

· 论 著 ·

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

潘晓东, 黄百芬, 蔡增轩, 王梦莉, 韩见龙, 陈苒

浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-四极杆静电场轨道离子阱质谱法, 分析沼虾中的过敏原蛋白。**方法** 基于 Bottom-up (自下而上) 蛋白分析策略, 采用 Tris-HCl 提取罗氏沼虾样品中的目标蛋白, 胰蛋白酶 40 °C 消化 6 h, 肽段经过色谱分离后采用四极杆静电场轨道离子阱质谱 (Full MS/dd-MS² 监测模式, TopN=10) 测定, 利用 UniProt 蛋白数据库和 Proteome Discoverer 软件鉴定过敏原蛋白。**结果** 获得 4 种过敏原蛋白, 分别为原肌球蛋白、精氨酸激酶、肌浆钙结合蛋白和血蓝蛋白, 肽段覆盖率分别为 53%、36%、12% 和 12%, 翻译后修饰的位点有天冬氨酸 (D) 的甲基化, 天冬酰胺 (N) 和谷氨酰胺 (Q) 的脱酰胺以及蛋氨酸 (M) 的氧化。**结论** 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道离子阱质谱能获得丰富的肽段及碎片信息, 灵敏度和分辨率较高, 可用于虾及虾制品的过敏原蛋白鉴定和分析。

关键词: 超高效液相色谱; 四极杆静电场轨道离子阱质谱; 过敏原蛋白; 虾; 特征肽段

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2020) 10-1010-04

Analysis of allergen protein in *Macrobrachium* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole orbitrap mass spectrometry

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 establish the ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole orbitrap mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS) for the analysis of allergen protein in *Macrobrachium*. **Methods** Based on the strategy of bottom-up protein analysis, the proteins in *Macrobrachium* samples were extracted by Tris-HCl, digested by trypsin at 40 °C for 6 hours, separated by chromatography, and analyzed by Q-Orbitrap-MS spectrometry (Full MS/dd-MS², TopN=10). Allergen proteins were identified with UniProt protein database and Proteome Discoverer software. **Results** Four kinds of allergen proteins were obtained, which were tropomyosin, arginine kinase, sarcoplasmic calcium binding protein and hemocyanin. The coverage rates of peptides in proteins were 53%, 36%, 12% and 12%, respectively. Post translation modifications were methylation of aspartic acid (D), deacylation of aspartic acid (N), glutamyl ammonia (Q) and oxidation of methionine (M). **Conclusion** The UPLC-Q-Orbitrap-MS can identified abundant peptide and fragment information with high sensitivity and resolution, which provides a technical support for the analysis of shrimp allergens.

Keywords: ultra-high performance liquid chromatography; quadrupole orbitrap mass spectrometry; allergen protein; shrimp; characteristic peptide

食物过敏通常是由摄入蛋白质引起 IgE 介导的消化系统内或全身性的变态反应^[1-2]。流行病学调查

显示, 我国成人食物过敏发生率高达 6%, 死亡率逐年上升^[3]。联合国粮农组织提出八大类致敏食物, 虾、蟹等甲壳动物是其中重要的一类^[4-5]。虾过敏后最常见的临床症状是荨麻疹和血管性红肿等皮肤反应, 其次为恶心、呕吐和腹泻等消化道反应, 严重者可导致休克甚至死亡^[6]。虾及虾制品过敏原蛋白分

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2020.10.009

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: 潘晓东, E-mail: xdpan@cdc.zj.cn

析通常采用酶联免疫吸附试验 (ELISA)、聚合酶链反应 (PCR) 和放射过敏原吸附实验 (RAST) [7], 这些方法为过敏原的控制提供了一定的技术基础。随着质谱技术的提高和生物信息学的发展, 过敏原蛋白的质谱分析因灵敏度高、选择性强等优点受到关注 [8-10]。然而质谱的类型很多, 如三重四极杆 [11]、飞行时间 [12]、静电场轨道离子阱 [13-14] 等。静电场轨道离子阱具有较高的分析灵敏度, 且在质荷比 (m/z) 为 200 时可获得高达 500 000 的超高分辨率测量结果 [15]。本研究基于 Bottom-up (自下而上) 蛋白分析策略, 采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道离子阱质谱分析沼虾中的过敏原蛋白, 为虾及虾制品的过敏原检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品和试剂 罗氏沼虾购于农贸市场, 去除虾的头部和外壳, 取肌肉组织进行均浆处理, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。碳酸氢铵、二硫苏糖醇 (DTT)、碘代乙酰胺 (IAA)、胰蛋白酶和三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 均购自美国 sigma 公司, 乙腈和甲酸为色谱级, 盐酸 (HCl) 优级纯, 均购自美国 Merck 公司。

1.2 样品前处理方法 称取 5.0 g 样品, 加入 15 mL Tris-HCl (200 mM, pH 8.2), 振荡 30 min, 超声 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时 $8\ 000\times g$ 离心 15 min, 离心半径 10 cm, 取上清提取液。精确吸取 200 μL 提取液, 加入 665 μL 水和 10 μL 50 mM 二硫苏糖醇溶液混合后, 置于振荡恒温金属浴中 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 取出后加入 10 μL 150 mM 碘代乙酰胺溶液, 摇匀室温避光静置 30 min, 加入 100 μL 500 mM 碳酸氢铵溶液和 10 μL 胰蛋白酶溶液, 于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 金属浴中分别反应 1、2、4、6、8、20 h, 对不同酶解时间获得的原肌球蛋白、精氨酸激酶、肌浆钙结合蛋白和血蓝蛋白质谱肽段数量总数进行分析 (重复 3 次, $n=3$), 选择获得肽段总数达到最多者为最佳反应时间。然后加入 5 μL 甲酸, 摇匀用 0.22 μm 滤膜过滤, 待进样。

1.3 色谱和质谱条件 液相色谱仪: Vanquish LC (美国 Thermo 公司); Waters Acquity BEH C300 色谱柱 (1.7 μm , $2.1\times 100\text{ mm}$), 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: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL 。

质谱仪: Q Exactive 高分辨质谱 (美国 Thermo 公司); 离子源 (HESI) 加热, 温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; 毛细管温

度 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, 鞘气 (N_2) 流速 40 L/min, 辅助气 (N_2) 流速 10 L/min; 喷雾电压 3.5 kV, 透镜电压 50 V; 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; 二级离子全扫描 (ms^2) 分辨率: $R=17\ 500$; TopN=10; 二级最低阈值 10^4 ; Peptide match 打开; 电荷离子排除为 7, 8, 9; 顶点激发, 2~8 s; 碰撞能量 NEC/step: 25, 35, 45。仪器每 7 d 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。

1.4 质谱数据分析 虾肉蛋白的序列数据来自 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 Proteome Discoverer 2.1 (美国 Thermo 公司) 软件搜索和计算匹配。Proteome Discoverer 软件参数设置为: 检索方式 Sequest HT, 最大漏切位点数 2, 肽段范围 4~144, 母离子容差 10 ppm; 碎片离子容差 0.02 Da; b 离子权重 1; y 离子权重 1; 肽段修饰检索: 甲基化、乙酰化、磷酸化、硫化、脱胺化等。鉴定得到肽段要求假阳性率 $<1\%$, 置信度 $>95\%$ 。Sequest 分值为采用 Sequest 搜索算法对蛋白匹配度的打分, 分数越高则可信度越高。

2 结果

2.1 酶解处理过程优化 酶解时间为 1、2、4、6、8、20 h 时, 原肌球蛋白、精氨酸激酶、肌浆钙结合蛋白和血蓝蛋白质谱肽段总数分别为 235 ± 4 、 368 ± 5 、 750 ± 4 、 810 ± 5 、 812 ± 5 和 810 ± 6 。因 6 h 后获得的肽段总数达到高点, 故将胰蛋白酶酶解时间设定为 6 h。

2.2 主要过敏原蛋白及肽段鉴定 沼虾胰蛋白酶酶解产物的总离子流色谱图见图 1, 其峰型对称, 谱峰尖锐, 数据采集状况良好, 谱图重现性好。

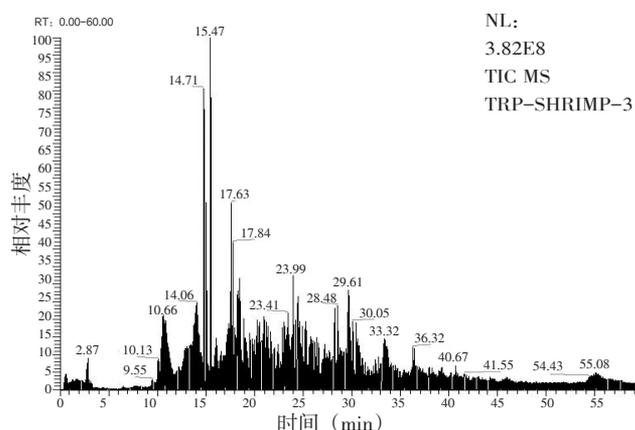


图 1 超高效液相色谱-四级杆静电场轨道离子阱质谱分析沼虾胰蛋白酶酶解产物总离子流色谱图

经 Proteome Discoverer 软件检索和计算匹配,原肌球蛋白、精氨酸激酶、血蓝蛋白和肌浆钙结合蛋白的肽段覆盖率分别为 53%、36%、12% 和 12%, 见表 1。这 4 种过敏原蛋白的典型肽段的氨基酸残基数量集中在 10~25 之间。过敏原蛋白肽段的氨基酸的翻译后修饰没有明显的规律, 主要修饰位点为天冬氨酸 (D) 的甲基化、天冬酰胺 (N)

和谷氨酰胺 (Q) 的脱酰胺以及蛋氨酸 (M) 的氧化。肌浆钙结合蛋白在 210、214、156 位点发生天冬氨酸甲基化; 血蓝蛋白在 283 位点发生精氨酸脱酰胺; 精氨酸激酶在 101、152 位点发生天冬酰胺脱酰胺, 166 位点蛋氨酸氧化; 原肌球蛋白在 51、61 位点发生谷氨酰胺脱酰胺, 在 55、80、146、262 位点发生天冬酰胺脱酰胺。

表 1 4 种主要过敏原蛋白的检索情况

蛋白序列号	蛋白名称	氨基酸数量	肽段覆盖率 (%)	肽段数量	Sequest 分值	代表性肽段 (序列位置)
D3XNR9	原肌球蛋白	284	53	20	222.4	RMQQLNDLDSVQEALLK (49~66) EVDRLLEDELVNEKEK (252~266) SITDELDTQTFSELSGY (269~284) RIQLLEEDLER (91~100) MQQLNDLDSVQEALLK (50~66) EVDRLLEDELVNEK (252~266)
E2JE77	精氨酸激酶	355	36	11	331.7	GESGGQTGHTYDISNK (306~321) ASVHVDLPGWTK (273~284) LSGDLAGNYPLTGMDEK (145~162) TFLVWVNEEDQLR (203~226) IKGNINAEVPHSVR (96~110) GNINAEVPHSVR (98~110)
A0A342CJ41	血蓝蛋白	633	12	6	47.2	YGGFPPARPDHIHFEDVDGVAR (276~297) YNMPPGVMEHFETATR (373~388) DMHIMESR (300~307) TYFEDYEFDLR (436~446) MTNTPGKFEMEFTGTK YMDNIFK (171~186)
A0A3R7NZC3	肌浆钙结合蛋白	289	12	3	103.9	VMADLWNELAELADFNK (153~169) TVDVNGDGVVGVVEEYR (208~223) KVMADLWNELAELADFNK (152~169)

3 讨论

食物过敏原蛋白的分子量通常介于 10 000~70 000^[4], 例如, 原肌球蛋白为虾主要的过敏原, 相对分子质量约为 36 000, 对热稳定, 在甲壳类、昆虫和软体动物中具有高度保守性, 是无脊椎动物的泛过敏原; 精氨酸激酶是调节无脊椎动物能量代谢的重要酶类, 相对分子质量约为 40 000^[5,16]。采用 Tris-HCl 缓冲溶液进行提取, 由于过敏原蛋白分子量较小, 易于溶解; 而其他蛋白由于分子量较大, 一般不溶于 Tris-HCl, 减少了检测干扰。同时在提取过程中采用超声辅助处理, 可促进目标蛋白溶解。

蛋白的质谱分析方法主要有 Top-down (自上而下) 和 Bottom-up (自下而上)^[17], Top-down 技术可

以直接对完整的蛋白, 包括翻译后修饰蛋白及其他大片段蛋白测序; Bottom-up 也称“鸟枪法”, 是将大量蛋白质酶解后得到多肽混合物, 经色谱柱分离后采用串联质谱进行分析, 通过搜索数据库进行大量蛋白质鉴定, 实现了高通量、高灵敏度和高分辨率。常用的蛋白酶为胰蛋白酶, 能切断多肽链中的赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧。本次采用静电场轨道离子阱质谱分析, 经蛋白检索软件鉴定出的虾过敏原蛋白有原肌球蛋白、精氨酸激酶、肌浆钙结合蛋白和血蓝蛋白, 质谱获取的肽段覆盖率均超过 10%。与飞行时间质谱^[12,18]相比, 静电场轨道离子阱质谱的灵敏度较高, 有助于获取更多的肽段信息。质谱数据依赖采集 (data dependent acquisition, DDA) 常用于肽段碎

(下转第 1017 页)