

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1103.2—2006

转基因植物及其产品食用安全检测 抗营养素第2部分：胰蛋白酶 抑制剂的测定

Safety assessment of genetically modified plant and derived products
Part 2: assay of anti-nutrients pancreatic trypsin inhibitor

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、农业部科技发展中心、中国农业大学、天津市卫生防病中心。

本标准主要起草人：杨月欣、王竹、韩军花、李宁、汪其怀、黄昆仑、刘克明、刘培磊、连庆。

转基因植物及其产品食用安全检测

抗营养素第 2 部分：胰蛋白酶抑制剂的测定

1 范围

本标准规定了转基因植物及其产品中胰蛋白酶抑制剂的测定方法。

本标准适用于转基因大豆及其产品、转基因谷物及其产品中胰蛋白酶抑制剂的测定。其他的转基因植物,如花生、马铃薯等也可用该方法进行测定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

转基因植物 **genetically modified plant**

指利用基因工程技术改变基因组构成,用于农业生产或者农产品加工的植物。

2.2

转基因植物产品 **products derived from genetically modified plant**

指转基因植物的直接加工产品和含有转基因植物的产品。

3 原理

胰蛋白酶可作用于苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯胺(BAPA),释放出黄色的对硝基苯胺,该物质在 410 nm 下有最大吸收值。转基因植物及其产品中的胰蛋白酶抑制剂可抑制这一反应,使吸光度值下降,其下降程度与胰蛋白酶抑制剂活性成正比。用分光光度计在 410 nm 处测定吸光度值的变化,可对胰蛋白酶抑制剂活性进行定量分析。

4 试验材料

转基因植物及其产品、受体植物及其产品。如果对转基因植物产品中的胰蛋白酶抑制剂进行测定,转基因植物产品和受体植物产品的处理条件应相同。

上述材料的水分含量和种植环境应基本一致。

5 试剂

除非另有说明,仅使用分析纯试剂;水为蒸馏水。

5.1 三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]。

5.2 0.05 mol/L Tris 缓冲液:称取 6.05 g Tris 和 2.94 g 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)溶于 800 mL 水中,用浓盐酸调节溶液的 pH 至 8.2,加水定容至 1 L。

5.3 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 0.4 g 氢氧化钠,加入 800 mL 水溶解后,再加水定容至 1 L。

5.4 戊烷:己烷(1:1, V:V)。

5.5 1 mmol/L 盐酸。

5.6 胰蛋白酶:大于 10 000 BAEE μ /mg。

BAEE 为 N α -苯甲酰-L-精氨酸乙烷酯(N α -benzoyl-L-arginine ethyl ester)。BAEE u(BAEE 单位)表

示胰蛋白酶与BAEE在25℃、pH 7.6、体积3.2 mL条件下反应,在253 nm波长下每分钟引起吸光度值升高0.001,即为1个BAEE u。

5.7 胰蛋白酶溶液:称取10 mg胰蛋白酶,溶于200 mL 1 mmol/L盐酸中。

5.8 苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯胺(benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide, BAPA)。

5.9 BAPA底物溶液:称取40 mg BAPA,溶于1 mL二甲基亚砜中,用预热至37℃的Tris缓冲液稀释至100 mL。BAPA底物溶液应于实验当日配制。

5.10 反应终止液:取30 mL冰乙酸,加水定容至100 mL。

6 仪器和设备

6.1 通常实验室仪器设备。

6.2 恒温水箱。

6.3 分光光度计。

6.4 旋涡搅拌器。

6.5 电磁搅拌器。

7 操作步骤

7.1 试样的制备

将试验材料磨碎,过筛(筛盘为100目~200目)。称取0.2 g~1 g试样,加入50 mL 0.01 mol/L氢氧化钠溶液,pH应控制在8.4~10.0之间,低档速电磁搅拌下浸提3 h,过滤。浸出液用于测定,必要时,可进行稀释。

如果试样的脂肪含量较高(如全脂大豆粗粉或豆粉),应在室温条件下先用戊烷:己烷(1:1)脱脂。脱脂方法如下:将试样浸泡于20 mL戊烷:己烷(1:1)中,低档速电磁搅拌30 min,过滤。残渣用约50 mL戊烷:己烷(1:1)淋洗两次,收集残渣。然后进行浸提。

7.2 测定管和对照管的制备

取两组平行的试管,按表1在每组试管中依次加入试样浸出液、水和胰蛋白酶溶液,于37℃水浴中混合后,再加入5.0 mL预热至37℃的BAPA底物溶液,从第一管加入起计时,于37℃水浴中摇动混匀,并准确反应10 min,最后加入1.0 mL反应终止液。用0.45 μm微孔滤膜过滤,弃初始滤液,收集滤液。

表1 测定管反应体系

单位为毫升

试 剂	非抑管	测定管 1	测定管 2	测定管 3	测定管 4
试样浸出液	0.0	0.3	0.6	1.0	1.5
水	2.0	1.7	1.4	1.0	0.5
胰蛋白酶溶液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
BAPA底物溶液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
反应终止液	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

在制备测定管的同时,应制备试剂对照管和试样对照管,即取2 mL水或试样浸出液,然后按顺序加入2 mL胰蛋白酶溶液、1 mL反应终止液和5 mL BAPA底物溶液,混匀后过滤。

7.3 测定

以试剂对照管调节吸光度值为0,在410 nm波长下测定各测定管和对照管的吸光度值,以平行试管的算术平均值表示。

8 结果表示

8.1 酶活性的表示方法

8.1.1 胰蛋白酶活性单位(TU):在规定实验条件下,每 10 mL 反应混合液在 410 nm 波长下每分钟升高 0.01 吸光度值即为一个 TU。

8.1.2 胰蛋白酶抑制率:在规定实验条件下,与非抑管相比,测定管吸光度值降低的比率。

8.1.3 胰蛋白酶抑制剂单位(TIU):在规定实验条件下,与非抑管相比,每 10 mL 反应混合液在 410 nm 波长下每分钟降低 0.01 吸光度值即为一个 TIU。

8.2 计算

8.2.1 各测定管的胰蛋白酶抑制率按式(1)计算。

$$TIR = \frac{A_N - A_T - A_{T0}}{A_N} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

TIR ——胰蛋白酶抑制率, %;

A_N ——非抑管吸光度值;

A_T ——测定管吸光度值;

A_{T0} ——试样对照管吸光度值。

8.2.2 只有胰蛋白酶抑制率在 20% ~ 70% 范围内时,测定管吸光度值可用于胰蛋白酶抑制剂活性计算,各测定管胰蛋白酶抑制剂活性按式(2)计算。

$$TI = \frac{A_N - A_T - A_{T0}}{t \times 0.01} \quad (2)$$

式中:

TI ——胰蛋白酶抑制剂活性,单位为胰蛋白酶抑制剂单位(TIU);

t ——反应时间,单位为分钟(min)。

8.2.3 单位体积试样浸出液中胰蛋白酶抑制剂活性

以测定用试样浸出液体积(单位为 mL)为横坐标, TI 为纵坐标作图,拟和直线回归方程,计算斜率,斜率值即是单位体积试样浸出液中胰蛋白酶抑制剂活性(单位为 TIU/mL)。当测定用试样浸出液体积和 TI 不是一条直线关系时,单位体积试样浸出液中胰蛋白酶抑制剂活性用各测定管单位体积胰蛋白酶抑制剂活性的算术平均值表示。

8.2.4 试样中胰蛋白酶抑制剂活性按式(3)计算。

$$TIM = \frac{TIV \times V \times F}{m} \quad (3)$$

式中:

TIM ——试样中胰蛋白抑制剂活性,单位为胰蛋白酶抑制剂单位每克(TIU/g);

TIV ——单位体积试样浸出液中胰蛋白酶抑制剂活性,单位为胰蛋白酶抑制剂单位每毫升(TIU/mL);

V ——试样浸出液总体积,单位为毫升(mL);

F ——稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

9 允许差

重复条件下,两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 10%。