

## 利用质谱分析仪 MALDI-TOF MS 分析动物的毛发

大箸 信一\*<sup>1</sup>、岛 圭介\*<sup>2</sup>

关键词：动物毛发，山羊绒，羊毛，混合率，异物分析

1) 大阪大学研究生院工学研究科  
2) S&B 食品株式会社



材料

### ■ 摘要

2018 年，通过使用质谱分析仪 MALDI-TOFMS 检测动物种类特异性的兽毛肽的辨别动物毛发的方法成为 ISO 标准得以发表。该辨别方法也适用于一根毛发的分析，因此不仅可以防止伪造山羊绒，也可应用于羽毛和人体毛发等各种动物毛发的辨别以及食品混入异物的检查。

本文中除以往标准型号的 MALDI-TOF MS AXIMA Performance 之外，还将向您介绍使用价格更加低廉、结构紧凑的台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020，根据 ISO 标准进行动物毛发纤维定性 / 定量的分析案例。

### 1. 前言

正确分析动物毛发（动物的毛）的技术在各种领域中扮演着重要角色。兽毛应用于大衣、上衣、毛衣等各种纤维产品中。根据家庭用品质量显示法的规定，这些纤维产品必须标明纤维的种类，使用多种纤维时必须表示其混用率。此外，在食品中混入毛发时，确定其种类是明确混入路径的重要手段。

以往，几乎所有确定动物毛发种类的方法都是使用显微镜。毛皮的话，可以根据外观相对容易地推测出动物种类，但纤维产品的话，经过了脱色、染色等处理，难以通过外观推测出动物皮毛的种类。使用显微镜，以 400 倍左右的倍率进行观察，可以在毛发表面看到被称为角质层的鳞状结构，此外还可以在毛发中央部分观察到被称为毛髓质的、内含空气的结构。通过详细观察毛发的粗细、颜色以及毛发的形状，可以判别动物毛发的种类。

\*1 金泽工业大学基因组生物工学研究所  
\*2 株式会社岛津制作所全球应用开发中心

但是，10多年前，有人使用难以与山羊绒区分开来的牦牛假冒山羊绒，更加客观的分析动物毛发的方法得以开发。

人与动物毛发的结构十分相似。除去水分后，毛发的90%左右由蛋白质构成。图1所示为动物毛发的结构。以角蛋白I和角蛋白II等分子量在5万左右的蛋白质成对的结构为基础，这些蛋白质大量聚集在一起形成纤维状结构。除此之外，在其周围包裹被称为角蛋白结合蛋白质的低分子量蛋白质，形成角质层等。角蛋白蛋白质含有大量胱氨酸，硫磺原子，由两个原子结合在一起，形成牢固的网状结构。

## 2. 试样的准备和质谱分析

毛发在防御外部冲击的同时，还具有保温的作用，其功能与毛发的结构存在着密切的关系。毛发的蛋白质中包含有大量胱氨酸，通过二硫键在分子内、分子间形成大量交叉链接结构。为了对毛发进行化学分析，需要将其溶解，使用被称为还原剂的物质切断二硫键结合。另外，得到的蛋白质提取液含有多种蛋白质及盐类等，所以需要多用磷酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)等进行提纯。一系列的操作流程如图2所示。具体的提取操作和精制操作将在2.1以后介绍。

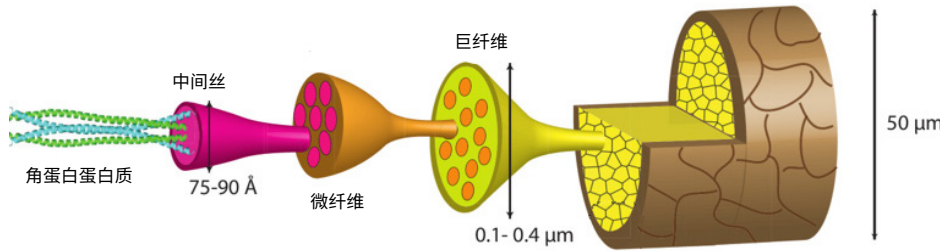


图1 动物毛发的模式图

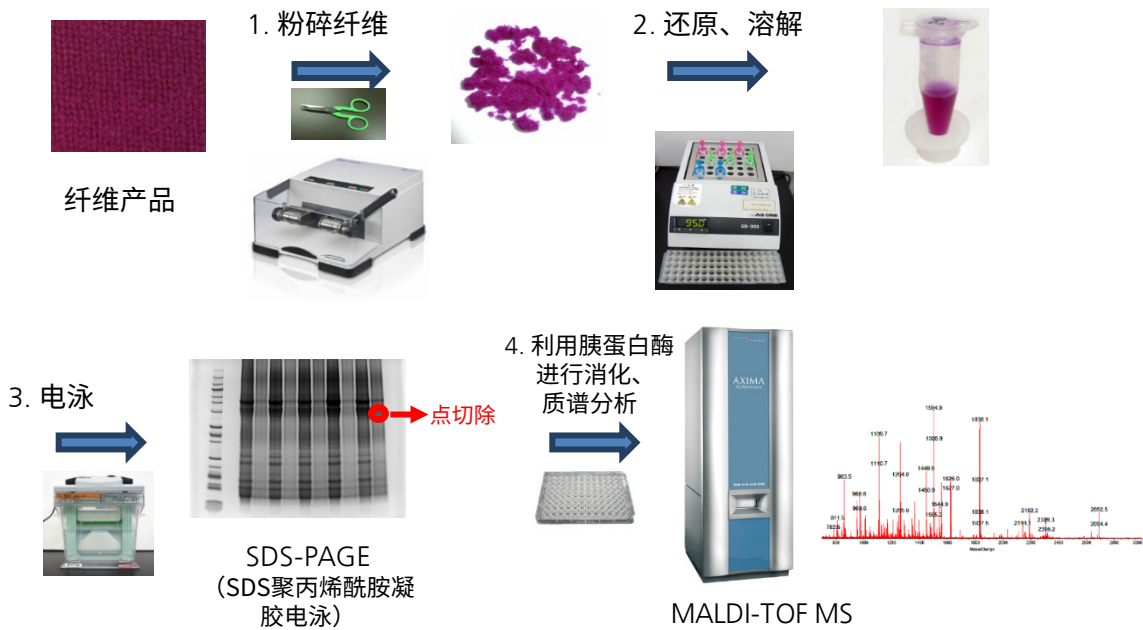


图2 利用 MALDI-TOF MS 分析动物毛发的方法

1. 使用剪刀和球磨机粉碎动物毛发纤维，
2. 还原、溶解纤维，
3. 电泳已溶解的蛋白质溶液，
4. 对切取的点进行胰蛋白酶消化、质谱分析

### 2-1. 蛋白质的提取和 SDS-PAGE<sup>1)</sup>

取 100 ~ 200 mg 的毛发、线、布等试样放入 50 mL 烧杯中，用前端尖锐的剪刀剪 4~5 分钟左右。量取约 10~20 mg 剪后试样放入 2 mL 的反应管中。

然后，向放有试样的反应管中加入 0.5mL 含 4%SDS 的磷酸缓冲液 (0.1 M、pH 7.8)，再加入 10 $\mu$ L 二硫苏糖醇 (DTT) 水溶液 (50 mM)，使用旋涡混合器充分搅拌。

将反应管放入铝电解槽，在 95 °C 下反应 15 分钟。

从电解槽中取出反应管，使用离心机在室温、6500G 下离心 1 分钟。追加 10  $\mu$ L DTT 水溶液，再次在 95 °C 下反应 15 分钟。

结束后，从电解槽中取出反应管，使用离心机在 50G 下离心 1 分钟，加入 50  $\mu$ L 碘乙酰胺 (IAA) 溶液，在 25 °C 下反应 15 分钟。离心后，加入 20  $\mu$ L DTT 水溶液，停止 IAA 反应。使用离心机在室温、15000G 下离心 5 分钟。使用移液管将上清液移至其他管内，供之后的分析使用。为防止 SDS 沉淀，在室温下保存试样，不要放入冷库。

使用微板电泳装置、微凝胶对蛋白质提取液进行部分纯化。直接使用蛋白质提取液原液，或使用试样稀释液稀释至 2~3 倍，添加 5  $\mu$ L~10  $\mu$ L 作为 SDS-PAGE 的试样。

电泳 10~20 分钟后，从电泳装置中取出凝胶，水洗后，使用 CBB 染色液进行染色。确认到蛋白质带后，去除染色液，用水脱色。

通常可在上端、中央、下段确认到蛋白质带。将中央的带切成直径 1 mm 左右的圆或同等大小的四方形。将切好的凝胶放入 96 孔微板，加入 100  $\mu$ L 50 mM 碳酸氢铵/50% 乙腈，放置 10 分钟。去除清洗液后，再次重复 2 次相同的操作。此时的放置时间也可作为 1 分钟左右。进行 3 次清洗之后，加入 100  $\mu$ L 乙腈，吸去。放置 10 分钟左右后，使凝胶干燥。

### 2-2. 胰蛋白酶处理

在干燥的凝胶上加入 35  $\mu$ L 胰蛋白酶溶液 (1  $\mu$ g/mL 50 mM 碳酸氢铵水溶液)，盖上封板条防止干燥，在 60 °C 下反应 30 分钟，或在 37 °C 下反应一整夜。

使用安装有 C18 填充硅胶移液管前端的 10  $\mu$ L 移液管吸出、排出胰蛋白酶处理液。重复 10 次左右后，用 0.1% TFA 溶液清洗 3 次。最后吸入 1.5~2  $\mu$ L 基质溶液 (5 mg/mL 0.1 %TFA、70% 乙腈)，在 MALDI-TOF MS 用的金属板上吸出、排出 5 次后，最终排出。

### 2-3. 胰蛋白酶处理肽的 MALDI-TOF MS 分析

使用 MALDI-TOFMS 测定金属板上点出的样品。搭载于中端以上机型的高精度测定模式中的反射子模式和搭载于低端以上机型的高灵敏度测定模式中的线性模式均可进行测定。对激光功率等的测量条件进行调整，以便在观察到动物种类特异性峰值的 m/z 2450-2750 的区域获得良好的分辨率。

针对同一样品重复照射 50 次激光，取其平均值作为 1 次的测定值。至少重复 3 次该测定。观察所得质谱 m/z 2450-2750 范围的峰谱，确定所含动物种类。

### 3. 利用 MALDI-TOF MS 确定动物毛发的方法

图3所示为使用 SDS-PAGE 分析动物纤维提取液的结果。在分子量 4~6 万的范围内观测到 2 根带, 并且在分子量更低的范围内观测到多根带。图 4(a)~(e) 所示为山羊绒, 从各带采集点, 针对各点进行胰蛋白酶处理后进行质谱分析。

针对各质谱数据与数据库进行比对, 结果表明条带 1 为角蛋白 Type II, 条带 2 为角蛋白 Type I 的蛋白质。其他带推测为角蛋白结合蛋白的产物, 但并无法鉴定。

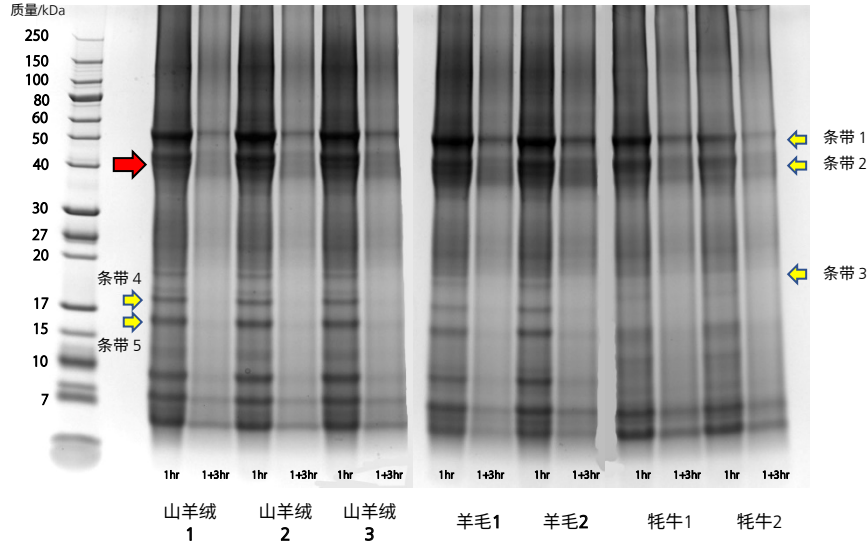


图3 动物毛发蛋白质提取液的 SDS-PAGE 横纹的部分表示存在各自不同的蛋白质。鉴定动物种类利用红色箭头所示的带。黄色箭头所示的带为胰蛋白酶处理后, 观察动物之间的谱图差异。

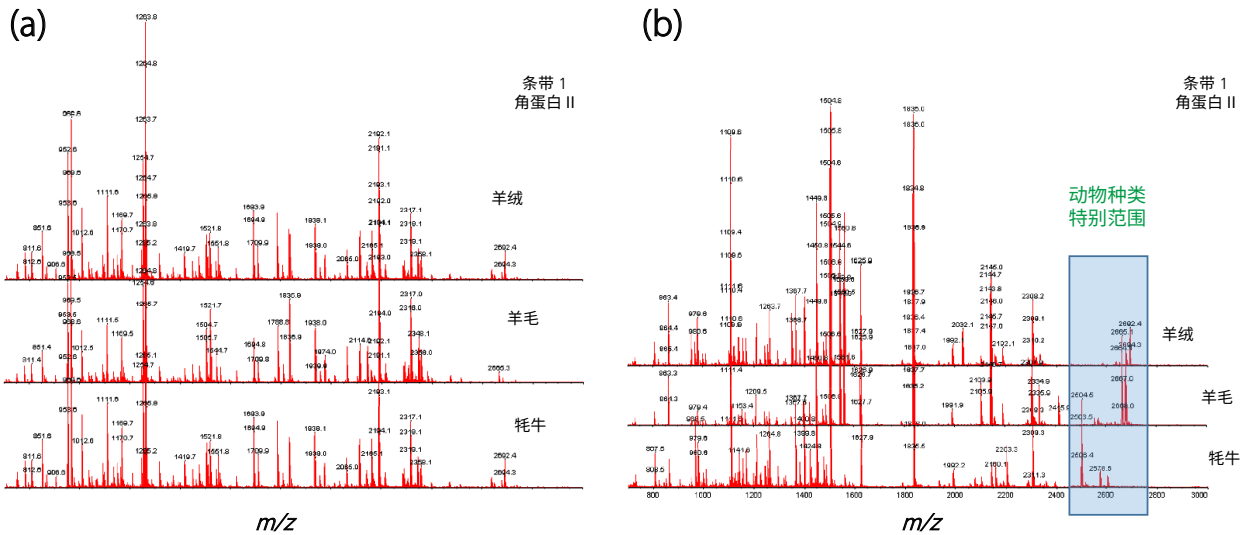


图4 针对各蛋白质带进行胰蛋白酶处理所得的 MALDI-TOF MS 谱图比较 (a) Band1 Keratin II (b) Band2 Keratin I

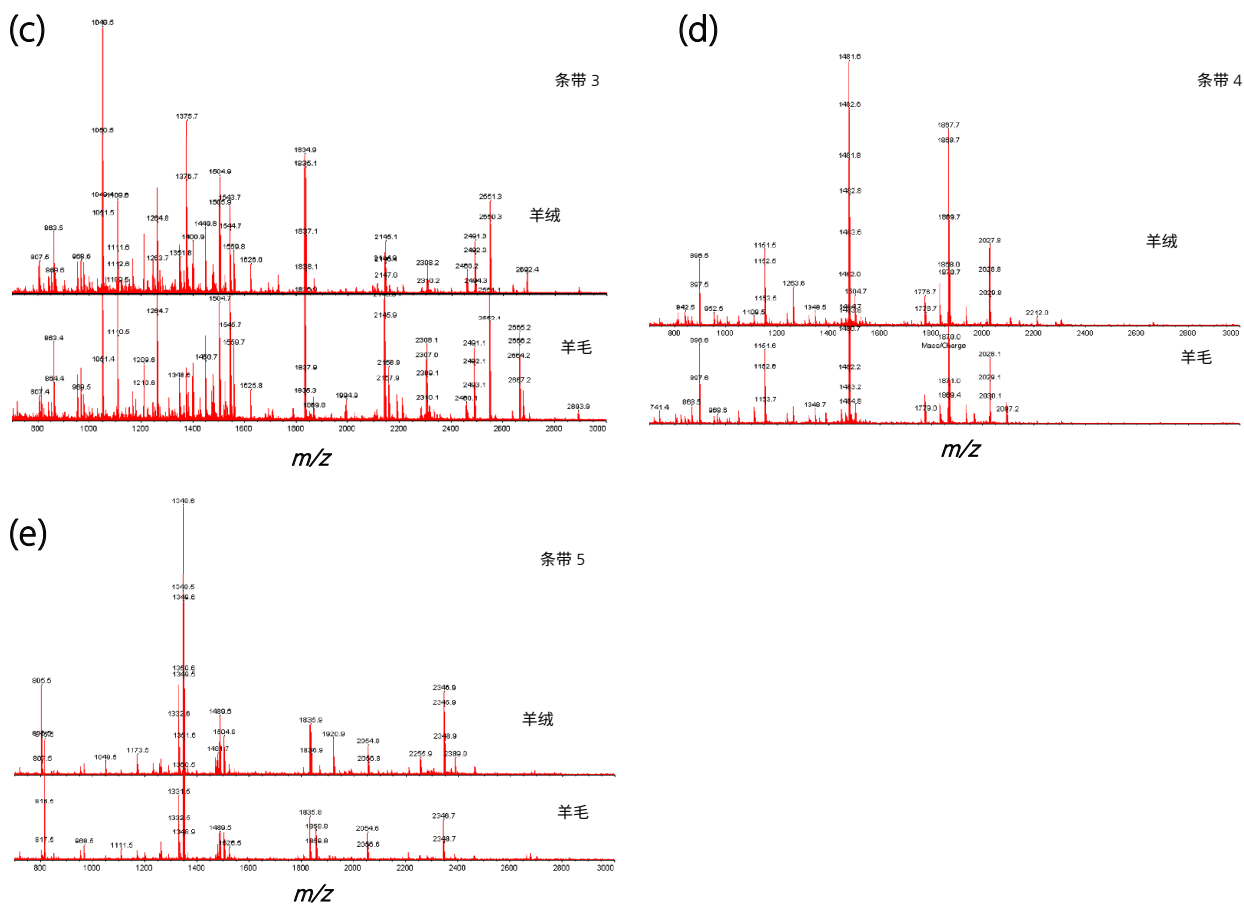


图 4 针对各蛋白质带进行胰蛋白酶处理所得的 MALDI-TOF 谱图比较  
(c) Band3 (d) Band4 (e) Band5

然后，对羊毛、牦牛也进行了同样的测定，探索三者之间不同位置的峰谱。各自带中所得的各动物谱图非常相似，特别是山羊绒和羊毛之间，很难看出有何不同。其中在带 2 的  $m/z$  2450-2750 范围内发现动物种类特别的峰谱。图 5 所示为其谱图。

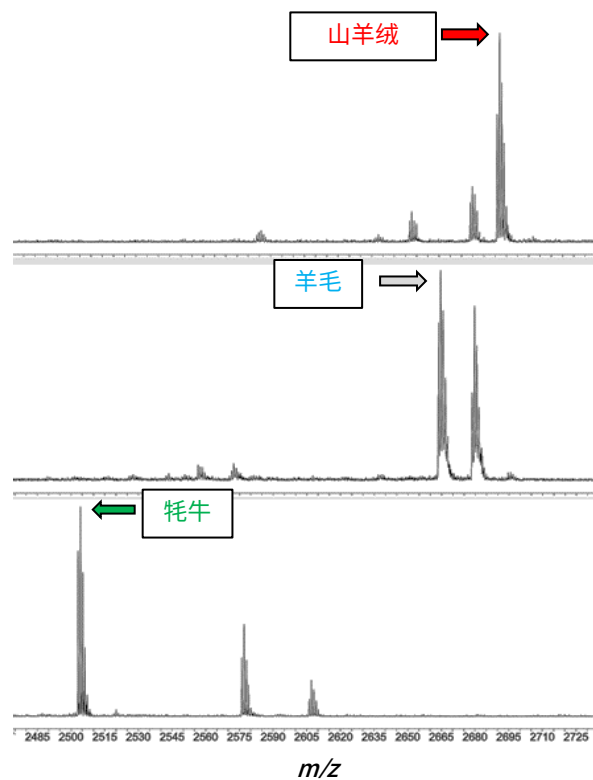


表 1 动物种类特别肽的氨基酸排列<sup>\*1</sup>

	m/z	氨基酸排列	蛋白质名
山羊绒	2691.17	YSCQLNQVQSLISNVESQLAEIR	角蛋白 33A[ 山羊 ]
	2679.08	YSCQLNQVQSLISNVESQLAEIR	酸性毛发角蛋白 1[ 山羊 ]
	2637.12	YSCQLSQVQSLIVSVESQLAEIR	预测：低质量蛋白：角蛋白，I 型表皮 Ha4 样 [ 山羊 ]
	2535.03	YSSQLAQMQGLIGNVESQLAEIR	预测：低质量蛋白：角蛋白，I 型表皮 Ha5[ 山羊 ]
羊毛	2664.01	YSCQLSQVQSLIVNVESQLAEIR	角蛋白 33B[ 绵羊 ]
	2679.92	YSCQLNQVQSLISNVESQLAEIR	角蛋白 31[ 绵羊 ]
	2550.90	YSSQLAQMQGLIGNVESQLAEIR	Rec 名称：全称 = 角蛋白，I 型表皮 Ha5；其他名称：全程 = 角蛋白 -35；缩写 =K35
牦牛	2504.04	YSSQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	角蛋白，I 型微原纤，47.6 kDa 样 [ 牦牛 ]
	2576.02	YSCQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	TPA：角蛋白 31[ 牦牛 ]
	2534.98	YSSQLAQMQGLIGNVESQLAEIR	预测：角蛋白，I 型表皮 Ha5[ 牦牛 ]

\*1 涂黑色的峰谱为主要峰谱

针对这些动物种类特别峰谱进行 MS/MS 解析，推测氨基酸排列，结果如表 1 所示<sup>2)</sup>。由 23 个氨基酸组成的肽当中，山羊绒与羊毛之间有 1 个氨基酸不同，山羊绒与牦牛之间有 4 个氨基酸不同。

在大多数纤维产品的加工工序当中，均进行了漂白、脱色、染色等化学处理，但是动物毛发的特别峰谱位置并不会因这些处理而发生改变，也可用于鉴定纤维产品中的动物毛发。

分析一根毛发时，将以 1/5 左右的比例进行前文所述的蛋白质提取法。提取后的处理可与通常分析法相同。图 6 所示为 SDS-PAGE 的示例。电泳会在 15 分钟左右后停止，因而电泳距离短，却可清晰地确认角蛋白 I 及角蛋白 II 的带。切取该部分并脱色后，进行胰蛋白酶处理。胰蛋白酶处理的时间为 60°C 下 30 分钟，或在 37°C 下进行一整夜。图 7、图 8 所示为由此所得的各种动物谱图的示例。

## 4. 一根毛发的分析

分析纤维产品中的动物毛发时，为避免产品中的构成偏差，希望从大范围的产品当中进行抽样平均，使用其中的一部分。因此很少会要求进行微量分析。另一方面，分析混入食品等中的毛发时，则希望以尽可能少量的试样进行分析。

很多科学调查均是通过毛发的 DNA 分析，获得血型等可以确定个人的信息。但是，纤维产品中所使用的动物毛发多为羽干部分，特别是大量染色的产品，很多时候难以分析 DNA。由于 MALDI-TOF MS 法会分析蛋白质，因此即使是一根毛发也足以进行测定。

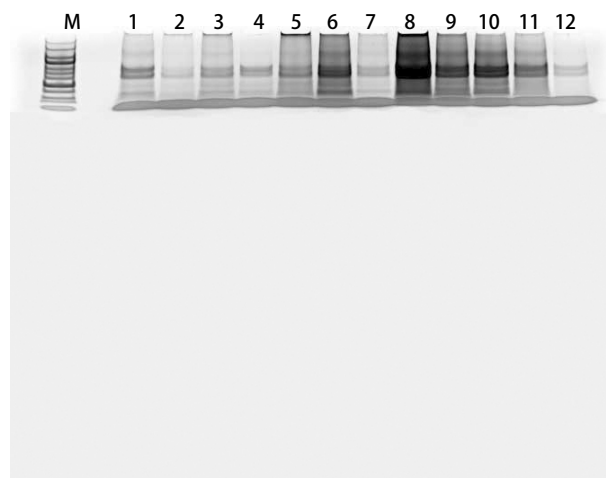


图 6 由 1 根毛发提取的蛋白质的 SDS-PAGE  
电泳时间：15 分钟、凝胶大小：90×83 mm、凝胶浓度：12.5%、  
电泳缓冲：Tris-MOPS SDS、胰蛋白酶处理：37 °C、一整夜  
1 绒山羊，2 绵羊，3 牦牛，4 安哥拉山羊，5 骆驼，6 马，7 牛，  
8 狗，9 猫，10 人，11 狸，12 狐狸。

不同动物种类的特别峰谱位置各不相同，但多数情况下，同属动物之间的峰谱出现在相同位置。山羊绒和安哥拉山羊毛等需要另外通过显微镜进行区分。表 2 所示为主要动物特别峰谱的峰谱位置 (m/z) 与跟据数据库推测的氨基酸排列。貉、狐狸、犬的主要峰谱位置相同，而狐狸、犬分别在 2638、2641 处观察到第二峰谱，由此可以进行判别。除这里所示的动物之外，利用基因组数据库可以推测、确认动物特别峰谱的位置。像这样仅观察 m/z 2450-2750 的谱图即可确定所含动物毛发种类是 MALDI-TOF MS 法的一大特征。

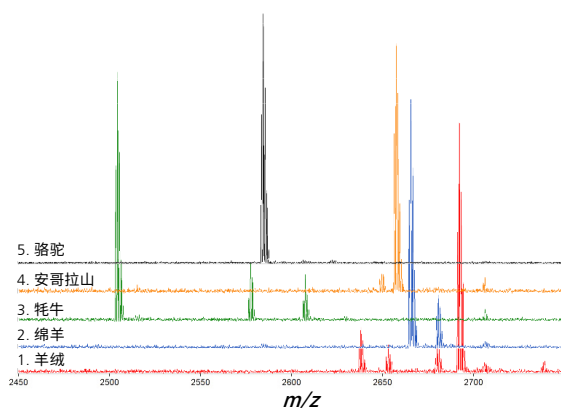


图 7 利用一根毛发的 MALDI-TOF MS 分析所得的动物种类特别峰谱 (1)

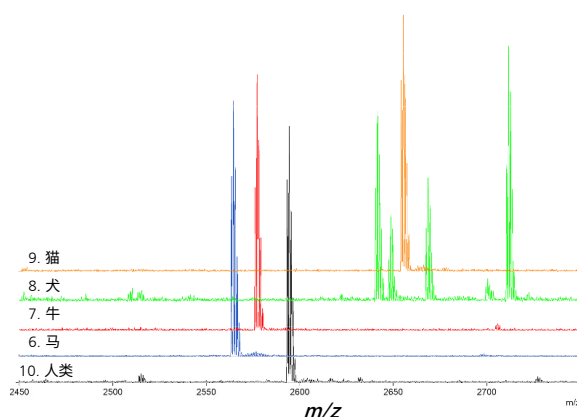


图 8 利用一根毛发的 MALDI-TOF MS 分析所得的动物种类特别峰谱 (2)

表 2 动物种类特别肽的氨基酸排列和峰谱位置 (m/z)

动物名	学名	氨基酸排列*1	Peak1	Peak2
猪	家猪	YSSQLAQVQGLIGNVEAQLAEIR	2487.3	
牦牛	牦牛	YSSQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	2503.3	2576.3
毛丝鼠	长尾龙猫	YGSQLAQVQHLLISSVESQLAEIR	2556.3	
马	家马	YSSQLSQVQGLITNVESQLAEIR	2563.3	
日本鹿	梅花鹿	YSSQLSQVQGLITNVESQLAEIR	2576.3	2503.3
牛	家牛	YSCQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	2576.3	
土拨鼠	旱獭	YSSQLSQVQGMITNVESQLAEIR	2581.3	
骆驼	野骆驼	YGSQLSQVQGLITNVEHQLAEIR	2583.4	
羊驼	羊驼		2583.4	
人	晚期智人	YSSQLSQVQSLITNVESQLAEIR	2593.3	
豹	豹	YSAQLGQVQCMITNVESQLAEIR	2657.3	2638.3
海狸鼠	河狸鼠		2652.1	
猫	家猫	YSSQLGQVQCMITNVESQLAEIR	2654.3	
欧亚猞猁	猞猁	YSSQLGQVQCMITNVESQLAEIR	2654.3	
兔子	家兔	YSSQLSQVQCMISNVESQLGEIR	2656.3	
安哥拉兔毛	家兔	YSSQLSQVQCMISNVESQLGEIR	2656.3	
麝香牛	麝香牛		2664.4	2691.4
绵羊	家绵羊	YSCQLNQVQSLIVSVESQLAEIR	2664.4	
斯瓦卡拉	家绵羊	YSCQLNQVQSLIVSVESQLAEIR	2664.4	
浣熊毛	浣熊		2684.3	2698.3
臭鼬	臭鼬		2684.3	
松鼠	松鼠	YSSQLSQVQCMITNVESQLAEIR	2684.3	
山羊绒	山羊	YSCQLNQVQSLIVNVESQLAEIR	2691.4	
安哥拉山羊毛	家山羊	YSCQLNQVQSLIVNVESQLAEIR	2691.4	
黑貂	紫貂		2698.3	2684.3
水貂	北美水貂		2698.3	2684.3
鼬	雪貂	YSSQLSQLQCMITNVESQLAEIR	2698.3	2684.3
亚洲鼬	黄鼬		2698.3	2684.3
狐狸	赤狐	YSSQLNQVQCMITNVESQLAEIR	2711.3	2638.3
郊狼	草原狼		2711.3	2641.3
犬	家犬	YSSQLNQVQCMITNVESQLAEIR	2711.3	2641.3
貉	似浣熊貉		2711.3	

\*1 根据 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 推测

## 5. 利用 MALDI-TOF MS 进行动物毛发定量分析

使用多种动物毛发的纤维产品不仅要求明确动物毛发种类，还要求表示混用率。使用显微镜进行辨别时，将纤维切成 0.4 mm 左右，用显微镜进行观察，判别纤维的种类，数出根数。至少对 1000 根纤维进行此操作，同时要对 100 根左右的纤维测定直径，求出各纤维重量百分比。此操作需要很高的熟练程度。MALDI-TOFMS 法作为前文所述定性分析的延伸，可根据各种动物特别峰谱的强度比轻松地求出组成。

众所周知，MALDI-TOFMS 法当中，在照射激光进行电离时，被用作电离辅助剂（基质）的低分子化合物结晶的状态会影响肽、蛋白质的电离。每次照射激光后电离状态都会产生微妙的变化，因此认为其不适宜进行定量分析。但是，分析动物毛发时，并不需要各自组分的绝对浓度，例如只要知道山羊绒和羊毛的比例即可，因此可以使用此方法。如图 9 所示，通过测定山羊绒、羊毛、牦牛的峰谱强度，求出其比值，即可求出组成<sup>2)</sup>。

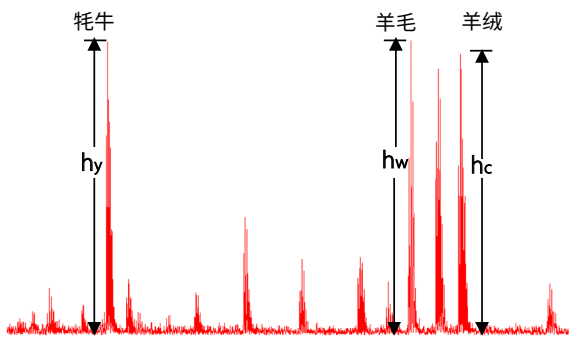


图 9 混纺中山羊绒峰谱比的计算方法  

$$\text{山羊绒峰谱比}(\%) = hc \times 100 / (hc + hw + hy)$$

$$hc = \text{cashmere peak height}$$

$$hw = \text{wool peak height}$$

$$hy = \text{yak peak height}$$

图 10 所示为测定以一定比例混合山羊绒和羊毛的标准试样时的标准曲线示例。此时，形成倾斜度为 1、通过原点的直线，峰谱比几乎与组成一致。多数情况下标准曲线不会呈直线，因此需要进行校正，求出组成。此外，包含 3 种以上的动物毛发时，可按每 2 种进行标准曲线校正，而后求出整体的组成。本应用笔记中记载的谱图为 MALDI-TOF MSAXIMA Performance™ 的反射子模式下获得的谱图，MALDI-8020 的线性模式下也可获得如图 11 所示的相同谱图、标准曲线。

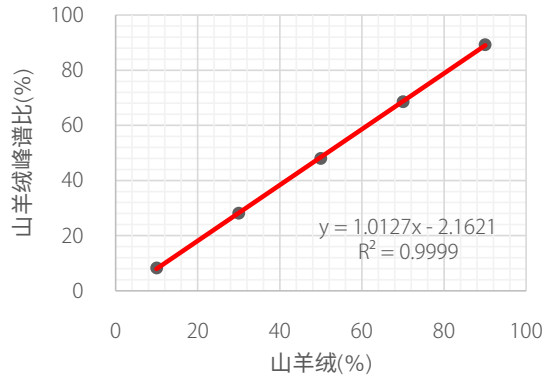


图 10 山羊绒 / 羊毛混合物的标准曲线

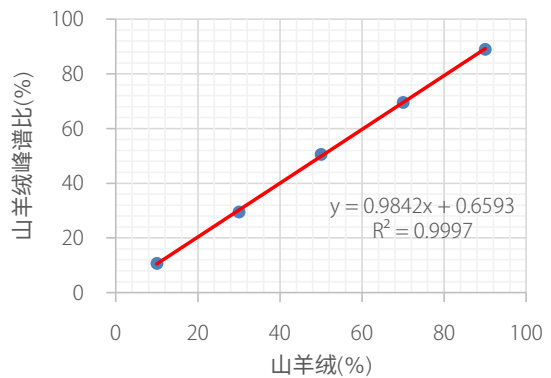


图 11 线性模式 (MALDI-8020) 下所得山羊绒 / 羊毛混合物的标准曲线

市售的纤维产品当中,纤维多进行了漂白、脱色、染色等处理,而此类产品同样可采用 MALDI-TOF MS 法进行测定。此外,很多时候棉、丝绸、尼龙、聚酯等动物毛发以外的天然纤维、合成纤维也会混纺在一起, MALDI-TOF MS 法可以在不分开这些纤维的情况下,直接求出动物毛发部分的组成。

表 3 所示为使用 MALDI-TOF MS 法求出山羊绒和羊毛混纺品混用率的事例。多个试样含有动物毛发以外的纤维,使用显微镜法确定其组成,仅看动物毛发部分的组成的话,比较两者得出的结果是一致的。

表 3 显微镜法与 MALDI-TOF MS 法的分析结果比较

样品名	显微镜法 (动物毛发部分*)		MALDI-TOF MS 法 (校正后)	
	Ca	W	Ca	W
样品 A	18.5	81.5	15.8	84.2
样品 B	12.5	87.5	15.2	84.8
样品 C	21.7	78.3	21.8	78.2
样品 D	90.0	10.0	89.5	10.5
样品 E	22.2	77.8	21.5	78.5
样品 F	10.0	90.0	6.5	93.5

\*1 包含天然纤维、化学纤维等动物毛发以外的纤维时,仅计算动物毛发部分的组成。



## 6. 利用 MALDI-TOF MS 法辨别动物毛发的实际应用

2018 年 9 月, MALDI-TOF MS 法作为国际标准 (ISO) 得以发表<sup>3)</sup>。此外,日本产业规格 (JIS) 的相关工作也在进行当中。图 2 所示的纤维产品一系列辨别作业可在约 6-8 小时内完成,可同时处理 10 种左右的试样。如此, MALDI-TOF MS 法已经成为与显微镜法并存的新动物毛发分析法,开始在检查现场使用。

MALDI-TOF MS 法无法区分同属动物,例如山羊绒与安哥拉山羊毛,安哥拉兔毛和兔毛等,因而需要另行使用显微镜进行区分。将来,通过将常规显微镜方法与诸如 MALDI-TOF MS 方法之类的新方法相结合,有望实现更准确的动物毛发分析。

### <参考文献>

- 1) 大箸信一、出村由香、佐野元昭、SEN'I GAKKAISHI、68 (10)、276 (2012)。
- 2) 大箸信一、出村由香、佐野元昭、吉冈阳一郎、SEN'I GAKKAISHI、70 (6)、114 (2014)。
- 3) ISO20418-2 Textiles — Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres — Part 2: Peptide detection using MALDI-TOF MS.

## 台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020



实现同级最小的占地面积以及具有竞争力的性能。采用长使用寿命的固体激光和自动离子源清洁功能的低运营成本。

### 主要特性

- 线性模式（正离子）
- 200 Hz 固体激光、355 nm
- 快速导入样品的加载锁定室
- 利用 UV 激光实现的离子源清洁功能
- 结构紧凑的台式机型
- 低噪音运行（< 55 dB）

## TOF-TOF 型 高灵敏度 MS/MS 解析 MALDI-TOF MS AXIMA Performance™



利用搭载高能量 CID 的 TOF-TOF 型 MALDI-TOF MS 高灵敏度 MS/MS 测定，可鉴定蛋白质，解析分子结构。

### 主要特性

- 配备有可进行高精度测定的反射子模式和可进行高灵敏度测定的
- 线性模式（正 / 负离子）
- 利用高能量 CID-MS/MS 解析分子结构
- 利用 Curved Field Reflectron 机构实现高灵敏度 MS/MS
- 根据粒子光学系统和同轴方向，通过照射激光实现高灵敏度

AXIMA Performance 岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。  
本资料中出现的名称、产品名称、服务标记和徽标是其各公司的商标和注册商标。  
此外，TM、® 标志可能未在文中明确说明。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020年8月