

靶向蛋白质组学技术在多物种奶及其奶制品鉴别中的应用研究

陈雨滢¹ 任一平² 王丽丽^{*1} 黄忠平^{*1}

¹(浙江工业大学化学工程学院, 杭州 310014) ²(清华长三角研究院分析测试中心, 嘉兴 314006)

摘 要 基于靶向蛋白质组学技术,采用超高效液相色谱-串联高分辨质谱/串联三重四极杆质谱,建立了一种鉴别奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴和骆驼共 8 个物种奶的分析方法。针对 8 个物种奶中 6 种乳蛋白酶解产生的特征多肽进行分析,利用同位素内标法实现多条多肽的同时检测及比较,通过理论多肽分析、实际多肽检测、干扰考察、线性与最大酶解时间比较,最终筛选出 13 条特征多肽。依据 13 条特征多肽对模拟混合奶样品中的不同物种奶进行分析,对市售 16 个奶制品中的奶源物种进行鉴别。结果表明,特征多肽在奶源物种鉴别中具有良好的稳定性与特异性,本方法对多物种奶制品行业的质量控制与监管具有参考价值。

关键词 靶向蛋白质组学; 液相色谱-质谱联用技术; 物种鉴别; 乳蛋白

奶制品是日常膳食体系中常见的饮品和营养摄入源之一。常见的奶制品除奶牛奶外,还有山羊奶、绵羊奶、水牛奶、牦牛奶、马奶、驴奶和骆驼奶等产量较少的奶源,这些奶各具独特营养价值^[1-4]。例如,山羊奶致敏性低^[5],含有大量的脂肪和蛋白微粒,容易水解吸收^[6-7]; 驴奶富含乳清蛋白,其乳清蛋白与酪蛋白的比例与人乳接近,更易于吸收^[7]; 骆驼奶含有比奶牛奶高 30 倍的维生素 C^[8],并且富含内胰岛素,可作为治疗糖尿病的辅助食品^[9-10]。由于产量少且营养价值高,这些奶在市场上的价格高于奶牛奶。在利益的驱使下,这些奶及其奶制品在加工过程中存在掺入奶牛奶或直接以奶牛奶冒充等问题。因此,建立奶制品物种成分的鉴别方法以识别不同物种奶,对于奶制品行业的品质监管具有重要意义。

目前,有关不同物种来源奶(简称多物种奶)的鉴别研究已有许多报道,例如,聚合酶链式反应法(PCR)^[11]、酶联免疫吸附分析法(ELISA)^[12]、凝胶电泳法^[13]、高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)^[14-15]和基质辅助激光解吸-飞行时间质谱法(MALDI-TOF)^[16]等。PCR 和 ELISA 法通过基因或抗原抗体免疫结合实现对多物种奶中标志物的识别,具有较高的灵敏度。但是,该类检测方法通常仅适用于定性或半定量分析,并且易出现假阳性结果。HPLC-MS 和 MALDI-TOF 法通过分子质荷比的分析实现对目标蛋白质的特异性识别。但是,由于蛋白质分子量大、修饰多,在诸如高温灭菌奶、乳粉等奶制品加工过程中,其结构组成容易因温度、压力等因素的影响而发生变异,使检测方法容易受到干扰。

靶向蛋白质组学技术^[17-18]是一种基于已知蛋白质氨基酸序列信息,利用蛋白酶水解结合 HPLC-MS 技术,筛选出待测目标蛋白质的特征多肽,并通过对特征多肽的检测实现目标蛋白质定性和定量分析的方法。由于特征多肽序列短、质量数小、检测的灵敏度和稳定性高,并且其结构组成在加工过程中受温度和压力等因素的影响较小^[19],因此在全脂粉和婴儿配方奶粉^[20]等检测中具很强的抗干扰能力。目前,靶向蛋白质组学技术已在水牛与奶牛乳清蛋白特征多肽鉴别^[21-22]、山羊与奶牛的乳清蛋白差异分析^[23]等方面得到应用。Camerini 等^[21]利用靶向蛋白质组学技术分析了水牛奶酪中残留的乳清成分,并建立了鉴别水牛与奶牛 β 乳球蛋白的分析方法。Ke 等^[24]利用靶向蛋白质组学技术对山羊奶与奶牛奶中 6 种乳蛋白的特征多肽进行了对比与筛选,利用特征多肽实现了山羊奶制品中奶牛奶成分掺假的检测。但是,目前的研究通常仅针对少数物种奶与奶牛奶的鉴别分析,由于奶制品行业中奶源物种繁多,建立一种针对多物种来源乳制品的同时检测方法,有利于更全面地分析奶制品的物种来源,实现大批量奶制品的快速鉴别。

本研究基于靶向蛋白质组学和液相色谱-质谱法相结合的鉴别方法,建立了奶牛、水牛、牦牛、山

羊、绵羊、马、驴和骆驼 8 个物种奶的物种鉴别方法。本方法利用胰蛋白酶酶解技术和同位素二甲基衍生化技术作为辅助,实现了对物种的特征多肽的检测,并鉴别了模拟样品与实际奶制品中乳蛋白的物种来源。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Q-Exactive 超高效液相色谱组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪(UHPLC-Orbitrap MS,美国 ThermoFisher 公司);TQ-XS 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪(UHPLC-TQ MS,美国 Waters 公司);Cascada I 型超纯水仪(美国 Pall 公司)

二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAA)、氰基硼氢化钠(HPLC 级,美国 Sigma-Aldrich 公司);甲醛、同位素甲醛($^{13}\text{CD}_2\text{O}$)(HPLC 级,美国 Sigma-Aldrich 公司); NaHCO_3 、氨水(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);乙腈(ACN)、甲酸(FA)(HPLC 级,德国 Merck 公司);测序级重组胰蛋白酶(Trypsin,上海雅心生物科技有限公司)

31 个纯鲜奶样(奶牛奶 5 个、水牛奶 3 个、牦牛奶 5 个、山羊奶 5 个、绵羊奶 2 个、驴奶和马奶各 3 个、骆驼奶 5 个)均来自当地乳品企业。采样后,立即在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻储存。

16 个市售奶制品样品(水牛鲜奶 2 个、牦牛鲜奶 1 个、牦牛高温灭菌奶 2 个、牦牛乳粉 1 个、山羊鲜奶 2 个、山羊乳粉 2 个、绵羊乳粉 2 个、驴鲜奶 1 个、驴乳粉 1 个和骆驼鲜奶 2 个)通过网购或当地采购获得。

1.2 标准曲线与模拟混合样品的配制

8 个物种奶的标准样品由各物种鲜奶与超纯水混合配制,其混合比例(V/V)依次为 0:100、5:95、10:90、20:80、40:60、60:40、80:20 和 100:0。

模拟混合样品由奶牛奶与其它 7 个物种奶分别混合获得,其混合比例(V/V)为 0:100、5:95、10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20、90:10、95:5、100:0。

属内物种间混合样品,由牦牛奶与水牛奶,山羊奶与绵羊奶及驴奶与马奶两两混合获得,其混合比例(V/V)为 0:100、20:80、40:60、60:40、80:20、100:0。

1.3 样品前处理

1.3.1 酶解

准确称取样品(乳粉样品 0.05 g,奶样 0.5 mL),加入超纯水充分溶解,定容至 10 mL。移取稀释后的样品溶液 100 μL 于 2 mL 离心管中,加入 100 μL 超纯水、500 μL 100 mmol/L NaHCO_3 溶液、100 μL 100 mmol/L DTT 溶液,混匀,于 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温反应 30 min;冷却至室温,加入 100 μL 300 mmol/L IAA 溶液,避光静置 30 min;加入 100 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ Trypsin,混匀,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温酶解 4 h,冷却至室温,15000 r/min 离心 5 min,待二甲基化。

1.3.2 二甲基化反应

从离心后样品溶液中吸取 100 μL 上清液,加入 4 μL 1% (V/V) 甲醛溶液(同位素内标样品中加入等量同位素甲醛溶液)和 4 μL 0.6 mol/L 氰基硼氢化钠溶液,在室温下反应 1 h。加入 16 μL 1% (V/V) 氨水,中止二甲基化反应,并加入 10 μL 甲酸中和过量的氨水,于室温下静置至样品溶液不再产生气泡。取 50 μL 二甲基化后的样品溶液与 50 μL 同位素二甲基化的内标溶液混合,待测。

1.4 液相色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH300 C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm , 30 nm);柱温 $35\text{ }^\circ\text{C}$;进样量:10 μL ;自动进样器温度: $15\text{ }^\circ\text{C}$;色谱流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液,流速:0.3 mL/min。梯度洗脱:0~1 min, 2% B;1~4.5 min, 2%~80% B;4.5~5.5 min, 80%~100% B;5.5~6.5 min, 100% B;6.5~7 min, 100%~2% B;7~9 min, 2% B。

1.5 Orbitrap 质谱条件

鞘气流量:40 L/min;辅助气流量:10 L/min;离子源电压:3.5 kV;毛细管温度: $320\text{ }^\circ\text{C}$;辅助气

温度：350 ℃。质谱检测扫描范围： m/z 200 ~ 3000；分辨率：70000；AGC target $3e^6$ ；最大进样时间：100 ms。dd-MS² 参数为分辨率 17500，AGC target $1e^5$ ，最大进样时间为 50 ms，循环计数为 10，质量间隔窗口为 m/z 4.0。蛋白质分析软件 Proteome discoverer 2.1(美国 Thermo-Fisher 公司)参数为酶切模式 Trypsin；漏切位点 0 ~ 2；质量偏移为 10 ppm(10^{-6})；氨基酸固定修饰：半胱氨酸的甲酰化，多肽 N 端以及赖氨酸的二甲基化；氨基酸的动态修饰：磷酸化和氧化。

1.6 三重四极杆质谱条件

毛细管电压：3.0 kV；离子源温度：150 ℃；脱溶剂温度：350 ℃；脱溶剂气流量：800 L/min；锥孔反吹气流量：150 L/h；质谱碰撞气流量 0.12 mL/min。所得数据由 Masslynx 软件采集(美国 Waters 公司)。

2 结果与讨论

2.1 理论特征多肽的序列分析

常见的乳蛋白主要分为乳清蛋白和酪蛋白两大类,在乳清蛋白中, α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白是主要的组成部分;在酪蛋白中, α s1 酪蛋白、 α s2 酪蛋白、 β 酪蛋白和 κ 酪蛋白是主要的组成部分。这 6 种蛋白的含量常占乳蛋白组成的 90% 以上,是各物种最具代表性的乳蛋白。故本研究主要针对 8 个物种奶中的上述 6 个乳蛋白进行分析,其中,仅骆驼奶不含有 β -乳球蛋白。

为了确定各乳蛋白中具有物种代表性的多肽,首先对乳蛋白的氨基酸序列进行了理论分析。通过 Uniprot(<http://www.uniprot.org>)数据库查询,获得共计 47 种乳蛋白的氨基酸序列信息。通过模拟 Trypsin 酶切,对相应多肽进行特异性筛选^[21,24]。以奶牛奶为例,对奶牛与其它 7 个物种乳蛋白的氨基酸序列进行了比较,在奶牛奶的 6 种乳蛋白中,筛选出 6 条在其它物种乳蛋白中无重复氨基酸序列的理论特征多肽(表 1)。通过美国国家生物信息中心(NCBI)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)提供的蛋白质数据库中的局部序列比对工具(BLAST)对这 6 条多肽在已知的 8 个物种蛋白质数据库中的信息进行比对分析,结果表明,在数据库中没有其它蛋白质包含与这 6 条多肽一致的氨基酸序列,证明这些多肽具有物种特异性。通过相同方式,在其余 7 个物种乳蛋白中筛选出总计 110 条理论特征多肽,详见电子版文后支持信息表 S1 ~ S7。

2.2 理论特征多肽的静电场轨道阱质谱检测

为确认理论特征多肽是否存在于实际奶制品中,使用 UHPLC-Orbitrap MS 对按照 1.3 节所述步骤处理后的 8 个物种奶样中的多肽进行分析,并使用数据关联监测模式(ddms²)对多肽的二级质谱信息进行采集。采集到的数据通过软件 Proteome discoverer 2.1 进行处理,以 Uniprot 数据库信息作为参考,对 8 个物种奶样品的质谱数据进行筛选匹配。以奶牛奶为例,在奶牛奶的 6 条理论特征多肽中(表 1),UHPLC-Orbitrap MS 共检测到 5 条特征多肽,未检测到多肽 QMEAESISSSEEIVPNSVEQK,其可能的原因

表 1 奶牛乳蛋白理论候选特征多肽

Table 1 Theoretical candidate specific peptides of 6 proteins in bovine milk

所属蛋白 Protein	理论特异多肽 Specific peptides
β -乳球蛋白 β -Lactoglobulin	LSFNPTQLEEQCHI*
α -乳白蛋白 α -Lactalbumin	GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAIVQNNDSTEYGLFQINNK* [‡]
α s1-酪蛋白 α s1-Casein	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK* [‡] QMEAESISSSEEIVPNSVEQK
α s2-酪蛋白 α s2-Casein	ENLCSTFCK* [‡] VIPYVR* ^{‡,b,y}
β -酪蛋白 β -Casein	-
κ -酪蛋白 κ -Casein	-

* Q Exactive MS 检测多肽; [‡]在牦牛奶中存在干扰的多肽; [‡]在绵羊奶中存在干扰的多肽; ^b在水牛奶中存在干扰的多肽。
* Peptides detected by Q Exactive mass spectrometry (MS); [‡]Peptide has interference in yak milk; [‡]Peptide has interference in sheep milk;
^bPeptide has interference in buffalo milk.

是此序列中存在的甲硫氨酸发生了氧化,使得多肽结构发生了变化^[25]。

此外,对奶牛的 5 条特征多肽在其余 7 个物种样品中进行干扰考察,发现部分特征多肽在其它物种的奶样中也会被检测到。如多肽 VIPYVR 在水牛奶和牦牛奶样品中被检测到,多肽 QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK 在绵羊奶样品中被检测到,多肽 ENLCSTFCK 和多肽 GYGGVSLPEWVCTTFHTSGYDTQAI VQNNDSTEYGLFQINN K 在牦牛奶样品中被检测到。依据实验结果,在奶牛奶中仅多肽 LSFNPTQLEE QCHI 能被 MS 检测到,并且不存在干扰。同理,对其余 7 个物种的特征多肽进行考察后,共筛选出 44 条符合标准的候选特征多肽,详见电子版文后支持信息表 S1 ~ S7。

2.3 特征多肽的筛选

2.3.1 特征多肽的二甲基衍生化

依据各候选特征多肽的 Orbitrap MS 数据,利用 UHPLC-TQ MS 建立相应的多反应监测(MRM)检测方法。奶牛奶、水牛奶和牦牛奶候选特征多肽的 MRM 参数见表 2,其余物种的特征多肽 MRM 参数见电子版文后支持信息表 S8 ~ S10。为了克服质谱离子化效率及稳定性对候选多肽的影响,采用同位素标记法对候选特征多肽进行校正。考虑到本研究包含的目标候选多肽数量较多,常见的合成同位素多肽法所需的时间与经济成本过高,本研究采用同位素二甲基衍生化法^[26]对所研究的目标多肽进行同位素标记。针对同一种多肽,以其二甲基衍生化产物与同位素二甲基衍生化产物峰面积比值作为其相对峰面积,实现内标法检测。为确保所有候选多肽都能被完全衍生化,首先考察了各候选多肽的二甲基衍生化效率。以多肽 LSFNPTQLEE QCHI 为例,如图 1 所示,在二甲基衍生化与同位素二甲基衍生化处理样品中,均未发现未被衍生化的多肽,表明其衍生化效率高。同时,二甲基衍生化的多肽与同位素二甲基衍生化的多肽之间不存在干扰。

表 2 奶牛、水牛和牦牛奶候选特征多肽的 MRM 参数、最大酶解时间和线性相关系数(n=3)
Table 2 Multi-reaction monitoring (MRM) parameters, digestion time and correlation coefficients for candidate peptides of bovine, buffalo and yak milk (n=3)

物种 Species	特征多肽 Specific peptides	母离子 Molecular ion (m/z)	子离子 Fragment ions (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)	酶解时间 Digestion time (h)	线性相关系数 Correlation coefficients (R ²)
奶牛 Cow	LSFNPTQLEE QCHI-L	872.6(+2)	928.3(+1)/490.1(+1) ^a	20	0.5	0.994
	LSFNPTQLEE QCHI-H	875.6(+2)	928.3(+1)/496.1(+1) ^a	20		
	LSFNPTQLEE QCHV-L	577.3(+3)	914.1(+1)/490.1(+1) ^a	20	0.5	0.992
	LSFNPTQLEE QCHV-H	579.3(+3)	914.1(+1)/496.1(+1) ^a	20		
	YNVPQLEIVPNLAEQLHSMK-L	627.9(+4)	475.1(+1)/872.1(+1) ^a	20	1*	0.935
	YNVPQLEIVPNLAEQLHSMK-H	630.9(+4)	477.1(+1)/877.8(+1) ^a	20		
	VNELSTDIGSESTEDQAMEDIK-L	876.3(+3)	787.3(+1)/977.5(+1) ^a	20	2*	0.941
	VNELSTDIGSESTEDQAMEDIK-H	880.3(+3)	793.3(+1)/983.5(+1) ^a	20		
水牛 Buffalo	NMAIHPSK-L	318.4(+2)	359.3(+1)/405.9(+1) ^a	10	3*	0.995
	NMAIHPSK-H	322.4(+2)	365.3(+1)/408.9(+1) ^a	10		
	FQSEEQQMEDELQDK-L	716.5(+3)	1035.4(+1)/775.0(+1) ^a	20	3	0.936
	FQSEEQQMEDELQDK-H	720.5(+3)	1041.4(+1)/781.0(+1) ^a	20		
	IHPFAQTQSLVYPFGPIPK-L	765.0(+3)	1043.4(+1)/880.2(+1) ^a	20	2*	0.996
	IHPFAQTQSLVYPFGPIPK-H	769.1(+3)	1049.4(+1)/886.2(+1) ^a	20		
	FFNDK-L	726.3(+1)	404.4(+1)/552.1(+1) ^a	30	0.5	0.932
	FFNDK-H	738.3(+1)	410.4(+1)/558.1(+1) ^a	30		
	SCQAQPTTMTR-L	654.7(+2)	700.5(+1)/1193.5(+1) ^a	30	1	0.995
	SCQAQPTTMTR-H	657.7(+2)	706.5(+1)/1193.5(+1) ^a	30		
牦牛 Yak	LSFNPTQLEG QCHI-L	557.8(+3)	613.9(+1)/490.1(+1) ^a	20	2	0.995
	LSFNPTQLEG QCHI-H	559.8(+3)	613.9(+1)/496.1(+1) ^a	20		

^a定量离子; * 在达到最大酶解水平后含量下降的多肽; 特征多肽中, L 表示经过二甲基衍生化, H 表示经过同位素二甲基衍生化。
^aQuantitative ion; * The peptides that decrease after reaching the highest peak in digestion; L represents the specific peptides that are isotope dimethylated and H represent the specific peptides that are isotope dimethylated.

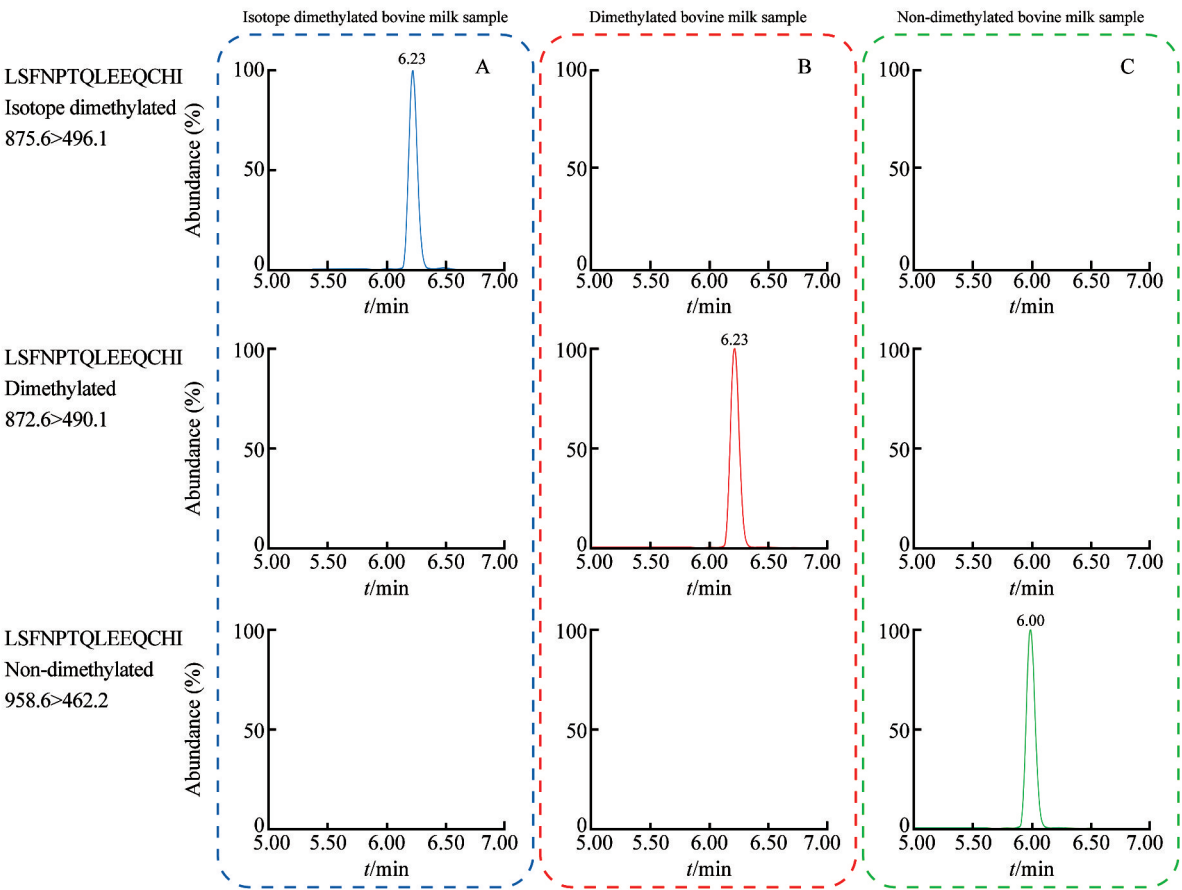


图 1 同位素二甲基衍生化的奶牛奶样品(A)、二甲基衍生化的奶牛奶样品(B)和无衍生化的奶牛奶样品(C)中同位素二甲基化特征多肽 LSFNPTQLEEQCHI (875.6 > 496.1)、二甲基化特征多肽 LSFNPTQLEEQCHI(872.6 > 490.1)以及多肽 LSFNPTQLEEQCHI(958.6 > 462.2)的多反应监测(MRM)色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of peptide LSFNPTQLEEQCHI with isotope dimethylation (875.6 > 496.1), dimethylation (872.6 > 490.1), and non-dimethylated (958.6 > 462.2) in isotope dimethylated bovine milk sample (A), dimethylated bovine milk sample (B), and non-dimethylated bovine milk sample (C)

2.3.2 特征多肽酶解水平与线性考察

在确定 MRM 参数以及二甲基衍生化效率之后,本研究考察了候选特征多肽在 0~6 h(0、0.5、1、2、3、4 和 6 h)内的酶解水平,平行实验 3 次,比较了各多肽达到最大酶解程度所需的时间。如表 2 所示,奶牛奶、水牛奶、牦牛奶的 10 条候选多肽酶解程度均可在 3 h 内达到最大,表明多肽酶解效率较高;但水牛奶多肽 YNVPQLEIVPNLAEEQLHSMK 等 4 条多肽(表 2 中标记*)在达到最大酶解水平后的几个小时内含量明显下降,表明其稳定性或抗基质干扰能力较弱。

奶牛、水牛和牦牛 3 个物种奶的候选多肽的线性结果如表 2 所示。奶牛与牦牛奶的候选特征多肽均表现出良好的线性关系,其线性相关系数 r^2 均大于 0.994。在水牛奶的候选多肽中,多肽 FQSEEQQMEDELQDK 与多肽 FFNDK 线性相关系数均低于 0.95,多肽 LSFNPTQLEEQCHV 与 SCQAQPTTMTR 线性相关系数大于 0.99,具有较好的线性关系。

依据实验结果,奶牛奶与牦牛奶中候选多肽符合酶解水平与线性考察的要求,因此确定候选多肽 LSFNPTQLEEQCHI(奶牛)与 LSFNPTQLEGQCHI(牦牛)即为其对应物种的特征多肽;而在水牛奶中,选择来自乳清蛋白的候选多肽 LSFNPTQLEEQCHV(水牛)与来自酪蛋白的特征多肽 SCQAQPTTMTRK(水牛)共同作为水牛奶特征多肽。此外,同时采用两条多肽可识别目标蛋白,以确定其来源于水牛酪蛋白,还是来源于水牛乳清蛋白,在婴儿配方粉等强化奶制品中可以实现乳清蛋白与酪蛋白的分别鉴

定。同理,在其余 5 个物种奶中,共有 9 条多肽(除驴奶 1 条以外,其余物种奶均选择乳清蛋白与酪蛋白中特征多肽各 1 条)被最终选作对应的特征多肽,详见表 3。

表 3 8 个物种奶特征多肽的氨基酸序列

Table 3 Amino acid sequences of specific peptides for 8 species milk

物种 Species	蛋白 Protein	特征多肽 Specific peptide
奶牛 Cow	β -乳球蛋白 β -Lactoglobulin	LSFNPTQLEEQCHI
水牛 Buffalo	β -乳球蛋白 β -Lactoglobulin	LSFNPTQLEEQCHV
	κ -酪蛋白 κ -Casein	SCQAQPTTMTR
牦牛 Yak	β -乳球蛋白 β -Lactoglobulin	LSFNPTQLEGQCHI
山羊 Goat	α -乳白蛋白 α -Lactalbumin	FLDDDLTDDIVCAK
	κ -酪蛋白 κ -Casein	SCQDQPTTLAR
绵羊 Sheep	β -乳球蛋白 β -Lactoglobulin	TPEVDNEALEK
	α s1-酪蛋白 α s1-Casein	ITMPLW
马 Horse	α s2-酪蛋白 α s2-Casein	LLYYEK
	β -酪蛋白 β -Casein	DTPVQAFLLYQDPR
驴 Donkey	α s1-酪蛋白 α s1-Casein	YNQLQLQAIYAQELIR
骆驼 Camel	α -乳白蛋白 α -Lactalbumin	LEQWQCEK
	α s1-酪蛋白 α s1-Casein	INEDNHPQLGEPVK

2.4 模拟混合样品的检测

为考察所筛选的 13 条特征多肽对各物种奶的分辨能力,采用上述方法对奶牛奶与其它 7 个物种奶的模拟混合样品进行了 MRM 检测,以奶牛奶标准曲线样品作为参考,分析各混合样品中奶牛奶特征多肽的含量,并计算出奶牛奶的混合比例。同理,以各物种奶标准曲线样品作为参考,获得对应混合样品中各物种奶的混合比例,并与理论值进行比较,结果见电子版文后支持信息表 S11。通过各物种奶特征多肽计算的样品混合比例与理论混合比例基本一致,并且依据多肽计算的比例所绘制的浓度曲线线性相关系数均大于 0.99,表明各物种奶特征多肽在与奶牛奶混合样品的鉴别过程中可保持良好的特异性。

为验证特征多肽在相近物种奶间的区分能力,针对奶牛、水牛和牦牛(组 A),山羊和绵羊(组 B)以及马和驴(组 C)3 个组进行了属内模拟混合样品考察,具体检测结果见电子版文后支持信息表 S12。结果表明,在 3 组共 5 个属内混合奶样品中,依据特征多肽计算所得混合比例与理论比例基本一致,各物种奶特征肽段表现出了良好的特异性。同时,还对 8 个物种奶进行了等比例混合,并考察了混合样品中各多肽的鉴别能力,结果表明,利用特征多肽计算获得的 8 个物种奶的实测比例均与理论比例(12.5%)相近(图 2)。

2.5 奶制品检测

利用本方法对 17 个不同物种来源的市售鲜奶及奶制品进行了物种来源鉴别,由于本研究采用各物种纯奶作为标准参考,并未合成多肽标准品,故无法对检测到的目标乳蛋白进行准确的定量分析。考虑到不同奶之间蛋白含量的个体差异以及奶与其它奶制品的蛋白含量差异,也很难以百分比表示检测到的蛋白,因此,仅对各实际样品进行了定性分析,其检测结果如电子版文后支持信息表 S13 所示,在市售的 9 个鲜奶样品中,均只发现其本身物种奶来源的特征多肽;在其余 8 个奶制品中,在 4 个样品中仅检测到其本身物种特征多肽。在牦牛高温灭菌乳样品 1、2,牦牛乳粉和山羊乳粉 1 中检测到了来自奶牛的特征多肽,见电子版文后支持信息图 S1,检测结果表明,本研究所筛选的 13 条特征多肽在加工奶

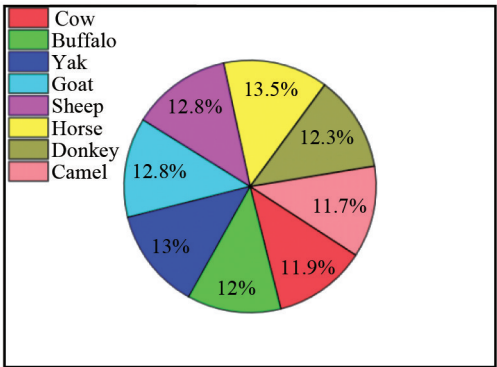


图 2 8 个物种奶等比例混合模拟样中各物种奶的实测比例分布图

Fig. 2 Result of intermixing experiment of 8 species milk mixed in equal proportion

制品的物种来源检测过程中具有良好的特异性,针对奶制品中的掺假具有分辨能力。

3 结论

本研究基于靶向蛋白质组学的分析原理,采用 UHPLC-Orbitrap MS 与 UHPLC-TQ MS,建立了奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、驴、马和骆驼 8 个不同物种奶的鉴别方法。利用二甲基衍生化实现对不同物种来源的多条多肽的分析比较,最终筛选出 13 条具有物种特异性的特征多肽,实现了对混合样品及实际奶制品中乳蛋白物种来源的鉴别。研究表明,特征多肽分析在多物种乳蛋白鉴别过程中不仅表现出良好的稳定性、特异性,同时还可满足高温灭菌乳或乳粉等加工奶制品的检测需求。本研究有望在奶制品行业的品质监管中发挥积极作用。

References

- [1] BARLOWSKA J, SZWAJKOWSKA M, LITWIŃCZUK Z, KRÓL J. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.*, 2011, 10(6): 291-302.
- [2] SHENG Q H, LI J C, ALAM M S, FANG X P, GUO M R. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2008, 43 (3): 568-572.
- [3] WANG J G, SUN Y J, MANG L. *Food Res. Dev.*, 2006, 22: 261-367.
- [4] VINCENZETTI S, POLIDORI P, MARIANI P, CAMMERTONI N, FANTUZ F, VITA A. *Food Chem.*, 2007, 106(2): 640-649.
- [5] HAENLEIN G. *Small Ruminant Res.*, 2004, 51(2): 155-163.
- [6] BARRIONUEVO M, ALFEREZ M J M, ALIAGA I L, SAMPELAYO M R S, CAMPOS M S. *J. Dairy Sci.*, 2002, 85(3): 657-664.
- [7] ALFEREZ M J M, BARRIONUEVO M, ALIAGA I L, SANZ-SAMPELAYO M R, LISBONA F, ROBLES J C, CAMPOS M S. *J. Dairy Res.*, 2001, 68(3): 451-461.
- [8] MIHIC T, RAINKIE D, WILBY K J, PAWLUK S A. *Evid-based. Compl. Alt.*, 2016, 21(4): 110-126.
- [9] MASKOVA E, PAULICKOVA I. *Czech J. Food Sci.*, 2006, 24(3): 127-132.
- [10] REN Q R, ZHANG H, GUO H Y, JIANG L, TIAN M, REN F Z. *J. Dairy Sci.*, 2014, 97(10): 6000-6006.
- [11] BEIER E, LEHENBAUER T W, SANGIAH S. *Small Ruminant Res.*, 2000, 37(3): 209-214.
- [12] HADDADIN M S Y, GAMMOH S I, ROBINSON R K. *J. Dairy Res.*, 2008, 75(1): 8-12.
- [13] ROY D, YE A, MOUGHAN P J. *J. Dairy Sci.*, 2020, 103(7): 5844-5862.
- [14] CHEN P K, CHANG L W, CHUNG Y Y, LEE M H, LING Y C. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18: 1167-1171.
- [15] YANG Y, BU D, ZHAO X, SUN P, WANG J Q, ZHOU L Y. *J. Proteome Res.*, 2013, 12(4): 1660-1667.
- [16] CALVANO C D, DE CEGLE C, MONOPOLI A, ZAMBONIN C G. *J. Mass Spectrom.*, 2012, 47(9): 1141-1149.
- [17] MARX V. *Nat. Methods*, 2013, 10: 19-22.
- [18] ALEXIA G, VALERIE C, AZEMI B, FLEUR G, JACQUES T, VERONIQUE M. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2019, 173: 96-107.
- [19] CZERWENKA C, MAIER I, POTOCNIK N, PITTNER F, LINDNER W. *Anal. Chem.*, 2007, 79(14): 5165-5172.
- [20] ZHANG J, LAI S, ZHANG Y, HUANG B, LI D, REN Y. *Anal. Chim. Acta*, 2012, 727: 47-53.
- [21] CAMERINI S, MONTEPELOSO E, CASELLA M, CRESCENZI M, MARIANELLA R M, FUSELLI F. *Food Chem.*, 2016, 197: 1240-1248.
- [22] SUN Y, WANG C, SUN X, GUO M. *J. Dairy Sci.*, 2020, 103(10): 8732-8740.
- [23] MAITY S, AMBATIPUDI K. *Res. Vet. Sci.*, 2019, 125: 244-252.
- [24] KE X, ZHANG J, LAI S, CHEN Q, ZHANG Y, JIANG Y, MO W, REN Y. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, 409(1): 213-224.
- [25] DICULESCU V, ENACHE T. *J. Electroanal. Chem.*, 2019, 834: 124-129.
- [26] HSU J L, HUANG S Y, CHOU N H, CHEN S H. *Anal. Chem.*, 2003, 75(24): 6843-6852.

Application of Targeted Proteomics in Species Identification of Milk Proteins in Multi-species Milk Products

CHEN Yu-Tian¹, REN Yi-Ping², WANG Li-Li^{*1}, HUANG Zhong-Ping^{*1}

¹(*College of Chemical Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China*)

²(*Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Zhejiang Analysis and Test Center, Jiaxing 314006, China*)

Abstract A method based on target proteomics and ultrahigh performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry/tandem mass spectrometry was established for species identification of milks and dairies from cow, buffalo, yak, goat, sheep, horse, donkey and camel. Tryptic hydrolyzed peptides from 6 kinds of milk proteins in 8 species were analyzed and screened through theoretical analysis, instrument examination, investigation of interferences, linearity and digestion speed. A total of 13 specific peptides were finally chosen and applied to identification and detection of multi-species for milk mixture samples and commercial dairies. The results showed that specific peptides maintained good stability and specificity during species analysis. This method provided valuable suggestion in quality control and supervision of multi-species dairy industry.

Keywords Targeted proteomics; High performance liquid chromatography-mass spectrometry; Species identification; Milk protein

(Received 2020-12-18; accepted 2021-04-22)