

乳品中主要过敏原蛋白检测方法的开发及应用

徐增益, 陈燕秋, 雷雯*

(上海化工研究院有限公司, 上海市稳定同位素检测与应用研发专业技术服务平台, 上海 200062)

摘要:通过对 β -乳球蛋白酶解反应的各个关键条件进行优化, 确定了还原烷基化试剂用量为 50 μL 、还原温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、胰蛋白酶溶液浓度为 1 mg/mL、酶解温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解时间为 16 h、终止酶解试剂为 10% 甲酸溶液, 在该条件下特征多肽酶解较为完全; 并对色谱检测条件进行优化, 利用同位素稀释质谱法准确定量乳品中 β -乳球蛋白, $\text{RSD}<7\%$, 可为乳品中过敏原准确定量提供一定的参考。

关键词:酶解; 多肽; β -乳球蛋白; 过敏原; 条件优化

中图分类号: O658

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2022)S2-0403-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.S2.083

Development and application of detection method for main allergen proteins in dairy products

XU Zeng-yi, CHEN Yan-qiu, LEI Wen*

(Shanghai Stable Isotope Detection and Application R&D Professional Technical Service Platform,
Shanghai Research Institute of Chemical Industry Co., Ltd., Shanghai 200062, China)

Abstract: Through optimizing key conditions for the enzyme lysis reaction of β -lactoglobulin, it is determined that the dosage of reducing alkylation reagent is 50 μL , the reduction temperature is at 55 $^{\circ}\text{C}$, the concentration of trypsin solution is 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, enzymatic lysis temperature is at 37 $^{\circ}\text{C}$, the enzymatic lysis lasts for 16 h, and 10% formic acid solution is used as the terminating enzyme lysis reagent. Under these conditions, the enzyme lysis of characteristic peptide can be relatively complete. β -Lactoglobulin in dairy products is accurately quantified by isotope dilution mass spectrometry, with an RSD less than 7%, which can provide reference for the accurate quantification of allergens in dairy products.

Key words: enzyme lysis; polypeptides; β -lactoglobulin; allergen; condition optimization

β -乳球蛋白是乳清中的主要蛋白质, 基本存在于所有牛类的乳汁当中, 是乳品的主要过敏原。其水解物质或某些片段能够起到降胆固醇和抗氧化的作用, 但对于婴幼儿却是“威胁”, 主要是由于婴幼儿消化系统发育不完全, β -乳球蛋白一进入婴幼儿体内就会被判定为病原, 从而诱发免疫反应。因此, 对 β -乳球蛋白进行准确定量是行业的迫切需要^[1-9], 更是对婴幼儿健康的保障。

β -乳球蛋白通常以二聚体的形式存在, 二聚体平均相对分子质量约为 18 320^[10], 在 $\text{pH}<3$ 时易解离为单体, 其单体包括 162 个氨基酸残基。目前利用多肽可实现对蛋白质的准确定量, 但前提条件是蛋白质的定量酶解。随着蛋白组学的不断发展, 酶

解^[11-15]也成为该领域研究的热点。目前国内关于 β -乳球蛋白酶解条件优化的研究较少, 现有的一些优化条件不够全面。 β -乳球蛋白多选用胰蛋白酶 (Trypsin) 进行酶解, 但胰蛋白酶^[16-18]属于催化剂, 只影响酶解过程的速率, 无法改变反应的化学平衡位置, 为了使酶解反应尽量完全, 需要对酶解反应的各个条件进行优化。本研究基于蛋白组学的酶解技术, 对蛋白质的酶解条件, 包括还原烷基化试剂用量、还原温度、酶解温度、酶浓度以及酶解时间等进行优化, 选择 β -乳球蛋白对应的特征多肽 IDALNENK (IK-8), 以稳定同位素多肽作为内标稀释剂, 开发了准确定量 β -乳球蛋白的方法, 并应用于市售乳品过敏原蛋白的检测, 可为乳品中过敏原

收稿日期: 2022-04-14; 修回日期: 2022-06-10

基金项目: 上海市稳定同位素检测及应用研发专业技术服务平台 (20DZ2292500); 上海市自然科学基金 (19ZR1423600)

作者简介: 徐增益 (1995-), 女, 硕士生, 主要从事稳定同位素分析检测方面的研究; 雷雯 (1986-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事分析检测、代谢流等方面的研究, 通讯联系人, leiwensr@163.com。

准确定量提供一定的方法参考。

1 主要仪器与试剂

Thermo TSQ quantum 液相色谱质谱联用仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];超纯水系统(美国 Merck Millipore 公司);电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团,精度 0.01 mg);pH 计(瑞士梅特勒-托利多集团,Five Easy Plus);ALPHA 1-2 LD 冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司);SB-5200DT 超声波清洗机(上海般诺生物科技有限公司)。

甲酸(色谱纯,中国 CNW 公司);乙腈(色谱纯)、碘乙酰胺(IAM),中国 CINC 公司;胰蛋白酶、 β -乳球蛋白(纯度>98%),SIGMA 公司;盐酸、三氟乙酸(国药集团化学试剂有限公司);碳酸氢铵、IDALNENK($^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -Leu,纯度>98%,丰度>98%原子),上海化工研究院有限公司;二硫苏糖醇(DTT,上海安谱实验科技股份有限公司);骆驼奶粉(基质);样品牛奶。

2 实验方法

2.1 标准溶液配制

β -乳球蛋白标准品储备溶液(1 mg/mL):称取 β -乳球蛋白固体 10 mg(精确至 0.01 mg),用超纯水溶解后定容至 10 mL。置于-20℃冰箱内保存。

β -乳球蛋白特异多肽标准储备溶液(500 $\mu\text{mol/L}$):称取 β -乳球蛋白特异多肽固体 4.56 mg(精确至 0.01 mg),用超纯水溶解后定容至 10 mL。置于-20℃冰箱内保存。

精密称取内标肽段 IDALNENK 适量,用水溶液配制成 2 mmol/L 的储备溶液冻存于-80℃。临用前配制,4℃保存备用。

2.2 样品前处理

量取样品牛奶试样约 25 mL(内含蛋白质约 750 mg 左右),转移至 50 mL 的容量瓶,并用 50 mmol/L 的碳酸氢铵定容至刻度线,置于涡旋混合器上充分溶解后备用。

2.3 液相色谱的检测条件

色谱柱 Shimadzu C18(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液;流动相 B 为 0.1%甲酸-乙腈溶液;流速 1.0 mL/min;梯度洗脱程序:0~3.0 min(10% B),3.0~13.0 min(10%~30% B),13.0~14.0 min(30%~90% B),14.0~18.0 min(90% B),14.0~18.0 min(30%~90% B)。

柱温 35℃;进样量 10 μL 。

2.4 质谱的检测条件

电喷雾模式为 ESI;质谱扫描方式为多反应检测扫描(MRM),特征肽段 IDALNENK 的 m/z 为 459~803,内标肽段 IDALNENK 的 m/z 为 462.5~810;毛细管电压 3.5 kV;鞘气流速为 13 mL/min;离子传输管温度为 275℃。

3 结果与讨论

3.1 酶解条件优化实验

对 β -乳球蛋白进行氨基酸序列分析和酶解位点分析。在 NCBI 数据库中获得 β -乳球蛋白的氨基酸序列,经模拟得到胰酶 Trypsin 在 β -乳球蛋白上的酶解位点,如图 1 所示。

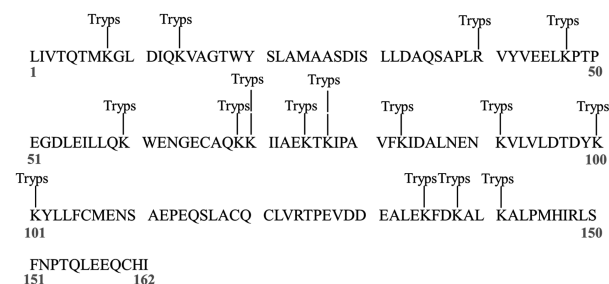


图 1 β -乳球蛋白的氨基端序列和胰蛋白酶的酶解位点图

3.1.1 优化还原烷基化试剂用量

蛋白质结构盘绕折叠,内部容易包埋酶解位点导致酶解试剂难以切割。因此需要加入还原烷基化试剂使蛋白质序列中的酶解位点完全暴露,从而使酶能够直接作用于特定位点。故考察了还原烷基化试剂 DTT 用量对酶解效率的影响,如图 2 所示。

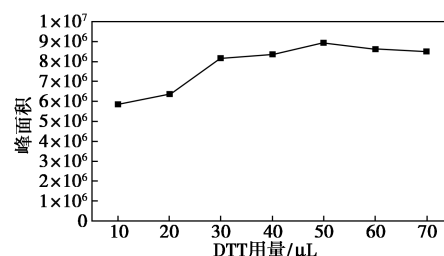


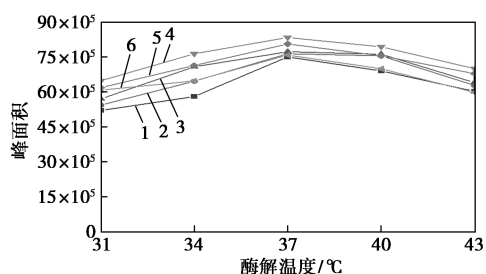
图 2 不同 DTT 用量下 β -乳球蛋白酶解特征多肽 IDALNENK 峰面积

从图 2 可知,随着 DTT 用量不断增加,酶解后多肽 IDALNENK 的峰面积有上升趋势,当 DTT 用量为 50 μL 时峰面积达最大值;继续增加 DTT 用量,多肽 IDALNENK 峰面积开始呈现下降趋势。这主

要是由于随着 DTT 用量的增加,蛋白质中半胱氨酸(Cys)形成的 S—S 被不断还原,使其产生单一的酶解多肽,进而增强作用效果,当用量继续增加时,还原状态的 S—S 量突增,还未能发生烷基化反应^[19-20]便又重新形成 S—S,作用效果下降。故确定本研究 DTT 试剂的用量为 50 μL 。

3.1.2 还原温度与酶解温度的优化

温度是影响蛋白质酶解效率的一个关键因素。DTT 作为还原剂的最佳还原反应温度通常为 45、50 及 60 $^{\circ}\text{C}$,胰蛋白酶的最佳作用温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右。为进一步优化最佳温度条件,分别取 40、45、50、55、60、65 $^{\circ}\text{C}$ 作为还原反应温度,分别以 31、34、37、40、43 $^{\circ}\text{C}$ 作为酶解温度,结果如图 3 所示。



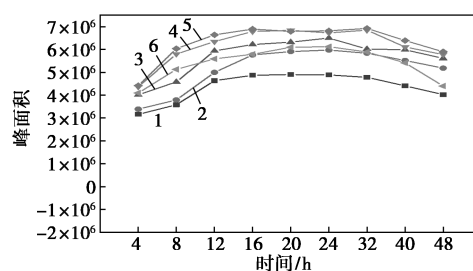
1—40 $^{\circ}\text{C}$; 2—45 $^{\circ}\text{C}$; 3—50 $^{\circ}\text{C}$; 4—55 $^{\circ}\text{C}$; 5—60 $^{\circ}\text{C}$; 6—65 $^{\circ}\text{C}$

图 3 还原温度与酶解温度的优化实验

从图 3 可以发现,随着酶解温度的提高,酶解的多肽含量呈现先上升后降低的趋势,37 $^{\circ}\text{C}$ 时多肽含量达到最大值。这主要是由于温度较低时随着温度的升高,胰蛋白酶的活性不断增加;当温度过高时,胰蛋白酶逐渐失活,酶解的多肽含量有所降低。故最佳的酶解温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 。此外还发现,随着还原温度的上升,酶解的多肽含量不断上升,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下作用效果最佳,随着还原温度进一步提高,多肽含量开始下降。这主要是由于过低的温度难以使还原剂充分作用;温度过高使反应向反方向进行。因此,选择还原反应温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.1.3 酶浓度与酶解时间的优化

影响酶解效果的另一重要因素是胰酶浓度和胰酶的酶解时间。无论是酶浓度的选择,还是时间的确定,均对酶解效率、离子化效率有一定的影响,进而影响检测方法的重复性。故为了进一步保证方法具有良好的重现性,特针对 β -乳球蛋白的酶浓度与酶解时间进行相关考察,分别选取酶浓度 0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mg/mL,酶解时间 4、8、12、16、20、24、32、48 h 进行考察,结果如图 4 所示。



1—0.2 mg/mL; 2—0.5 mg/mL; 3—0.8 mg/mL; 4—1.0 mg/mL; 5—1.2 mg/mL; 6—1.5 mg/mL

图 4 酶的浓度及酶解时间优化实验

由图 4 可以发现,随着酶浓度的增加,酶解效果越来越好,但是当酶浓度过高时,作用效果开始下降,当酶浓度为 1 和 1.2 mg/mL 时,作用效果最好。这主要是由于胰蛋白酶浓度过低会导致蛋白质难以充分酶解,进而影响作用效果;而胰酶浓度过高时,其产生的自溶产物多,影响后端质谱的离子化效率。基于实验的检测周期及节约成本的考量,确定胰蛋白酶的浓度为 1 mg/mL。而随着酶解时间的增加,作用效果也是先增加后下降。主要是由于在酶浓度适宜的条件下酶解时间过短,酶解反应不充分;而酶解时间过长胰蛋白酶的自溶物又会不断增多,与待测物离子在离子化时形成竞争进而影响离子化效率。故确定酶解时间 16 h 作为本方法的样品处理条件。

3.1.4 终止酶解试剂的选择

终止酶解反应的原理是在过酸条件下胰蛋白酶失活,反应停止。分别考察了盐酸、甲酸和三氟乙酸 3 种试剂的作用效果。发现 3 种试剂均能有效终止酶解反应,但通过结合色谱分离流动相以及色谱柱保护效果考虑,确定以甲酸作为终止酶解的试剂。虽然盐酸溶液是常用的终止酶解试剂,能显著调节溶液的 pH,但其酸性极强,对色谱柱的使用寿命有较大影响,且盐酸对质谱的离子源也有一定损害。

本研究将以 10%甲酸溶液作为终止剂,将酶解溶液 pH 调至酸性 (pH 约为 2),以此终止酶解反应。

3.2 以 IDALNENK ($^{13}\text{C}_6$, ^{15}N -Leu) 为内标定量乳品中的 β -乳球蛋白

将市面上采购的 5 种样品牛奶进行内标法定量。各称取样品 6 份,分别加入 50 μL DTT 溶液,还原温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,胰蛋白酶溶液的浓度为 1 mg/mL,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜反应 16 h,终止酶解试剂为 10%甲酸溶液。

按上述酶解条件进行处理后上机分析,用内标法计算,定量结果见表 1。

表 1 内标法定量 5 种奶品中 β -乳球蛋白含量 g/L

序号	1 号奶品	2 号奶品	3 号奶品	4 号奶品	5 号奶品
1	2.73	3.21	2.99	3.22	3.53
2	2.98	3.15	2.56	3.21	3.64
3	2.53	3.27	2.93	3.33	3.45
4	2.99	3.54	2.79	3.41	3.29
5	2.72	3.41	2.77	3.12	3.55
6	2.83	3.22	2.84	3.27	3.43
平均值	2.80	3.30	2.81	3.26	3.48
RSD/%	6.26	4.45	5.32	3.10	3.46

通过建立的同位素稀释质谱法定量 5 种样品牛奶中的 β -乳球蛋白含量,该方法的 $RSD < 7\%$,可实现对市面上乳品过敏原的准确定量。

4 结论

(1) 开发优化了 β -乳球蛋白酶解条件,最佳条件为:0.1 mol/L 还原剂(DTT 溶液 50 μ L),在 55 $^{\circ}$ C 下反应 60 min 后加入 100 μ L IAM 溶液(0.1 mol/L),30 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min,然后加入 100 μ L 的胰蛋白酶溶液(1 g/L),在 37 $^{\circ}$ C 下过夜反应 16 h。

(2) 采用同位素稀释质谱法对市售 5 种奶品进行 β -乳球蛋白的定量分析,该方法准确度高、精密度高, $RSD < 7\%$,可为市面上乳品过敏原的准确定量提供技术支撑。

参考文献

- [1] Hernández-Ledesma B, Dávalos A, Bartolomé B, et al. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS [J]. Journal of agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(3): 588-593.
- [2] 程显隆, 陈佳, 李明华, 等. 特征多肽检测技术用于胶类药材专属性鉴别方法研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(2): 104-108.
- [3] 周炎, 陈雨焯, 赖世云, 等. 基于靶向蛋白质组学的乳品中牛血清白蛋白的定量检测方法[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 256-265.
- [4] 范琳琳, 李慧颖, 姚倩倩, 等. 牛奶中活性蛋白和活性脂肪酸生物活性研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(1): 395-405.
- [5] 张敏, 王瑶, 苏运聪, 等. 不同乳品中 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白和乳铁蛋白的测定[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(5): 17-21.
- [6] Leeb E, Götz A, Letzel T, et al. Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides [J]. Food Chemistry, 2015, 187: 545-554.
- [7] Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 281(1): 11-17.
- [8] Ashley J, D'Aurelio R, Piekarska M, et al. Development of a β -lactoglobulin sensor based on SPR for milk allergens detection [J]. Biosensors, 2018, 8(2): 1-11.
- [9] Cheison S C, Schmitt M, Leeb E, et al. Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of β -lactoglobulin: Analysis by LC-ESI-TOF/MS [J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 457-467.
- [10] Galan-Malo P, Pellicer S, Pérez M D, et al. Development of a novel duplex lateral flow test for simultaneous detection of casein and β -lactoglobulin in food [J]. Food Chemistry, 2019, 293: 41-48.
- [11] Je J Y, Qian Z J, Byun H G, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(5): 840-846.
- [12] Zhao Q, Xiong H, Selomulya C, et al. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins [J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1360-1367.
- [13] 李伟民, 周海燕, 郑丽娟, 等. 碱性蛋白酶酶解荷叶蛋白制备多肽的工艺 [J]. 食品工业, 2020, 41(9): 157-161.
- [14] Deng Y, Butré C I, Wierenga P A. Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis [J]. International Dairy Journal, 2018, 86: 39-48.
- [15] Zhao G, Liu Y, Zhao M, et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate [J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1438-1443.
- [16] Mao Y, Krischke M, Hengst C, et al. Comparison of the influence of pH on the selectivity of free and immobilized trypsin for β -lactoglobulin hydrolysis [J]. Food Chemistry, 2018, 253: 194-202.
- [17] Huesgen P F, Lange P F, Rogers L D, et al. Lysarginase mirrors trypsin for protein C-terminal and methylation-site identification [J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 55-58.
- [18] Wicht O, Li W, Willems L, et al. Proteolytic activation of the porcine epidemic diarrhea coronavirus spike fusion protein by trypsin in cell culture [J]. Journal of Virology, 2014, 88(14): 7952-7961.
- [19] 黄竞男, 张旭敏. 蛋白质组学样品消化条件的优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 2884-2891.
- [20] 李翠翠, 马宇翔, 闫慧丽, 等. 面条加工过程中蛋白质中巯基和二硫键的变化规律 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 143-147. ■