

物种特异性明胶鉴定的完整发现工作流程

Chantel Lee, Li Yan Chan

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

明胶是食品和化妆品中的常见成分，用于制备明胶的动物物种通常出于健康和宗教原因而受到限制和监管。例如，明胶分析在清真认证中变得越来越重要。蛋白质组学可以通过液质联用(LC-MS)法测定物种特异性肽段标记，为评估明胶来源提供了另一种方法。我们开发了一种性能稳定的样品前处理和超高效液相色谱解决方案，通过与在MS^E模式下运行的电喷雾电离四极杆飞行时间质谱(UPLC™-QToF-MS^E)方法联用，可有效鉴定代表牛和猪明胶的肽段标记。ProteinWorks™ eXpress快速酶解试剂盒是一种即用型试剂盒，由预先称重的试剂和简单的逐步说明组成。该试剂盒适用于多种样品，无需进一步的方法开发，可简化并加快样品前处理。工作流程包括使用ProteinWorks eXpress快速酶解试剂盒进行样品前处理、使用ACQUITY™ Premier UPLC色谱柱进行分离以及使用UPLC-QToF-MS^E进行测定，最终为鉴定明胶物种特异性标志物提供了一种可靠的方法。

优势

- 使用ProteinWorks eXpress快速酶解试剂盒简单完成样品前处理
 - 使用ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统通过优化仪器方法在ACQUITY Premier HSS T3 UPLC色谱柱上鉴定和分离特异性肽段标记
 - 蛋白质组学数据分析软件Progenesis™ QI通过特有的共检测工作流程来确定特有肽段标记，从而确定明胶的物种来源
-

简介

明胶因其独特的凝胶特性而广泛应用于食品和制药行业，它是由通常来自各种动物的胶原蛋白产生的肽混合物。商业明胶的主要原料是牛和猪的身体部位，例如它们的皮和骨头。此外，也有一些其他来源，例如鱼，但不太常见。

1986年，牛海绵状脑病(BSE)的爆发导致牛明胶在人类消费品中的使用受到限制。由于一些宗教和文化的因素，以猪为原料的产品也受到了一定程度的限制。例如，穆斯林清真和犹太洁食法要求食品不含猪衍生物，而大多数印度教徒为乳素食者（不吃肉和蛋），并且基本不食用牛肉¹。制造商和进口商可能需要提交实验室分析报告，以确认产品符合宗教和法规贴标要求²。因此，明胶鉴定是确保产品不含牛或猪衍生物的关键。

目前有多种方法可用于鉴定明胶，包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、使用聚合酶链式反应(PCR)技术的DNA方法，以及采用光谱学和质谱分析的方法³⁻⁵。然而，这些方法都有自身的局限性。ELISA的有效性并不理想，这是因为不同物种的胶原序列之间具有高度同源性，一些抗体显示出较差的物种专属性。DNA技术具有区分不同明胶来源的潜力，但仍存在令人担忧的问题，因为成品中明胶DNA的含量很低，并且在高温加热和其他加工处理下DNA可能会断裂。光谱技术，例如傅里叶变换红外光谱(FTIR)，可以通过化学计量学根据光谱特征差异来区分各种明胶来源，但灵敏度较低，尚未用于确定含有多物种原料的明胶或产品。在过去的十年中，用于防止食品欺诈的蛋白质和肽质谱分析在可追溯性和真伪评估领域广受欢迎⁶。该方法利用LC-MS测定物种特异性肽段标记从而评估明胶来源⁷⁻¹⁰。不同于DNA，蛋白质的氨基酸序列在明胶加工过程中保持高度一致，因此，LC-MS方法具有在一次分析中检测多种明胶种类的优势。

该方法利用不同动物物种胶原蛋白之间蛋白质水平的差异，在溶解、还原、烷基化和胰蛋白酶酶解后，准确地检测每种动物物种的明胶。本研究演示了工作流程的第一步；通过鸟枪法蛋白质组学分析方法，从猪和牛明胶的胰蛋白酶酶解物中初步鉴定物种特异性肽。UPLC-MS^E的新颖之处在于它使用数据非依赖型采集模式，并通过交替的高低碰撞能量提供子离子和母离子信息，从而生成信息丰富的质谱图。

结果与讨论

用50 mM碳酸氢铵溶液(NH₄HCO₃)预处理六种市售的牛和猪明胶标准品(Sigma Aldrich)。随后执行ProteinWorks eXpress快速酶解试剂盒的5步方案，如图1所示。

将ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和Xevo™ G2-XS QToF质谱仪联用，使用水/乙腈梯度在1.8 μm ACQUITY Premier HSS T3分析柱（部件号：186009468 <
<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009468-acquity-premier-hss-t3-column-18--m-21-x-100-mm-1-pk.html>>）上进行分析。



图1.5步酶解方案

对每种明胶标准品重复进样三次。使用蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1分析原始数据，这是一款用于LC-MS数据的发现分析软件，用于鉴定明胶物种形成的特征标志物。该软件具有菜单引导的工作流程，自动执行色谱

对齐、数据归一化和峰提取。将肽数据导出至EZInfo，使用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)模型（图2），在S-plot中突出显示了与牛和猪明胶相关的区别化合物。选择置信度和重要程度最高的特征（图2中方框内）导回蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1，以验证并评价鉴定结果。图3显示了肽段SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR的鉴定示例，使用Ion Accounting鉴定工作流程，设置如下：FDR小于1%、固定修饰（半胱氨酸脲甲基化）和可变修饰（甲硫氨酸氧化）、使用*Sus scrofa domesticus*和*Bos taurus* UniProt数据库。在比较所选肽的归一化丰度曲线时，可以清楚地看到，这些肽段均具有独特性和物种特异性（图4）。筛查出的特征肽段标记总结在表1中，在验证后可用作商业产品定量LC-MS/MS分析的靶标。

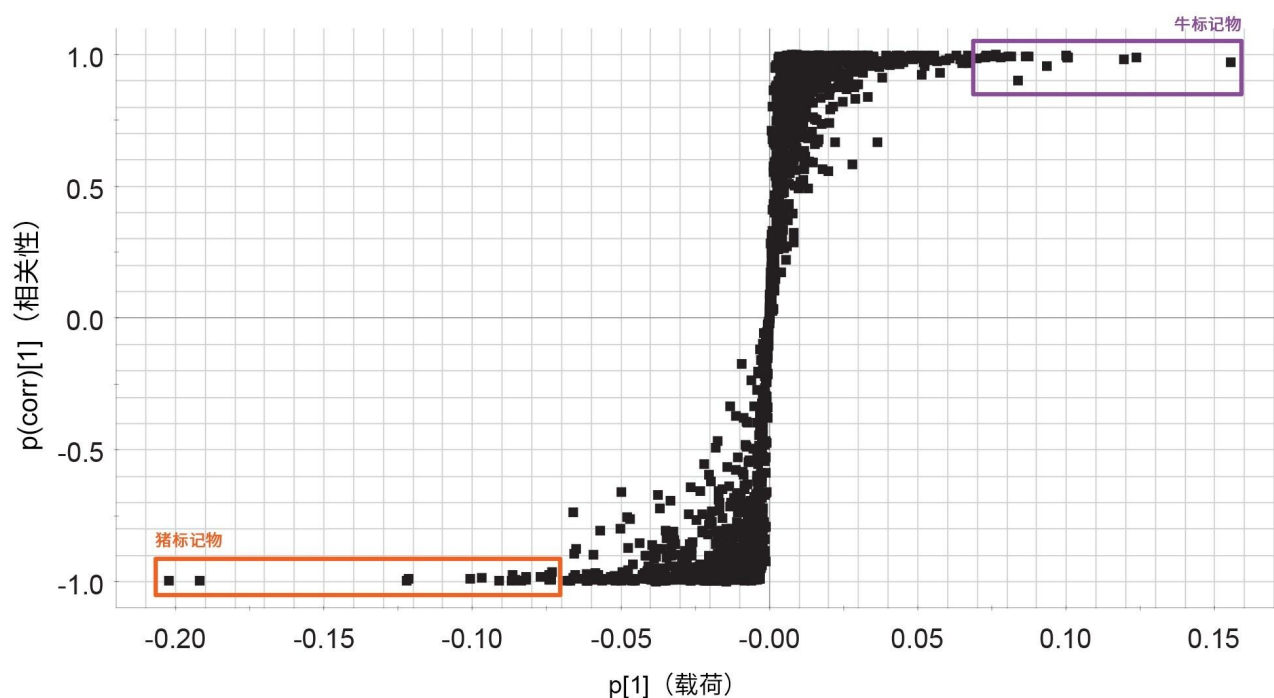


图2.区分牛明胶与猪明胶的S-plot

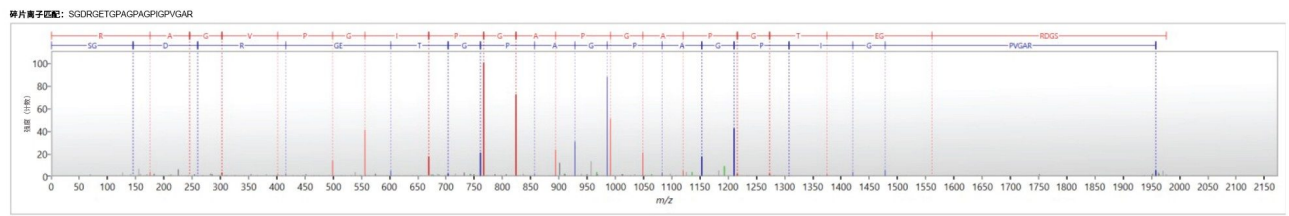


图3. 鉴定肽段SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR

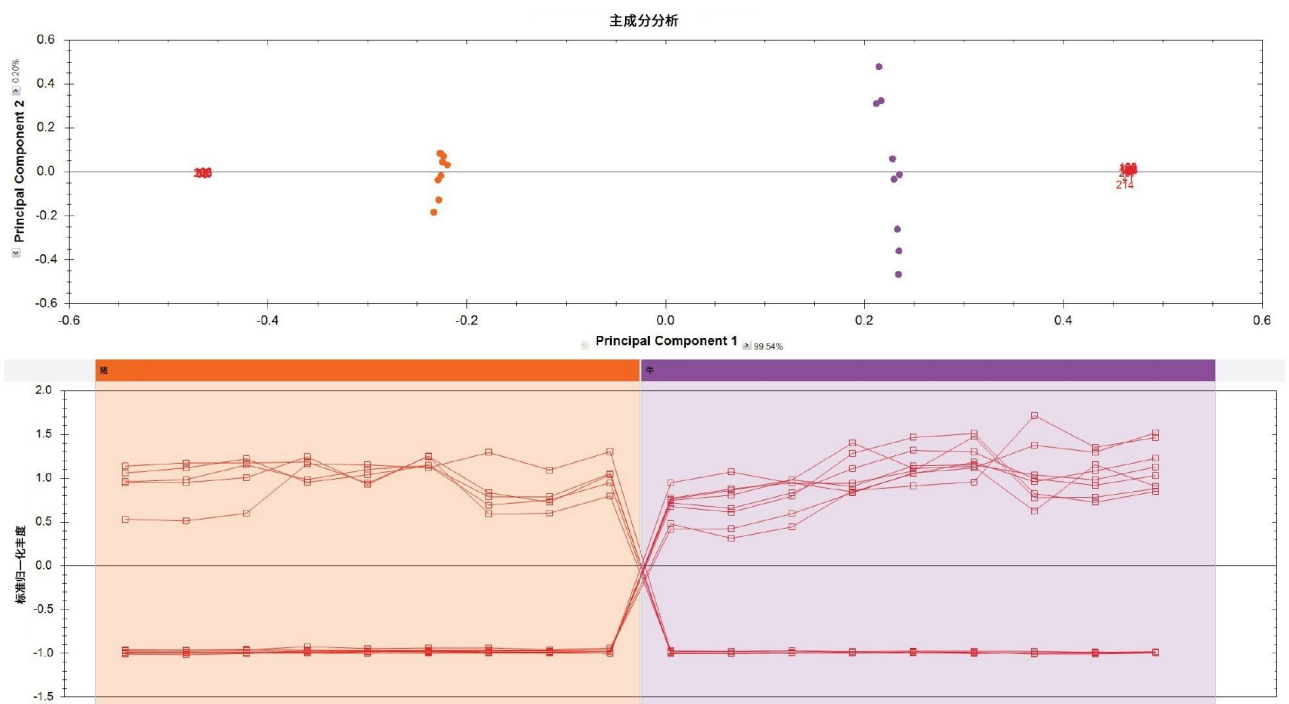


图4. 猪（橙色，左）和牛（紫色，右）的主成分分析(PCA)和标准化归一化丰度图

类别	序列	质量数	<i>m/z</i>	电荷	质量误差 (ppm)
牛	QGPSGASGER	944.4297	473.2221	2	-1.5
	GSPGPAGPK	766.3970	767.4043	1	-0.5
	GATGPAGVR	784.4193	785.4265	1	0.2
	GEPGPAGSVGPAGAVGPR	1531.7728	766.8937	2	-1.0
	SGDRGETGPAGPAGPIGPVGAR	1974.9881	659.3366	3	0.5
		1974.9770	988.4958	2	-5.1
	IGQPGAVGPAGIR	1191.6740	596.8443	2	1.3
GETGPAGPAGPIGPVGAR	1559.8054	780.9100	2	-0.2	
猪	TGQPGAVGPAGIR	1179.6356	590.8251	2	-0.4
		1179.6339	1180.6412	1	-1.8
	SGDRGETGPAGPAGPVGPVGAR	1960.9776	654.6665	3	3.1
		1960.9691	981.4918	2	-1.3
	GETGPAGPAGPVGPVGAR	1545.7902	773.9024	2	0.2

表1.牛和猪肽段标记

结论

本实验展示了如何使用UPLC-QToF MS和蛋白质组学数据分析软件Progenesis Q1，通过直观的蛋白质组学发现工作流程来确定猪和牛来源明胶的一系列不同肽段标记。通用试剂盒的使用简化了流程，有助于实施此类蛋白质组学方法，并确保它们在实验室和仪器平台之间具有重现性。接下来，我们需要针对这些肽段标记创建有针对性的方法，以验证用于在食品成分和成品中区分明胶物种来源的灵敏度和选择性。

参考资料

1. Uddin SMK *et al.* Halal and Kosher Gelatin: Applications as Well as Detection Approaches with Challenges and Prospects. *Food Bioscience* (2021) 41:101422.
2. Ali ME, Suleiman N. Eleven Shades of Food Integrity: A Halal Supply Chain Perspective. *Trends in Food*

Sci. Technol.(2018) 71:216–224.

3. Hameed AM *et al.*A Review of Gelatin Source Authentication Methods.*Trop.Life Sci.Res.*(2018), 29(2):213–227.
4. Rohman A *et al.*Review on Analytical Methods for Analysis of Porcine Gelatine in Food and Pharmaceutical Products for Halal Authentication.*Trends in Food Sci.Technol.* (2020) 101:122–132.
5. Ishaq A *et al.*Potentiality of Analytical Approaches to Determine Gelatin Authenticity in Food Systems: A Review.*LWT* (2020) 121:108968.
6. Valetta M *et al.*Mass Spectrometry-Based Protein and Peptide Profiling for Food Frauds, Traceability, and Authenticity Assessment. *Food Chem.* (2021) 365:130456.
7. Cheng X-L *et al.*Identification of Five Gelatins by Ultra-Performance Liquid Chromatography/Time-Of-Flight Mass Spectrometry (UPLC/QToF-MS) Using Principal Component Analysis.*J. Pharm.Biomed.Anal.* (2012) 62:191-195.
8. Grundy H *et al.* A Mass Spectrometry Method for the Determination of the Species of Origin of Gelatine in Foods and Pharmaceutical Products.*Food Chem.* (2016) 190:276-284.
9. Sha M-X *et al.*The Identification of Three Mammalian Gelatins by Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometries.*LWT* (2018) 89:74e86.
10. Deng G *et al.*Recent Advances in Animal Origin Identification of Gelatin-based Products Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods: A Mini Review. *Reviews in Anal.Chem.*(2020) 9:260-271.

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>>

蛋白质组学数据分析软件Progenesis QI <<https://www.waters.com/134790652>>

720007533ZH, 2022年2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](#)