

利用 Perfinity iDP-LCMSMS 系统构建牛奶中 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白的定性定量分析方法之外标法

LCMSMS-415

摘要： 本文使用岛津在线蛋白酶切高效液相色谱仪 Perfinity iDP 和 LCMS-8060 液质联用系统建立了牛奶中 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白定性定量分析方法。首先结合 Skyline 软件实现 A1 β 和 A2 β -酪蛋白特征肽段筛选以及 MRM 能量优化，然后利用在线蛋白酶切高效液相色谱仪 Perfinity iDP 优化在线酶解和液相条件，从而实现 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白的全自动在线酶切和特征肽段定量分析。两种蛋白的标准曲线相关系数均大于 0.99，特征肽段的准确度范围在 88.1~114.0% 之间。

关键词： A1 β -酪蛋白 A2 β -酪蛋白 Skyline 定性定量分析 在线蛋白酶切 LC-MS/MS

牛奶中占总乳蛋白质 30% 的 β -酪蛋白是人体氨基酸的重要来源，并能促进矿物质在人体内的消化及吸收，是目前国内外牛奶研究与开发的热点之一。 β -酪蛋白基因的不同突变导致了 12 种基因变异，而 A1 和 A2 是最常见的变异。这两种 β -酪蛋白仅体现在第 67 位氨基酸的不同，A1 型在该位置上为组氨酸，A2 型为脯氨酸，正是这个微小的差异导致了代谢产物的不同。A1 β -酪蛋白在体内消化过程中会产生 β -酪啡肽 -7 (BCM-7)，而 A2 β -酪蛋白在体内消化时不会产生 BCM-7。有研究表明 BCM-7 可能干扰人体正常代谢，因为它可能会影响神经、内分泌和免疫系统中的许多阿片类受体。因此，A2 β -酪蛋白可以有效降低 BCM-7 干扰体内自然消化过程的机会，更有利于促进婴幼儿的生长发育。而今天全球普遍存在的是 A1 β -酪

蛋白，现在市面上有很多品牌的牛奶都标识为 A2 奶，但是无法辨别真假。目前国内还没有成熟的分析方法。相关部门为了对该类产品进行鉴定，急需建立一套定性定量方法对 A2 奶进行分析。

随着液相色谱和质谱技术以及生物样品分离技术的发展，LC-MS/MS 定量技术在蛋白质定量研究中的应用日益广泛。相对于传统的免疫分析方法（例如 ELISA），LC-MS/MS 定量技术提高了蛋白分析的精密度和准确度。本文基于岛津在线蛋白酶切高效液相色谱仪 Perfinity iDP 和 LCMS-8060 液质联用系统，通过 Skyline 设计完成 MRM 通道的优化，实现 A1 β 和 A2 β -酪蛋白特征肽段筛选以及能量优化，进一步建立外标定量分析方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

1.1.1 方法优化

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站，Skyline Ver.3.5.0.9319 软件。

1.1.2 在线蛋白酶切定量

在线酶切定量使用岛津在线蛋白酶切高效液相色谱仪 Perfinity iDP 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-20AD、LC-20ADXR \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站，Perfinity 1.0 软件。

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱 : Peptide C18 2.0 mm I.D.× 150 mm L., 1.7 μm
流 动 相 : A 相 -0.1% 甲酸水溶液 B 相 -0.1% 甲酸乙腈
流 速 : 0.4 mL/min
柱 温 : 40°C
进 样 量 : 10 μL
梯 度 洗 脱 : B 相初始浓度为 20%, 8 分钟内线性升到 90%。

质谱条件

分 析 仪 器 : LCMS-8060 源 温 度 : 300°C
离 子 化 模 式 : ESI(+) D L 温 度 : 200°C
离 子 源 接 口 电 压 : 4.0 kV 加 热 模 块 温 度 : 400°C
加 热 气 : 空气 10.0 L/min 扫 描 模 式 : 多反应监测 (MRM)
雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 驻 留 时 间 : 60 ms
干 燥 气 : 氮气 10.0 L/min 定 量 分 析 MRM 参 数 : 见表 1
碰 撞 气 : 氦气

1.3 样品前处理过程

纯的 A1β- 酪蛋白牛奶和纯的 A2β- 酪蛋白牛奶处理流程 (用于 MRM 参数优化) : 经称量、溶解、定容后, 用二硫苏糖醇 (DTT) 将蛋白质分子内或分子间的二硫键打开, 再用碘代乙酰胺 (IAA) 进行烷基化, 后加入过量的碱性胰蛋白酶, 在 37°C 下过夜酶解。

标准曲线制备: 将纯 A1β- 酪蛋白牛奶和纯 A2β- 酪蛋白牛奶按照二者比例为 9/95、10/90、25/75、50/50、75/25、90/10 分别混合后, 配制成浓度为 5%A1 (95%A2)、10% A1 (90%A2)、25% A1 (75%A2)、50% A1 (50%A2)、75% A1 (25%A2)、90% A1 (10%A2)、95% A1 (5%A2) 系列溶液。

标准曲线以及实际样品处理流程: 样品经称量、稀释、定容后, 用二硫苏糖醇 (DTT) 将试样中的蛋白质分子内或分子间的二硫键打开, 利用碘代乙酰胺 (IAA) 进行烷基化后待用。

表 1 MRM 参数

蛋白名称	肽段选择	MRM 通道 [m/z]	CE (V)
A1β-酪蛋白	IHPFAQTQSLVYPPFGPIHNSLPQN IPPLTQTPVWVPPFLQPEVMGVSK	1064.2>1428.75	-26.5
		1064.2>846.45	-44.5
		1064.2>714.9*	-26.5
		1064.2>423.7	-26.5
A2β-酪蛋白	IHPFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQN IPPLTQTPVWVPPFLQPEVMGVSK	1072.2>1428.75	-26.8
		1072.2>846.45	-38.8
		1072.2>714.9*	-26.8
		1072.2>423.7	-26.8

注: * 表示定量离子

■ 结果与讨论

2.1 多特征肽段 MRM 参数优化

根据 Trypsin 酶的酶解位点推测 A1 β - 酪蛋白和 A2 β - 酪蛋白的特征肽段分别为 IHPFAQTQSLVYFPFGPIHNS LPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK 和 IHPFAQTQSLVY PFGPIPNLSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGV SK, 利用 Skyline 软件预测这两个蛋白的 MRM 通道, 将预测结果导入到 LabSolutions 中建立 LC-MS/MS 方法, 进样分析, 分析结果显示 A1 β - 酪蛋白和 A2 β - 酪蛋白的特征肽段带 5 个电荷时灵敏度和稳定性最好。MRM 离子对通道确定后对碰撞能量进行优化 (图 1), 借助 Skyline 软件在分析结果中筛选最优碰撞能量。

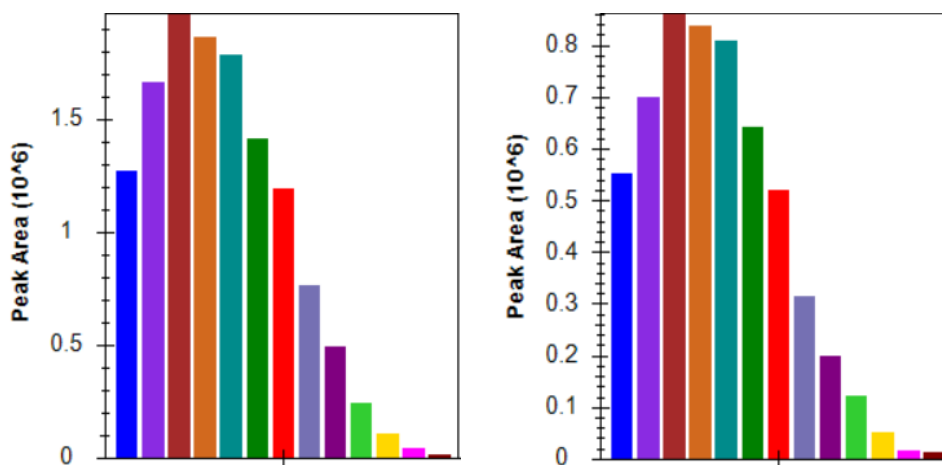


图 1 A1 β - 酪蛋白的特征肽段中离子对 1072.2 > 714.9 (图 1a) 和 A2 β - 酪蛋白的特征肽段中离子对 1064.2 > 714.9 (图 1b) 的 CE 能量优化结果 (Skyline 软件)

2.2 Perfinity iDP 在线酶切参数设置

利用 Perfinity iDP 和 LCMS-8060 联用系统对 A1 β - 酪蛋白和 A2 β - 酪蛋白进行定性定量分析, 操作简单方便, 仅需 16.54 min 即可完成包括在线酶切在内的整个分析过程。直接将还原烷基化的牛奶样品上机分析, 在线酶解时间设置为 2 min, 酶解完成后经脱盐柱脱盐, 7 min 后进入色谱柱进行色谱分离, 利用 LCMS-8060 检测酶解后的特征肽段。在 Perfinity iDP 配套软件中输入酶解时间、色谱柱尺寸、流速、柱温以及梯度洗脱的起始和终止浓度, 软件会自动生成在线酶切的时间程序 (图 2)。

时间	单元	处理命令	值
1	0.01 控制器	Event	12
2	0.01 泵	B.Conc	20
3	0.01 泵	C.Flow	0.05
4	0.01 控制器	Start	1)
5	4.01 泵	C.Flow	0.05
6	4.11 泵	C.Flow	0.2
7	4.61 控制器	Event	0
8	4.61 泵	C.Flow	0.2
9	4.61 泵	SV(Pump C)	D
10	4.71 泵	C.Flow	2
11	6.11 泵	SV(Pump C)	B
12	7.11 泵	C.Flow	2
13	7.12 泵	C.Flow	0.1
14	7.22 控制器	Event	14
15	7.22 泵	B.Conc	20

图 2 在线酶切、脱盐和分析时间程序表

2.3 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白定量分析方法建立

利用 Skyline 软件导出含最优碰撞能量的 MRM 列表和 Perfinity iDP 构建的在线酶解分析的时间程序表, 构建 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白完整的 LC-MS/MS 方法, 定量分析的典型色谱图如图 3 所示, A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白混合牛奶在 A1 β -酪蛋白 5%-95% (A2 β -酪蛋白 95%-5%) 范围内特征肽段具有良好的线性关系, 标准曲线见图 4。实验结果证明通过 Skyline 筛选出的特征肽段在生物基质中满足特异性要求, 其中 IYPTNGYTR 灵敏度较高, 作为定量肽段; GLEWVAR 和 FTISADTSK 具有较好的选择性, 可作为定性肽段进行分析。

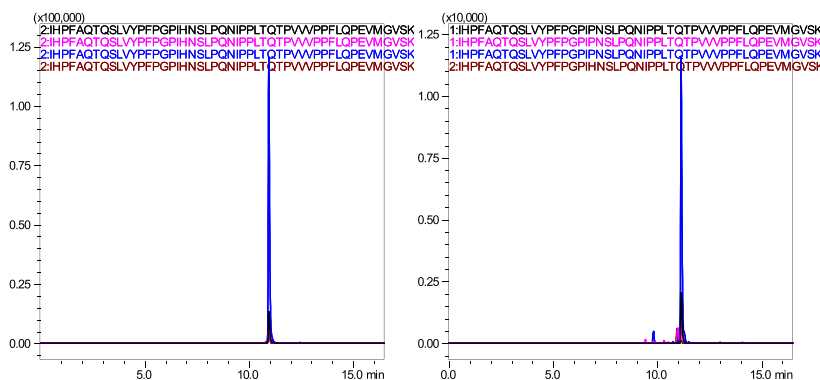


图 3 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白 LC-MS/MS 分析获得的典型色谱图

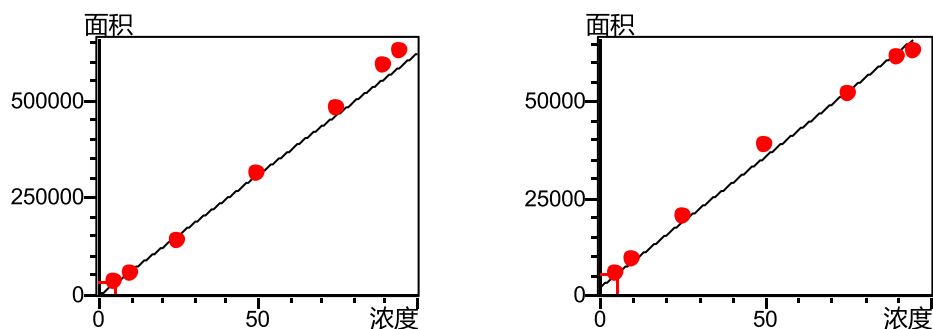


图 4 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白牛奶混合比例标准曲线

表 2 标准曲线的线性方程和相关系数

蛋白名称	校准曲线	线性范围	相关系数 r	准确度 (%)
A1 β -酪蛋白	$Y = (6221.33)X + (-793.962)$	5-95%	0.9946	88.1~114.0
A2 β -酪蛋白	$Y = (675.202)X + (2143.33)$	5-95%	0.9981	82.3~109.7

2.4 牛奶样品分析结果

表 3 不同批次牛奶中 A1 β -酪蛋白和 A2 β -酪蛋白占总 β 酪蛋白含量

奶粉批号	A1 β -酪蛋白 %	A2 β -酪蛋白 %
A1A2-1	50%	50%
A1A2-2	42%	58%
A1A2-3	46%	54%
A1A2-4	36%	64%
A1A2-5	45%	55%

实验结果显示抽中的 5 批牛奶样本所含 β 酪蛋白中 A1 β - 酪蛋白和 A2 β - 酪蛋白含量相当，A2 β - 酪蛋白含量在 50-64% 之间。这几批次牛奶都不能称之为真正的 A2 奶，A2 奶要求产品中 A2 β - 酪蛋白的含量为 100%。

■ 结论

本文使用岛津在线蛋白酶切高效液相色谱仪 Perfinity iDP 和 LCMS-8060 液质联用系统建立了牛奶中 A1 β - 酪蛋白和 A2 β - 酪蛋白定性定量分析方法，首先借助 Skyline 软件实现 A1 和 A2 β - 酪蛋白特征肽段筛选以及能量优化，之后在线酶解高效液相色谱仪 Perfinity iDP 上优化在线酶解和液相条件，从而实现 A1 β - 酪蛋白和 A2 β - 酪蛋白的全自动在线酶解和特征肽段定量分析。两种蛋白的标准曲线相关系数均大于 0.99，标准品准确度范围在 88.1~114.0% 之间。利用该定量方法分析检测了 5 批牛奶样本。该方法分析速度快、方便快捷，适合牛奶中 A1 和 A2 β - 酪蛋白的定性定量检测。

岛津应用云

