enrichment of genetically modified soybean, selenium compound species distribution and transformation before and after enrichment. **Methods** The total selenium content in genetically modified soybean were detected by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Extracted with protease, selenium species of selenate [Se(VI)], selenite [Se(IV)], selenomethionine (SeMet) and selenocystine (SeCys) in genetically modified soybean were detected using high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS). The changes of total selenium content in different parts of the soybean plant and distribution of transformation of selenium species based on the contrast test, which were made by potted planting, were also studied. **Results** The genetically modified soybean had a better enrichment on selenium, with the selenite uptaken by soybean plant partly being converted into selenomethionine and selenocystine. **Conclusion** The analysis of distribution and transformation of selenium

基金项目: 深圳出入境检验检疫局科技项目(SZ2011008)

Fund: Supported by Scientific and Technological Project of Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (SZ2011008)

*通讯作者: 赵琼晖, 高级工程师, 从事食品理化检测。E-mail: fsyswbt@163.com

*Corresponding author: ZHAO Qiong-Hui, Senior Engineer, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: szficslh2@163.com

and its species will push forward the evaluation of food safety risks and the development of biological utilization of genetically modified soybean.

KEY WORDS: genetically modified soybean; selenium species; enrichment; high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry

1 引言

近几年转基因大豆进口量突飞猛进, 年进口量已突破 5000 万吨, 我国已跃升转基因大豆进口第一大国^[1]。大豆中含有一定量人体必需的微量元素硒, 硒被誉为“生命火种”和“抗癌之王”。大豆等农作物对硒具有一定的富集作用^[2-4], 特别是在富硒地区或者受到硒污染的地区, 农作物中硒含量更高。但硒属于两性元素, 无机硒毒性大, 中毒量与需要量之间范围很小; 有机硒毒性小, 生物利用率高, 目前已被用作硒强化剂广泛应用到各种富硒食品中。但由于转基因食品的安全性一直备受争议^[5,6], 同时有报道显示转基因作物富集某些元素后元素形态会在作物不同部位发生转化^[7-11], 转基因大豆会富集硒而且硒的存在形态可能会因基因转变而发生变化, 因此研究转基因大豆对硒的富集作用并准确分析转基因大豆中的硒形态分布对转基因大豆安全风险评估和生物开发利用具有重要的指导意义。本研究采用高效液相色谱电感耦合等离子体质谱联用技术(high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry, HPLC-ICP-MS)分析了转基因大豆中硒酸盐、亚硒酸盐、硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸等几种形态^[12-16], 探讨了转基因大豆对硒的富集作用以及形态分布和转化情况。

2 材料和方法

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 2695, 美国沃特世公司); 电感耦合等离子体质谱仪(X Series2, 美国热电公司)。

试剂: 柠檬酸, 分析纯; 蛋白酶 K(Sigma); 硒酸根标准溶液(GBW10033)、亚硒酸根标准溶液(GBW10032, 中国计量科学研究院); 硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸(Across organics 公司)。

2.2 仪器条件

2.2.1 色谱条件

Hamilton PRP X-100 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5

μm); 流动相: 5 mmol/L 柠檬酸溶液, pH 4.5, 流速 1 mL/min, 进样量 100 μL。

2.2.2 ICP-MS 参数

功率: 1400 W; 冷却气流速: 14 L/min; 辅助气流速: 0.8 L/min; 雾化气流速: 0.85 L/min; H₂/He 混合气流速: 5.8 mL/min; H₂/He 混合气比例: 3/97。

2.3 样品前处理

将采摘的待测样本自然风干后用搅拌机打碎制成匀质样品。采用压力罐消解, 称取匀质样品 1 g 到聚四氟乙烯罐中, 加入 5 mL 硝酸和 1 mL 双氧水, 置于烘箱中 145 °C 消解 4 h, 冷却定容, 电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)法检测总硒含量。

称取 2~3 g 匀质样品, 加入 20 mg 蛋白酶, 再加入 20 mL 水, 37 °C 水浴振荡 4 h, 4000 r/min 离心, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 同样方法做试剂空白, 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用(HPLC-ICP-MS)检测样品中的硒化合物形态。

3 结果与讨论

3.1 样本种植和制备

选取从深圳口岸进口的美国转基因大豆进行试验, 将所选试验样本送到专业实验室进行转基因成分鉴定, 经鉴定所选大豆为抗草甘膦转基因大豆(roundup ready soybean, RRS), 属于转基因大豆。

本研究查阅了相关文献^[3,4], 根据作物种类和自然环境污染状况, 确定了富集实验需要施加的亚硒酸盐浓度为 10 mg/L。在正常发芽后, 将同一批大豆苗分盆种植, 分成两组, 对其中一组大豆植株根系施加浓度为 10 mg/L 的亚硒酸盐溶液, 每天 1 次, 每次 5 mL, 考察大豆的吸附作用; 另一组作为对照组正常种植, 不添加任何元素成分。为了避免肥料成分带来的影响, 在种植过程中除正常浇水外, 不添加任何肥料, 直至大豆成熟为止。分别采集成熟大豆的根、茎、叶和大豆果实, 自然风干后, 用搅拌机打碎制成匀质样品放入冷藏冰箱备用。

3.2 总硒含量

采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)检测上述制备的样本中的总硒含量。结果显示,这种转基因大豆种子自身含有一定量的硒,硒含量为 (0.256 ± 0.047) mg/kg($n=6$)。同时在生长过程中对硒具有较好的富集作用,对照组和富集组各6份样本大豆的各部位均有一定量的富集(见表1),特别是在大豆根部和大豆果实中富集效果更加明显。本实验仅考察大豆是否存在吸附硒元素的现象以及可能存在的形态变化,不对吸附效率、吸附机制等进行评价,因此不计算吸附量和吸附比率等信息。但从检测结果可以看出,富集组各大豆植株的富集情况基本一致,由此推测根部首先吸收富集最大量的硒,获得的硒会转运到植株各个部位,最后大部分集中到大豆果实中。

3.3 硒形态分布

对采集的大豆果实、根、茎进行形态分析(见图1~3),探讨形态分布的差异。由于大豆成熟后,叶子变黄干枯,样品采集量较少,在进行总量分析后样本量不够用于形态分析,因此本实验不对叶片进行形态分布研究。结果发现在吸收了无机硒溶液之后的生长过程中,硒的化学形态会产生变化,有一部分从无机硒变成了有机硒,而且在植株的不同部位存在的化学形态及其分布比例也有差异(表2)。

3.4 形态转化

种植试验结果发现,大豆对硒具有较强的富集作用,与对照组相比,大豆植株的根、茎、叶和大豆果实中均检测到较高含量的硒,特别是根和果实中,硒含量超出对照组几十倍。因此,如果富硒地区或者大豆种植区域受到严重硒污染的话,在收获的大豆中将会含有较高含量的硒,这将会导致大豆存在一定的食用安全风险。

进一步的形态分析发现,在大豆植株根部主要存在的是无机形态的硒酸盐和亚硒酸盐,特别是亚硒酸盐含量很高,这也与本实验添加的溶液相一致。在大豆的茎部未检测到硒酸盐,但检测到一定量的硒代蛋氨酸和微量的硒代胱氨酸存在,而在大豆果实中则检测到含量较高的硒代蛋氨酸,含量已经超过亚硒酸盐的含量,这可能是植株吸收的大部分亚硒酸盐在大豆果实中都转化成了硒代蛋氨酸。因此,可以看出大豆吸附无机形态的亚硒酸盐后,在生长过程中经过根、茎最终富集到大豆果实中,并将部分无机硒转化为有机的硒代氨基酸。定量分析结果发现,富集组大豆果实中的无机硒含量远高于对照组大豆中的无机硒含量,虽然更多的硒化合物以硒代蛋氨酸形式存在,但亚硒酸盐的绝对含量和相对含量均较高,食用安全风险不容忽视。

表1 种植后富集组和对照组大豆各部位硒含量($n=6$)

Table 1 Comparison of selenium content of each part of soybeans between concentration group and the control group after planting (mg/kg, $n=6$)

| 部位 | 豆子 | 叶 | 根 | 茎 |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 对照组 | 0.100±0.006 | 0.285±0.012 | 0.108±0.004 | 0.069±0.003 |
| 富集组 | 2.373±0.062 | 0.963±0.018 | 3.468±0.079 | 1.041±0.054 |

表2 富集组和对照组大豆各部位硒形态含量

Table 2 Comparison of selenium content of each part of soybeans between concentration group and the control group (mg/kg)

| 形态 | 对照组 | | | | | | 富集组 | | | | | |
|-------|-------|------|-------|------|----|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | 豆子 | RSD% | 根 | RSD% | 茎 | RSD% | 豆子 | RSD% | 根 | RSD% | 茎 | RSD% |
| SeIV | 0.028 | 4.4 | 0.055 | 3.9 | ND | / | 0.794 | 1.5 | 2.705 | 0.7 | 0.619 | 1.8 |
| SeVI | ND | / | ND | / | ND | / | ND | / | 0.594 | 1.6 | ND | / |
| SeCys | 0.010 | 6.8 | ND | / | ND | / | 0.183 | 3.2 | 0.061 | 4.1 | 0.104 | 3.5 |
| SeMet | 0.051 | 5.1 | 0.039 | 3.8 | ND | / | 1.206 | 0.9 | ND | / | 0.303 | 2.2 |

ND: not detected

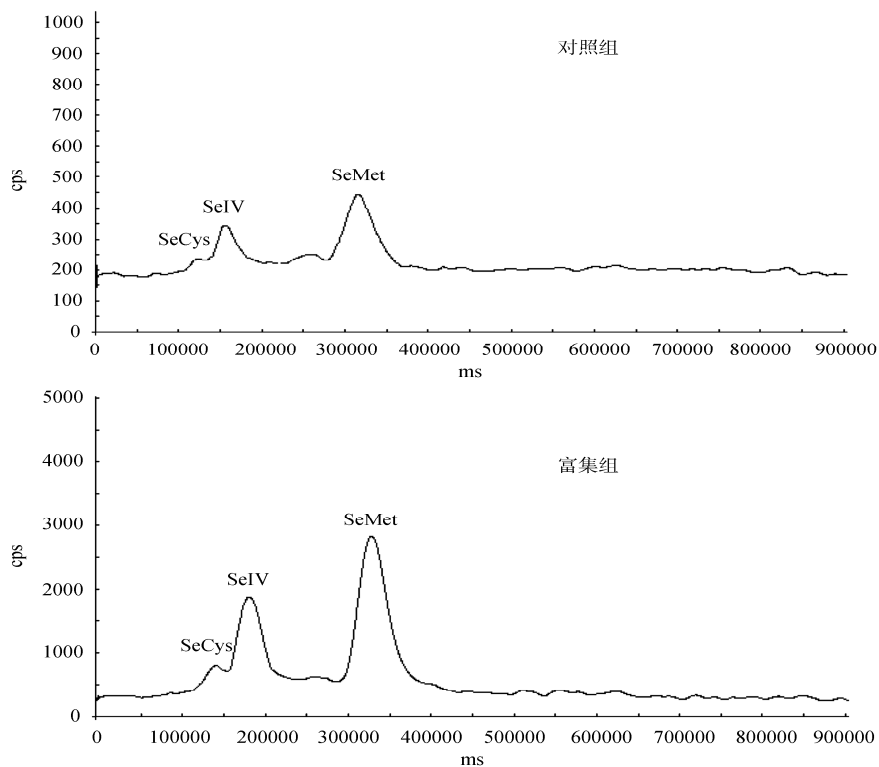


图 1 转基因大豆吸附硒前后富集组和对照组大豆果实中硒形态分布图

Fig. 1 Distribution of selenium species of soybean fruits in concentration group and the control group

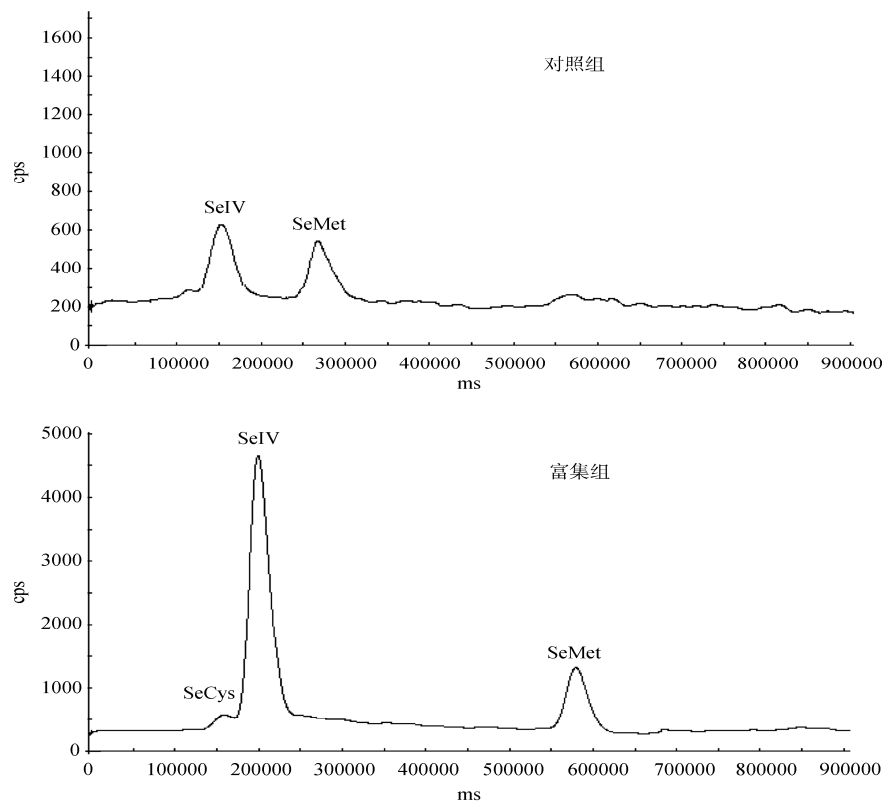


图 2 转基因大豆吸附硒前后富集组和对照组植株根部硒形态分布图

Fig. 2 Distribution of selenium species of soybean roots in concentration group and the control group

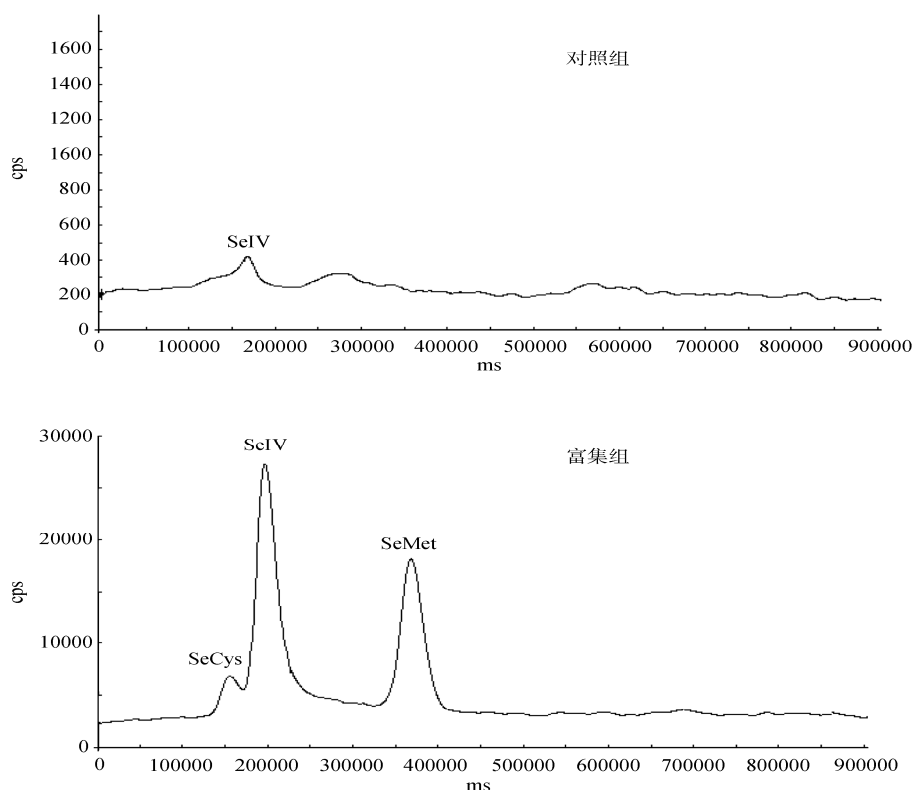


图3 转基因大豆吸附硒前后富集组和对照组植株茎部硒形态分布图

Fig. 3 Distribution of selenium species of soybean stems in concentration group and the control group

4 结论

经过对进口转基因大豆富集作用和元素形态分析发现,转基因大豆对土壤和环境中的硒具有一定的富集作用,硒总量分析结果显示,富集组硒含量较对照组高出数十倍。形态分布测定结果显示,在富集组大豆果实中存在较高含量的硒代蛋氨酸、亚硒酸盐和硒代胱氨酸,说明植株吸收的亚硒酸盐在生长过程中发生了形态转化,有相当一部分亚硒酸盐转化成了有机形态的硒代蛋氨酸和硒代胱氨酸,但是与对照组相比,亚硒酸盐的含量仍很高,因此有必要对转基因大豆进行形态分析,特别是在转基因食品安全备受争议的阶段,更要明确确定其中的元素形态,以便更好地掌控转基因大豆的食用安全风险并对其生物开发利用提供可靠信息。

参考文献

- [1] 高静. 进口转基因大豆放行, 中国大豆产业链恐再遭重创[N]. 中国商报, 2013-06-25.
Gao J. Release of import of genetically modified soybeans, soy-bean industry chain in China hit hard again [N]. China Business Herald, 2013-06-25
- [2] 段曼莉, 付冬冬, 王松山, 等. 亚硒酸盐对四种蔬菜生长、吸收及转运硒的影响[J]. 环境科学学报, 2011, 31(3): 658-665.
Duan ML, Fu DD, Wang SS, *et al.* Effects of different selenite concentrations on plant growth, absorption and transportation of selenium in four different vegetables [J]. Acta Sci Circumst, 2011, 31(3): 658-665.
- [3] 周勋波, 李全起, 吴魏, 等. 不同基因型大豆生育特性与积硒关系研究[J]. 华北农学报, 2006, 21(2): 398-402.
Zhou XB, Li QQ, Wu W, *et al.* Studies on the relation between growth character and Se-accumulation different genotypic soybean [J]. Acta Agric Boreali Sin, 2006, 21(2): 398-402.
- [4] 樊翠, 张红, 杨润强, 等. 大豆发芽期间硒富集能力[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 17-20. Fan C, Zhang H, Yang RQ, *et al.* Preliminary study on selenium accumulation during soybean germination [J]. Food Sci, 2011, 32(20): 17-20.
- [5] Ellen VH, Adinda DS, Yann D, *et al.* The safety assessment of genetically modified crops for food and feed use [Z]. Scientific Institute of Public Health, 2003.4
- [6] Safety assessment of genetically modified foods(Guidance

- document) [S]. Food Standard, Australia, New Zealand, 2007.
- [7] Yu XZ, Gu JD. Differences in uptake and translocation of selenate and selenite by the weeping willow and hybrid willow [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2008, 15(6): 499–508.
- [8] Pedrero Z, Elvira D, Cámara C, *et al.* Selenium transformation studies during broccoli (*Brassica oleracea*) growing process by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS) [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 596(2): 251–256.
- [9] Montes BM, Yanes EG, Ponce LC, *et al.* Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICPMS and ES-MS detection: an approach for phytoremediation studies [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(1): 107–113.
- [10] Sandra M, Monika S, Juris M, *et al.* Localization and speciation of selenium and mercury in *Brassica juncea*—implications for Se–Hg antagonism [J]. *J Anal At Spectrom*, 2006, 21(4): 404–412.
- [11] Bañuelos G, Terry N, Leduc DL, *et al.* Field trial of transgenic Indian mustard plants shows enhanced phytoremediation of selenium-contaminated sediment [J]. *Environ Sci Technol.*, 2005, 39(6): 1771–7.
- [12] 王丙涛, 谢丽琪, 林燕奎, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用检测食品中的五种硒形态[J]. *色谱*, 2011, 29(3): 223–227.
- Wang BT, Xie LQ, Lin YK, *et al.* Determination of selenium species in food by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(3): 223–227.
- [13] 铁梅, 方禹之, 孙铁彪, 等. HPLC-ICPMS 联用技术在富硒金针菇硒的形态分析中的应用[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(4): 635–639.
- Tie M, Fang YZ, Sun TB, *et al.* Application of HPLC-ICP-MS in speciation analysis of selenium in selenized flammulina velutipes [J]. *Chem J Chin Univ*, 2007, 28(4): 635–639.
- [14] Maria MB, Maria JDM, Elisa BG. Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS [J]. *Talanta*, 2006, 68: 1287–1293.
- [15] Wrobel K, Joseph AC. Selenium speciation in low molecular weight fraction of Se-enriched yeasts by HPLC-ICP-MS: detection of selenoadenosylmethionine [J]. *J Anal At Spectrom*, 2002, 17(9): 1048–1054.
- [16] Chan QL, Scott EA, Joseph AC. Selenium speciation profiles in selenite-enriched soybean (*Glycine Max*) by HPLC-ICPMS and ESI-ITMS [J]. *Metallomics*, 2010, 2(2): 147–153.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



王丙涛, 高级工程师, 主要从事食品安全检测研究。

E-mail: fsyswbt@163.com



赵琼晖, 高级工程师, 主要从事食品安全检测研究。

E-mail: szficslh2@163.com