

SCIEX液质联用技术定量测定乳制品中的乳铁蛋白

SCIEX LC-MS/MS Application Technology on Quantitation of Lactoferrin in Dairy Products

钟晨春, 朱怀恩, 靳文海

Zhong Chenchun, Zhu Huaen, Jin Wenhai

JAPAC Solution Innovation Center, SCIEX

Keywords : lactoferrin, QTRAP[®] 4500, MRM, dairy products, signature peptides

引言

作为乳汁中一种特有的活性蛋白质, 乳铁蛋白被广泛认为具有调节免疫、抑制病毒和有害菌等作用, 其产品也因此受到不少消费者的追捧。然而, 目前市场上不少所谓的乳铁蛋白粉实质上是带有“乳铁”商标的乳清蛋白固体饮料。这样的普通食品经过摇身一变, 售价直逼甚至超过乳铁蛋白保健食品、调制乳粉的价格。因为没有具体的国标检测方法, 所以目前可以检测乳铁蛋白含量的检测机构并不多。

基于LC-MS/MS的蛋白质定量通常会通过酶解作用将目标蛋白质水解成若干肽段, 用特征性肽段来表征目标蛋白质。利用提纯后的蛋白质单体作为标准样品, 添加至空白基质样品中, 与被测样品一起进行完全相同的前处理过程, 并且合成与特征性肽段序列相同的同位素标记肽段作为内标, 能够获得更加准确的定量结果。以与作为经典目标蛋白质定量整体解决方案的提供者, SCIEX在乳制品中乳铁蛋白的定量中也使用了相同的工作流程。

本方案采用SCIEX TripleTOF[®] 5600⁺采集原始数据, ProteinPilot和Skyline软件进行数据处理, 获得特征性肽段信息, 通过SCIEX QTRAP[®] 4500优化质谱检测参数以及定量分析, 优化了样品前处理的关键步骤, 大大提高了分析方法建立和数据处理效率以及定量结果的准确性, 特点如下:

- 1、集合了TripleTOF[®] 5600⁺、QTRAP[®] 4500与ProteinPilot和Skyline在处理复杂数据上的优势, 能够实现快速分析、简易操作, 获得检测灵敏度高的MRM离子对。
- 2、使用原型蛋白质建立标准曲线, 能够有效地克服蛋白质在酶解生成肽段等前处理过程中由蛋白质-肽段转化率以及其他步骤带来的误差。

- 3、使用特定蛋白作为空白基质, 能够克服酶解反应体系中蛋白质浓度不同引起的酶解效率不同带来的误差。

仪器设备和试剂

SCIEX公司TripleTOF[®] 5600⁺、QTRAP[®] 4500液质联用系统

婴儿配方奶粉、乳铁蛋白 (购置于Sigma公司)

恒温反应箱、高速离心机

乙腈 (色谱纯)、甲酸 (色谱纯)

超纯水 (电导率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

液相条件

色谱柱: C18, 50 2.1 mm

流动相: A: 水 (含0.1%甲酸)

B: 乙腈 (含0.1%甲酸)

流速: 0.35 mL/min

柱温: 40

进样量: 5 μL

质谱条件

扫描方式: TOF MS-IDA (TripleTOF[®] 5600⁺)

MRM (QTRAP 4500)

检测离子质荷比范围: 300~1500 m/z

Turbo VTM ESI离子源参数

气帘气CUR: 30 psi

碰撞气CAD: Medium

IS电压: 5500 V

源温度: 550 $^{\circ}\text{C}$

雾化气GAS1: 55 psi

辅助气GAS2: 55 psi

样品制备：

婴儿配方奶粉加入纯水溶解，并加入同位素肽段内标，经过二硫苏糖醇和碘代乙酰胺溶液反应打开二硫键并保护巯基后；加入胰蛋白酶溶液进行酶解；反应结束后加入等体积乙腈混合，离心，移取上清进样分析。

用于建立标准曲线的乳铁蛋白与婴儿配方奶粉加入纯水溶解的后续制备方法相同。

数据处理过程和结果：

1. 特征性肽段选择

利用将UniProt数据库寻找到牛乳铁蛋白的氨基酸序列和SCIEX TripleTOF[®] 5600⁺ 仪器分析数据结果导入ProteinPilot和Skyline，经处理后可以获得包含质谱分析参数条件的候选肽段MRM离子对信息。通过后续实验考察最终确定被测蛋白质的特征性肽段及其内标肽段。

表1. 候选特征性肽段MRM信息。

Q1	Q3	ID	DP	CE
712	246	lactoferrin 1	60	40
712	1150	lactoferrin 2	60	34
723	687	lactoferrin IS	90	26

2. 线性范围

用一系列浓度的乳铁蛋白工作溶液分别进样，以lactoferrin 1 对应肽段MRM峰面积比浓度做标准曲线。图为乳铁的线性范围及线性相关系数 r 。

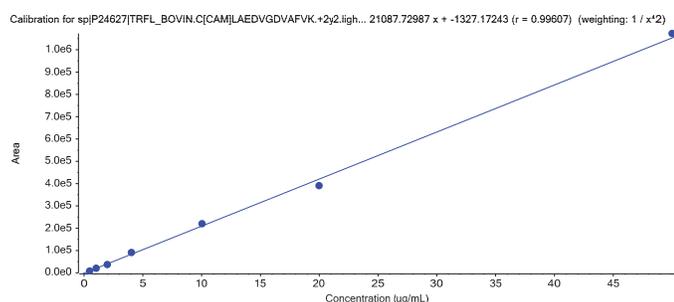


图2. 牛乳铁蛋白标准曲线，线性范围0.2-50 µg/mL，线性相关系数 $r = 0.99607$ 。

3. 加样回收率

在婴儿配方奶粉中添加与被测样品中乳铁蛋白浓度相当的已知浓度的牛乳铁蛋白标准品，通过上述LC-MS/MS方法检测定量，并计算回收率。

表2. 牛乳铁蛋白的加样回收率。

蛋白质	回收率% (accuracy, RSD; n=3)	
	+100%	
牛乳铁蛋白	104	4.66

4. 定量结果

选择三种不同品牌的婴儿配方奶粉，每次做三个平行样品，做三个批次平行实验，计算其中牛乳铁蛋白的含量。实验结果表明，定量方法准确可重复。

表4. 牛乳铁蛋白在婴儿配方奶粉中的含量。

婴儿配方奶粉	乳铁蛋白 (n=3)		
	含量 (g/kg)	批次内 (RSD%)	批次间 (RSD%)
样品1	0.64	5.44	10.26
样品2	0.82	3.32	15.12
样品3	1.07	0.54	13.43

结论

- 1、本实验针对牛乳铁蛋白筛选出各自用于定量检测的特征性肽段，在此基础上建立合适的分析方法，获得了良好的定量分析结果。
- 2、本实验充分体现了QTRAP[®] 4500、TripleTOF[®] 5600⁺与ProteinPilot和Skyline在处理复杂数据上的集合优势，经过样品前处理过程的优化，能够实现快速分析、简易操作，最终建立了准确、可靠、稳定的定量分析方法，是进行食源性蛋白质定量研究的利器。
- 3、本实验展示了SCIEX在蛋白质定量条件建立和优化上的优势，能够提供高效快捷一体化的解决方案，为客户相关工作提供便利和支持。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-10044-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-2419 7200

传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室

电话：020-8510 0200

传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX