

# LTQ-Orbitrap 液-质联用技术对水牛奶酪蛋白的鉴定

王丽娜, 徐明芳\*, 成希飞, 向明霞, 李子超, 李昀锴  
(暨南大学生命科学技术学院, 广东 广州 510632)

**摘要:** 建立一种快速、高效的分析酪蛋白组分氨基酸序列的 LTQ-Orbitrap 质谱方法。为了研究水牛奶酪蛋白、乳牛奶酪蛋白和山羊奶酪蛋白的氨基酸序列组成及氨基酸的替换现象, 采用 LTQ-Orbitrap 液-质联用技术分别对乳源酪蛋白的 4 种主要组分进行分析, 搜索数据库获得 4 种组分的氨基酸全序列。与水牛奶 4 种酪蛋白组分进行比对。结果表明, 乳牛奶的 4 种酪蛋白发生氨基酸替换的部位和比率明显小于山羊奶。这意味着与水牛奶酪蛋白相比, 乳牛奶酪蛋白氨基酸的稳定性优于山羊奶酪蛋白。

**关键词:** 水牛奶; 酪蛋白; 氨基酸序列; 酪蛋白结构; LTQ-Orbitrap 质谱

## Identification of Water Buffalo Caseins by Liquid Chromatography and LTQ-Orbitrap Mass Spectroscopy

WANG Li-na, XU Ming-fang\*, CHENG Xi-fei, XIANG Ming-xia, LI Zi-chao, LI Yun-kai  
(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** A rapid and efficient method to analyze the amino acid sequence of casein was presented using LTQ-Orbitrap mass spectroscopy coupled with liquid chromatography. In order to understand the amino acid sequence and substitution of cow, water buffalo and goat caseins, LTQ-Orbitrap mass spectroscopy coupled with liquid chromatography was used to analyze 4 major casein components, and their complete amino acid sequences were acquired by database searching. The amino acid substitutions of cow milk caseins were markedly lower than those of goat milk caseins. Thus, this study demonstrates that the amino acid sequences of cow milk caseins are more stable than those of goat milk caseins.

**Key words:** water buffalo milk; casein; amino acid sequence; casein structure; LTQ-Orbitrap mass spectrometry

中图分类号: Q657.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)01-0098-05

水牛奶是我国奶业特别是我国南方奶业的一个重要发展方向, 其主要营养成分高于荷斯坦乳牛奶, 是未来最具市场竞争力的乳品<sup>[1]</sup>。国内外对水牛奶的研究越来越多, 主要是常规营养成分<sup>[2-3]</sup>、理化性质<sup>[4-5]</sup>、稳定性<sup>[6]</sup>、乳蛋白质的组成和特性<sup>[7-8]</sup>以及蛋白分离分析<sup>[9-12]</sup>等方面的研究, 在水牛奶酪蛋白(casein, CN)组分的肽质指纹谱、氨基酸序列谱等方面的研究则未见报道。

质谱(mass spectrometry, MS)是蛋白质组学研究的关键技术, 在对蛋白质结构分析的研究中占据了重要地位。蛋白质鉴定是蛋白质组学研究的分支, 传统的鉴定方法有 Edman 降解法、氨基酸分析法等。Edman 降解法测定的肽

序列非常准确, 但速度较慢, 费用较高。氨基酸分析法经济快速, 但灵敏度低<sup>[13]</sup>。二维线性离子阱高分辨静电场组合质谱仪(LTQ Orbitrap XL)是目前最先进的质谱仪, 它将 LTQ 与获得专利的 Orbitrap 技术整合, 具有无可超越的 MS 和 MS<sup>n</sup> 的灵敏度、快速扫描率、高质量精确度和高达 100K 的分辨能力, 并具有新的 HCD 八极碰撞单元的特性, 可以在 MS/MS 裂解应用中增加灵活性, 具有直接从复杂样品中快速、灵敏、可靠的检测化合物的能力。LTQ Orbitrap XL 质谱可提供蛋白质定量信息, 如 SILAC、O<sup>18</sup> 等标记定量的蛋白, 分析蛋白质的分子质量, 氨基酸序列、蛋白质磷酸化位点、差异蛋白比较等信息。

收稿日期: 2011-07-18

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B011300003)

作者简介: 王丽娜(1985—), 女, 硕士, 研究方向为应用微生物及微生物工程。E-mail: wln4828@163.com

\* 通信作者: 徐明芳(1962—), 女, 教授, 博士, 研究方向为乳品科学与工程。E-mail: txmfxmf2006@126.com

本实验主要利用 LTQ-Orbitrap 组合型傅里叶转换质谱仪对水牛奶酪蛋白的酶解肽段进行质谱分析,检测各产物肽的相对分子质量,然后在数据库中检索,寻找蛋白的氨基酸序列,并与乳牛奶酪蛋白和山羊奶酪蛋白相对应组分的氨基酸序列比对,研究其氨基酸序列间的差异性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

水牛奶、荷斯坦乳牛奶、山羊奶 市售。

乙腈、碳酸氢铵、三氟乙酸(TFA)、DL-二巯苏糖醇(DTT)、吡啶-3-乙酸(IAA) 美国 Sigma 公司;胰蛋白酶 美国 Promega 公司;30g/100mL 丙烯酰胺贮备液、1.0mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH6.8)、1.5mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.8)、10g/100mL 过硫酸铵、10g/100mL SDS 溶液、N, N, N', N' - 四甲基乙二胺(TEMED)溶液;5 × 样品缓冲液(1.25mL 1.0mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH6.8), 0.5g SDS, 2.5mL 100% 甘油, 25mg 溴酚蓝, 0.25mL  $\beta$ -巯基乙醇, 全部混合后用水稀释定容至 5 mL);电极缓冲液(0.025mol/L Tris, 0.192mol/L 甘氨酸, 0.1g/100mL SDS, pH8.3);染色液(0.2g/100mL 考马斯亮蓝 R-250, 45% 甲醇, 10% 冰醋酸);脱色液(10% 冰醋酸, 25% 乙醇)。

LTQ Orbitrap XL 质谱仪 美国 Thermo 公司;C<sub>18</sub> 反相色谱柱 美国 Michrom Bioresources 公司;SCIENTZ-11D 型超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物仪器公司;小型高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酪蛋白的提取

取 20mL 新鲜水牛奶, 4000r/min 离心 20min, 收集下层脱脂乳, 1mol/L HCl 溶液调 pH 值至 4.6, 4000r/min 离心 15min, 弃上清。沉淀用蒸馏水洗涤两次, 丙酮洗涤两次, 每次 4000r/min 离心 10min, 收集沉淀, 风干, -20℃ 保存备用。

#### 1.2.2 酪蛋白溶液的酶解实验

SDS-PAGE 电泳: 上样量 10 $\mu$ L; 5% 浓缩胶, 10% 分离胶; 浓缩电压 60V, 分离电压 100V。

蛋白酶解: 目标蛋白切胶回收, 纯化水洗胶两次, 加入 70 $\mu$ L 脱色液, 37℃ 水浴 30min, 然后用 100% 乙腈脱水处理。加入还原剂, 于 57℃ 水浴 1h, 随后加入同体积的烷基化试剂, 室温避光放置 30min, 经乙腈脱水至胶块完全变白后于每管中加入胰蛋白酶溶液 2~

4 $\mu$ L, 冰浴 20min, 再加 20 $\mu$ L 覆盖液, 37℃ 水浴酶解 16h。酶解结束后于真空干燥仪中冻干。

#### 1.2.3 质谱分析

冻干的酶解片段用样品溶解液溶解, 充分振荡涡旋, 于 13200r/min、4℃ 离心 10min, 取上清液进行质谱分析。样品经 C<sub>18</sub> 反相柱(100mm × 75 $\mu$ m, 3 $\mu$ m)分离后, 直接用 LTQ-Orbitrap XL 检测。肽段在反相柱上的洗脱梯度是 5%~45% 乙腈(含 0.1% 甲酸)洗脱 60min, 流速为 300nL/min。

质谱主要参数设置如下: 离子传输管温度为 200℃; 电喷雾电压是 1.85kV。一级质谱在 Orbitrap 里扫描, 扫描范围是 400~2000D, 二级质谱在 LTQ 里用 CID 碰撞模式完成, 标准化碰撞能量为 35%, 活化  $q$  值为 0.25 和活化时间为 30ms。所以信息用 Mascot 软件进行数据库检索, 得到最合适的鉴定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 水牛奶酪蛋白的总离子流色谱

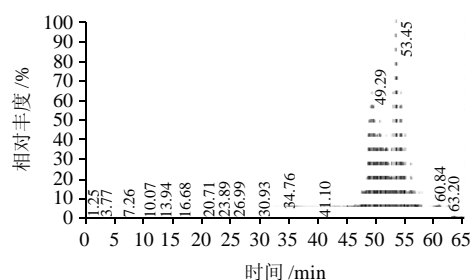
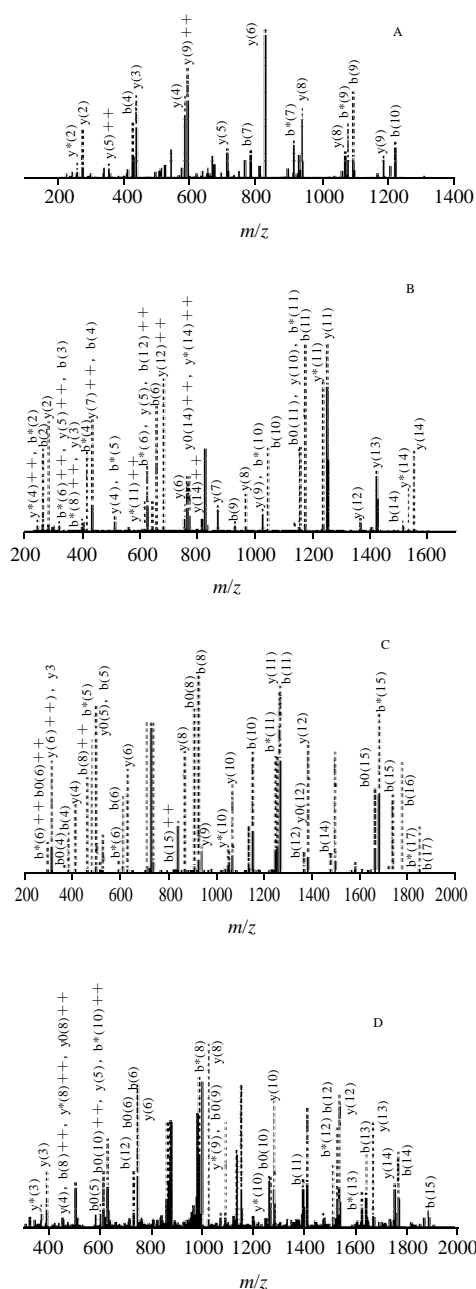


图1 水牛奶酪蛋白酶解液的总离子流指纹图谱

Fig.1 Total ion current fingerprint of water buffalo milk casein hydrolysate

胰蛋白酶酶解的水牛奶酪蛋白的多肽混合物经 LTQ-Orbitrap XL 液-质联用分析, 获得样品的总离子流色谱图, 见图 1。在质谱分析过程中, 精确质量数扫描可以确定离子所带电荷数, 利用二级质谱得到的碎片离子可识别肽段的氨基酸序列。如多肽混合物中检测出离子的  $m/z$  分别为 684.4、844.5、995.6、1014.4, 精确质量数扫描表明该 4 种离子均带有两个电荷, 二级质谱扫描结果表明, 4 种离子的氨基酸序列分别为 ALNEINQFY QK(图 2A)、HQGLPQGVLNENLLR(图 2B)、SPAQILQWQ VLPNTVPAK(图 2C)和 FQSEEQQMEDELQDK(图 2D), 经鉴定, 这些序列分别是  $\alpha_{s2}$ -、 $\alpha_{s1}$ -、 $\kappa$ - 和  $\beta$ - 酪蛋白的部分肽段。



A. ALNEINQFYQK; B. HQGLPQGVLENLLR; C. SP AQILQWQVLPNTVPAK; D. FQSEEQQMEDELQDK.

图2 LTQ质谱鉴定得到的肽段的二级质谱图

Fig.2 MS-MS spectra of peptides identified by LTQ mass spectrometry

## 2.2 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的氨基酸序列测定结果

酪蛋白酶解得到的肽混合液经LC分离后直接用LTQ-Orbitrap质谱仪检测,识别出的部分肽段信息见表1。经鉴定明,此酪蛋白是 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白前体,含有一个由15个氨基酸残基组成的高度保守的信号肽序列。 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白由199个氨基酸残基组成,其完整的氨基酸序列见图3。同样的方法用于乳牛奶和山羊奶 $\alpha_{s1}$ -酪蛋

白的氨基酸序列的分析,并将3种品种的 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白进行序列比对,结果发现,水牛奶 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的序列与乳牛奶和山羊奶的 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白存在多处氨基酸替换,但与山羊奶 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的差异更大,特别是在3~16位氨基酸区段。

表1 水牛奶 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的肽段鉴定

Table 1 Peptides identified in water buffalo milk  $\alpha_{s1}$ -casein

相对分子质量(实测值)	相对分子质量(理论值)	片段	肽序列
2153.2081	2153.2069	19~37	QPIKHQGLPQGVLENLLR
1686.9164	1686.9165	23~37	HQGLPQGVLENLLR
1383.7240	1383.7227	38~49	FFVAPFPEVFGK
1640.8606	1640.8603	38~51	FFVAPFPEVFGKEK
1266.6982	1266.6972	106~115	YLGYLEQLLR
2836.5169	2836.5156	116~139	LKKYNVPQLEIVPNLAEEQLHSMK
2595.3370	2595.3366	118~139	KYNVPQLEIVPNLAEEQLHSMK
3486.7977	3486.7929	118~147	KYNVPQLEIVPNLAEEQLHSMKEGIHAQQK
2451.2454	2451.2467	119~139	YNVPQLEIVPNLAEEQLHSMK
3358.7002	3358.6979	119~147	YNVPQLEIVPNLAEEQLHSMKEGIHAQQK
3221.6002	3221.5968	140~166	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYFQLFR
2330.1414	2330.1405	148~166	EPMIGVNQELAYFYFQLFR
763.3578	763.3575	209~214	TTMPLW

	Signal peptide			
	-15	-1		
Buffalo	MKLLILTCLVAVALA			
Bovine	MKLLILTCLVAVALA			
Goat	MKLLILTCLVAVALA			
	1	20	40	50
Buffalo	RPKQPIKHQGLPQGVLENLLRFFVAPFPEVFGKEKYNELSTDIGSESTE			
Bovine	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGKEKYNELSKDIGSESTE			
Goat	RPKHPINHRGLSPEVLENLLRFFVAPFPEVFRKENINELSKDIGSESTE			
	51	70	90	100
Buffalo	DQAMEDIKQMEAESISSEIIVPISVEQKHIQKEDVPSEYLGYLEQLLR			
Bovine	DQAMEDIKQMEAESISSEIIVPNSVEQKHIQKEDVPSEYLGYLEQLLR			
Goat	DQAMEDAKQMKAGSSSSSEIIVPNSAEQKYIQKEDVPSEYLGYLEQLLR			
	101	120	140	150
Buffalo	LKKYNVPQLEIVPNLAEEQLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYFQLF			
Bovine	LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYFPELF			
Goat	LKKYNVPQLEIVPKSAEEQLHSMKEGNPAHQKQPMIAVNQELAYFYFQLF			
	151	170	190	199
Buffalo	RQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGKTTMPLW			
Bovine	RQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW			
Goat	RQFYQLDAYPSGAWYYLPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGKTTMPLW			

粗体代表氨基酸的替换。Buffalo.水牛奶;

Bovine.乳牛奶; Goat.山羊奶。下图同。

图3 水牛奶、乳牛奶和山羊奶 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的氨基酸序列对比

Fig.3 Comparison of amino acid sequences of water buffalo, cow and goat milk  $\alpha_{s1}$ -caseins

## 2.3 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的氨基酸序列测定结果

实验中未搜索到与水牛奶 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白相匹配的氨基酸序列,按Mascot得分、匹配的片段数和覆盖率等进行综合评判,仅搜索到乳牛奶 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白前体相关信息(表2)。这可能是因为水牛奶中 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的氨基酸序列

与乳牛奶  $\alpha_{s2}$ -CN 的氨基酸序列高度一致, 结果有待进一步的证明。从实验结果可推测, 在鉴定酪蛋白的种属来源时, 以  $\alpha_{s2}$ -CN 的氨基酸序列为标准容易发生错误。

表2 乳牛奶  $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的肽段鉴定  
Table 2 Peptides identified in cow milk  $\alpha_{s2}$ -casein

相对分子 质量(实测值)	相对分子 质量(理论值)	片段	肽序列
2028.9067	2028.9067	40~56	NMAINPSKENLCSTFCK
1157.4846	1157.4845	48~56	ENLCSTFCK
1245.6344	1245.6353	86~95	ITVDDKHYQK
2594.3145	2594.3129	86~106	ITVDDKHYQKALNEINQFYQK
1366.6882	1366.6881	96~106	ALNEINQFYQK
2708.4614	2708.4003	107~128	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK
2864.5009	2864.5014	107~129	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR
1350.7740	1350.7732	129~140	RNAVPIPTLNR
1194.6722	1194.6721	130~140	NAVPIPTLNR
1632.8815	1632.8835	168~180	LTEEEKNRLNFLK
633.3850	633.3850	176~180	LNFLK
2282.2209	2282.2211	186~203	YQKFALPQYLKTVYQHQQ
978.5536	978.5538	189~196	FALPQYLK
1113.6006	1113.6005	204~212	AMKPWIQPK

		Signal peptide					
		-15				-1	
Bovine		MKFFIFTCLLAVALA					
Goat		MKFFIFTCLLAVALA					
		1	14	15	20	40	50
Bovine		KNT MEHVSSEESI- ISQETYKQEKNNMAINPS KENLCSTFCKEVVRNANEE					
Goat		KHKMEHVSSEEPINIFQE IYKQEKNNMAIHPRKEKLCSTTSCEEVVRNANEE					
		51	70			90	100
Bovine		EYSIGSSSEESAEEVATEEVKITVDDKHQKALNEINQFYQKFPQYLQYLY					
Goat		EYSIRSSSEESAEEVAPEI I KITVDDKHQKALNEINQFYQKFPQYLQYPY					
		101	120			140	150
Bovine		QGPIVLNPWDQVQRNAVPI I TPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKK					
Goat		QGPIVLNPWDQVQRNAGPFTPTVYNREQLSTSEENSKKT I DMESTEVFTKK					
		151	170			190	200
Bovine		TKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQKFA LPQYLKTVYQHQAAMKPW IQPKTKV					
Goat		TKLTEEEKNRLNFLKKISQYYQKFAWPQYLKTVDQHQAKAMPWTQPKTNA					
		201	207				
Bovine		IPYVRYL					
Goat		IPYVRYL					

图4 乳牛奶和山羊奶  $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的氨基酸序列对比

**Fig.4 Comparison of amino acid sequences of water buffalo, cow and goat milk  $\alpha_{s2}$ -caseins**

图4是乳牛奶与山羊奶 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的氨基酸序列对比。与 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白一样， $\alpha_{s2}$ -酪蛋白也含有一个由高度保守的15个氨基酸组成的信号肽序列。以乳牛奶 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的序列为基准，山羊奶 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白在14~15个氨基酸区段多了一个氨基酸(N)，即天冬酰胺，在29~41氨基酸区段与乳牛奶的差异最大，氨基酸替换频繁。如乳牛奶 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白序列中第16位上的丝氨酸残基(S)被替换为山羊奶 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白上的苯丙氨酸残基(F)，G55替换为

R55, R170 替换为 Y170, 等。

#### 2.4 $\beta$ -酪蛋白的氨基酸序列的测定结果

表3 水牛奶  $\beta$ -酪蛋白的肽段鉴定  
Table 3 Peptides identified in water buffalo milk  $\beta$ -casein

相对分子 质量(实测值)	相对分子 质量(理论值)	片段	肽序列
2026.8434	2026.8426	48~63	FQSEEQQQMEDELQDK
2236.2014	2236.2045	64~83	IHFIAQTQSLVYFFGPIPK
3125.7194	3125.7199	84~112	SLPQNIPPLTQTIPVVVPFLQPEIMGVSK
1028.5108	1028.5113	121~128	HKEMFFPK
779.4910	779.4905	185~191	VLPVPQK
3736.0282	3736.0215	192~224	AVPYQRDMPIQAFLLYQEPVLGVRGPPPIV
2185.2194	2185.1605	199~217	DMPIQAFLLYQEPVLGVR
2924.5894	2924.5874	199~224	DMPIQAFLLYQEPVLGVRGPPPIV
741.4342	741.4425	218~224	GPPPIV

表 3 是水牛奶  $\beta$ -酪蛋白前体的部分肽段信息。 $\beta$ -酪蛋白有一个高度保守的 15 个氨基酸残基的信号肽序列,成熟的  $\beta$ -酪蛋白序列随物种的改变而发生不同氨基酸的替换。质谱鉴定结果表明,水牛奶  $\beta$ -酪蛋白由 209 个氨基酸残基组成,其序列与乳牛奶  $\beta$ -酪蛋白仅有 5 个氨基酸的替换,该结论与 Fiat 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。

	Signal peptide			
	-15	-1		
Buffalo	MKVLILACLVALALA			
Bovine	MKVLILACLVALALA			
Goat	MKVLILACLVALAIA			
	1	20	40	50
Buffalo	RELEELNVPGE I VESLSSEESIT <del>HI</del> INKKIEKFQSEEQQMEDELQDKIH			
Bovine	RELEELNVPGE I VESLSSEESITRINKKIEKFQSEEQQ TEDELQDKIH			
Goat	REQEELNVVGETVESLSSEESIT <del>HI</del> INKKIEKFQSEEQQ TEDELQDKIH			
	51	70	90	100
Buffalo	PFAQTQSLVYPFGPIPKSLPNIPPLTQTPTVVVPPFLQPE I MGVSKVKE			
Bovine	PFAQTQSLVYPFGPIPNLSLPNIPPLTQTPTVVVPPFLQPEVMGVSKVKE			
Goat	PFAQAQSLVYPFTGPIPNLSLPNIPPLTQTPTVVVPPFLQPEI MGVPKVKE			
	101	120	140	150
Buffalo	AMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPQP			
Bovine	AMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWGMHQPQP			
Goat	TMVPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSLTLTDVEKLHLPLPLVQSWMHQPQP			
	151	170	190	200
Buffalo	LPPTVMFPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGP			
Bovine	LPPTVMFPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGP			
Goat	LSPTMFPQSVLSLSQPKVLPVPQKAVP- QRDMPAQAFLLYQEPVLGP			
	201	209		
Buffalo	VRGFPPI IV			
Bovine	VRGFPPI IV			
Goat	VRGFPPIIV			

图5 水牛奶、乳牛奶和山羊奶  $\beta$ -酪蛋白的氨基酸序列对比

**Fig.5 Comparison of amino acid sequences of water buffalo, cow and goat milk  $\beta$  -caseins**

由图 5 可知, 5 个氨基酸替换分别发生在第 25、41、68、92、148 位残基上。山羊奶  $\beta$ -酪蛋白只含有 207

个氨基酸残基,在第180、181氨基酸位点上缺失了两个氨基酸:酪氨酸(Y)和脯氨酸(P),与水牛奶 $\beta$ -酪蛋白相比,共有12处的氨基酸被替换。

## 2.5 $\kappa$ -酪蛋白的氨基酸序列测定结果

表4 水牛奶 $\kappa$ -酪蛋白的肽段鉴定  
Table 4 Peptides identified in water buffalo milk  $\kappa$ -casein

相对分子质量(实测值)	相对分子质量(理论值)	片段	肽序列
669.3121	669.3122	38~42	FFNDK
1562.9206	1562.9184	43~55	IAKYIPIQYVLSR
1250.7030	1250.7023	46~55	YIPIQYVLSR
1989.1538	1989.1047	90~107	SPAQILQWQVLPNTVPAK
1623.8338	1623.8344	119~132	HPHPLHSFMAIPPK
1751.9309	1751.9294	119~133	HPHPLHSFMAIPPKK
2237.1529	2237.1528	119~137	HPHPLHSFMAIPPKKNQDK

$\kappa$ -酪蛋白与其他酪蛋白组分不同,是唯一对钙不敏感且含有糖基的组分,在酪蛋白胶体的稳定性方面也起着重要的作用。LTQ-Orbitrap 质谱鉴定结果表明, $\kappa$ -酪蛋白前体含有190个氨基酸,部分肽段信息见表4。与其他3种酪蛋白组分不同<sup>[15]</sup>, $\kappa$ -酪蛋白有一个由21个高度保守的氨基酸残基组成的信号肽序列。

水牛奶 $\kappa$ -酪蛋白完整的氨基酸序列以及与乳牛奶和山羊奶的 $\kappa$ -酪蛋白的氨基酸序列的对比见图6。

	Signal peptide				
	-21				-1
Buffalo	MMKSFFLVVTLALTLPLFLGA				
Bovine	MMKSFFLVVTLALTLPLFLGA				
Goat	MMKSFFLVVTLALTLPLFLGA				
	1	20	40	50	
Buffalo	QEQNQEQPIRCEKEERFFNDKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLNYYQKPV				
Bovine	QEQNQEQPIRCEKDERFFS DKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLNYYQKPV				
Goat	QEQNQEQPICCEKDERFFDDKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLNYYQRPV				
	51	70	90	100	
Buffalo	INNQLPYPYAKPAVRSPAQ ILQWQVLPNTVPAKSCQAQPTTMRHPH				
Bovine	INNQLPYPYAKPAVRSPAQ ILQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMRHPH				
Goat	INNQLPYPYAKPAVRSPAQTLQWQVLPNTVPAKSCQDQPTT LARHPH				
	101	120	131	132	140
Buffalo	PHLSFMAIPPKKNQDKTE I PTINTIVSVEPT - - STPTTEAI ENTVA				
Bovine	PHLSFMAIPPKKNQDKTE I PTINTIASGEPT - - STPTTEAVESTV				
Goat	PHLSFMAIPPKKNQDKTEVPAINIASAEPTVHSTPTTEA IVNTVDN				
	151	169			
Buffalo	EVIESVPETNTAQTSTVV				
Bovine	EVIESPPEINTVQVTSTAV				
Goat	ESIASA SETNTAQTSTEV				

图6 水牛奶、乳牛奶和山羊奶 $\kappa$ -酪蛋白的氨基酸序列对比  
Fig. 6 Comparison of amino acid sequences of water buffalo, cow and goat milk  $\kappa$ -caseins

如图6所示,水牛奶和乳牛奶的 $\kappa$ -酪蛋白都是由169个氨基酸残基组成的,而山羊奶的 $\kappa$ -酪蛋白则是由171个氨基酸残基组成的,在131~132氨基酸区段增加

了两个氨基酸:缬氨酸(V)和组氨酸(H)。经比对,3种不同品种来源的 $\kappa$ -酪蛋白在第120~169氨基酸区段的差异较其他区段的差异大,氨基酸替换现象频繁。

## 3 结 论

酪蛋白经胰蛋白酶酶解的肽段,通过C<sub>18</sub>反相柱分离后直接用LTQ-Orbitrap 质谱仪进行鉴定分析。搜索数据库获得来源于水牛奶的 $\alpha$ <sub>s1</sub>-、 $\beta$ -、 $\kappa$ -酪蛋白的氨基酸全序列, $\alpha$ <sub>s2</sub>-酪蛋白仅分析到与之匹配度最高的来源于乳牛奶的氨基酸序列。同样的方法分析乳牛奶和山羊奶酪蛋白组分的氨基酸序列,并与水牛奶相对应的组分的序列比对,结果表明,不同品种的乳源酪蛋白的氨基酸序列均不相同,存在氨基酸替换现象。在酪蛋白的氨基酸序列对比中,水牛奶与山羊奶的差异比与乳牛奶的差异大。

## 参考文献:

- [1] 谢秉铨,解冠华,陈红兵.水牛奶乳制品深加工的研究进展[J].食品科技,2007,32(7):9-12.
- [2] 梁明振,杨炳壮,苏安伟,等.水牛奶营养价值评价[J].广西畜牧兽医,2007,23(3):124-126.
- [3] 许小刚,周雪松,曾建新.粒径分析法快速判定均质工艺对水牛奶稳定性的影响[J].中国乳品工业,2009,37(1):42-44.
- [4] 韩刚,丁庆波.中国水牛奶理化性状研究[J].华南农业大学学报,1994,15(4):92-97.
- [5] 曾庆坤,杨炳壮,梁坤,等.不同品代水牛奶理化性质的研究[J].中国乳品工业,2007,35(5):13-15.
- [6] TUINIER R, de KRUIF C G. Stability of casein micelles in milk[J]. Journal of Chemical Physics, 2002, 117(3): 1290-1295.
- [7] ZICARELLI L. Buffalo milk: its properties, dairy yield and mozzarella production [J]. Veterinary Research Communications, 2004, 28(Suppl 1): 127-135.
- [8] NAYAK S K, ARORA S, SINDHU J S, et al. Effect of chemical phosphorylation on solubility of buffalo milk proteins[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(3): 268-273.
- [9] FELIGINI M, BONIZZII I, BUFFONI J N, et al. Identification and quantification of  $\alpha$ <sub>1</sub>-,  $\alpha$ <sub>2</sub>-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in water buffalo milk by reverse phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(7): 2988-2992.
- [10] HAM J S, JEONG S G, LEE S G, et al. Irradiation effect on  $\alpha$ - and  $\beta$ -caseins of milk and Queso Blanco cheese determined by capillary electrophoresis[J]. Radiat Phys Chem, 2009, 78(2): 158-163.
- [11] BRAMANTI E, SORTINO C, RASPI G. New chromatographic method for separation and determination of denatured  $\alpha$ <sub>1</sub>-,  $\alpha$ <sub>2</sub>-,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 958(1/2): 157-166.
- [12] CHEVALIER F, HIRTZ C, SOMMERER N, et al. Use of reducing/nonreducing two-dimensional electrophoresis for the study of disulfide-mediated interactions between proteins in raw and heated bovine milk[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(13): 5948-5955.
- [13] 张鹏,朱育强,陈新娟,等.差异蛋白质组学技术及其在园艺植物中的应用[J].中国农学通报,2011,27(4):212-218.
- [14] FIAT A M, JOLLÈS P. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1989, 87(1): 5-30.
- [15] GINGER M R, GRIGOR M R. Comparative aspects of milk caseins[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 1999, 124(2): 133-145.