

Application News

No. B95

MALDI-TOF 质量分析法

使用台式 MALDI-TOF 质谱仪鉴定动物毛发

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 具有简单、快速获取多肽、蛋白质、合成高分子等各种高分子产品的分子量信息的特点。在研究开发和质量控制领域, MALDI-TOF MS 广泛应用于合成产品和天然产物的分子量确认。

作为 MALDI 的新用途之一, 大箸信一等人提出通过检测具有物种特异性的动物毛发中的肽来鉴别动物毛发的方法¹⁾。作为“羊绒等动物毛发纤维中肽的检验方法”, 该鉴别方法已得到国际标准化组织 (ISO) 的认可, 并在 ISO 标准中做出定义²⁾。该鉴别方法还可以分析 1 根毛发, 不仅可以用于防止伪装羊毛, 还可以应用于检查混入食品等中的异物。

本文将为您介绍使用台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 鉴别动物毛发的案例。

K. Shima

样品的预处理

用剪刀和球磨机等将羊绒、牦牛毛、羊毛、羊驼、骆驼、马、家兔的原毛粉碎。取粉碎原毛 10~50 mg, 加入含有 50 mM 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT) 的 4% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 和 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 0.5 mL, 在 95°C 下加热 15 分钟~1 小时。加热后, 加入碘乙酰胺, 将提取液浓度调至 100 mM, 室温下反应 15 分钟, 再加入 25 mM 的 DTT 10 μ L, 停止反应。取提取液, 用三氟乙酸沉淀、洗涤后, 加 7 M 尿素和 2 M 硫脲溶液使其再溶解, 用 50 mM 碳酸氢铵稀释, 再加入 2.0 μ g 胰蛋白酶, 在 37°C 下消化过夜。



图 1 台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020

用 ZipTip[®] μ C18 (Merk Millipore) 进行脱盐处理。将脱盐后的样品溶液取 0.5 μ L 滴加在 MALDI 靶板上, 再添加 0.5 μ L 的基质溶液进行质量分析。取 CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), 加 50% 乙腈 / 0.05% 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA) 溶解, 将浓度调至 5 mg/mL, 用作基质。

质量分析使用台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” (图 1), 在正离子线性模式下进行测量。使用统计分析软件 eMSTAT Solution[™], 对从各质谱得到的峰值列表进行分析, 识别各动物毛发。

结果

动物毛发的胰蛋白酶消化肽的质谱如图 2 所示。在 m/z 2450-2750 的范围内, 检测出各种动物的物种特异性肽段峰。使用该物种特异性肽段峰, 可以鉴别动物毛发。构成动物毛发的蛋白质主要是角蛋白, 被检测出的肽也来源于角蛋白。

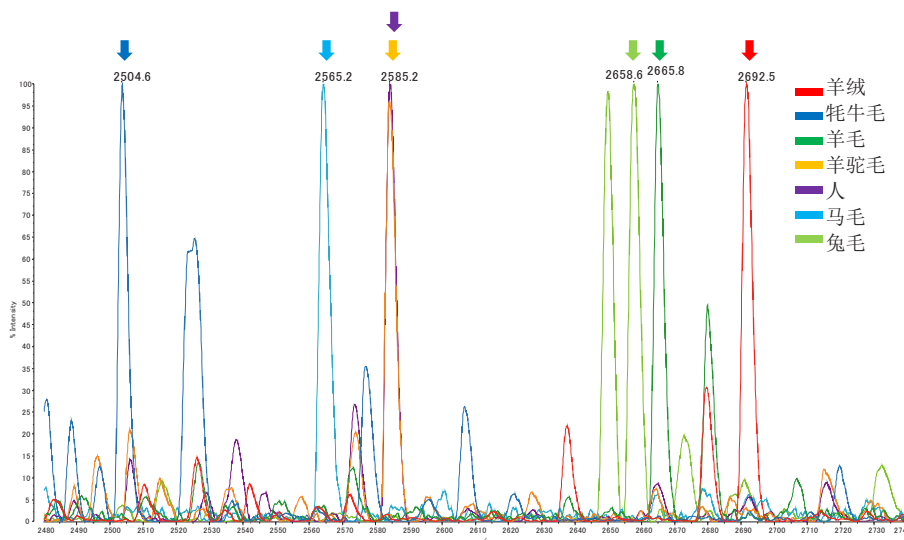


图 2 动物毛发胰蛋白酶消化肽的质谱图

表 1 角蛋白 I 型的物种特异性氨基酸序列区域¹⁾

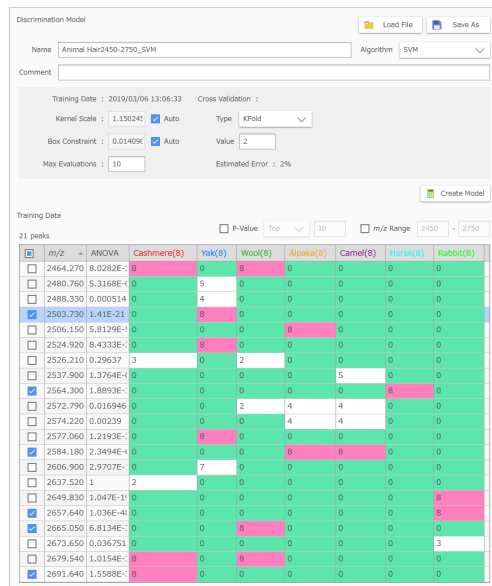
生物种属	I 型角蛋白	氨基酸序列	[M+H] ⁺ 平均质量*1
羊绒	Keratin 33A [<i>Capra hircus</i>]	YSCQLNQVQSLIVNVESQLAEIR	2692.38
牦牛毛	Keratin type I microfibrillar, 47.6 kDa-like [<i>Bos mutus</i>]	YSSQLAQVQGLIGNVESQLAEIR	2504.81
羊毛	Keratin 33B [<i>Ovis aries</i>]	YSCQLSQVQSLIVNVESQLAEIR	2666.03
骆驼 / 羊驼	Keratin, type I microfibrillar, 47.6 kDa [<i>Camelus dromedaries</i>]	YGSQLSQVQGLITNVEHQLAEIR	2584.90
马	Keratin 33A [<i>Equus caballus</i>]	YSSQLSQVQGLITNVESQLAEIR	2564.86
家兔	Keratin, type I cuticular Ha3-I [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	YSSQLSQVQCMISNVESQLGEIR	2657.99
犬	Keratin 33A [<i>Canis lupus familiaris</i>]	YSSQLNQVQCMITNVESQLAEIR	2713.07
褐家鼠	Keratin 31 [<i>Rattus norvegicus</i>]	YSSQLSQVQCLITNVESQLGEIR	2653.98
人	KRT34 protein [<i>Homo sapiens</i>]	YSSQLSQVQSLITNVESQLAEIR	2594.89

*1. 计算半胱氨酸残基被碘乙酰胺氨基甲基化的平均质量。

动物物种特异性肽段峰的分配结果如表 1 所示¹⁾。该氨基酸序列来源于 I 型角蛋白。除了此次测定的动物物种外，该序列证明人类和家鼠也具有特异性。此外，仅羊驼和骆驼的特异性肽段峰的分子质量一致，不能互相识别。

其次，使用图 2 动物物种的特异性肽段峰和 eMSTAT Solution，创建判别模型（算法：Support Vector Machine），判别动物毛发的动物物种（图 3 左）。使用创建的判别模型，对另行测定的羊绒、牦牛毛、羊毛各 3 个样品进行判别分析，可以准确判别所有动物种属（图 3 右）。

创建判别模型



总结

证实使用台式 MALDI-TOF MS MALDI-8020 和统计分析软件 eMSTAT Solution，可以快速鉴别动物毛发。使用该方法不仅可以鉴别羊绒，还可以鉴别羽毛和人体毛发。MALDI-8020 兼具台式设备的紧凑性和分子表达谱技术的卓越性能，今后有望开发成为一种可以简便、快速评价多种样品特性的产品。

判别分析

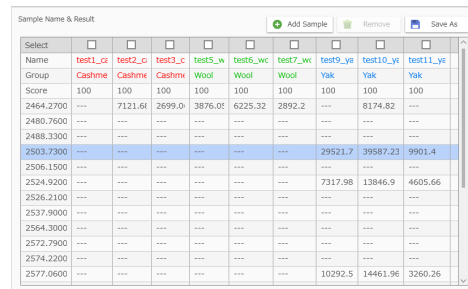


图 3 动物毛发的判别分析（左：创建的判别模型，右：动物毛发的判别分析结果）

致谢

关于获取的数据及提供的样品，谨向给予支持的金泽工业大学基因组生物学研究所大著信一教授表示衷心的感谢。

< 参考文献 >

- (1) 大著信一等：MALDI-TOF 质谱对羊绒及其他动物毛发类的定量分析，纤维学会志，70,6,114-120(2014)
- (2) ISO 20418-2: 2018 Textiles -- Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres -- Part 2: Peptide detection using MALDI-TOF MS

eMSTAT Solution 系株式会社岛津制作所在日本和其它国家的商标。

ZipTip 系 Merck KGaA 的注册商标。

其它本书所列的公司名称、产品名称、服务商标以及标识系各公司的商标和注册商标。另外，本文中略记 TM 标记、©标记。



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：2019年4月