

利用 PerfinityiDP 和 LCMS-8060 联用构建 α -酪蛋白的定量分析方法

LCMSMS-289

摘要： 本文使用岛津在线蛋白酶切液相色谱 PerfinityiDP 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用建立 α -酪蛋白的定量分析方法。首先通过 Skyline 软件完成 α -酪蛋白特征肽段的筛选和 MRM 碰撞能量优化，然后再结合 PerfinityiDP 配套软件自动生成的酶切、脱盐和分析时间程序，从而构建完整的 α -酪蛋白 LC-MS/MS 定量分析方法。本文完成了 α -酪蛋白的定量分析方法开发，定量特征肽段为 YLGYLEQLLR(634.35>991.55)，线性范围 30mg/L~3000mg/L。该方法前处理简单，避免了传统手动酶解的繁琐工作，分析速度快、重复性好、灵敏度高。

关键词： PerfinityiDP 三重四极杆质谱 α -酪蛋白定量分析

酪蛋白是哺乳动物包括母牛、羊和人奶中的主要蛋白质，又称：干酪素、酪朊、乳酪素，其中 α -酪蛋白是哺乳动物的主要蛋白（人乳除外）。酪蛋白对幼儿既是氨基酸的来源，也是钙和磷的来源。酪蛋白具有 pH 敏感性，因此在肠胃的酸性环境下可以凝固变成凝胶状，这也是酪蛋白消化率缓慢的原因所在。 α -酪蛋白既是营养物质，同时也是过敏源，可引发皮肤、胃肠道和呼吸道等过敏，因此检测食品中 α -酪蛋白显得尤为重要。

对于三重四极杆质谱检测大分子蛋白类化合物来说，通常需酶解后通过定量特征肽段来实现蛋白质的定量。传统的酶解方法一般需 12-24 小时，岛津推出的 PerfinityiDP(Integrated Digestion Platform) 是自动化在线

蛋白质酶切液相色谱，采用高效率的胰蛋白酶固定化色谱柱，对样品中的蛋白质进行在线酶切。通过使用已优化的专用胰蛋白酶酶解缓冲液，提高了酶解效率，实现了最快几分钟完成的在线酶切，与传统手工酶切相比，大大缩短了样品前处理时间；同时在重现性方面，由于 PerfinityiDP 系统将酶切、浓缩、分离、检测的一系列过程在线自动化，降低了人为误差，提高了分析精度。

为了准确、快速、高灵敏度地对 α -酪蛋白进行定量分析，本文首先利用 Skyline 软件筛选和优化特征肽段，然后再结合 PerfinityiDP 配套软件自动生成在线酶解、脱盐和分析程序，构建 α -酪蛋白的定量分析方法。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 PerfinityiDP 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-20AD、LC-20AD_{XR}×2 输液泵，DGLU-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，Skyline Ver.3.5.0.9319 软件，Perfinity 1.0 软件。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Acquity BEH Peptide C18(2.0 mm I.D. × 150 mm L.), 1.7 μ m(方法开发) / ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.7 μ m)(定量分析)

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(方法开发)
0.3 mL/min(定量分析)

柱温：40℃

进样量：10 μ L

肽段筛选洗脱条件：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，洗脱程序 0.0-3.0 min, 5%；3.0-35.0min, 5%~40%；35.0-37.5 min, 40%~95%；37.5~45.0 min, 95%；45.5-50.0 min, 5%。

定量分析洗脱条件：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，10 分钟内线性升到 70%。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 1.0 kV

加热气: 空气 15.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 5.0 L/min

碰撞气: 氦气

源温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 ms

延迟时间: 3 ms

定量分析 MRM 参数: 见表 1

1.3 样品前处理过程

肽段筛选和 MRM 通道构建:

称取 1 mg α -酪蛋白, 加入 175 μ L 的 8M 脲 (溶剂为 500mM 的 Tris-HCl 中), 混匀后加入 25 μ L 的 DTT 溶液 (40 mg/mL), 涡旋混匀后在 37°C 下反应 90 分钟, 加入 50 μ L 的 IAA 溶液 (40 mg/mL), 涡旋混匀后在 37°C 下避光反应 30 分钟, 反应完成后加入 750 μ L 碳酸氢铵溶液 (50 mM), 然后加入 20 μ L 胰蛋白酶溶液 (1 mg/mL) 所得, 过夜酶解 12 小时后上机分析进行方法初步优化。

在线酶解定量分析:

配制 α -酪蛋白标准曲线: 用纯水配制浓度分别为 30、150、300、1500、3000 mg/L 的标准品。

表1 MRM参数(α -酪蛋白定量分析方法)

肽段选择	MRM 通道[m/z]	CE (V)	肽段作用
	587.30 ⁺⁺ →758.40 ⁺ (y6)	-22.9	
HQGLPQEVLENLLR	587.30 ⁺⁺ →871.50 ⁺ (y7)	-18.9	定性肽段
	587.30 ⁺⁺ →970.55 ⁺ (y8)	-22.9	
YLGYLEQLLR	634.35 ⁺⁺ →991.55 ⁺ (y8)*	-26.9	
	634.35 ⁺⁺ →771.45 ⁺ (y6)	-26.9	定量肽段
	634.35 ⁺⁺ →658.40 ⁺ (y5)	-22.9	
FFVAPFPEVFGK	692.85 ⁺⁺ →991.50 ⁺ (y9)	-29.2	
	692.85 ⁺⁺ →920.50 ⁺ (y8)	-25.2	定性肽段
	692.85 ⁺⁺ →676.35 ⁺ (y6)	-29.2	

注: *表示定量离子

■ 结果讨论

2.1 α -酪蛋白特征肽段的选择和优化

利用 Skyline 软件筛选 α -酪蛋白的特征肽段并优化 MRM 碰撞能量, 结合文献报道和蛋白序列比对, 最终选择 3 个信号比较强的特征肽段 (图 1), 分别为: HQGLPQEVLENLLR、YLGYLEQLLR 和 FFVAPFPEVFGK。

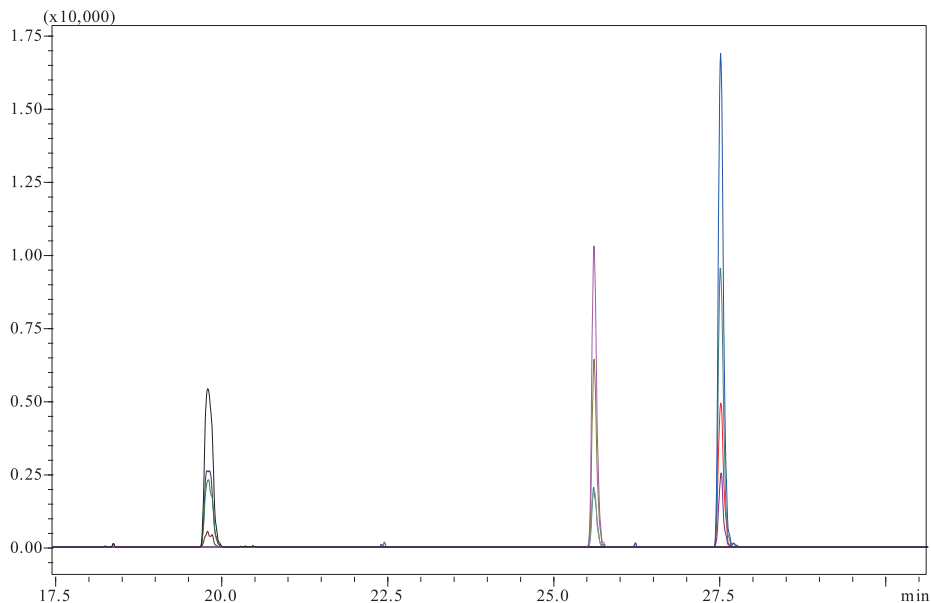


图1 Skyline软件最终确定的3个特征肽段MRM色谱图

2.2 PerfinityiDP 在线酶切、脱盐和分析时间程序建立

利用 PerfinityiDP 和 LCMS-8060 联用系统检测 α - 酪蛋白，操作简单方便，仅需 23 min 即可完成包括在线酶切在内的整个分析过程。在分析检测过程中直接将 α - 酪蛋白标准品溶液上机分析，将在线酶解时间设置为 4 min，酶解完成后经脱盐柱脱盐，11 min 后进入 C18 柱进行色谱分离，利用 LCMS-8060 检测酶解后的特征肽段，经过不同肽段和离子对的信号比对，最终选择 YLGYLEQLLR 作为定量肽段，离子对 634>991.55 作为定量离子对。

在 PerfinityiDP 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 (图 2)，软件会自动生成在线酶切的时间程序 (图 3)。

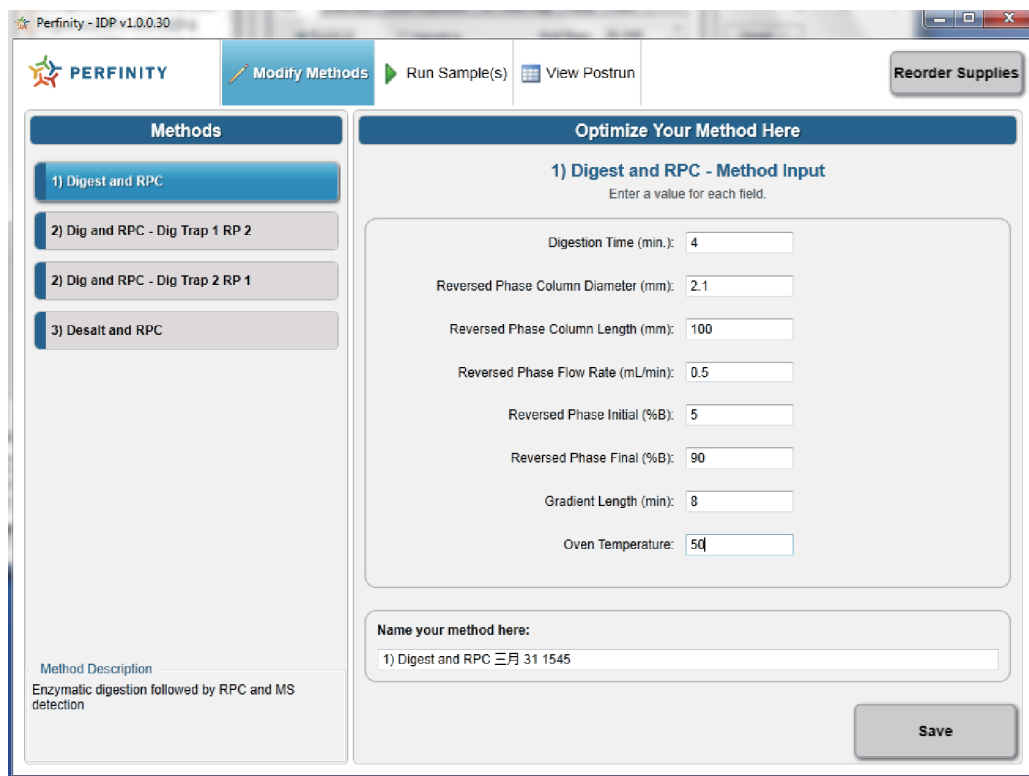


图2 Perfinity软件参数设置

	Time	Module	Command	Value
1	0.01	Controller	Event	12
2	0.01	Pumps	Pump B Conc.	5
3	0.01	Pumps	Pump C Flow	0.025
4	0.01	Controller	Start	1) Digest and RPC
5	8.01	Pumps	Pump C Flow	0.025
6	8.11	Pumps	Pump C Flow	0.4
7	8.61	Controller	Event	0
8	8.61	Pumps	Pump C Flow	0.4
9	8.61	Pumps	SV(Pump C)	D
10	8.71	Pumps	Pump C Flow	2
11	10.11	Pumps	SV(Pump C)	B
12	11.11	Pumps	Pump C Flow	2

图3 在线酶切、脱盐和分析时间程序表

2.3 α-酪蛋白定量分析方法建立

利用 Skyline 软件导出含最佳碰撞能量的 MRM 列表, 结合 Perfinity 软件生成的在线酶切、脱盐和分析时间程序列表构建完整的 LC-MS/MS 方法, 定量分析的典型色谱图如图 4 所示, 在 30~3000mg/L 范围内 YLGYLEQLLR 具有良好的线性关系 (图 5 和表 2) 和重复性 (表 3)。

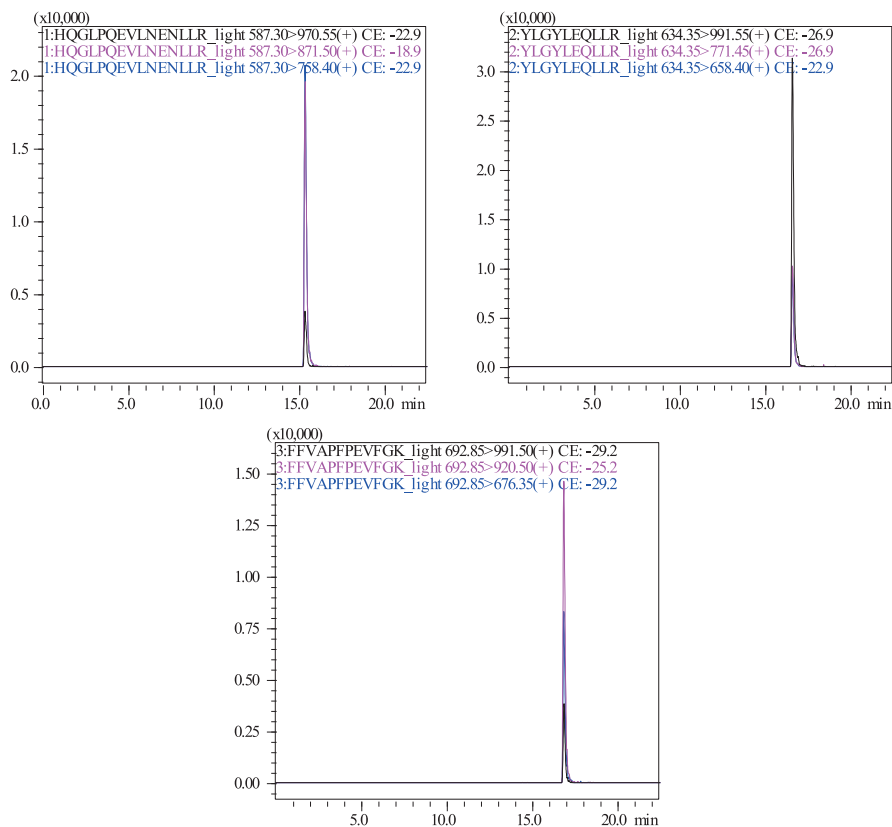


图4 α-酪蛋白LC-MS/MS分析获得的典型色谱图

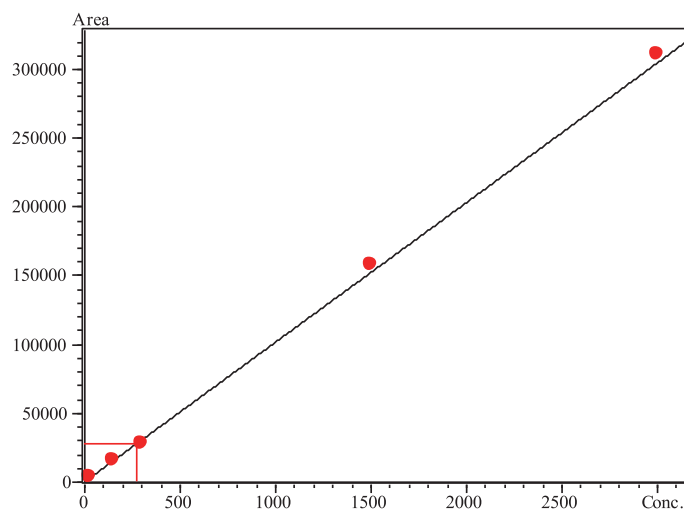

 图5 α -酪蛋白定量检测的标准曲线(YLGYLEQLLR (634.35>991.55))

表2 标准曲线的线性方程和相关系数

蛋白	肽段信息	校准曲线	线性范围 (mg/L)	相关系数 r	准确度 (%)
α -酪蛋白	YLGYLEQLLR (定量)	$Y = (101.500)X + (333.938)$	30~3000	0.9987	92.1~103.7

表3 精密度考察结果(每个浓度点重复6次进样)

理论浓度	RSD% (R.T)	RSD% (Area)
30 mg/L	0.057	6.05
300 mg/L	0.051	2.39
3000 mg/L	0.033	2.27

结论

采用岛津公司在线蛋白酶解液相色谱 PerfinityiDP- 三重四极杆质谱 LCMS-8060 联用系统检测奶制品类过敏源 α -酪蛋白, 此方法操作简单方便, 无需十几小时的手工酶切过程, 蛋白样品溶解后直接上机检测, 在线酶切、脱盐和色谱分离检测仅需 23 分钟即可完成, 实现过敏源蛋白的快速检测和定量。实验结果显示以特征肽段 YLGYLEQLLR 作为定量肽段, α -酪蛋白标准品在 30-3000 mg/L 范围内, 线性回归系数 r 为 0.9987, 准确度为 92.1-103.7%。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高, 适合过敏源的超快速检测。