

SCIEX液质联用技术基于alpha-乳白蛋白和beta-乳球蛋白对乳制品来源的鉴定

SCIEX LC-MS/MS Application Technology on Origin Identification of Dairy Products based on Alpha-lactalbumin and Beta-lactoglobulin

钟晨春, 朱怀恩, 靳文海

Zhong Chenchun, Zhu Huaien, Jin Wenhai

JAPAC Solution Innovation Center, SCIEX

Key words: alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, whey protein, dairy product origin, MRM, QTRAP® 4500

引言

羊乳与人乳的脂肪结构十分接近, 仅为牛乳的1/3, 极为细小且不粘结, 容易消化吸收。因此在用于婴儿配方乳品中, 羊乳被普遍认为优于牛乳。然而, 国内很多地区的液态羊奶并非纯羊乳加工而成, 而是在羊奶里添加大比例牛奶, 甚至有些牛奶的添加量高达90%, 只有10%是羊奶。究其原因牛奶原奶采购成本比羊奶低很多, 生产企业主要出于成本考虑进行掺杂; 而关于羊奶粉的纯正与混合构成, 国家食药监总局发布《婴幼儿配方乳粉产品配方注册管理办法》, 办法明确规定, 产品名称中有动物性来源的, 应当根据产品配方在配料表中如实标明使用的生乳、乳粉、乳清(蛋白)粉等乳制品原料的动物性来源。使用的乳制品原料有两种以上动物性来源时, 应当标明各种动物性来源原料所占比例。

基于LC-MS/MS的蛋白质定量通常会通过酶解作用将目标蛋白质水解成若干肽段, 用特征性肽段来表征目标蛋白质。从酶解后的若干肽段中, 根据序列BLAST比对结果寻找到种属特异性的肽段, 可以通过对这些肽段在样品中检测, 进而判断相应蛋白质的种属来源。以与作为经典目标蛋白质鉴定整体解决方案的提供者, SCIEX在乳制品来源鉴定中也使用了相同的工作流程。

本方案采用SCIEX TripleTOF® 5600+采集原始数据, ProteinPilot™和Skyline软件进行数据处理, 获得特征性肽段信息, 通过SCIEX QTRAP® 4500优化质谱检测参数以及鉴定分析, 优化了样品前处理的关键步骤, 大大提高了分析方法建立和数据处理效率以及检测灵敏度。

仪器设备和试剂

SCIEX公司TripleTOF® 5600+、QTRAP® 4500液质联用系统

牛奶粉、羊奶粉、市售羊奶粉

恒温反应箱、高速离心机

乙腈(色谱纯)、甲酸(色谱纯)

超纯水(电导率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

液相条件

色谱柱: C18, 50 \times 2.1 mm

流动相: A: 水(含0.1%甲酸)

B: 乙腈(含0.1%甲酸)

流速: 0.35 mL/min

柱温: 40 °C

进样量: 5 μL

质谱条件

扫描方式: TOF MS-IDA (TripleTOF® 5600+)

MRM (QTRAP® 4500)

检测离子质荷比范围: 300~1500 m/z

Turbo V™ ESI离子源参数

气帘气CUR: 30 psi

碰撞气CAD: Medium

IS电压: 5500 V

源温度: 550° C

雾化气GAS1: 55 psi

辅助气GAS2: 55 psi

样品制备：

奶粉样品加入纯水溶解，经过二硫苏糖醇和碘代乙酰胺溶液反应打开二硫键并保护巯基后；加入胰蛋白酶溶液进行酶解；反应结束后加入等体积乙腈混合，离心，移取上清进样分析。

数据处理过程和结果：

1. 特征性肽段选择

利用将UniProt数据库寻找到牛和羊各自alpha-乳白蛋白和beta-乳球蛋白的氨基酸序列和SCIEX TripleTOF® 5600+ 仪器分析数据结果导入ProteinPilot和Skyline软件，经处理后可以获得包含质谱分析参数条件的候选肽段MRM离子对信息，并通过序列BLAST比对后续实验考察最终确定被测蛋白质的特征性肽段。

表1. 牛和羊alpha-乳白蛋白和beta-乳球蛋白特征性肽段MRM信息。

Q1	Q3	ID	DP	CE
669	896	Bovine La 1	80	31
669	736	Bovine La 2	80	36
858	1255	Bovine Lg 1	90	40
858	928	Bovine Lg 2	90	38
820	921	Goat La 1	91	38
820	1380	Goat La 2	91	38
807	842	Goat Lg 1	130	44
807	600	Goat Lg 2	130	44

2. 肽段特异性检验

对纯牛奶粉、羊奶粉，以及市售某品牌羊奶粉进行分析（图1），结果表明所选择的牛源以及羊源的特异性良好，能够很好的区别奶粉来源，同时也发现所市面上随机采购的“羊奶粉”其中有掺杂牛源性成分。

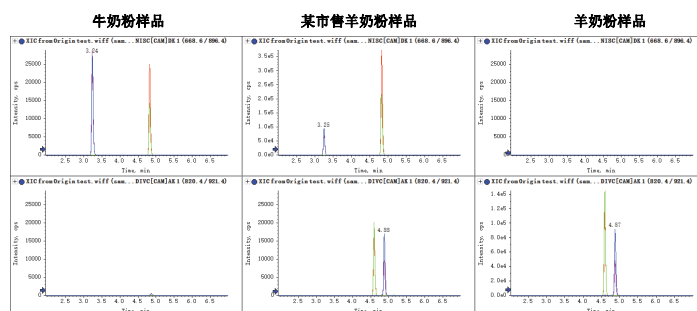


图1. 奶粉样品检测结果，纯牛奶粉和羊奶粉中能分别检测出对应种属特异性的alpha-乳白蛋白和beta-乳球蛋白的肽段，某市售羊奶粉样品则两种源性的肽段都能检出。

结论

- 1、本实验针对牛源和羊源alpha-乳白蛋白和beta-乳球蛋白筛选出各自用于定性检测的特征性肽段，在此基础上建立合适的分析方法，能够方便快捷准确的鉴别乳制品的来源。
- 2、本实验充分体现了QTRAP® 4500、TripleTOF® 5600+与ProteinPilot和Skyline在处理复杂数据上的集合优势，经过样品前处理过程的优化，能够实现快速分析、简易操作。
- 3 本实验展示了SCIEX在蛋白质分析条件建立和优化上的优势，能够提供高效快捷一体化的解决方案，为客户相关工作提供便利和支持。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-10090-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX