

# 应用一种新的毛细管 HPLC-ICP-MS 接口进行富硒酵母中含硒蛋白的鉴定

## 应用简报

### 食品添加剂

#### 作者

Juliusz Bianga 和 Joanna Szpunar

Laboratoire de Chimie Analytique  
Bio-inorganique et Environnement  
Pau, France



#### 前言

饮食是人体硒 (Se) 的主要来源，该必需元素的摄入主要取决于食品中的硒含量和所消耗的食物量。由于许多国家农产品中硒的含量很低，所以硒缺乏成为了一个值得注意的问题。人们已经开发了许多提高人体硒摄入的食品添加策略；富硒酵母就是人和动物添加剂最常用的硒来源之一。

评估硒是否充分不仅需要了解硒总含量，而且还要了解各种形态硒的含量。但到目前为止，大部分研究都仅限于针对占总硒 12-20% 左右的水溶性酵母成分。酵母的不溶性硒组分很多尚未被发现，表征这类主要组分的工作非常少，其中 Chassaigne 和 Chéry [1] 曾研究过酵母蛋白的硒特异性激光消融 (LA-) ICP-MS



Agilent Technologies

指纹谱, Tastet 等人 [2] 曾用实验室自制的 nanoHPLC-ICP-MS 接口对富硒多肽进行了硒选择性检测。在常规方法中, 通过测定总硒代蛋氨酸含量 (含硒蛋白含量) 来评估富硒酵母的质量。

本研究提出了一个 ICP-MS 辅助的蛋白质组学方法, 用于鉴定富硒酵母中的含硒蛋白。采用双向凝胶电泳分离不溶性含硒蛋白。使用 LA-ICP-MS 找出分离后的含硒蛋白斑点, 经切割后, 用胰蛋白酶消化; 所得多肽通过毛细管 HPLC-ICP-MS 进行分析, 然后用电喷雾离子化 (ESI-) MS/MS 进行表征, 鉴定出富硒酵母中主要的含硒蛋白——甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3。由于胰蛋白酶裂解产物量非常少, 所以需要使用毛细管色谱。

## 实验部分

### 样品

硒含量为 2.3 mg/g 的市售富硒酵母样品。

### 样品前处理

采用过去文献 [3] 所述的标准蛋白质组学方法进行蛋白质提取、双向凝胶电泳分离和目标斑点的胰酶裂解。

### HPLC-ICP-MS 和 ESI-MS/MS 分析

使用配备毛细管泵 (部件号 G1376A) 和手动进样阀 (100 nL 定量环) 的 Agilent 1100 LC。取 8  $\mu$ L 胰酶裂解产物加入到 Agilent Zorbax 300 SB-C18 35 x 0.5 mm 5  $\mu$ m 多肽卡套柱上, 采用流速 20  $\mu$ L/min 的等度洗脱, 流动相为 2% 乙腈 (ACN) - 0.1% 甲酸 (FA)。使用流动相冲洗样品 2 分钟, 然后反冲到 Agilent Zorbax 300SB-C18 150 x 0.3 mm x 3.5  $\mu$ m 分离柱上。使用梯度洗脱分离多肽, A: 水 + 0.1% FA; B: ACN + 0.1% FA, 流速 4  $\mu$ L/min。洗脱程序见表 1。

表 1. HPLC 洗脱程序

步骤	洗脱液 (%B)	时间 (分钟)
1	2	0-2
2	2-5	2-5
3	5-25	5-35
4	25-40	35-40
5	40-97	40-45
6	40-97	45-50
7	97-2	50-55

分离柱的出口与 ICP-MS 或 ESI-MS/MS 仪器连接。ICP-MS 操作条件见表 2。

表 2. Agilent 7700x ICP-MS 操作条件

参数	值
<b>光谱仪</b>	
雾化器/雾化室	毛细管 LC 接口套件 (部件号 G3680A)
炬管 ID	1 mm
接口锥	铂
<b>等离子体</b>	
RF 功率	1560 W
取样深度	7.5 mm
载气流速	780 mL/min
可选气体 (O <sub>2</sub> ) 流速	39 mL/min
<b>透镜</b>	
提取电压 1	3.2 V
提取电压 2	-200 V
<b>反应池</b>	
八极杆偏置电压	-100 V
氦气流速	10 mL/min
动能歧视	7 V

使用 20 ppb Y、Li、Tl、Ce 的 2% 硝酸溶液优化等离子体条件和检测参数。使用高能量氦碰撞池模式排除对硒同位素的多原子干扰。使用各 250 ms 的驻留时间采集  $^{77}\text{Se}$ 、 $^{78}\text{Se}$ 、 $^{80}\text{Se}$ 。

ESI LTQ Orbitrap Velos 质谱仪采用正离子模式；加热器和毛细管温度分别为 50 °C 和 280 °C。采用碰撞诱导解离 (CID) 在 MS SIM 模式下 (15% 标准化碰撞能量) 对 300–1100  $m/z$  质量范围进行测量；碰撞能量设置为 55% 时 HCD 池中产生子离子。

## 结果和讨论

蛋白质在凝胶上的分离结果如图 1 所示。选择用于证明 ICP-MS 辅助蛋白质组学方法可行性的斑点用圆圈标出。根据 LA-ICP-MS 测量结果，该蛋白斑点在胶上所有斑点中硒含量最高。

对该目标蛋白斑点进行胰酶裂解后的分离色谱图见图 2。毛细管 HPLC-ICP-MS 检测了 6 个峰 (图 2a)，其中 5 个可以用 ESI Orbitrap MS/MS 进行鉴定。ICP-MS 检测对确定硒肽的保留时间非常重要，可帮助找到质谱图中较小的硒形态，如图 2d 所示。使用基线 20 点标准差的 3 倍计算检测限 (LOD)。将该值与 1 ppm SeMet 信号进行比较。所得到的硒同位素 80 的 LOD (30% ACN, 0.1% FA 条件下) 为 0.2 pg。氨基酸缩写列表见表 3。

鉴定出的硒肽序列见表 4。使用 ICP-MS 检测所得信号与 ESI Orbitrap MS 在已鉴定硒肽对应的  $m/z$  值的选择离子模式 (图 2c) 所得的保留时间完全匹配。通过所得数据鉴定出了含硒的甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3 (表 5)。证明由于蛋白链中的硫-硒取代途径而引入硒，存在于蛋氨酸 (M) 和半胱氨酸 (C) 残基中，后者在酵母样品中首次发现。

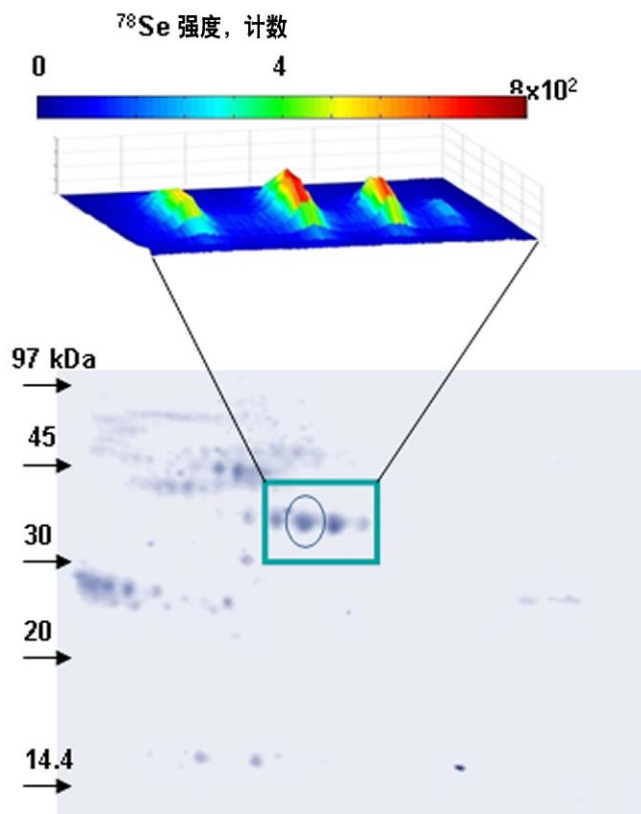


图 1. 含硒酵母蛋白的双向凝胶电泳分离 (凝胶上显示了 LA-ICP-MS 强度图像)

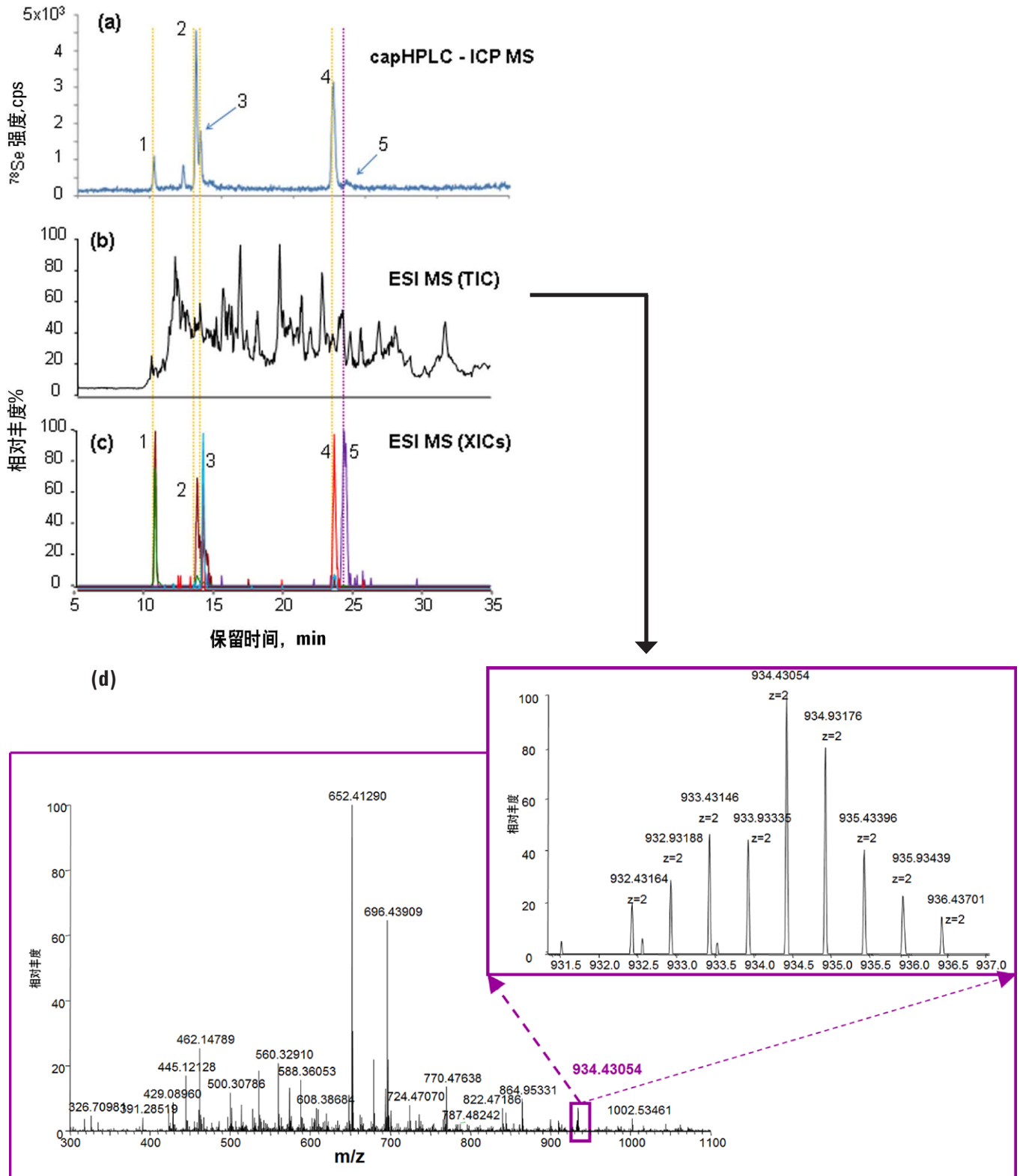


图 2. 图 1 标记的蛋白斑点胰酶裂解物中含硒多肽的毛细管 HPLC 分离。a) ICP-MS 检测，b) ESI Orbitrap MS 检测 (TIC)，c) ESI Orbitrap MS 检测 (选择离子色谱)，d) (少量) 硒形态的 ESI 质谱图。峰的鉴定结果见表 4

表 3. 氨基酸缩写

名称	缩写
丙氨酸	A
精氨酸	R
天门冬酰胺	N
天门冬氨酸	D
半胱氨酸	C
谷氨酸	E
谷氨酰胺	Q
甘氨酸	G
组氨酸	H
异亮氨酸	I
亮氨酸	L
赖氨酸	K
蛋氨酸	M
苯丙氨酸	F
脯氨酸	P
丝氨酸	S
苏氨酸	T
色氨酸	W
酪氨酸	Y
缬氨酸	V

表 4. 图 1 标记的蛋白斑点胰酶裂解物鉴定出的含硒多肽序列

色谱峰	序列	理论质量	实验质量	$\Delta$ 质量
1	LVSeM(ox)R	582.2523	582.2513	-0.00104
2	LVSeMR	566.2573	566.2564	-0.00094
3	LTGSeM(ox)AFR	430.1793	430.1837	0.004395
4	LTGSeMAFR	422.1822	422.1859	0.00369
5	IVSNASCTTNSeCLAPLAK 或 IVSNASSeCTTNCLAPLAK	934.4278	934.4279	0.00013

表 5. 图 1 标记的蛋白斑点中所鉴定的含硒蛋白甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3 的序列。粗体标记的多肽对应于色谱图 (图 2) 中检测到的和表 4 所列出的含硒肽

多肽
1 MVRVAINGFG RIGRL <b>V</b> MRIA LSRPNVEVVA LNDPFITNDY AAYMFKYDST
51 HGRYAGEVSH DDKHIVDVGK KIATYQERDP ANLPWGSSNV DIAIDSTGVF
101 KELDTAQKHI DAGAKKVIT APSSTAPMFV MGVNEEKYTS DLKIV <b>S</b> NASC
151 <b>TTNCLAPLAK</b> VINDAFGIEE GLMTTVHSLT ATQKTVDGSPS HKDWRGGRTA
201 SGNIISSSTG AAKAVGKVLPLQGG <b>KL</b> TGMA <b>FR</b> VPTVDVSV VDLTVKLNKE
251 TTYDEIKKVV KAAAEGKLG VLGYTEDAVV SSDFLGDSHS SIFDASAGIQ
301 LSPKFVKLVLS WYDNEYGYST RVVDLVEHVA KA

## 结论

本文建立了有效的 ICP-MS 辅助蛋白质组学方法, 用于鉴定市售富硒酵母样品不溶性硒组分中的含硒蛋白。采用双向凝胶电泳分离含硒蛋白, 并用胰蛋白酶进行裂解。采用 LA-ICP-MS、毛细管 HPLC-ICP-MS 和 ESI MS/MS 组合方法对裂解产物进行鉴定、分析和表征。由于胰酶裂解产物量非常少, 所以需要使用毛细管色谱。采用本方法鉴定出了甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶-3, 这是富硒酵母中的主要含硒蛋白。证明由于蛋白链中的硫-硒取代途径而引入硒, 存在于蛋氨酸 (M) 和半胱氨酸 (C) 残基中, 后者在酵母样品中首次发现。

## 参考文献

1. Chassaigne, H., Chery, C. C., Bordin, G., Vanhaecke, F. & Rodriguez, A. R. (2004). *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 85.
2. Tastet, L., Schaumlöffel, D. & Lobinski, R. (2008). *J. Anal. At. Spectrom.*, 23, 309.
3. Von Hage, J. (2008). *Proteomics Sample Preparation*. Wiley-VCH, Weinheim.

**[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)**

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012年10月2日出版

出版号：5991-0882CHCN



**Agilent Technologies**