

## 在牛奶蛋白的UPLC-MS<sup>E</sup>鉴定和UPLC-MS/MS定量中使用Andrew+移液机器人进行自动化样品前处理

---

Li Yan Chan, Adabelle Ong

Waters Corporation

### 摘要

具有高生物价值和营养价值的牛奶蛋白在应用于食品时表现出技术功能。我们开发出一整套解决方案来鉴定和定量两类牛奶蛋白，即酪蛋白和乳清。ProteinWorks Auto-eXpress快速酶解试剂盒是一款非常灵活且普遍适用的样品制备试剂盒，其中包含经过预先称重、具有批次可溯源性的试剂，这些试剂针对用户进行了优化，可通过特征性肽段分析方法对蛋白质进行准确、精密且稳定的LC-MS定量分析。本应用纪要中使用的ACQUITY Premier色谱柱基于MaxPeak高性能表面(HPS)技术，该技术提供了一种高效表面屏障，可减少分析物与金属表面的不良相互作用并改善酪蛋白中所含磷酸肽的分析。蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1工作流程有助于发现特征标记肽段，这一步对于牛奶蛋白的后续UPLC-MS/MS定量必不可少。使用Andrew+移液机器人实现校准标准品生成方法和分步酶解流程自动化，再结合云端OneLab软件，显著缩短了手动移液所需时间，使实验室分析人员可以同时执行其他任务，大幅提高工作效率。

### 优势

- 提高酶解速度和完成度 - 使用RapiGest SF表面活性剂加快蛋白质的胰蛋白酶酶解
- 不漏检任何肽 - 使用MaxPeak高性能表面技术增强磷酸肽检测

- 大幅提高工作效率 – 自动化方案简单省时，并可减少重复移液

---

## 简介

牛奶被公认具有健康益处，并含有宝贵的营养成分，还可用于生产乳制品，例如奶酪、黄油和酸奶。牛奶的重要成分包括蛋白质、脂质、脂肪酸和碳水化合物，其含量在不同动物种属来源的牛奶中有所不同<sup>1</sup>。对乳制品替代品的兴趣增加受到很多因素驱动，包括避免乳制品过敏原；对清洁标签产品的需要；与素食、严格素食和弹性素食生活方式的兼容性；以及对碳足迹、可持续性和动物福利的关注。确保此类牛奶替代品具有所需的营养成分非常重要。

研究表明，牛奶中的蛋白质成分提供了主要营养物质，并可通过抗菌和免疫调节活动防止感染，因此受到特别关注。它们对于乳制品的风味也起到至关重要的作用，会影响牛奶的口感和质地，这是感官体验的一部分。但是，在乳制品乳蛋白中发现的相同感官属性和功能在替代乳蛋白中仍然有限且不太理想，由此构成挑战<sup>2</sup>。目前，乳制品替代品的开发包括细胞乳制品或分离的乳制品成分，如纯素酪蛋白（需要表征影响食品技术产品开发的新基质和特性）。

众多牛奶蛋白研究中，现有的分析方法包括凝胶电泳、毛细管电泳、液相色谱和免疫学技术。但是，这些方法可能存在准确性不足、重现性较低等问题，并且样品处理程序费力费时。因此需要对这些蛋白质开发一种稳定可靠的定量方法，使其有利于研究和生产应用<sup>3</sup>，也可应用于乳制品替代蛋白。利用下文选择的牛奶蛋白证明该方法转移后用于其他替代蛋白质表征的性能。

本应用纪要的目的是测定液态牛奶样品中五种目标牛奶蛋白的浓度，即 $\alpha$ -酪蛋白( $\alpha$ -CN)、 $\beta$ -酪蛋白( $\beta$ -CN)、 $\kappa$ -酪蛋白( $\kappa$ -CN)、 $\alpha$ -乳清蛋白( $\alpha$ -LA)和 $\beta$ -乳球蛋白( $\beta$ -LG)。本文所述解决方案包括：(i)使用ProteinWorks Auto-eXpress快速酶解试剂盒进行胰蛋白酶酶解；(ii)使用自下而上式蛋白质组学方法发现每种蛋白质的特征肽段；(iii)使用UPLC-MS/MS方法在多重反应监测(MRM)模式下定量分析五种牛奶蛋白；(iv)使用Andrew+移液机器人自动化方案来简化流程。

---

## 实验

### 样品前处理

---

用ProteinWorks Auto-eXpress Low快速酶解试剂盒（部件号：[176004078 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/176004078-proteinworks-auto-express-low-5-digest-kit.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/application-kits/176004078-proteinworks-auto-express-low-5-digest-kit.html)）获得的酶解缓冲液溶解标准品，分别制得 $\alpha$ -CN、 $\beta$ -CN、 $\kappa$ -CN、 $\alpha$ -LA和 $\beta$ -LG浓度为10 mg/mL的五种储备液。各储备液取适当体积等分合并得到混标溶液，其中 $\alpha$ -CN和 $\beta$ -CN的初始浓度为3,500  $\mu$ g/mL、 $\kappa$ -CN和 $\beta$ -LG的初始浓度为1,000  $\mu$ g/mL、 $\alpha$ -LA的初始浓度为500  $\mu$ g/mL。然后利用Andrew+移液机器人进行连续稀释，得到一系列校准标准品。处理酶解流程前先用酶解缓冲液将五个市售牛奶样品稀释10倍。按照ProteinWorks Auto-eXpress Low快速酶解试剂盒的5步酶解流程处理28  $\mu$ L校准标准品或稀释后牛奶样品。校准系列配制和酶解流程完全由Andrew+移液机器人执行。

## 液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS FTN
色谱柱：	ACQUITY Premier CSH C <sub>18</sub> 色谱柱, 1.7 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100 mm（部件号：186009461）
柱温：	55 $^{\circ}$ C
样品温度：	4 $^{\circ}$ C
进样体积：	1 $\mu$ L
流速：	0.15 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度： (UPLC-QToF-MS <sup>E</sup> )	初始至1 min：1%流动相B； 1~15 min：流动相B从1%增加至40%； 15~15.5 min：流动相B从40%增加至90%； 15.5~17 min：90%流动相B；

	17~17.1 min: 流动相B从90%减少至1%;
	17.1~20 min: 1%流动相B
梯度:	初始至1 min: 5%流动相B;
(UPLC-MS/MS)	1~7.5 min: 流动相B从5%减少至50%;
	7.5~8 min: 流动相B从50%增加至90%;
	8~9 min: 90%流动相B;
	9~9.1 min: 流动相B从90%减少至5%;
	9.1~11 min: 5%流动相B

### UPLC-QToF-MS<sup>E</sup>的质谱条件

质谱系统:	Xevo G2-XS QToF
电离模式:	ESI+
采集模式:	ToF MS <sup>E</sup>
采集范围:	50–2000 Da
毛细管电压:	2.5 kV
碰撞能量范围:	15–40 eV
锥孔电压:	40 V
实时质量校正标样:	Glu血纤维蛋白肽B (2+, <i>m/z</i> 785.8426)

### UPLC-MS/MS的质谱条件

质谱系统：Xevo TQ-S micro

电离模式：ESI+

毛细管电压：2.2 kV

锥孔电压：30 V

离子源温度：120 °C

脱溶剂气温度：600 °C

脱溶剂气流速：1000 L/h

锥孔气流速：50 L/h

## 数据管理

色谱软件：MassLynx 4.2版

质谱软件：MassLynx 4.2版

信息学软件：TargetLynx v4.2

Progenesis QI for Proteomics v4.0

EZInfo v3.0

OneLab

---

## 结果与讨论

---

利用RapiGest SF表面活性剂（部件号：720003102 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2009/in-solution-enzymatic-protein-digestions-with-rapiGest.html>>）提高酶解速度和完成度，酶解后几乎不需要样品前处理，由此简化前处理流程。五个牛奶蛋白标准品先单独酶解一式三份，再进行UPLC-QToF-MS<sup>E</sup>分析。然后将混合QC样品的原始数据导入蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1，执行色谱对齐、数据归一化和峰提取。使用Ion Accounting鉴定工作流程总共鉴定出1050种肽，该工作流程设置如下：FDR小于1%、固定修饰（C的脲甲基化）和可变修饰（M的氧化和STY的磷酸基化）。加载的UniProt FASTA文件包含经筛选后仅含经审查牛序列的数据库。

主成分分析(PCA)是蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1的关键功能之一，有助于清晰显示数据，以确定是否存在任何异常值，还能了解样品的分组情况。图1中的无监督PCA得分图显示了五种蛋白的清晰聚集。所有混合QC样品都紧紧聚集在PCA得分图中心附近，证明该方法的重现性良好并且数据处理过程未引入任何偏差。 $\beta$ -CN和 $\kappa$ -CN紧密聚集在一起，表明两种酪蛋白之间的差异很小。

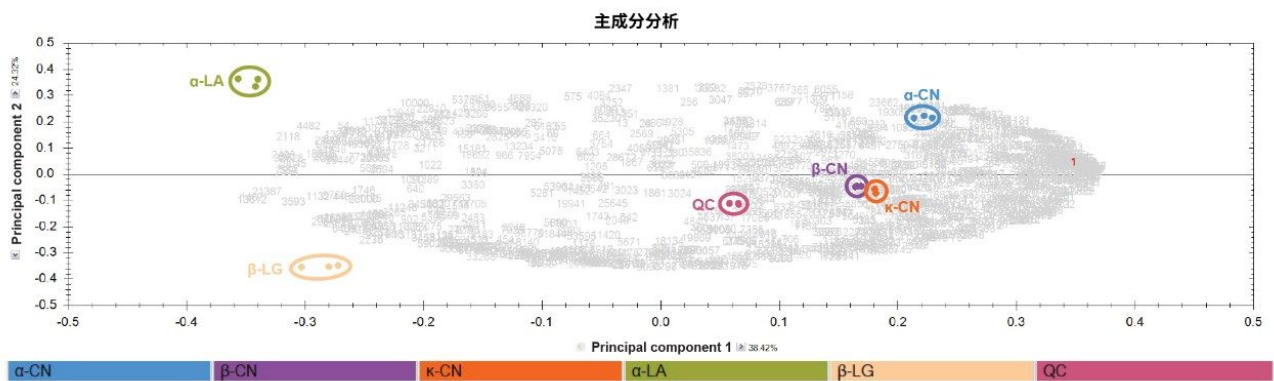


图1.蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1所得五种牛奶蛋白的PCA得分图

将肽数据导出至EZInfo，使用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)进行监督式多变量分析。OPLS-DA是一种有用的统计工具，有助于鉴定特征标记肽段。图2A显示了 $\beta$ -CN与其他四种蛋白的代表性OPLS-DA得分图。绘制S图（图2B）以突出显示导致 $\beta$ -CN与其他四种蛋白差异的特征。选择置信度和重要程度最高的特征（用蓝色突出显示）导回蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1，以验证并进一步评价鉴定结果（图2C）。本例中选择的肽段为 $\beta$ -CN的独特肽段序列，这些序列在其他四种蛋白中均未发现。对五种牛奶蛋白重复该过程，筛选出特征标记肽段列表。然后对每种蛋白选择一种肽段进行定量，并再监测至少一种肽段用于确认（表1）。肽段的选择标准包括良好的色谱分离度、信号强度和信噪比。

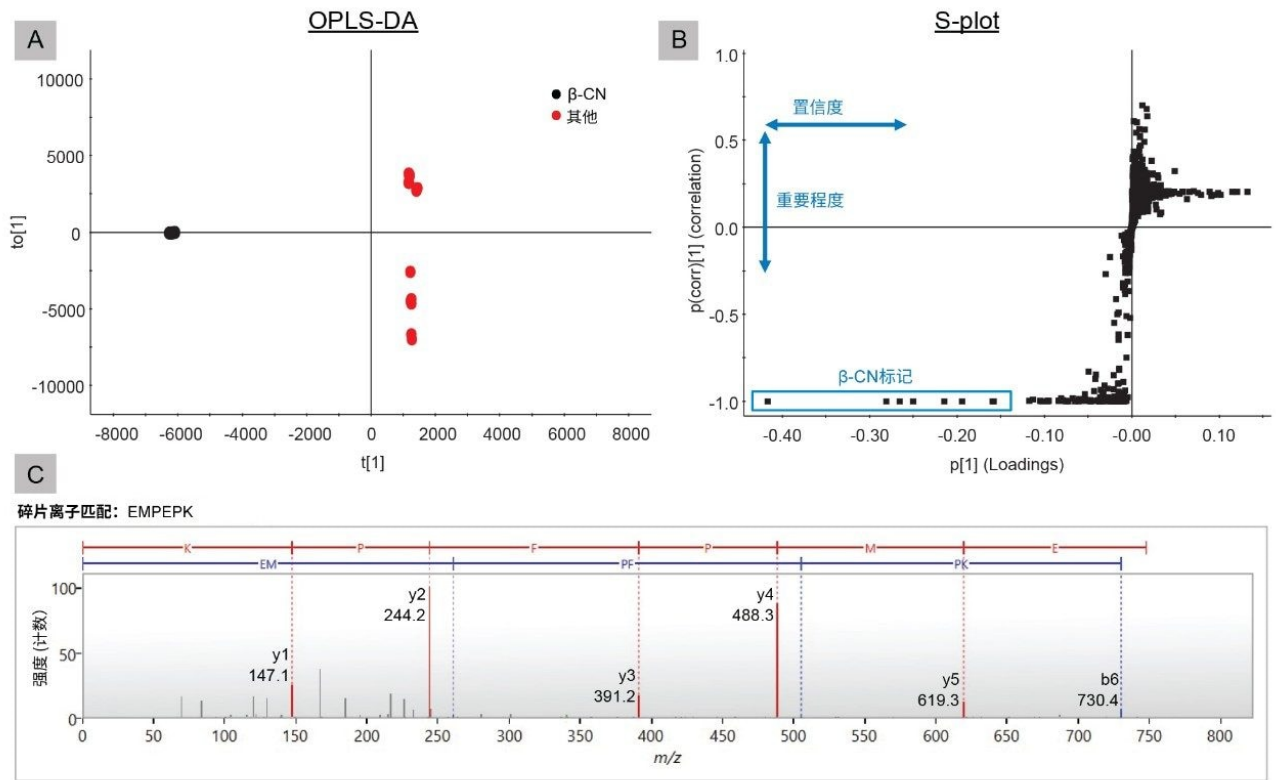


图2.A. OPLS-DA得分图; B.  $\beta$ -CN与其他四种蛋白的S-plot; C.肽段EMPEPK的鉴定示例

蛋白质	肽段	MRM	碰撞能量(eV)
α-酪蛋白 (α-CN)	HQGLPQEVLNENLLR	587.3>758.4	20
		587.3>790.4	20
		587.3>889.5	20
	YKVPQLEIVPNSAEER <sup>a</sup>	651.3>784.4	20
		651.3>882.3	20
		651.3>971.6	20
	FFVAPFPEVFGK	692.9>920.5	20
		692.9>991.5	20
		692.9>1090.6	20
β-酪蛋白 (β-CN)	EMPFPK <sup>a</sup>	374.7>244.2	10
		374.7>391.2	10
		374.7>488.3	10
	VLPVPQK	390.8>275.2	20
		390.8>372.2	20
		390.8>568.3	10
κ-酪蛋白 (κ-CN)	YIPIQYVLSR <sup>a</sup>	626.4>637.4	20
		626.4>765.4	20
		626.4>975.6	20
	SPAQILQWQVLSNTVPAK	660.7>315.2	20
		660.7>716.4	20
α-乳清蛋白 (α-LA)	CEVFR <sup>a</sup>	355.8>175.4	20
		355.8>322.4	20
		355.8>421.5	20
	VGINYWLAHK	400.9>468.3	20
		400.9>654.4	20
		400.9>817.4	20
β-乳球蛋白 (β-LG)	VLVLDTDYKK <sup>a</sup>	398.6>654.3	20
		398.6>769.4	20
		398.6>882.5	20
	ALPMHIR	419.2>327.2	20
		419.2>425.3	20
		419.2>653.4	20

表1.各牛奶蛋白特征肽段的MRM条件。<sup>a</sup>选择用于定量的肽段。



所选特征肽段的MRM条件汇总于表1中。对于待检肽段，所有MRM通道的信噪比不得低于3，同时必须确定至少两种肽段用于蛋白归属<sup>4</sup>。之前报告的应用纪要（部件号：[720007025ZH < https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/maximizing-phosphopeptide-recovery-in-lc-ms-studies-with-maxpeak-high-performance-surfaces-technology.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/maximizing-phosphopeptide-recovery-in-lc-ms-studies-with-maxpeak-high-performance-surfaces-technology.html)）描述了使用MaxPeak高性能表面(HPS)技术分析磷酸肽的优势以及对肽段YKVPQLEIVPNSAEER检测的改善。

制备校准标准品是所有定量分析的必要条件，但这些步骤重复、耗时且容易发生人为错误；同样，蛋白质酶解流程也需要重复添加试剂多次；因此，这两种任务成为自动化的理想对象。在OneLab中生成校准曲线制备方案和ProteinWorks 5步酶解方案，该软件是在Andrew+移液机器人上设计和执行方案所使用的云端软件（图3）。

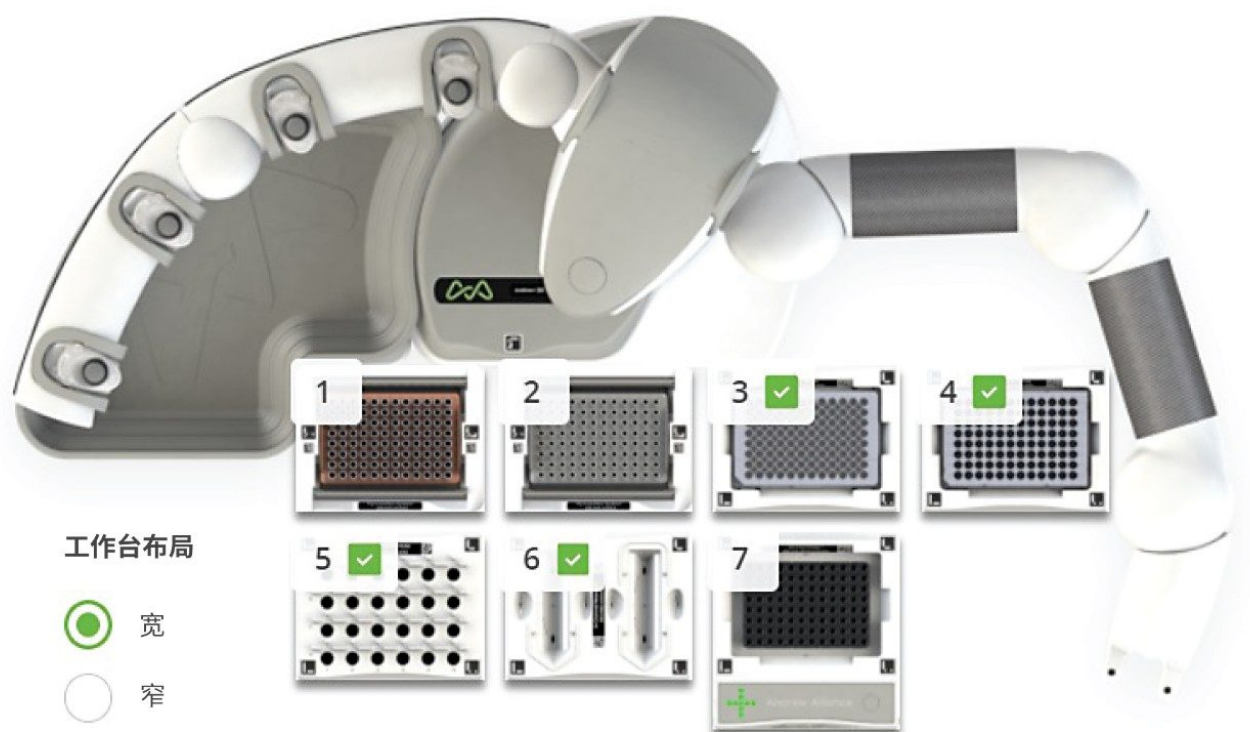


图3.使用Andrew+移液器和Domino模块制备标准品和样品的Andrew+工作台布局：1.吸头盒（10~300  $\mu\text{L}$  Optifit吸头）；2.吸头盒（0.1~10  $\mu\text{L}$  Optifit吸头）；3.微孔板；4.储存板；5.微量离心管；6.8通道移液器溶剂瓶；7.96-PCR板Peltier+。

比较Andrew+移液机器人与普通实验室分析人员所需的移液时间（不包括酶解过程中的加热时间）发现，Andrew+完成移液任务的速度是人工的5.5倍以上（图4）。流程自动化还能让实验室分析人员同时执行其他任务

，简化样品前处理程序，减少人为误差可能性，确保整个过程中分析方法性能的一致性。



图4.Andrew+与手动移液所需移液时间比较

利用Andrew+移液机器人创建的标准品校准曲线表现出优异的线性相关系数， $r^2 > 0.99$ ，使用简单的1/x加权并涵盖一系列浓度（表2）。

肽段标记	校准曲线	线性拟合结果 ( $r^2$ )	范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )
$\alpha$ -CN (YKVPQLEIVPNSAEER)	$44.564x + 353.050$	0.996	35–3,500
$\beta$ -CN (EMPFK)	$211.776x + 283.947$	0.998	35–3,500
$\kappa$ -CN (YIPIQYVLSR)	$318.841x + 2063.050$	0.994	10–1,000
$\alpha$ -LA (CEVFR)	$1181.280x + 940.877$	0.999	5–500
$\beta$ -LG (VLVLDTDYKK)	$27.041x - 146.845$	0.997	10–1,000

表2.五种蛋白各自对应的校准曲线

为提供代表性样品组，使用开发的半自动方法分析了多种市售乳制品，包括全脂、低脂、巧克力味和草莓味牛奶。图5展示了在各种牛奶样品中鉴定的不同浓度牛奶蛋白，所得结果与先前报道的文献高度吻合<sup>5</sup>。在五种目标蛋白中，我们观察到 $\beta$ -CN在所有牛奶样品中浓度最高(41~49%)，其次为 $\alpha$ -CN (27~34%)、 $\kappa$ -CN (11~15%)、 $\beta$ -LG (10~12%)和 $\alpha$ -LA (3%)。绝对定量分析应引入同位素标记的肽段作为内标。还建议进一步开展方法验证，例如测

试基质效应和回收率。

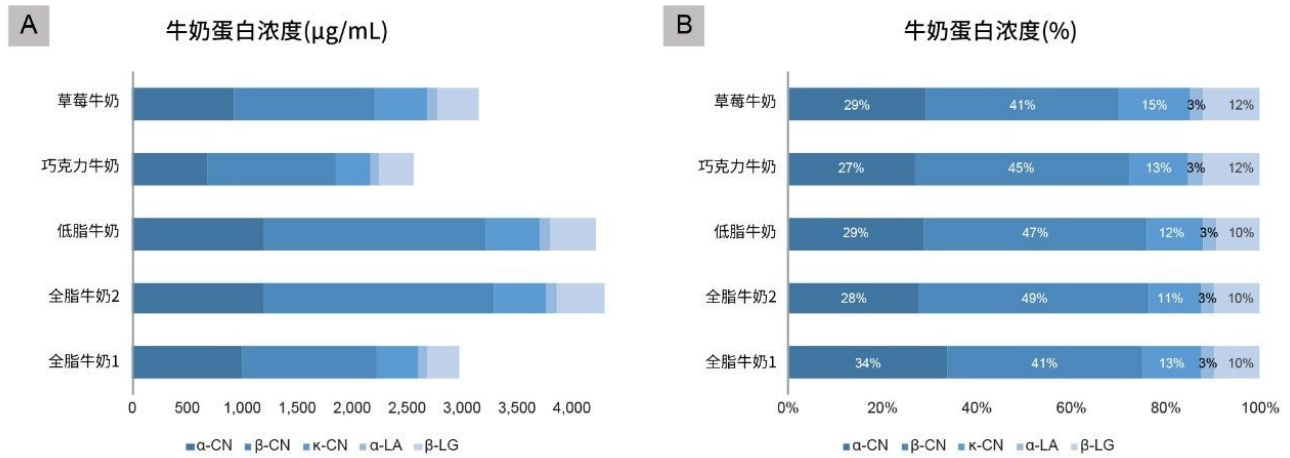


图5.市售乳制品中五种目标蛋白的浓度；A图用µg/mL表示，B图用百分比表示。

## 结论

自下而上式蛋白质组学分析是一种发现特征肽段的有用方法，已被证明适用于分析牛奶蛋白。蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1与EZInfo中的统计工具相结合，可将复杂工作流程化繁为简。发现的特征标记肽段已成功开发用于定量分析，并分析了多种市售乳制品以证明该方法的性能和有效性。使用OneLab创建并在Andrew+移液机器人上执行的自动化方法将移液时间大大缩短5.5倍以上，同时确保一致性。本应用纪要展示了一整套解决方案，同样的工作流程还可用于分析替代牛奶蛋白。

## 参考资料

1. Lucey J, Otter D, Horne D. A 100-Year Review: Progress on The Chemistry of Milk and Its Components. *J Dairy Sci.* (2017), 100: 9916–9932.
2. McClements D, Newman E, McClements I. Plant-based Milks: A Review of the Science Underpinning

Their Design, Fabrication, and Performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (2019), 18: 2047–2067.

3. Tremblay L, Laporte M, Léonil J, Dupont D, Paquin P. (2003) Quantitation of Proteins in Milk and Milk Products. In: Fox P, McSweeney P. (eds) *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. Springer, Boston, MA; 49–138.
4. Song E, Gao Y, Wu C, Shi T, Nie S, Fillmore T L, Schepmoes A A, Gritsenko M A, Qian W, Smith R D, Rodland K D, Liu T. Targeted Proteomic Assays For Quantitation of Proteins Identified by Proteogenomic Analysis of Ovarian Cancer. *Sci.Data* (2017), 1–13.
5. Bär C, Mathis D, Neuhaus P, Dürr D, Bisig W, Egger L, Portmann R. Protein Profile of Dairy Products: Simultaneous Quantification of Twenty Bovine Milk Proteins. *Int.Dairy J.*(2019), 97: 167–175.

## 致谢

本研究在沃特世国际食品与饮用水研究中心（IFWRC，新加坡）进行。本文作者诚挚感谢Turtletree Labs Pte.Ltd.提供的蛋白标准品以及有关新型牛奶领域的专业知识。

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

LC和LC-MS样品前处理工作流程的自动化液体处理功能 <  
<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135070059>>

蛋白质组学数据分析软件Progenesis QI <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134790665>>

720007335ZH, 2021年8月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.  
[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)  
沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号