

· 论 著 ·

虾过敏原蛋白质谱分析方法的酶解条件优化研究

潘晓东, 黄百芬, 蔡增轩, 王梦莉, 韩见龙, 陈荷

浙江省疾病预防控制中心理化毒理所, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 优化虾过敏原蛋白质谱分析试验的胰蛋白酶酶解条件, 提高质谱对虾过敏原蛋白的分析能力。**方法** 采用响应面设计对虾过敏原蛋白酶酶解的pH值、温度和时间进行优化, 用胰蛋白酶消化肽段, 经色谱分离后采用四极杆静电场轨道离子阱高分辨质谱测定, 利用UniProt蛋白数据库和MaxQuant软件对过敏原蛋白进行鉴定和定量分析。**结果** 获得虾中2种过敏原蛋白, 分别为原肌球蛋白和精氨酸激酶, 质谱强度为 $100.2 \times 10^6 \sim 436.5 \times 10^6$ 。响应面分析结果显示, 酶解时间为4.29 h、温度为44.15 ℃、溶液pH值为6.55时, 过敏原蛋白的质谱响应强度最高, 为 457.48×10^6 。采用溶液pH值6.5、温度44 ℃、时间4.2 h进行验证试验, 获得过敏原蛋白的平均响应强度为 448.1×10^6 , 与预测值偏差为2.1%。**结论** 采用响应面法可以优化蛋白酶酶解条件, 当pH值为6.5、温度为44 ℃、时间为4.2 h时具有最佳的酶解能力。

关键词: 过敏原蛋白; 响应面; 酶解; 质谱

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087 (2021) 08-0768-04

Optimization of enzymatic digestion conditions of shrimp allergens in mass spectrometry by response surface methodology

PAN Xiaodong, HUANG Baifen, CAI Zengxuan, WANG Mengli, HAN Jianlong, CHEN Qing

Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: **Objective** To optimize the enzymatic digestion conditions of trypsin, so as to improve the testing capacity of mass spectrometry for shrimp allergens. **Methods** The enzymatic digestion test was carried out by response surface methodology for optimizing pH, temperature and time. After enzymatic hydrolysis, the peptides were separated by chromatography and determined by high-resolution mass spectrometry with Q-orbitrap. The allergen protein was identified and quantified by UniProt database and MaxQuant software. **Results** Two allergen proteins, tropomyosin and arginine kinase, were isolated from shrimp, and their intensities ranged from 100.2×10^6 to 436.5×10^6 . Response surface analysis showed that when the digestion time was 4.29 hours, the temperature was 44.15 ℃ and pH value was 6.55, the maximal intensity of the allergen proteins was 457.48×10^6 . The experiment was validated with the digestion time of 4.2 h, pH value of 6.5, and temperature of 44 ℃, then resulted in the average intensity of 448.1×10^6 . The deviation from the predicted value was 2.1%. **Conclusions** The conditions of enzymatic digestion can be optimized by response surface methodology. The enzyme may have the best performance with the pH value of 6.5, temperature of 44 ℃ and digestion time of 4.2 hours.

Keywords: allergen protein; response surface methodology; enzymatic digestion; mass spectrometry

食物过敏是由蛋白类抗原引起的一种不良免疫反应, 影响致敏人群的身体健康。我国成人食物过敏发生率为6%, 主要过敏食物是虾肉, 且发病率呈逐年上升趋势^[1-2]。近年来, 蛋白组学技术广泛应用于食

物过敏原蛋白的鉴别及定量分析^[3]。该法常采用自下而上(bottom-up)策略, 即将蛋白酶解成肽段, 再经过色谱分离进入质谱分析, 通过碎片裂解技术, 得到肽段的碎片离子质量, 结合多肽氨基酸断裂方式, 计算多肽的氨基酸序列, 最终获取蛋白信息^[4-5]。目标蛋白的酶消化成为蛋白组学试验成功的关键。胰蛋白酶应用广泛、成本低、特异性强, 能酶切赖氨酸和精氨酸羧基末端形成的肽键, 是bottom-up蛋白组

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.08.003

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2019316301)

作者简介: 潘晓东, 博士, 副研究员, 主要从事理化分析工作

通信作者: 陈荷, E-mail: qingchen@cdc.zj.cn

学酶消化的金标准^[6]。胰蛋白酶通常的消化温度为 37 ℃, 溶液 pH 值为 7.0, 然而由于目标蛋白种类、试验设备等差异, 酶消化适宜的条件存在一定差异^[6], 因此在具体试验时需对酶消化条件进行优化。响应面法能同时改变变量的组合, 允许纳入相互作用效应^[7]。它可对多个响应并行优化, 以便找到它们之间的最佳折衷, 并且只需要从所有可能的变量组合中选取一小部分试验来覆盖设计空间, 大大减少试验次数。本研究采用响应面法对虾过敏原蛋白的酶消化条件, 即溶液 pH 值、消化温度和消化时间进行优化, 以提高酶对目标蛋白的酶解能力。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 超高效液相色谱-静电场轨道阱质谱仪, Vanquish 液相, Q Exactive 质谱, 均购自美国 Thermo 公司; Millipore Q 超纯水系统, 购自 Millipore 公司; Sigma 1-14 离心机, 购自美国 Sigma 公司; ThermoMSC-100 蛋白消化加热器, 购自杭州奥盛仪器有限公司。南美白对虾购于当地农贸市场, 将虾头部和外壳去除, 取肌肉组织进行均浆处理, -20 ℃冷冻保存, 待测。三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、碳酸氢铵、二硫苏糖醇、碘代乙酰胺、胰蛋白酶均购自美国 Sigma 公司, 纯度均大于 97%; 乙腈、乙酸和甲酸为色谱纯, 盐酸 (HCl) 和氨水为分析纯, 均购自德国 Merck 公司。Tris-HCl 缓冲液 (0.2 mol/L, pH=7.0): 228.0 g Tris 溶于 1 L 超纯水中, 再用 HCl 调 pH 值至 7.0。二硫苏糖醇溶液 (0.05 mol/L): 7.7 g 二硫苏糖醇溶于 1 L 超纯水中。

1.2 前处理方法 称取 3.0 g 样品, 加入 10 mL Tris-HCl 缓冲液 (0.2 mol/L, pH=7.0 缓冲液), 振荡 30 min, 超声 5 min, 4 ℃ 时 8 000×g 离心 15 min。精确吸取 200 μL 提取液, 加入 665 μL 水、10 μL 0.05 mol/L 二硫苏糖醇溶液混合后, 反应 30 min。取出后加入 10 μL 0.15 mol/L 碘代乙酰胺溶液摇匀, 室温避光静置 30 min。加入 100 μL 0.5 mol/L 碳酸氢铵溶液和 10 μL 胰蛋白酶溶液, 用乙酸或氨水调节溶液 pH 值至 7, 于 40 ℃金属浴中消化反应 5.25 h, 加入 5 μL 甲酸摇匀, 0.22 μm 滤膜过滤, 待进样。

1.3 响应面试验设计 通过中心复合试验法进行响应面优化。主要步骤: (1) 设计并执行试验; (2) 建立多元二次回归预测模型, 模型拟合度通过校正决定系数 R^2_{adj} 和相关系数 (r) 验证, 检验水准 $\alpha=0.01$; (3) 获得响应强度最优值并识别出最优过程条件; (4) 优化参数试验验证。针对胰蛋白酶消化蛋白过程

中溶液 pH 值、消化温度 (℃)、消化时间 (h), 设计 3 因素 (x) 3 水平的响应面分析试验 (表 1), 以 2 种过敏原蛋白原肌球蛋白和精氨酸激酶的相对定量结果的和为响应值 (y), 进行优化试验。采用 SAS JMP 10.0 软件 (试用版) 进行响应面分析, 通过软件自带的预测刻画器得到最优参数, 并进行试验验证。

表 1 中心复合试验设计的因素和水平

水平	因子 (x)		
	pH 值	温度 (℃)	时间 (h)
-1	5	35	1.5
0	7	40	5.25
1	9	55	9

1.4 色谱和质谱参数 液相色谱条件: Waters Acquity BEH C300 色谱柱 (1.7 μm, 2.1 × 100 mm); 流动相 A 水 (0.1% 甲酸), B 乙腈 (0.1% 甲酸), 梯度洗脱, 程序为 0~1 min, 4% B; 1~15 min, 30% B; 15~50 min, 95% B; 50~58 min, 99% B; 58~58.1 min, 4% B; 58.1~60 min, 4% B。流速 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量 5 μL。

质谱条件: 离子源 (HESI) 加热温度 250 ℃; 毛细管温度 320 ℃, 鞘气 (N₂) 流速 40 L/min, 辅助气 (N₂) 流速 10 L/min; 喷雾电压为 3.5 kV, 透镜电压为 50 V; 采用正离子扫描模式; Full MS/dd-MS² 监测模式, 一级质谱全扫描分辨率 $R=70\ 000$; C-trap 最大容量 (AGC target) 2×10^5 ; 最大注入时间 100 ms; 二级子离子全扫描 (ms^2) 分辨率 $R=17\ 500$; TopN=10; 二级最低阈值 10^4 ; 碰撞能量 NEC/step: 25, 35, 45。质谱仪每 7 日采用 Pierce LTQ Velos ESI 正离子校正溶液 (美国 Thermo 公司) 进行质量数校正。

1.5 质谱数据分析 虾肉蛋白序列来自 UniProt 蛋白数据库网站 (<http://www.uniprot.org>), 并下载为 Fasta 文件。质谱数据通过 MaxQuant 1.5.3 软件搜索, 采用非标记定量技术 (label-free quantification, LFQ) 对原肌球蛋白和精氨酸激酶进行相对定量, 并将定量值相加。MaxQuant 软件参数: 最大漏切位点数 2, 肽段范围 4~144, 母离子容差 10×10^{-6} ; 碎片离子容差 0.02 Da; b 离子权重 1; y 离子权重 1; 鉴定得到肽段和蛋白要求假阳性率小于 1%, 置信度大于 95%。

2 结果

2.1 优化试验结果 获得 2 种虾过敏原蛋白, 分别为原肌球蛋白和精氨酸激酶。响应面优化设计的 16 组试验结果显示, 2 种过敏原蛋白的质谱强度为 $100.2 \times 10^6 \sim 436.5 \times 10^6$, 见表 2。

表 2 响应面设计试验结果

试验号	pH 值	温度 (°C)	时间 (h)	强度 ($\times 10^6$)
1	5	30	1.50	300.7
2	9	30	1.50	329.2
3	5	80	1.50	327.5
4	5	30	9.00	253.7
5	9	80	1.50	132.5
6	9	30	9.00	257.7
7	5	80	9.00	407.8
8	9	80	9.00	100.2
9	7	55	5.25	424.4
10	7	55	5.25	419.9
11	7	55	1.50	435.1
12	7	55	9.00	436.5
13	7	30	5.25	396.1
14	7	80	5.25	351.0
15	5	55	5.25	390.5
16	9	55	5.25	289.6

2.2 响应面回归模型分析 本次建立的多元二次回归模型有统计学意义 ($F=61.391, P<0.001$), 拟合度较高 ($F=35.592, P=0.130$), 理论值与实际值呈一定的相关性 ($r=0.989$), 校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.973$, 即 97.3% 的试验数据变化可以用该模型说明。pH 值 ($F=114.362, P<0.001$)、温度 ($F=16.727, P=0.006$)、pH 值-温度 ($F=125.543, P<0.001$)、pH 值-时间 ($F=8.236, P=0.028$)、温度-时间 ($F=12.149, P=0.013$)、pH 值-pH 值 ($F=91.080, P<0.001$)、温度-温度 ($F=39.972, P=0.001$) 均有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.3 响应面分析 由图 1a 可见, 在 pH 和消化温度最低点时 (数值为 0) 和最高点时, 过敏原蛋白的响应强度均较低; 当缓冲液 pH 值一定时, 响应强度随消化温度增加, 呈先上升后缓慢下降趋势; 当消化温度不变时, 响应强度随 pH 值增加, 呈先升高后快速下降趋势。由图 1b 可见, 消化时间不变时, 响应强度随 pH 值增加呈先升高后下降趋势。由图 1c 可见,

消化时间不变时, 响应强度随消化温度增加, 呈先升高后缓慢下降趋势。

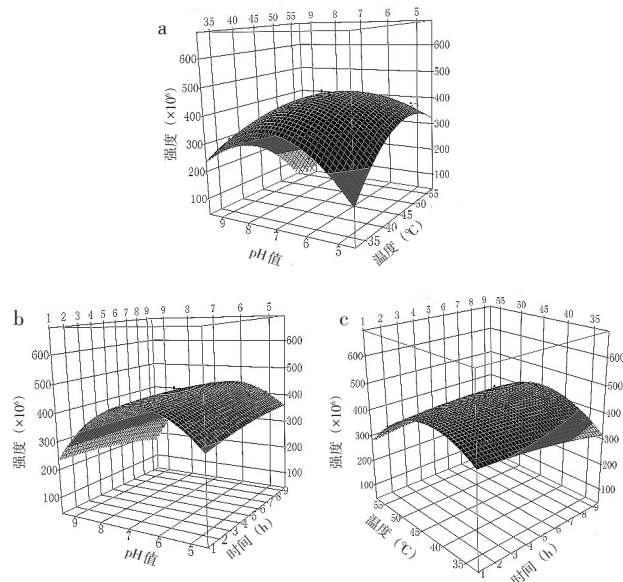


图 1 蛋白酶消化时间、温度和 pH 值的响应曲面图

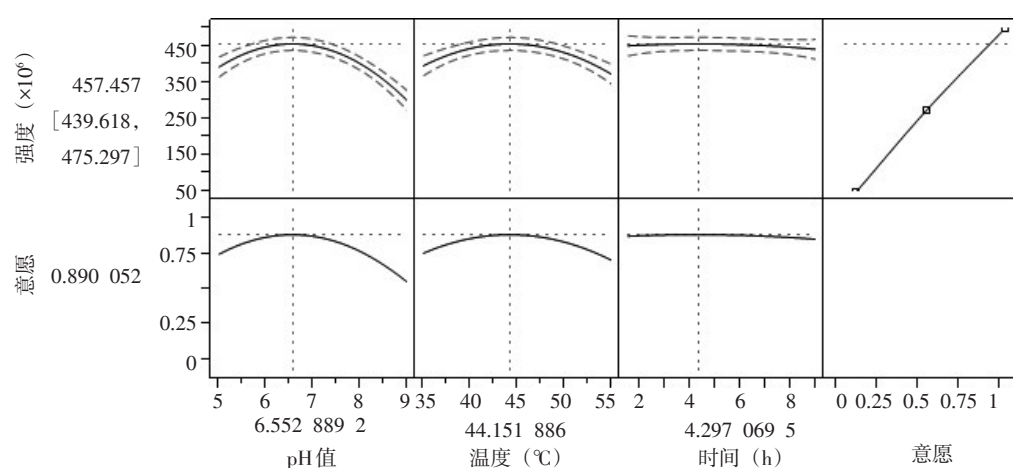
图 2 显示了蛋白酶最佳消化条件和在这些条件下完整模型的预测响应。通过预测刻画器最优化显示, 当消化时间为 4.29 h、消化温度为 44.15 °C、溶液 pH 值为 6.55 时, 过敏原蛋白的质谱响应强度最高, 为 457.48×10^6 。

2.4 蛋白酶最佳消化条件验证 考虑到实际试验操作, 对预测的最优化参数进行调整, 采用溶液 pH 值 6.5、消化温度 44 °C、消化时间 4.2 h 进行消化试验 (重复 3 次), 获得过敏原蛋白的平均响应强度为 448.1×10^6 , 与预测值偏差为 2.1%。

3 讨论

蛋白酶解是蛋白组学质谱分析的关键^[8], 一旦酶受到抑制或者消化不完全, 缺少相应肽段的形成, 在质谱分析和数据检索中, 会出现肽段的质谱响应低或者缺失, 造成蛋白覆盖率低, 甚至无法检索到目标蛋白^[9-13]。本研究在虾过敏原蛋白质谱分析时, 以原肌球蛋白和精氨酸激酶的质谱强度为目标, 对胰蛋白酶消化过程中 pH 值、消化温度和消化时间 3 个因素进行响应面设计优化。

响应面设计通过探究试验变量和指标的相关性, 经试验条件的改进, 建立响应面图形并对其进行回归拟合, 达到寻求最佳试验条件的目的^[14-15]。本研究采用中心复合试验, 基于不同的因素水平共进行 16 次试验, 建立回归模型, 溶液 pH 值和消化温度对响



注：曲线两侧虚线为95%置信区间，垂直虚线表示每个因素的最佳水平，水平虚线表示2个响应的预测值±标准差。

图2 蛋白酶最佳消化条件的预测刻画器剖面图

应强度具有显著影响。此外，溶液 pH 值、消化温度和消化时间三者之间存在显著的交互影响。当消化时间不变时，随着消化温度和 pH 值的增加，质谱响应强度出现先升后降趋势。通过预测刻画器预测最佳的试验参数为 pH 值 6.5、消化温度 44 °C、消化时间 4.2 h。经试验验证，测定值与预测值的偏差较小，为 2.1%（通常要求偏差在 5% 以内），提示响应面试验设计能够很好地优化蛋白酶消化过程中的溶液 pH 值、消化温度和消化时间。

参考文献

- [1] 刘晓宇, 李荔, 刘志刚. 食物过敏原介导食物过敏机制研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3 (4): 235-239.
- [2] CHEN Q, PAN X D, HUANG B F, et al. Authentication of shrimp muscle in complex foodstuff by in-solution digestion and high-resolution mass spectrometry [J]. Rsc Advances, 2017, 7 (52): 32903-32908.
- [3] 潘晓东, 黄百芬, 蔡增轩, 等. 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道离子阱质谱分析沼虾过敏原蛋白 [J]. 预防医学, 2020, 32 (10): 1010-1012, 1017.
- [4] NOOR Z, AHN S B, BAKER M S, et al. Mass spectrometry-based protein identification in proteomics-a review [J]. Brief Bioinform, 2021, 22 (2): 1620-1638.
- [5] AEBSOLD R, MANN M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function [J]. Nature, 2016, 537 (7620): 347-355.
- [6] SWITZER L, GIERA M, NIESSEN W M A. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments

- [J]. J Proteome Res, 2013, 12 (3): 1067-1077.
- [7] CHELLADURAI S J S, MURUGAN K, RAY A P, et al. Optimization of process parameters using response surface methodology: a review [J]. Mater Today Proc, 2021, 37: 1301-1304.
- [8] 徐长明, 张纪阳, 张伟, 等. 应用于 Bottom-up 蛋白质鉴定的质谱数据采集策略研究进展 [J]. 分析化学, 2013, 41 (7): 1120-1128.
- [9] MONACI L, DE ANGELIS E, MONTEMURRO N, et al. Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis [J]. TrAC, 2018, 106: 21-36.
- [10] VIDOVA V, SPACIL Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: targeted and data independent acquisition [J]. Anal Chim Acta, 2017, 964: 7-23.
- [11] SINITYN P, RUDOLPH J D, COX J. Computational methods for understanding mass spectrometry-based shotgun proteomics data [J]. Annu Rev Biomed Data Sci, 2018, 1: 207-234.
- [12] DUPREE E J, JAYTHIRTA M, YORKEY H, et al. A critical review of bottom-up proteomics: the good, the bad, and the future of this field [J/OL]. Proteomes, 2020, 8 (3) [2021-05-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32640657/>. DOI: 10.3390/proteomes8030014.
- [13] 潘晓东, 黄百芬, 张京顺, 等. 猪肉中 16 种 β -内酰胺类抗生素 UPLC-Q-Orbitrap 检测方法研究 [J]. 预防医学, 2019, 31 (11): 1100-1104.
- [14] YOLMEH M, JAFRI S M. Applications of response surface methodology in the food industry processes [J]. Food Bioproc Tech, 2017, 10 (3): 413-433.
- [15] 周志昊, 王凯杰, 龚萃萍, 等. 响应面法优化紫绒丝膜菌产紫色素培养基 [J]. 中国食品添加剂, 2016 (10): 77-82.

收稿日期: 2021-03-12 修回日期: 2021-05-26 本文编辑: 田田