

样品制备方法对高效液相色谱-串联质谱分析人乳内源肽的影响

于文皓¹, 于洋¹, 王雯丹², 李依彤², 司徒文佑², 靳艳^{1*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析重点实验室, 辽宁大连 116023; 2. 北京伊利科技发展有限公司, 北京 100070)

摘要:人乳内源肽是乳蛋白在乳腺中被降解形成的具有生理功能的肽,是人乳的重要组成部分,研究人乳内源肽对于婴儿健康具有重要的意义。高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)联用技术的应用,促使人乳内源肽的研究取得了突破性的进展。人乳中内源肽含量低、干扰组分多,样品制备方法是影响分析结果的关键步骤。为了研究样品制备方法对分析结果的影响,分别采用不变性超滤法(UF 1)、热变性超滤法(UF 2)、化学变性超滤法(UF 3)、三氯乙酸沉淀法(PCPN 1)、乙醇沉淀法(PCPN 2)、强疏水性碳介孔材料(highly ordered mesoporous carbon, OMC)富集法等6种方法从人乳中提取内源肽,利用LC-MS/MS研究样品制备方法对人乳内源肽分析结果的影响。结果表明,UF 1和UF 2法制备的样品中可鉴定到的肽段数目分别为1 161±8条和1 017±91条,两种方法制备的样品中肽序列的重合率大于70%,UF 1在所有方法中鉴定到的肽的数目最多。UF 3法制备的样品所能鉴定到的肽段数目最少,仅为366±18条。PCPN 1和PCPN 2两种沉淀法制备样品中的内源肽分别为779±69和876±55条,但内源肽差异较大,仅有约50%肽段序列重合。OMC法制备样品中肽的数目为549±151条,与其他方法相比,虽然鉴定的肽数量上没有优势,但该方法制备的样品中肽在等电点(pI)和亲水性平均系数(GRAVY)等性质上没有偏倚,说明该法可用于制备特定人乳内源肽。6种方法制备的样品中鉴定到来源于β-酪蛋白、免疫球蛋白受体、骨桥蛋白、α_{s1}-酪蛋白、κ-酪蛋白和胆盐激活脂肪酶的肽,并且源于以上蛋白质的肽段总数在该样品中均超过88%,说明6种方法制备的样品都可以满足鉴定一般人乳内源肽的需求。UF 2、UF 3和OMC法制备的样品中鉴定到源于乳铁蛋白的内源肽的数目分别为21、38和19条,内源肽在乳铁蛋白上的覆盖率分别为14%、16%和19%,而文献常用的PCPN 1法制备的样品则会丢失此类内源肽。综上,UF 2法制备的样品不仅肽段数量多、母体蛋白质种类丰富,还可鉴定到源于乳铁蛋白的肽,可作为人乳内源肽组学研究中的首选方法。

关键词:液相色谱;串联质谱;内源肽;人乳;提取方法

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2021)05-0463-09

Effect of sample preparation on analysis of human milk endogenous peptides using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YU Wenhao¹, YU Yang¹, WANG Wendan², LI Yitong², SZETO Ignatius M.², JIN Yan^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical and Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Beijing Yili Technology Development Co., Ltd., Beijing 100070, China)

Abstract: Hundreds of endogenous peptides were released from milk proteins within the human mammary gland and some of them possess a variety of bioactive functions. Thus, it is important to investigate human milk endogenous peptides for infant health. Peptidomics based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been used to investigate human milk endogenous peptides. Extraction of endogenous peptides from human milk is an

收稿日期:2020-10-13

* 通讯联系人.Tel:(0411)84379910,E-mail:yanjin@dicp.ac.cn.

基金项目:大连化物所创新研究基金项目(DICP I201906);内蒙古自治区重大基础研究开放课题。

Foundation item: Innovation Research Fund of Dalian Institute of Chemical and Physics (No. DICP I201906); Inner Mongolia Autonomous Region Basic Research Project.

essential and key procedure for analyzing human milk peptides using LC-MS/MS. This study aimed to compare methods for extracting endogenous peptides from human milk using LC-MS/MS. Ultrafiltration methods including that not involving denaturation (UF 1), that involving heat denaturation (UF 2), and that involving chemical denaturation (UF 3), precipitation methods using trichloroacetic acid (PCPN 1) and alcohol (PCPN 2), and an enrichment method using highly ordered mesoporous carbon (OMC) were used to extract endogenous peptides from human milk. Extracted endogenous peptides were then analyzed using LC-MS/MS. The samples extracted using UF 1 and UF 2 comprised $1\,161 \pm 8$ and $1\,017 \pm 91$ endogenous peptides, respectively. More than 70% peptide sequences in each sample extracted using UF 1 and UF 2 overlapped. The results revealed that endogenous peptides extracted using UF 1 and UF 2 showed similar characteristics. UF 1 yielded the highest number of peptides, whereas UF 3 extracted the least number of peptides at 366 ± 18 . The number of endogenous peptides extracted using PCPN 1 and PCPN 2 were 779 ± 69 and 876 ± 55 , respectively. However, their characteristics were quite different, and only about 50% peptide sequences overlapped. The number of peptides extracted using OMC (549 ± 151) was not remarkable compared with that using other methods. However, the isoelectric point (pI) and grand average of hydropathicity (GRAVY) of the peptides extracted using OMC were different from those extracted using other methods. This method presented no selectivity for the endogenous peptides with different pI and GRAVY and may be used to extract unique peptides from human milk. A total of 205 peptides were commonly identified in the samples using each of the six methods. The percent of shared peptides across the six samples ranged from 13% to 23%. The number of unique peptides in the samples extracted using UF 1 and UF 2 (226 and 228, respectively) were the highest among those extracted using the six methods. The results showed that all six methods could be used to extract endogenous peptides from these high-abundance precursor proteins. A total of 21, 38, and 19 peptides were extracted from lactotransferrin using UF 2, UF 3, and OMC, respectively, and the coverage rates of these peptides in lactotransferrin were 14%, 16%, and 19%, respectively. These three methods could extract the endogenous peptides from lactotransferrin in human milk, but PCPN 1 that has been commonly used in previous studies could not. The peptides from β -casein, polymeric immunoglobulin receptor, osteopontin, α_{s1} -casein, κ -casein, and bile salt-activated lipase were identified in all samples extracted using the six methods. Moreover, these precursor proteins contributed 88% peptides in the samples extracted using the six methods. In conclusion, UF 1 and UF 2 were efficient procedures for extracting endogenous peptides from human milk. In addition, UF 2 could extract peptides from lactotransferrin, which is the optimum choice for extracting endogenous peptides from human milk. Additionally, the OMC enrichment method can be used to enrich and extract specific endogenous peptides from human milk. This study systematically compared the sample preparation methods commonly used in human milk endogenous peptidomics in recent years. The results provide strong support for uniform and standardized sample preparation methods. An ultrafiltration method without denaturation, which is more advantageous than the currently commonly used trichloroacetic acid precipitation method, was also established to prepare human milk endogenous peptide samples. In combination with OMC, this method can help in a more comprehensive and in-depth understanding of the endogenous peptidome of human milk.

Key words: liquid chromatography (LC); tandem mass spectrometry (MS/MS); endogenous peptides; human milk; extraction method

人乳是婴儿最早的食物,不仅为婴儿提供生长发育所需的营养,而且为人类提供构建最初免疫系统的活性因子。蛋白质是人乳中最重要的营养成分之一,大部分蛋白质随乳汁分泌后被婴儿食用并消化吸收,但是还有部分蛋白质在乳腺中就被乳汁中的蛋白酶降解并泌出体外,形成了人乳的重要组分内源肽。人乳内源肽与婴儿生长发育密切相关。研究发现,母亲自身机能可根据婴儿健康调节内源肽的产生^[1],早产儿的自身消化系统还不完善不能消化大量蛋白质,需要更多内源肽满足早产儿的营养需求,因此肽的浓度和丰度等指标在早产的人乳样品中显著高于足月产的人乳样品^[2]。对人乳内源肽功能研究发现,人乳内源肽具有抗菌^[3,4]、免疫调节和调节肠道菌群^[5]等多种生理功能^[6],这些功能对于婴儿免疫系统建立具有重要作用。因此,研究人乳内源肽对于婴儿的健康、成长发育以及婴儿配方奶粉的研发具有重要意义。

基于 LC-MS/MS 的肽组学技术具有高效、高灵敏度的特点,在对人体血清^[7,8]、唾液^[9]等组织的肽组学研究中发挥重要作用,肽组学技术的应用也使得人乳内源肽的研究取得突破性进展^[10]。Dallas 等^[2]利用肽组学技术揭示了人乳内源肽在乳腺内形成的机制。Holton 等^[11]利用肽组学技术研究人乳内源肽在消化过程中的变化。Gan 等^[12]利用肽组学技术研究了 pH 对人乳中蛋白质和蛋白酶体系的影响。肽组学技术的应用揭示了人乳内源肽的产生、消化过程以及与婴儿生长发育的关系。但是内源肽在人乳中的含量非常低,高丰度蛋白质及其他成分干扰内源肽的分析检测,因此内源肽的分离制备是研究人乳内源肽必不可少的关键步骤。目前常用的肽制备方法有三氯乙酸(trichloroacetic acid solution, TCA)沉淀法^[2]、离心超滤法^[13,14]、有机溶剂沉淀法^[15-17],以及利用强疏水性碳介孔材料(highly ordered mesoporous carbon, OMC)富集法^[18]。目前文献报道的人乳内源肽研究中大多采用 TCA 沉淀法制备内源肽^[12,19],因此关于样品制备方法对于人乳内源肽分析结果影响的研究非常少见^[20]。为了比较不同制备方法对人乳内源肽的影响,本研究分别采用不变性、加热变性和化学变性后超滤的超滤法、有机溶剂沉淀和酸沉淀的沉淀法以及 OMC 材料富集法共 6 种方法制备人乳内源肽,利用 LC-MS/MS 研究样品制备方法对人乳内源肽分析结果的影响。

1 实验部分

1.1 仪器、材料、试剂与样品

LC-MS/MS 系统由 Agilent 1100 HPLC 系统和 LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪(配有纳升电喷雾离子源及 Xcalibur 2.1 数据处理系统)组成。SpeedVac 真空冷冻干燥机,美国 Thermo 公司。Milli-Q 超纯水一体机和超滤管(10 kDa, 0.5 mL)购自美国 Millipore 公司。Allegra 64R 台式高速冷冻离心机,美国 Beckman 公司。

石英毛细管购自美国 Polymicro Technologies 公司。Waters Oasis HLB 固相萃取小柱购自美国 Waters 公司。OMC 材料为中国科学院分离分析重点实验室自制。

甲酸(formic acid, FA, 色谱纯)购自美国 Fluka 公司;乙腈(acetonitrile, ACN, 色谱纯)购自德国 Merck 公司。甲醇(色谱纯)购自美国 Thermo 公司。三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、三氯乙酸(trichloroacetic acid solution, TCA)、脲、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)等试剂购自美国 Sigma 公司。其他有机溶剂购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

人乳样品由北京伊利科技发展有限公司提供,样品采自 45 位居住于哈尔滨、青岛、呼和浩特 3 个城市分娩后 3~17 天的母亲,乳母年龄为 23~39 周岁。样品采集后冷冻于 -80 °C,本研究所使用的样品是 45 份样品的混合物。

1.2 人乳内源肽的制备方法

采用了超滤法、沉淀法和 OMC 材料富集法 3 种方法制备人乳内源肽。超滤法中分别考察了不变性(UF 1)、热变性(UF 2)和化学变性(UF 3)3 种变性方式对内源肽的影响;沉淀法中分别考察了酸沉淀(PCPN 1)和有机溶剂沉淀(PCPN 2)两种沉淀方式的影响。内源肽制备方法和编号见表 1。

表 1 人乳内源肽的制备方法
Table 1 Methods of the extracting endogenous peptides from human milk

No.	Method
UF 1	10 kDa ultrafiltration
UF 2	heat denaturation, 10 kDa ultrafiltration
UF 3	chemical denaturation, 10 kDa ultrafiltration
PCPN 1	trichloroacetic acid precipitation
PCPN 2	alcohol precipitation
OMC	highly ordered mesoporous carbon enrichment

1.2.1 超滤法

不变性:取 200 μL 人乳用去离子水稀释 5 倍混合均匀。热变性:参考 Wang 等^[7]的方法,取 200 μL 人乳用去离子水稀释 5 倍混合均匀,稀释液在水浴 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。化学变性:参考 Wan 等^[21]的方法,取 200 μL 人乳加入 800 μL 蛋白质变性液(7 mol/L 脲、2 mol/L 硫脲、20 mmol/L DTT),混合均匀变性 30 min。不变性、热变性和化学变性后的样品分别用截留相对分子质量 10 kDa 的超滤管在 14 000 g、20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下超滤 30 min,收集超滤液分别得到 UF 1、UF 2 和 UF 3 法制备的样品,超滤液冷冻干燥后进行后续处理。

1.2.2 沉淀法

酸沉淀法:参考 Dallas 等的方法^[2,22],取 200 μL 人乳与 200 g/L TCA 以体积比 1:1 混合,充分混合后在 14 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 20 min,收集上清液为 PCPN 1 样品。有机溶剂沉淀法:取 200 μL 人乳与 800 μL 有机溶剂(50% 乙醇+50% 丙酮+0.1% 醋酸)混合,充分混合后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀,在 14 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 20 min,收集上清液为 PCPN 2 样品。酸沉淀法和有机溶剂沉淀法获得的上清液冷冻干燥后进行后续处理。

1.2.3 OMC 富集法

取 20 μL 人乳,加入 120 μL 0.1% (v/v) TFA 水溶液,95 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 后加入 30 μL 质量浓度为 30 g/L 的 OMC 材料,振荡孵育 30 min,在 20 000 g、20 $^{\circ}\text{C}$ 离心 3 min,弃去上清液,加入 100 μL 0.1% (v/v) TFA 水溶液混匀后离心弃去上清液,以上操作重复两次。加入 100 μL 80% (v/v) ACN/0.1% (v/v) TFA 水溶液混匀后离心收集上清液,以上操作重复两次,合并收集到的上清液,即为 OMC 样品,冷冻干燥后用于后续处理。

1.3 样品脱盐处理

经过 1.2 节不同方法处理的样品分别用 SPE 柱除盐,步骤如下:SPE 柱用 1.5 mL 甲醇活化后加入 1.5 mL 0.1% (v/v) TFA 水溶液平衡,将样品以 0.5 mL 0.1% (v/v) TFA 水溶液溶解后加入 SPE 柱中,以 1.5 mL 80% (v/v) ACN/0.1% (v/v) TFA-H₂O 溶液进行洗脱,收集洗脱液冷冻干燥保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 LC-MS/MS 分析

脱盐后的样品以 0.1% (v/v) 甲酸水溶液溶解并制备成质量浓度为 0.2 g/L 的溶液,上样量为 8

μL ,加载到 15 cm 毛细管分析柱(内径为 180 μm ,填充 C₁₈ AQ 填料)中进行液相色谱-质谱分析。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液,流动相 B 为含 0.1% 甲酸的 98% 乙腈溶液。梯度洗脱程序如下:0~80 min, 5% B~25% B; 80~95 min, 25% B~35% B; 95~97 min, 35% B~90% B; 97~107 min, 90% B; 107~109 min, 90% B~0% B; 109~126 min, 0% B; 流速 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。在 Orbitrap 质量分析仪中以 60 000 的分辨率获得了完整的质谱扫描图(m/z 400~2 000)。对其中最强的 15 个离子进行离子碰撞解离(CID),再进行 MS/MS 扫描,扫描范围在 m/z 400~2 000。动态排除功能设置如下:重复 2; 持续时间 30 s; 排除持续时间为 60 s。系统控制和数据收集由 Xcalibur 软件进行。每个样品进行 3 次质谱分析。

1.5 数据检索

Xcalibur 采集的 *.RAW 文件用 Thermo Proteome Discoverer (v1.4) 转换成 *.MGF 格式,之后用 Mascot 2.5.1 软件在人蛋白质数据库(Human spains, 蛋白质数目为 22 427, <http://www.uniprot.org/>)中进行检索。搜库参数如下:不设置酶切、最大漏切数和固定修饰,可变修饰设置为甲硫氨酸的氧化(+15.994 9 Da)。母离子的质量容忍偏差为 20 ppm,碎片离子为 0.8 Da。导出肽段时控制假阳性率(FDR)<1%,对导出结果 Score > 20 的肽段视为有效数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 LC-MS/MS 分析内源肽的基峰色谱图

将人乳样品分别经过表 1 所列的方法处理后进行 LC-MS/MS 分析,图 1 为在相同分析条件下不同方法制备的人乳内源肽的基峰色谱图。UF 1、UF 2、UF 3 与 OMC 法制备的样品的色谱峰在 10~100 min 的时间内均有分布,说明超滤法和 OMC 法制备的样品中肽段极性较宽泛。经 PCPN 1 和 PCPN 2 两种沉淀法制备的样品显示出较大差别,其中 PCPN 1 法制备的样品谱峰主要集中在 10~70 min,说明该样品中亲水性肽较多;PCPN 2 法制备的样品的谱峰主要集中在 50~100 min,说明该样品中疏水性肽段较多。

2.2 不同方法制备的人乳内源肽及其母体蛋白质

每个样品经过 3 次平行实验,在 3 次实验结果中均被鉴定到的肽视为共有肽段;3 次结果鉴定到

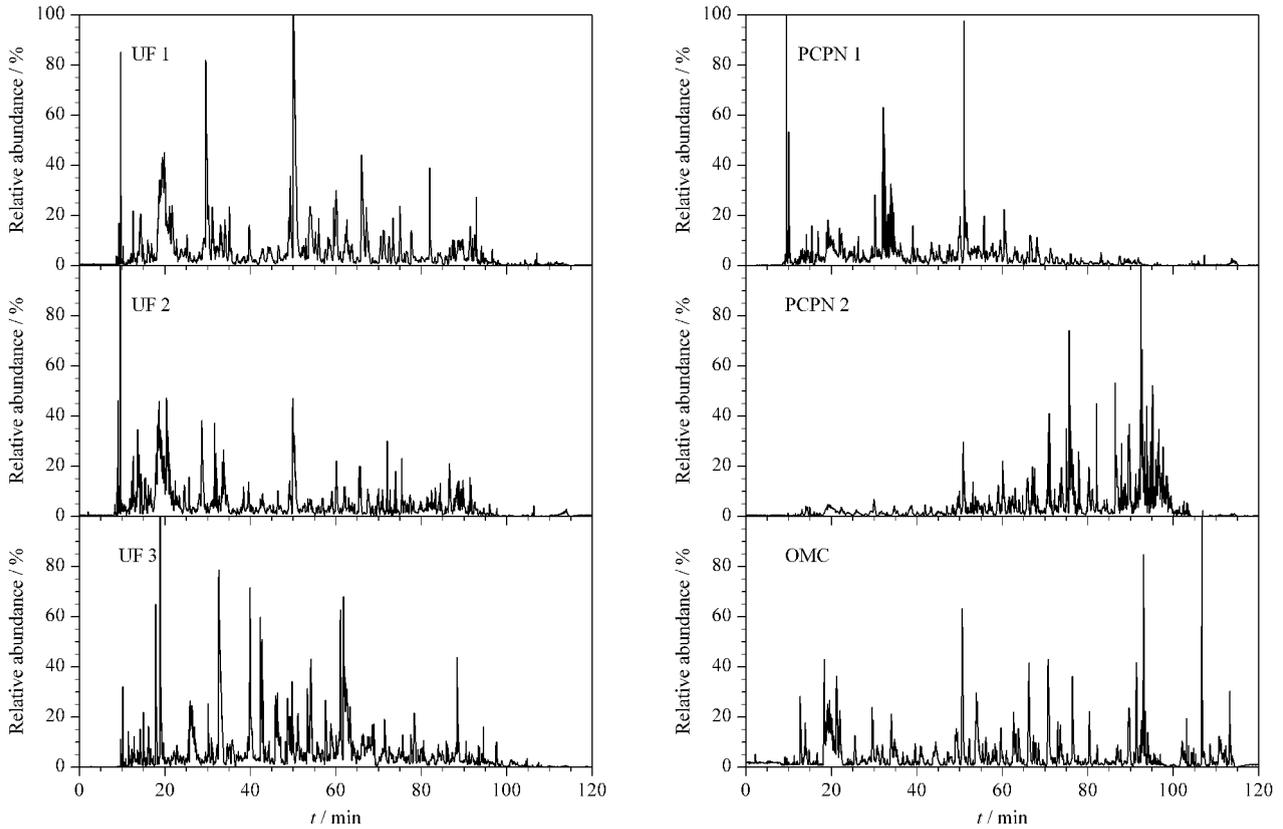


图 1 不同方法制备的人乳内源肽的 LC-MS/MS 基峰色谱图

Fig. 1 Base peak chromatograms of human milk endogenous peptides extracted using different methods

的所有肽段合并删除重复肽段后得到的肽段为该方法的总肽段鉴定结果;共有肽段数占总肽段数的百分比为共有肽段百分比。母体蛋白质为释放内源肽的蛋白质,其数据处理与肽的处理方法一致。

不同方法制备的样品经 LC-MS/MS 分析,所鉴定到的肽及其母体蛋白质的数目结果见表 2。由表 2 可见,不同方法制备的样品中所能鉴定到的肽段数目存在很大差别,其中 UF 1 法和 UF 2 法制备的样品鉴定到的肽段数目最多,分别为 1161 ± 8 条和 1017 ± 91 条;化学变性法 UF 3 鉴定的肽段数目最少,只有 366 ± 18 条。两种沉淀法 PCPN 1 和 PCPN

2 鉴定的肽段数目非常接近,分别为 779 ± 69 和 876 ± 55 条。OMC 法制备的样品中鉴定到的肽段数目为 549 ± 151 条。样品中鉴定的内源肽的母体蛋白质数目与内源肽数目表现出类似的规律。

共有肽段百分比和肽段数目的相对标准偏差 (RSD) 反映了样品数据的稳定性。UF 1 法制备的样品中共有肽段百分比最高为 51.49%, OMC 法制备的样品中共有肽段百分比最低仅为 31.82%,其他 4 种方法制备的样品百分比比较接近,为 38.48%~44.28%。同一样品 3 次重复实验的结果中肽段数目的 RSD 顺序依次为:UF 1 法制备的样品中鉴定

表 2 LC-MS/MS 鉴定的不同方法制备的人乳内源肽及其母体蛋白质数目 (n=3)

Table 2 Numbers of human milk endogenous peptides and precursor proteins identified using LC-MS/MS in samples extracted using different methods (n=3)

Method	Peptide				Protein			
	Number	RSD/%	Number overlapped	Percent overlapped/%	Number	RSD/%	Number overlapped	Percent overlapped/%
UF 1	1161±8	0.65	795	51.49	27±1	2.17	22	68.75
UF 2	1017±91	8.98	573	38.48	26±2	7.91	16	42.11
UF 3	366±18	4.89	222	42.37	11±2	21.65	7	46.67
PCPN 1	779±69	8.84	484	44.00	15±2	13.58	11	52.38
PCPN 2	876±55	6.29	542	44.28	18±3	14.70	13	59.09
OMC	549±151	27.55	280	31.82	14±3	21.12	8	44.44

到肽段数目的 RSD 最低为 0.65%，OMC 法制备的样品中鉴定到肽段数目的 RSD 最高为 27.55%，其他 3 种方法制备的样品中鉴定到肽段数目的 RSD 均小于 10%。每种样品中鉴定到的母体蛋白质中共有蛋白质的百分比与共有肽段的百分比显示出相似的变化规律。

以上结果说明,UF 1 法制备的样品所能鉴定到肽段数目最多,数据的稳定性最好;UF 2 法制备的样品所能鉴定到的肽段数目与 UF 1 法制备的样品的数目最接近,但稳定性较差;UF 3 法制备的样品所能鉴定到的肽段数目最少;PCPN 1 法制备的样品和 PCPN 2 法制备的样品所能鉴定到的肽段数目和数据稳定性都接近;OMC 法制备的样品的数据稳定性最差。目前人乳内源肽组学研究的文献中^[2,22,23]常采用 PCPN 1 方法制备的内源肽,从以上结果来看该方法制备的样品在鉴定肽段数目、数据稳定性等方面均不占优势。

2.3 不同方法制备的人乳内源肽的性质

将 LC-MS/MS 鉴定到的内源肽的长度、等电点 (isoelectric point, pI) 及亲水性平均系数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 等性质进行计算,不同性质的肽段占比的统计结果见图 2。6 种方法制备的样品所鉴定到的肽的氨基酸数目为 6~45,其中 11~20 个氨基酸的肽占比最大,其次是 21~30 个氨基酸的肽和氨基酸数 ≤ 10 个的肽,不同方法制备的肽在氨基酸数目分布方面没有明显差别。6 种方法制备的人乳内源肽的等电点范围为 2.00~13.00,除了 OMC 法外其他 5 种方法制备的样品的肽的等电点分布非常类似,即 pI 为 4.01~5.00 的肽占比最大。而 OMC 法制备的肽在不同 pI 间的百分比非常接近,说明 OMC 法富集内源肽时对 pI 没有偏倚。6 种方法制备的肽的 GRAVY 在 -3.00~2.00 的范围,所有的样品中 GRAVY 在 -0.99~0.00 内的肽占比都最大,6 种方法制备的样品中 GRAVY 为 0.01~1 的肽占比 OMC 法最高。以上结果说明,除 OMC 法外其他 5 种方法制备的人乳内源肽的物理性质差别不大,OMC 法制备的人乳内源肽的 pI 和 GRAVY 均显示与其他 5 种方法存在差别,说明 OMC 法制备的样品结果显示一定的特异性。

2.4 不同方法制备的人乳内源肽的差异

为了比较不同方法制备的样品中所鉴定到的肽段的差异,对同一肽段在不同样品中鉴定到的次数进行统计,结果见图 3。图 3 中的 6 个色块分别代

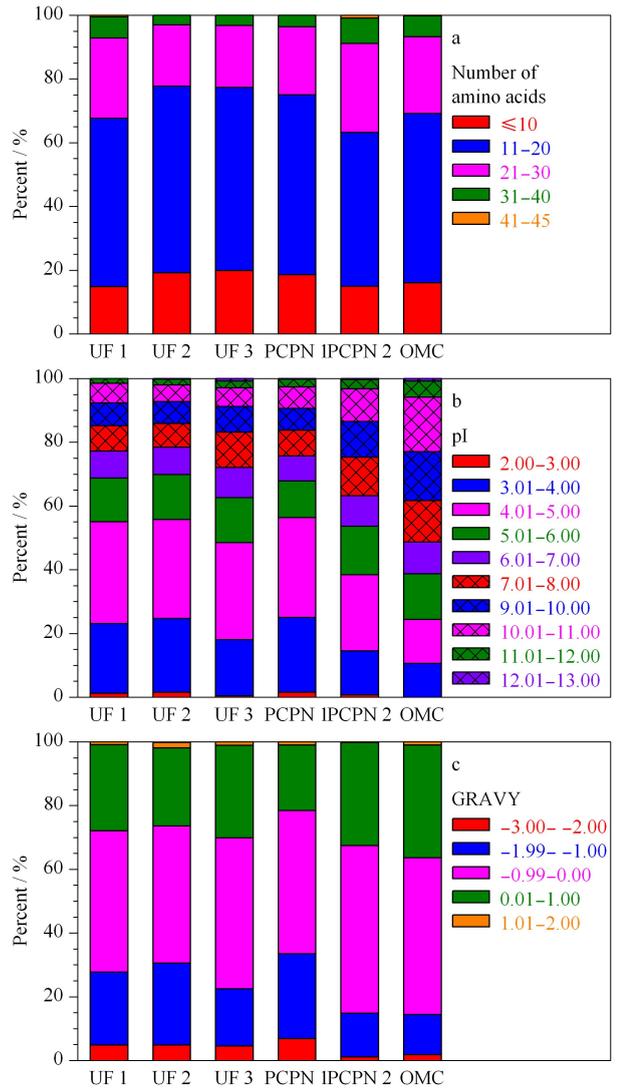


图 2 不同方法制备的人乳内源肽的性质
Fig. 2 Characteristics of endogenous human milk peptides extracted using different methods
 a. number of amino acids of endogenous peptides; b. pI of endogenous peptides; c. GRAVY of endogenous peptides.

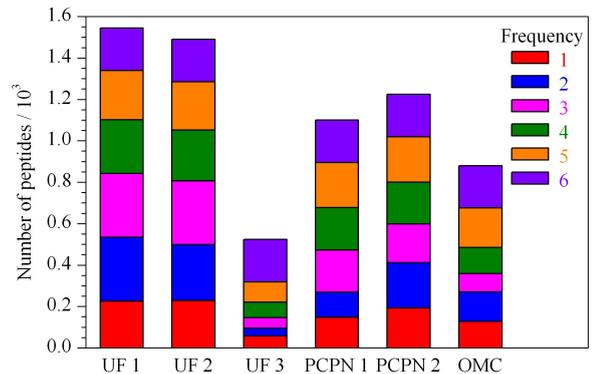


图 3 不同方法制备的样品中鉴定到的肽段的个数及频次
Fig. 3 Numbers and frequencies of human milk endogenous peptides identified in samples extracted using different methods

表同一肽段在 6 种方法制备的样品被鉴定的次数,例如 6 表示同一个肽段在 6 个样品中均被鉴定到,5 表示同一肽段在 5 个样品中鉴定到,以此类推。6 个样品中都能鉴定到的共有肽段有 205 条,分别是来源于 β -酪蛋白的 171 条、 α_{s1} -酪蛋白的 14 条、免疫球蛋白受体的 9 条、骨桥蛋白的 6 条和 κ -酪蛋白的 5 条。共有肽段数占各样品总肽段数的百分比分别为 13% (UF 1)、14% (UF 2)、39% (UF 3)、19% (PCPN 1)、17% (PCPN 2) 和 23% (OMC)。虽然 UF 3 法和 OMC 法制备的样品中鉴定到的总肽段数目较少,但共有肽段占比较高。图 3 中 1 表示某个样品中所能鉴定到的独有肽段,6 个样品独有肽段占比在 11%~16% 的范围内,UF 1 法和 UF 2 法制备的样品中鉴定到的独有肽段数目最多分别为 226 和 228 条。UF 1 和 UF 2 制备的样品中不仅肽的总数最高而且独有肽段数目最多。

为了比较不变性、热变性和化学变性对超滤结果的影响,UF 1、UF 2 和 UF 3 法制备的样品中鉴定到的总肽段结果的维恩图见图 4a。3 种超滤样品的共有肽段数目占其总肽段数目的百分比分别为 68%、71% 和 83%,说明 3 种方法均能鉴定到人乳中大部分的内源肽,虽然化学变性的 UF 3 能鉴定到的肽段数目少,但该样品中 83% 的肽和另外两个样品中鉴定到的相同。UF 1 和 UF 2 中所鉴定到的肽段的数目接近,两种方法制备的样品中共有肽段分别占其鉴定肽段的百分比为 70% 和 73%,说明两种方法制备的肽非常接近,变性与否对所制备的肽影

响不大,这个结果与 Dallas 证明不变性和热变性对三氯乙酸沉淀制备人乳内源肽没有影响的结论一致^[22]。两种沉淀法 PCPN 1 和 PCPN 2 制备的样品的总肽段数目的维恩图见图 4b,两种方法共有肽段数目占其总肽段数目的百分比分别是 54% 和 49%,说明不同沉淀方法所制备的人乳内源肽差异较大。

2.5 人乳内源肽的母体蛋白质

不同方法制备的样品中释放内源肽数目最多的前十个母体蛋白质列于图 5。6 种方法制备的样品中均能鉴定到的母体蛋白质有: β -酪蛋白,免疫球蛋白受体、骨桥蛋白、 α_{s1} -酪蛋白、 κ -酪蛋白和胆盐激活脂肪酶,来源于共有的母体蛋白质的肽段数目在该样品中占比均超过 88%,说明 6 种方法制备的样品都可以满足鉴定一般人乳内源性多肽的要求。

乳铁蛋白是人乳中重要的糖蛋白,对于婴儿胃肠道系统具有重要的作用,已证实乳铁蛋白释放的肽具有抗菌等作用,因此检测人乳中的乳铁蛋白及其肽段对于婴儿健康的研究非常重要。现有的人乳内

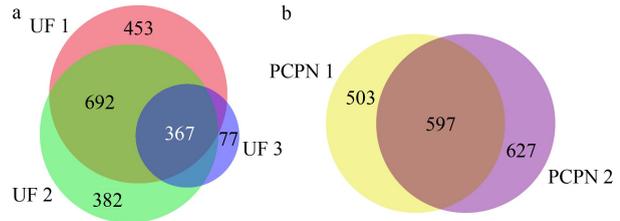


图 4 (a) 超滤法和 (b) 沉淀法制备的样品中人乳内源肽的维恩图
Fig. 4 Venn diagrams of human milk endogenous peptides in samples extracted using (a) ultrafiltration methods and (b) precipitation methods

	UF 1	UF 2	UF 3	PCPN 1	PCPN 2	OMC
Beta-casein	875	777	323	558	795	610
Polymeric immunoglobulin receptor	189	203	63	193	88	40
Osteopontin	139	149	25	179	53	30
Alpha-S1-casein	130	141	31	77	107	41
Kappa-casein	36	35	22	30	67	84
Bile salt-activated lipase	27	23	1	4	21	10
Clusterin	32	24		11	7	20
Butyrophilin subfamily 1 member A1	26	26	6	16	21	
Lactotransferrin		21	38			19
Perilipin-2	18	5		1	3	
Serum albumin			3			
Complement C4-A	9	7	3	3	9	
Beta-1,4-galactosyltransferase 1	8	9		5	15	3
Mucin-1	8	14		6	18	5
Histone H2B type 1-O						6
Histone H2B type 2-F		1	3			

图 5 不同方法制备的样品中释放肽段数目最多的前 10 个母体蛋白质

Fig. 5 Top 10 precursor proteins releasing abundant human milk endogenous peptides in samples extracted using different methods

源肽的研究采用三氯乙酸沉淀法处理样品,报道的结果中均未检测到来源于乳铁蛋白的内源性肽段^[22,23]。由图 5 可见,UF 2、UF 3 和 OMC 法制备的样品中均鉴定到乳铁蛋白释放的内源肽,分别为 21、38 和 19 条,而其他 3 种方法制备的样品未检测到源于乳铁蛋白的内源肽。说明不同样品制备方法可能导致源于乳铁蛋白的特异性肽段丢失。

图 6 展示了所鉴定到的内源肽在母体蛋白质上的覆盖率, β -酪蛋白释放的内源肽数目最多,肽段在 β -酪蛋白上的覆盖率也最高,这与 β -酪蛋白结构疏松、亲水性强的特点相关^[24]。免疫球蛋白受体蛋白释放的内源肽数目较多,但蛋白质覆盖率相对较低,说明免疫球蛋白受体蛋白释放内源肽的区域相对较

集中。所有样品中内源肽在骨桥蛋白和 α_{s1} -酪蛋白的覆盖率较高,UF 1、UF 2 和 PCPN 1 法制备的样品中内源肽在骨桥蛋白和 α_{s1} -酪蛋白的覆盖率均超过 70%。UF 2、UF 3 和 OMC 法制备的样品中检测到来源于乳铁蛋白的内源肽在乳铁蛋白上的覆盖率分别为 14%、16% 和 19%,说明源于乳铁蛋白的内源肽不是偶然检测到的,而是以上 3 种制备方法有利于这类肽的富集。OMC 法制备的样品中来源于 κ -酪蛋白的肽段数目最多为 84 条,蛋白质覆盖率也最高为 55%;该样品也是唯一鉴定到 6 条来源于组蛋白 H2B1-O 型的内源肽,蛋白质覆盖率为 41%。以上结果说明,不同的样品制备方法直接影响特异性肽的富集,可根据研究目的选择合适的制备方法。

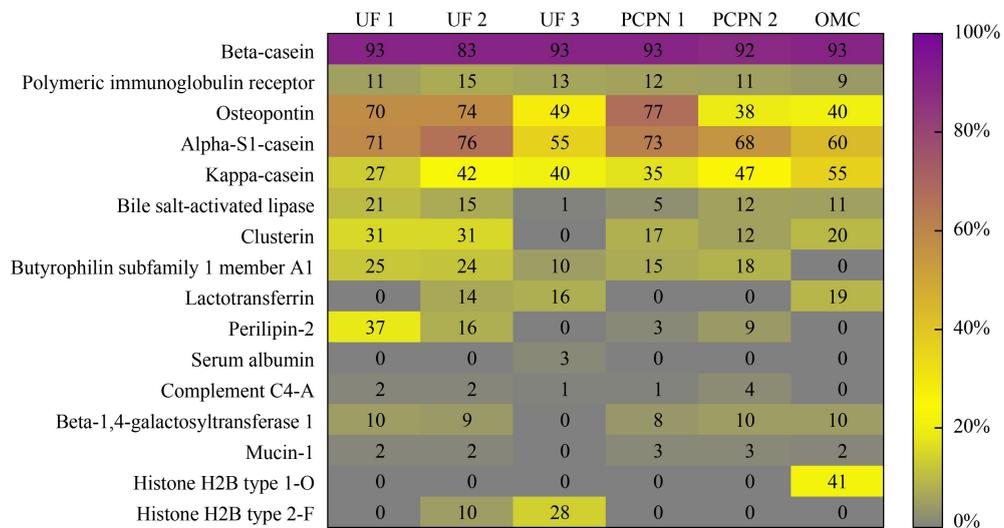


图 6 内源肽在母体蛋白质上的覆盖率

Fig. 6 Percent of coverage of human milk endogenous peptides in precursor proteins

3 结论

人乳成分复杂多变且样品珍贵,样品制备方法对人乳内源肽研究有决定性的影响。本研究系统比较了不同样品制备方法对于 LC-MS/MS 分析人乳内源肽的影响,结果表明热变性超滤法制备的样品中内源肽的数目多,可富集到源于乳铁蛋白的内源肽,是较理想的制备人乳内源肽的方法。本文的研究结果表明人乳中存在对于婴儿健康重要的源于乳铁蛋白的内源肽,文献常用的样品制备方法导致这类内源肽丢失而未被检测到。因此,统一和规范样品制备方法对于研究结果的可比性具有重要的意义,本研究可为人乳内源肽的样品制备方法的选择提供借鉴。

参考文献:

- [1] Dingess K A, De Waard M, Boeren S, et al. Food Funct, 2017, 8(10): 3769
- [2] Dallas D C, Smink C J, Robinson R C, et al. J Nutr, 2015, 145(3): 425
- [3] Hakansson A P. J Pediat-Brazil, 2015, 91(1): 4
- [4] Wang X, Sun Y, Wang F, et al. Food Funct, 2020, 11(3): 2291
- [5] Liepke C, Adermann K, Raida M, et al. Eur J Biochem, 2002, 269(2): 712
- [6] Wada Y, Lonnerdal B. J Nutr Biochem, 2014, 25(5): 503
- [7] Wang S, Qin H, Mao J, et al. J Proteome Res, 2020, 19(4): 1423
- [8] Niu H, Zhang H Y, Peng J X, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(8): 853
牛欢, 张红燕, 彭佳喜, 等. 色谱, 2019, 37(8): 853
- [9] Kong X Y, Du J S, Xu J L, et al. Chinese Journal of

- Analytical Chemistry, 2019, 47(11): 1816
孔祥怡, 杜建时, 徐金玲, 等. 分析化学, 2019, 47(11): 1816
- [10] Yu W H, Qi Y X, Jin Y. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(5): 471
于文皓, 祁艳霞, 靳艳. 色谱, 2019, 37(5): 471
- [11] Holton T A, Vijayakumar V, Dallas D C, et al. J Proteome Res, 2014, 13(12): 5777
- [12] Gan J N, Robinson R C, Wang J Q, et al. Food Chem, 2019, 274: 766
- [13] Zheng X, Baker H, Hancock W S. J Chromatogr A, 2006, 1120(1/2): 173
- [14] Johnson K L, Mason C J, Muddiman D C, et al. Anal Chem, 2004, 76(17): 5097
- [15] Mahboob S, Mohamedali A, Ahn S B, et al. J Proteomics, 2015, 127: 300
- [16] Lai Z W, Petrera A, Schilling O. Biol Chem, 2015, 396(3): 185
- [17] Aristoteli L P, Molloy M P, Baker M S. J Proteome Res, 2007, 6(2): 571
- [18] Qin H, Gao P, Wang F, et al. Angew Chem Int Ed, 2011, 50(51): 12218
- [19] Nielsen S D, Beverly R L, Dallas D C. J Mammary Gland Biol, 2017, 22(4): 251
- [20] Dingess K A, Van Den Toorn H W P, Mank M, et al. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(7): 1351
- [21] Wan J, Cui X W, Zhang J, et al. Biochem Bioph Res Co, 2013, 438(1): 236
- [22] Dallas D C, Guerrero A, Khaldi N, et al. J Proteome Res, 2013, 12(5): 2295
- [23] Dallas D C, Guerrero A, Khaldi N, et al. J Nutr, 2014, 144(6): 815
- [24] Sadat-Mekmene L, Jardin J, Corre C, et al. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(1): 179