

基于 LC-MS/MS 分析不同蛋白酶酶解奶牛胎盘产物差异及其抗氧化活性预测

张钺¹ 尤留超¹ 朱颖琨¹ 莘余¹ 吕尚揆¹ 裴淼毓¹ 傅宏庆² 沈留红^{1*}

(1. 四川农业大学 动物医学院/动物疫病与人类健康四川省重点实验室/奶牛疾病研究中心, 成都 611130;

2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300)

摘要 为探究胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解奶牛胎盘产物间差异,用此3种酶在最优条件下酶解奶牛胎盘获得胎盘酶解产物,每种酶重复3次,利用LC-MS/M技术鉴定产物中蛋白和肽段,BIO-PEP数据库匹配和测算十肽及以下的抗氧化活性多肽。结果显示:胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物分别鉴定出541、137和86种蛋白,2766、1170和128个肽段,胰蛋白酶鉴定蛋白和肽段数极显著高于其余2种酶($P < 0.01$),木瓜蛋白酶鉴定蛋白和肽段数均显著低于其余2种酶($P < 0.05$);3种酶酶解产物十肽及以下具有潜在抗氧化能力肽段分别占十肽及以下肽段总量的39.14%(256/654)、32.80%(81/247)和53.33%(16/30),木瓜蛋白酶占比显著高于其余2种酶($P < 0.05$);胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶3种酶酶解产物抗氧化多肽共同特征是分别含有EL、LY、MM、LK、IR、MY、VY残基,HL、LK、TY、HH、EL残基和LK、IR、EL等残基。综上,通过LC-MS/M技术对酶解产物定性和定量分析,胰蛋白酶酶解奶牛胎盘的产物生物学信息最丰富,在蛋白组学中可靠性和准确性最高;木瓜蛋白酶酶解奶牛胎盘最彻底,其产物潜在抗氧化活性最强,本研究为使用蛋白组学研究奶牛胎盘时酶的选择和奶牛胎盘抗氧化活性多肽的开发利用提供理论依据。

关键词 奶牛; 胎盘; 蛋白酶; LC-MS/MS; 抗氧化

中图分类号 S852.5

文章编号 1007-4333(2021)11-0133-09

文献标志码 A

LC-MS/MS based comparative analysis and antioxidant activity prediction of cow placenta hydrolyzed by different proteases

ZHANG Yue¹, YOU Liuchao¹, ZHU Yinkun¹, SHEN Yu¹, LV Shangku¹,
PEI Miaoyu¹, FU Hongqing², SHEN Liuhong^{1*}

(1. The Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province/The Medical research center for cow disease/
College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

Abstract In order to investigate the differences among the placenta products of trypsin, pepsin and papain, placenta hydrolysates were obtained by enzyme hydrolysis of the three enzymes under the optimal conditions. Each enzyme was repeated 3 times. LC-MS/M technology was used to identify the proteins and peptides in the products, and the BIO-PEP database was used to match and calculate the antioxidant peptides below peptides. The results showed 541, 137, 86 proteins and 2766, 1170, 128 peptides were identified in trypsin group, pepsin group and papain group, respectively. The number of identified proteins and peptides in the trypsin group was significantly higher than the other

收稿日期: 2021-02-20

基金项目: 四川省科技厅科技计划项目(2019YJ0650);国家重点研发计划项目(2018YFD0500900);江苏农牧科技职业学院产业发展关键技术创新项目(NSF2021ZR01);四川农业大学本科科研兴趣培养计划(KY2020186)

第一作者: 张钺, 硕士研究生, E-mail: 1874618455@qq.com

通讯作者: 沈留红, 副教授, 主要从事反刍动物疾病及繁殖新技术研究, E-mail: shenlh@sicau.edu.cn

two groups ($P < 0.01$), and the number of identified proteins and peptides in the papain group was significantly lower than the other two groups ($P < 0.05$). The potential antioxidant peptides of decapeptide and below accounted for 39.14% (256/654), 32.80% (81/247) and 53.33% (16/30). The proportion of papain group was significantly higher than the other two groups ($P < 0.05$). The common features of three kinds of antioxidant peptides were EL, LY, MM, LK, IR, MY, VY, HL, LK, TY, HH, EI and LK, IR, EL. In summary, the biological information of cow placenta hydrolyzed by trypsin is the richest, and its reliability and accuracy are the highest in proteomics. Papain has the most thorough enzymatic hydrolysis of cow placenta, and its products have the strongest potential antioxidant activity. The antioxidant activity of dairy cow placenta comes from Y, M, H, K. In summary, according to the qualitative and quantitative analysis of enzymolysis products by LC-MS/M technology, the biological information of cow placenta hydrolyzed by trypsin is the most abundant, and its reliability and accuracy are the highest in proteomics. Papain hydrolyzes cow placenta most thoroughly, and its products have the strongest potential antioxidant activity. This study provides a theoretical basis for the selection of enzymes and the development and utilization of antioxidant peptides in cow placenta by proteomics.

Keywords dairy cow; placenta; protease; LC-MS/MS; antioxidation.

奶牛胎盘是奶牛养殖中的副产物,未得到有效利用,且处理不当易造成环境污染和生物安全风险。而胎盘含大量肽类、多糖类、激素、脂质和矿物质等生物活性物质^[1],多肽类物质可能是其主要活性成分,具有促免疫、抗氧化、促进组织恢复和抗肿瘤等作用^[2-4]。因此,从奶牛胎盘中提取活性多肽成分有利于新型肽类药物开发,进而促进奶牛胎盘合理利用,减少因胎盘丢弃造成环境污染。

目前从动植物成分中制备活性多肽的方法主要有直接分离法、超声波破碎法和酶解法等。直接分离法要求严格、成本高,常用于确定的单个或几个多肽研究^[5],无法对大量多肽样本进行筛选;超声破碎法操作简便、省时省力、提取率高^[6],但其主要提取胎盘中可溶性蛋白和多肽,无法提取组织中不溶性蛋白,而胎盘不溶性蛋白质亦可产生具有生物活性的多肽;而酶解法是制备成分种类单一、作用方式较为确定的胎盘生物活性多肽有效方法,具有条件温和、过程可控、成本较低等优点^[7],能够将不溶性蛋白酶解为小和分子量易于吸收的多肽,更利于对其活性成分研究。目前酶解动植物组织制备多肽的酶有胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶等^[8],不同蛋白酶酶解产物生物活性存在差异^[9]。常采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)法、普鲁士蓝法和菲罗嗪法等测定多肽抗氧化活性,但上述方法与生物体内活性氧产生和猝灭并无直接关联,因此生物相关性低,只能评估体外抗氧化活性,不能进一步分析抗氧化活性多肽序列。而液相色谱-串联质谱(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/M)被广泛用于

功能性蛋白和多肽研究,如检测红酒中致敏蛋白^[10]、大麦麦芽评估^[11]及鱼类鉴定^[12]等,可从原料中鉴定和分析大量蛋白及多肽序列,利用生物信息学数据库进一步研究多肽序列^[13]。此外,LC-MS/MS技术识别的肽段数量,可决定蛋白质组学敏感性和特异性^[14]。目前尚未见奶牛胎盘抗氧化活性多肽序列及其制备抗氧化活性多肽蛋白酶选择的相关研究。

因此,本研究旨在胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解奶牛胎盘获得具有最优还原活性和提取率多肽的基础上^[15-16],利用LC-MS/M技术对酶解产物定性和定量分析,探究奶牛胎盘各种酶酶解产物间差异及对蛋白组学影响,并通过BIOPEP数据库(http://www.uwm.edu.pl/biochemia/biopep/start_biopep.php)预测不同酶解产物抗氧化活性,发掘具有潜在抗氧化活性多肽,为奶牛胎盘蛋白组学研究对酶的选择和奶牛胎盘抗氧化活性多肽的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择某规模化奶牛场半封闭统一舍饲、2~4胎、体况良好、妊娠足月、自然分娩脱落的健康中国荷斯坦奶牛新鲜胎盘组织,其自然脱落后立即用生理盐水清洗,除去胎盘内残留血液及污物,至胎盘子叶呈粉红色后,于-20℃冷冻保存。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白酶(Trypsin, 250 U/mg,批号920T041),胃蛋白酶(Pepsin, 250 U/mg,批号810H021),木瓜

蛋白酶(Papain, 800 U/mg, 批号 621G025), 北京索莱宝科技有限公司生物; 0.1% 甲酸水溶液、0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈 84%)、自配。上样柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap100, 100 μm \times 2 cm, nanoViper C18), 分析柱(Thermo scientific EASY column, 10 cm, ID 75 μm , 3 μm , C18-A2), LYOQUEST 冷冻干燥机(阿自倍尔泰事达); Sorvall™ Legend™ XT 冷冻离心机(Thermo scientific)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备和分组

参照胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解奶牛胎盘制备酶解产物最优条件^[15-16]: 胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和胃蛋白酶的反应时间分别为 5.80、4.70 和 5.49 h, 底物体积分数分别为 34.96%、34.03% 和 35.74%, 酶底比分别为 3.33%、3.66% 和 3.92%, 每种蛋白酶重复 3 次, 分别记为胰蛋白酶组(Trypsin)、胃蛋白酶组(Pepsin)和木瓜蛋白酶组(Papain)。

1.3.2 LC-MS/MS 分析

采用纳升流速的 HPLC 液相系统 Easy nLC 进行样品分离。缓冲液 A 液为 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液(乙腈为 84%)。色谱柱以 95% 的 A 液平衡, 样品由自动进样器进入上样柱, 经过分析柱分离, 流速为 300 nL/min。

样品经色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析。检测方式为正离子, 母离子扫描范围 300~1 800 m/z, 一级质谱分辨率 70 000 at 200 m/z, AGC target 为 1e6, Maximum IT 为 50 ms, 动态排除时间为 60 s。多肽和多肽碎片质量电荷比按下列方法采集: 每次全扫描后采集 20 个碎片图谱(MS2 scan), MS2 Activation Type 为 HCD, Isolation window 为 2 m/z, 二级质谱分辨率 17 500 at 200 m/z, Normalized Collision Energy 为 30 eV, Underfill 为 0.1%。

1.3.3 蛋白质和肽段鉴定及定量分析

将质谱分析原始数据导入 Max Quant 软件, 基于 Uniprot_Bos_taurus 数据库(https://www.uniprot.org)进行蛋白质和肽段鉴定及定量分析。部分相关参数设定: 裂解酶, Trypsin/Papain/Pepsin; 允许的最大漏切位点数, 2; 可信肽段的筛选标准(Peptide false discovery rate, Peptide FDR), ≤ 0.01 ; 一级离子质量容差, 6 ppm; 二级离子质量容差, 20 ppm; 固定修饰, 脲甲基化; 可变修饰,

氧化。

1.4 数据处理

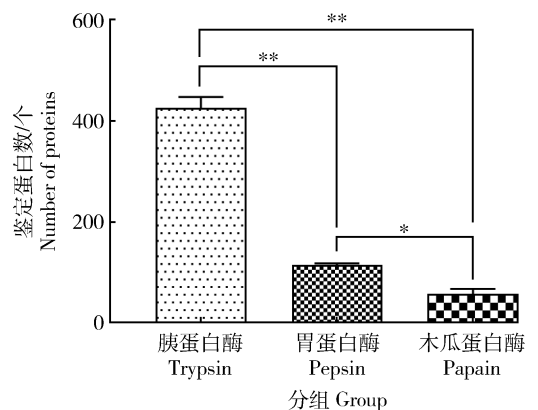
采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析, 单因素方差分析和邓肯多极差检验组间差异, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P < 0.05$ 为差异显著。使用 GraphPad Prism 8.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物质谱及蛋白鉴定分析

质谱分析显示胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物鉴定多肽的峰值均出现在质荷比(m/z) 400 以下, 且波形相似, 最大峰值在 303~305 m/z, 表明此质谱分析准确和生物学重复均一。

胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物蛋白鉴定结果见图 1, 去除重复后, 三组蛋白酶分别鉴定出 541、136 和 86 个蛋白。胰蛋白酶酶解产物鉴定蛋白数极显著高于其余 2 种酶($P < 0.01$), 胃蛋白酶显著高于木瓜蛋白酶($P < 0.05$)。



** $P < 0.01$ 表示差异极显著, * $P < 0.05$ 表示差异显著。下同。

** $P < 0.01$ indicates extremely significant differences,

* $P < 0.05$ indicates significant difference. The same below.

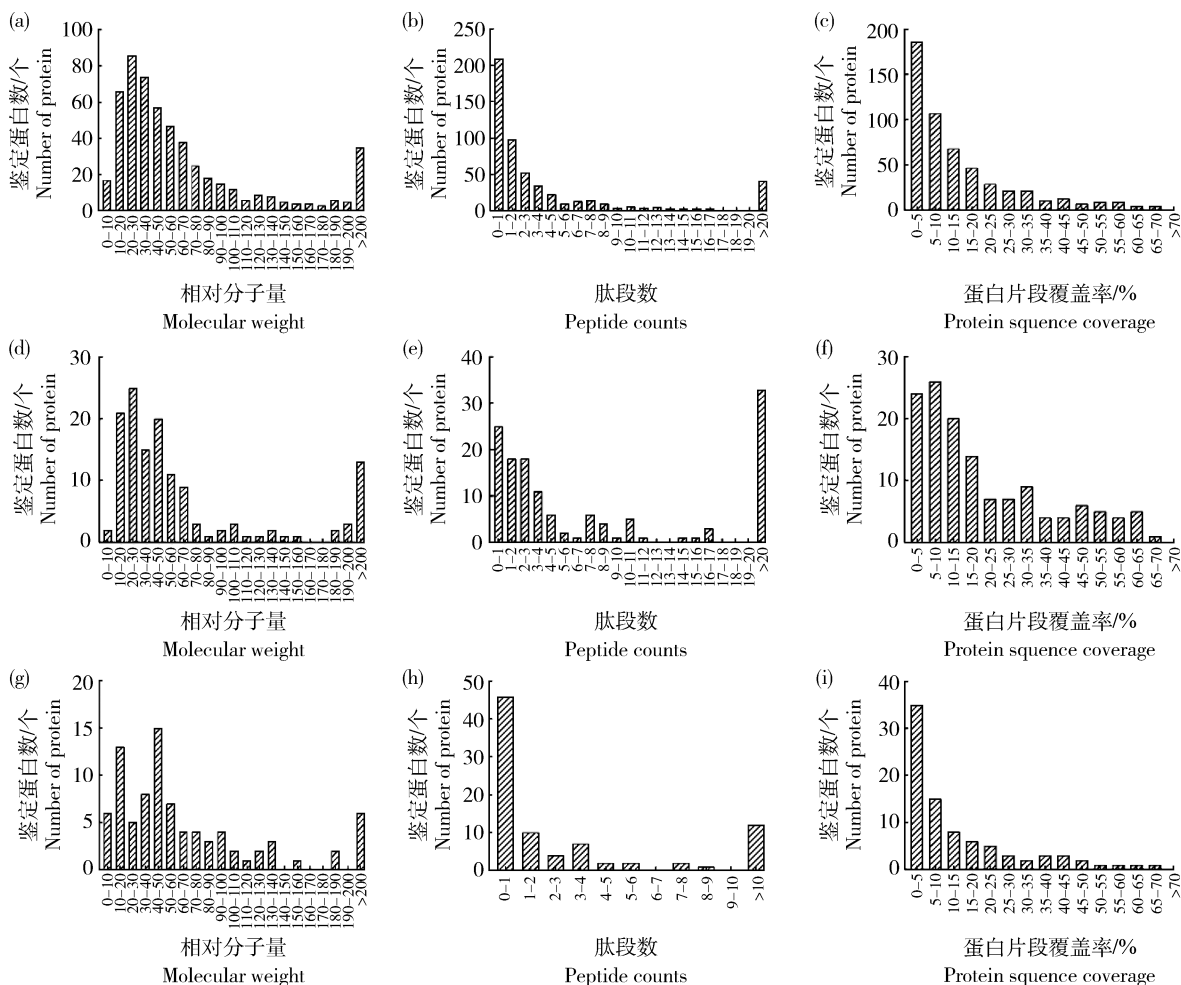
图 1 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物鉴定蛋白数量

Fig. 1 Numbers of identified proteins in trypsin, pepsin and papain hydrolysates

胰蛋白酶酶解产物鉴定蛋白中 330 种蛋白(61.11%)的分子量在 10~60 ku, 85 种蛋白(15.74%)分子量超过 100 ku(图 2(a)); 大多数蛋白(471 个, 87.22%)由从 1~10 个多肽鉴定出, 平均值为 5.98 个多肽(图 2(b)); 序列覆盖率大于 25% 的蛋白有 103 个(19.07%), 247 个(45.74%)

大于10%(图2(c))。胃蛋白酶酶解产物分子量在10~60 ku的蛋白共92种(67.65%),27种蛋白(21.26%)分子量超过100 ku(21.26%)(图2(d));92个蛋白67.65%由从1~10个多肽鉴定出,平均值为14.46个多肽(图2(e));序列覆盖率大于25%的蛋白有45个(32.85%),86个(62.77%)大于10%(图2(f))。木瓜蛋白酶酶解产物蛋白质的相

对分子量、肽段数量、和序列覆盖分布见图2;48种蛋白(55.81%)分子量在10~60 ku,15种蛋白(17.44%)分子量超过100 ku(图2(g));74个蛋白(86.05%)由从1~10个多肽鉴定出,平均值为8.88个多肽(图2(h));序列覆盖率大于25%的蛋白有17个(19.77%),36个(41.86%)大于10%(图2(i))。



(a)~(c)胰蛋白酶;(d)~(f)胃蛋白酶;(g)~(i)木瓜蛋白酶

(a)~(c) Trypsin; (d)~(f) Pepsin; (g)~(i) Papain

图2 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解蛋白的相对分子量、肽段组成和蛋白片段覆盖率

Fig. 2 Molecular weight, peptide counts and protein sequence coverage of identified proteins in trypsin, pepsin and papain hydrolysates

2.2 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物肽段鉴定及分析

胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物蛋白鉴定结果见图3,去除重复共鉴定出2766、1170和128个肽段。胰蛋白酶鉴定肽段数极显著高于其余2种酶($P < 0.01$),胃蛋白显著高于木瓜蛋白酶

($P < 0.05$)。

胰蛋白酶酶解产物2463种(89.05%)肽段相对分子量小于3000 u,257种肽段相对分子量小于1000 u(图4(a)),其中255种长度在十肽及以下;肽段长度在十肽及以下有654种(图4(d))。胃蛋白酶酶解产物所有肽段对分子量均在3000 u以

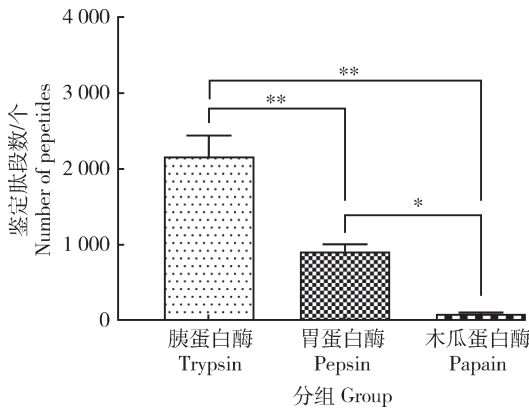


图 3 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物鉴定肽段数

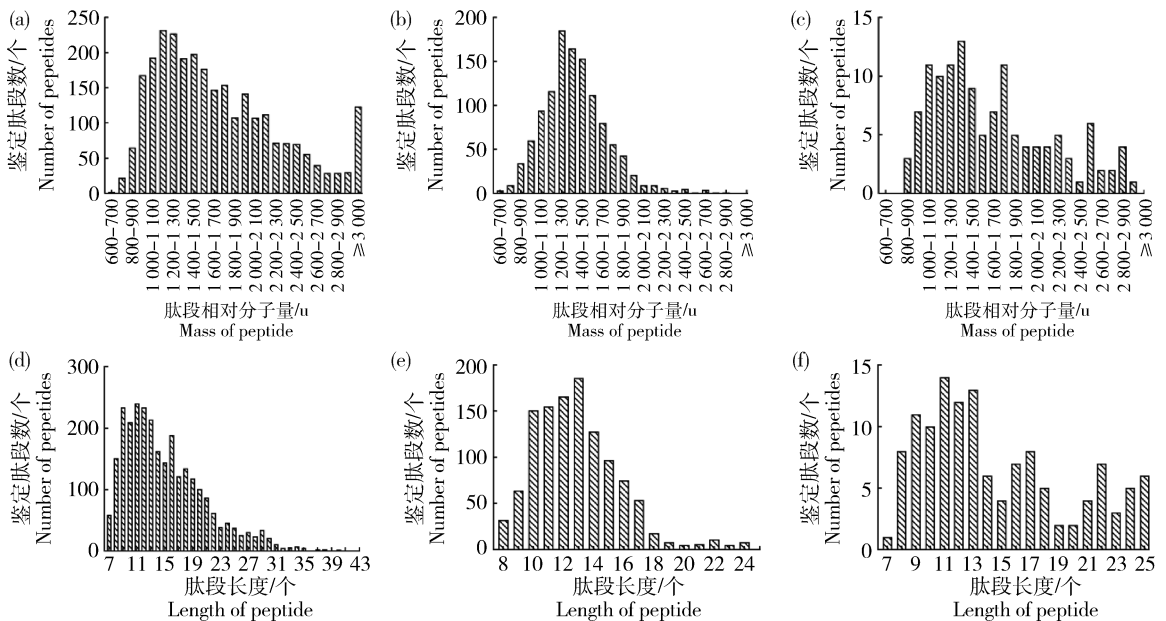
Fig. 3 Numbers of identified peptides in trypsin, pepsin and papain hydrolysates

下,106 种肽段相对分子量小于 1000 u(图 4(b)),其中 95 种长度在十肽及以下;肽段长度在十肽及以下

有 247 种(图 4(e))。木瓜蛋白酶酶解产物所有肽段对分子量均在 3 000 u 以下,相对分子量小于 1 000 u 有 10 种(图 4(c)),且其长度均在十肽及以下;有 30 种肽段长度在十肽及以下(图 4(f))。

2.3 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物鉴定肽段的抗氧化活性预测

胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物鉴定肽段利用 BIO-PEP 数据库进行匹配,未发现数据库内含的抗氧化活性多肽。相对分子量小于 3 000 u 的肽段具有较强抗氧化作用^[17],而小于 1 000 u 的抗氧化多肽往往活性最强^[18],胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物鉴定多肽相对分子量小于 1 000 u 分别有 257 种、106 种和 10 种,而这些肽段绝大部分(255 种、95 种、10 种)长度小于或等于 10 个多肽,因此,使用 BIO-PEP 数据库可对十肽及以下多肽进行抗氧化活性预测。



(a)(d)胰蛋白酶;(b)(e)胃蛋白酶;(c)(f)木瓜蛋白酶
(a)(d) Trypsin; (b)(e) Pepsin; (c)(f) Papain

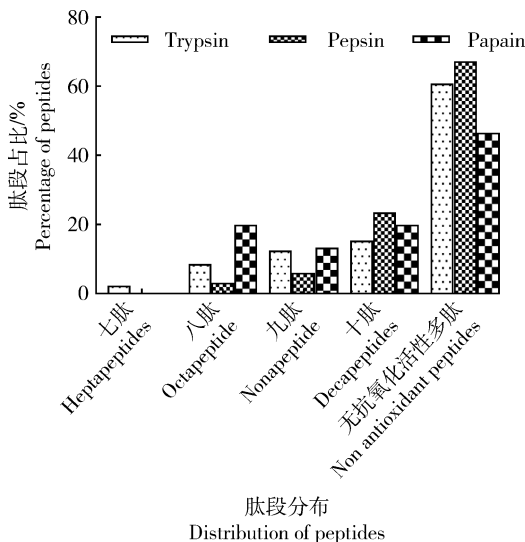
图 4 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物鉴定肽段的相对分子量((a)~(c))和肽段长度((d)~(f))

Fig. 4 Mass of peptide and length of peptide of identified peptides in trypsin, pepsin and papain hydrolysates

胰蛋白酶酶解产物共有 16 种七肽,57 种八肽,82 种九肽和 101 种十肽具有潜在抗氧化活性,共 256 种,占十肽及以下肽段(654 种)的 39.14%(图 5)。其共同特征为:具有谷氨酸-亮氨酸(Glutamic-Leucine, EL)、亮氨酸-酪氨酸(Leucine-

Tyrosine, LY)、甲硫氨酸-甲硫氨酸(Methionine-Methionine, MM)、亮氨酸-赖氨酸(Leucine-Lysine, LK)、异亮氨酸-精氨酸(Isoleucine-Arginine, IR)、甲硫氨酸-酪氨酸(Methionine-Tyrosine, MY)或缬氨酸-酪氨酸(Valine-Tyrosine, VY)残基等结构。

胃蛋白酶酶解产物共有 8 种八肽, 15 种九肽和 58 种十肽具有潜在抗氧化活性, 共 81 种, 占十肽及以下肽段(247 种)的 32.80%(图 5)。其共同特征为: 具有组氨酸-亮氨酸(Histidine-Leucine, HL)、LK、苏氨酸-酪氨酸(Threonine-Tyrosine, TY)、组氨酸-组氨酸(Histidine-Histidine, HH)或 EL 残基等结构。木瓜蛋白酶酶解产物共有 6 种八肽, 4 种九肽和 6 种十肽具有潜在抗氧化活性, 共 16 种, 占十肽及以下肽段(30 种)的 53.33%(图 5)。其共同特征为: 具有 LK、IR 或 EL 等结构。



“十肽”表示肽段长度为 10 个氨基酸且具有抗氧化活性的多肽, 纵坐标表示“十肽”及以下肽段比例, 以此类推。

“Decapeptide” refers to a peptide with length of 10 amino acids and antioxidant activity. Y axis indicates the proportion of “ten decapeptide” and below, and so on.

图 5 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物十肽及以下肽段抗氧化活性预测

Fig. 5 Antioxidant activity prediction of decapeptides and below in trypsin, pepsin and papain hydrolysates

3 讨论

3.1 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物中蛋白和肽段差异分析

获得多肽水平上的信息在蛋白组学中需追溯到原始蛋白质, 单一蛋白质时比较容易, 但在蛋白组成复杂时会变得困难。有研究指出, 因分析中肽段太短或太长而丢失, 不同蛋白质共有肽段的出现阻碍了蛋白质推断, 导致一组蛋白质的鉴定, 而不是单一蛋白质的鉴定^[23], 因而会阻碍蛋白的鉴定和定量。而工作酶(即消化蛋白所用水解酶)不同是造成肽段

信息不同的主要原因之一, 也是影响蛋白组学结果重要因素。胰蛋白酶是目前蛋白组学研究中最常用工作酶之一, 具有高度特异性, 酶解位点为碱性氨基酸精氨酸和赖氨酸-COOH 端^[24], 但缺乏精氨酸和赖氨酸残基的蛋白不能被胰蛋白酶水解, 此外其最适 pH 接近中性, 部分蛋白在此 pH 下溶解度小, 也不能被水解。因此, 胰蛋白酶存在一定局限性。胃蛋白酶特异性水解位点可以是芳香族氨基酸, 也可能是其他疏水性氨基酸 NH₂ 端和 COOH 端^[25], 特异性不高, 但其在酸性环境中活性最强, 而部分蛋白在酸性环境的溶解度较大, 利于胃蛋白酶消化。木瓜蛋白酶具有广泛特异性, 广泛应用于活性多肽制备^[26], 酶解位点为赖氨酸、精氨酸和甘氨酸 NH₂ 端和 COOH 端。上述 3 种蛋白酶不同特点造成酶解产物间差异。Zhang 等^[27]使用胰蛋白酶酶解对虾获得 575 种蛋白和 2 677 个肽段; Wen 等^[28]对比单独使用胃蛋白酶或胃蛋白酶后分析发现, 使用胰蛋白酶对猪肉、牛肉、鸡肉和鱼肉匀浆酶解产物差异, 发现经胃蛋白酶酶解后从猪肉、牛肉、鸡肉和鱼肉分别鉴定出 101、140、175 和 32 种多肽, 经胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解后分别鉴定出 72、59、92 和 28 种多肽, 表明经胰蛋白酶进一步消化后各物种酶解产物蛋白数量差异不显著, 胃蛋白酶对肉类的酶解能力较强。Ha 等^[29]使用木瓜蛋白酶从脱脂奶粉中提取分离出 308 个多肽, 其中 56 个具有潜在抗氧化活性, 结果表明木瓜蛋白酶可应用于抗氧化活性多肽研究。Jung 等^[30]认为胰蛋白酶和胃蛋白酶对猪胎盘具有良好水解效率, 而牛胎盘酶解产物研究相关信息较少。

本研究使用胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶研究奶牛胎盘酶解产物差异, 获取相关信息, 鉴定蛋白中独特多肽数量胰蛋白酶最多, 胃蛋白酶次之, 木瓜蛋白酶最少, 结果表明胰蛋白酶是鉴定蛋白最可靠的蛋白酶。且胰蛋白酶酶解产物鉴定肽段中 81.52% 相对分子量在 1 000~3 000 u, 83.84% 长度在 20 个氨基酸以内, 大部分肽段能与蛋白准确对应, 胃蛋白酶和木瓜蛋白酶鉴定肽段均在 3 000 u 以内, 分别有 97.35% 和 80.47% 长度在 20 个氨基酸内, 均符合蛋白组学鉴定要求。蛋白质检测的可靠性随蛋白质组中独特多肽数量增加而提高^[31], 然而, 鉴定蛋白覆盖率越广则检测准确率越高^[31], 本研究中胰蛋白酶和木瓜蛋白酶鉴定蛋白覆盖率要明显优于木瓜蛋白酶, 且木瓜蛋白酶鉴定蛋白质量分

布较差,在 140~200 ku 间存在缺失,说明木瓜蛋白酶用于蛋白质组学准确率较差。可能原因是木瓜蛋白酶特异性低,酶切位点广泛,酶解胎盘所获肽段长度小于 5 个氨基酸,而 5 个氨基酸以下组成的多肽分子量高和电荷高,LC-MS/MS 质谱技术检出率极低^[32],但肽段长度较短的多肽往往活性较高,因此木瓜蛋白酶可用于研究小分子活性多肽。

3.2 胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物抗氧化活性差异分析

肽的抗氧化活性与序列中氨基酸组成、排列顺序、分子量大小、肽键及肽的空间结构有关^[33]。通常认为具有供氢或供电子能力的氨基酸残基(如 Tyr、Trp、Cys、Met 和 His 等)具有清除自由基的能力^[27,34],疏水性氨基酸残基可增强肽抑制脂质过氧化能力^[35],而酸性和碱性氨基酸残基具有螯合金属离子的能力^[36]。此外,Gly 和 Pro 等氨基酸也对肽的抗氧化活性具有一定作用。而天然抗氧化活性多肽生物学作用较多且来源广泛,但从奶牛胎盘中提取抗氧化活性多肽鲜见报道。本研究通过 BIOPEP 数据库匹配和测算,分析了不同蛋白酶酶解奶牛胎盘产物的抗氧化活性:胰蛋白酶组中 GVVGPQGAR 强度最高,由牛和小鼠胶原蛋白 α -2(I)链的 P02465 蛋白水解产生,与猪胶原蛋白酶解物具有较高相似性,其 QGAR 残基使其产生抗氧化活性^[18];NDEELNK 强度次高,由构成组蛋白 H2A 的 F2Z4 J1 蛋白水解产生,其中 EL 残基为其抗氧化活性来源^[19];强度第三位的 GPSGPQGIR 同样来源于 P02465 蛋白,其 IR 使其可能具有抗氧化活性^[20]。胃蛋白酶酶解产物中 YYAPFDGILG 强度最高,来源于组成牛胃蛋白酶 A 的 A0A3Q1LZC9 蛋白,其 YYA 残基为抗氧化活性来源^[21];EKIWHHSF 强度次高,来源于组成肌动蛋白的 G8 JKKX4 蛋白,其 WHH 残基为抗氧化活性来源;强度第三位的 PARHQTHGSL 由组成硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 2 的 F1MER7 蛋白水解产生,其 RHQ 残基使其具有抗氧化活性^[19]。木瓜蛋白酶酶解产物中 REEYLLK 强度最高,由包含 GTPase 活化蛋白 2 的 IQ 模体(IQGAP2)的 F1MTR1 蛋白水解产生,其活性来源为 YLL 残基^[22]和 LK 残基^[20];KGNYLILK 次高,来源于血小板内皮细胞粘附分子的 A0A3Q1MHJ9 蛋白,其活性来源为 LK 残基^[19];RNDEELNK 强度第三,为组成组蛋白 H2AFJ 的 Q3ZBX9 蛋白水解产物,其活性来源为

EL 残基。

胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解奶牛胎盘组织有潜在抗氧化活性多肽共同特征分别是含有 EL、LY、MM、LK、IR、MY、VY 等残基,HL、LK、TY、HH、EL 等残基和 LK、IR、EL 等残基,上述残基中含有 Y、M、H 和 K 等具有自由基清除能力的氨基酸,L、I 和 V 等疏水性氨基酸,酸性氨基酸 E 和碱性氨基酸 K、R、H。上述氨基酸残基与资料研究报告一致^[34-36],可能是奶牛胎盘酶解产物抗氧化活性的来源。另外,本研究表明,胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物十肽及以下具有潜在抗氧化能力的肽段分别占十肽及以下肽段总量 39.14%、32.80%和 53.33%,木瓜蛋白酶酶解产物的潜在抗氧化能力最强,结果进一步说明了木瓜蛋白酶具有广泛特异性^[26],更适用于奶牛胎盘活性多肽制备。

4 结 论

通过利用 LC-MS/M 技术对酶解产物定性和定量分析,胰蛋白酶在蛋白质组学中可靠性和准确率均高于胃蛋白酶,而木瓜蛋白酶最差;木瓜蛋白酶对奶牛胎盘酶解更彻底,其酶解产物十肽以下具有潜在抗氧化能力肽段占比最高,潜在抗氧化活性最强;奶牛胎盘酶解产物抗氧化活性多来源于 EL、LY、MM、LK、IR、MY、VY、HL、TY、HH 等氨基酸残基。研究结果为奶牛胎盘蛋白组学选择蛋白酶和提取奶牛胎盘抗氧化活性多肽提供理论基础,促进奶牛胎盘开发利用。

参考文献 References

- [1] Han J, Kim M R, Park Y, Hong Y H, Suh H J. Skin permeability of porcine placenta extracts and its physiological activities[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2013, 33(3): 356-362
- [2] Huang L, Wu X M, Ji Y, Wang Y. Fingerprint analysis of placenta polypeptide injection by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 2(1): 71-75
- [3] Heo J H, Heo Y, Lee H J, Kim M, Shin H Y. Topical anti-inflammatory and anti-oxidative effects of porcine placenta extracts on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced contact dermatitis [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 18(1): (331)
- [4] Park H J, Shim H S, Lee S, Hahm D H, Lee H, Oh C T, Han H J, Ji H J, Shim I. Anti-stress effects of human

- placenta extract: possible involvement of the oxidative stress system in rats [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 18(1): 1-8
- [5] Sah B N P, Vasiljevic T, Mckechnie S, Donkor O N. Antioxidant peptides isolated from synbiotic yoghurt exhibit antiproliferative activities against HT-29 colon cancer cells[J]. *International Dairy Journal*, 2016, 63: 99-106
- [6] 佟臻昊. 骆驼胎盘可溶性蛋白的提取及应用研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019
- Tong Z H. Extraction and application of soluble protein from camel placenta [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [7] 师玉森. 猪胎盘功能性肽的分离纯化及其活性的初步研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013
- Shi Y M. Studies on the isolation, purification and activities of functional peptides from pig placenta [D]. Hangzhou: Zhejiang Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- [8] Jiang Z Z, Xu Y J, Su Y T. Preparation process of active enzymolysis polypeptides from seahorse bone meal[J]. *Food Science & Nutrition*, 2014, 2(5): 490-499
- [9] Chen F Y, Jiang H B, Lu Y B, Chen W W, Huang G R. Identification and in silico analysis of antithrombotic peptides from the enzymatic hydrolysates of tenebrio molitor larvae[J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245(12): 2687-2695
- [10] Jaekels N, Tenzer S, Rosfa S, Schild H, Decker H, Wigand P. Purification and structural characterisation of lipid transfer protein from red wine and grapes[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 263-269
- [11] Vo T S, Ngo D H, Kim J A, Ryu B, Kim S K. An antihypertensive peptide from tilapia gelatin diminishes free radical formation in murine microglial cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(22): 12193-12197
- [12] Mazzeo M F, Giulio B D, Guerriero G, Ciarcia G, Malorni A, Russo G L, Siciliano R A. Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(23): 11071-11076
- [13] Huang B B, Lin H C, Chang Y W. Analysis of proteins and potential bioactive peptides from tilapia (*Oreochromis spp.*) processing co-products using proteomic techniques coupled with BIOPEP database [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 19: 629-640
- [14] Wilson R. Sensitivity and specificity: twin goals of proteomics assays. Can they be combined? [J]. *Expert Review of Proteomics*, 2013, 10(2): 135-149
- [15] 沈留红, 朱颖琨, 张钺, 尤留超, 钱柏霖, 石滢, 董可, 张帅杰, 吴禹熹, 余树民, 曹随忠, 王娅. 超声破碎和胰蛋白酶解奶牛胎盘制备还原性多肽方法的建立与优化[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(4): 89-101
- Shen L H, Zhu Y K, Zhang Y, You L C, Qian B L, Shi T, Dong K, Zhang S J, Wu Y X, Yu S M, Cao S Z, Wang Y. Establishment and optimization of dairy cow's placental reductive polypeptide preparation methods by sonication and trypsin digestion [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(4): 89-101 (in Chinese)
- [16] 沈留红, 张钺, 尤留超, 朱颖琨, 石滢, 董可, 曹随忠. 奶牛胎盘还原性多肽不同蛋白酶解方法的建立与优化. [J]. *东北农业大学学报*, 2021, 52(1): 54-36
- Shen L H, Zhang Y, You L C, Zhu Y K, Shi T, Dong K, Cao S Z. Establishment and optimization by different enzymolysis methods of reducing polypeptide preparation from dairy cows' placenta [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2021, 52(1): 54-36 (in Chinese)
- [17] Ngoh Y Y, Gan C Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv Pinto) [J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 331-337
- [18] Lin S Y, Jin Y, Liu M Y, Yang Y, Zhang M S, Guo Y, Jones G, Liu J B, Yin Y G. Research on the preparation of antioxidant peptides derived from egg white with assisting of high-intensity pulsed electric field [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(1-4): 300-306
- [19] Minkiewicz, Iwaniak, Urewicz. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 23(5978)
- [20] Huang W Y, Majumder K, Wu J P. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(3): 635-641
- [21] Saito K, Jin D H, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, Nokihara K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3668-3674
- [22] Tian M, Fang B, Jiang L, Guo H Y, Cui J Y, Ren F Z. Structure-activity relationship of a series of antioxidant tripeptides derived from β -Lactoglobulin using QSAR modeling [J]. *Dairy Science & Technology*, 2015, 95(4): 451-463
- [23] Tholey A, Becker A. Top-down proteomics for the analysis of proteolytic events-Methods, applications and perspectives [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2017, 1864(11): 2191-2199
- [24] Li Q, Feng Y, Tan M J, Zhai L H. Evaluation of endoproteinase Lys-C/trypsin sequential digestion used in proteomics sample preparation [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(3): 316-321
- [25] Savoie L, Agudelo R A, Gauthier S F, Marin J, Pouliot Y. In vitro determination of the release kinetics of peptides and free amino acids during the digestion of food proteins. [J]. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2005, 88(3): 935-948
- [26] Dhakal D, Koomsap P, Lamichhane A, Sadiq M B, Anal A

- K. Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres[J]. *Food Bioscience*, 2018, 23: 23-30
- [27] Zhang M, Huang T S, Mu T H. Production and *in vitro* gastrointestinal digestion of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sweet potato protein affected by pretreatment[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2019, 74(2): 225-231
- [28] Wen S Y, Zhou G H, Song S X, Xu X L, Voglmeir J, Liu L, Zhao F, Li M J, Li L, Yu X B, Bai Y, Li C B. Discrimination of *in vitro* and *in vivo* digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish[J]. *PROTEOMICS*, 2015, 15 (21): 3688-3698
- [29] Ha G E, Chang O K, Han G S, Ham J S, Park B Y, Jeong S G. Comparison of antioxidant activities of hydrolysates of domestic and imported skim milk powders treated with papain [J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2015, 35(3): 360-369
- [30] Jung K H, Choi Y C, Chun J Y, Min S G, Hong G. P Effects of concentration and reaction time of trypsin, pepsin, and chymotrypsin on the hydrolysis efficiency of porcine placenta [J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2014, 34(2): 151-157
- [31] Chu C, Yan N, Du Y M, Liu X M, Chu M J, Shi J, Zhang H B, Liu Y H, Zhang Z F. iTRAQ-based proteomic analysis reveals the accumulation of bioactive compounds in Chinese wild rice (*Zizania latifolia*) during germination [J]. *Food Chemistry*, 2019, 289: 635-644
- [32] Zhang B, Mao J L, Yao H, Aubourg S P. Label-free based proteomics analysis of protein changes in frozen whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pre-soaked with sodium trimetaphosphate [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109455
- [33] 郑淋. 抗氧化肽的构效关系及定向制备的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015
- Zheng L. Structure-activity relationship and directional preparation of antioxidant peptide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015 (in Chinese)
- [34] Noorani K P M, Nazeer R A. Enzymatic production of two tripeptides on ACE-I inhibition and antioxidant activities [J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2020, 26(4): 2365-2377
- [35] Kim H, Yang S, Jang A. Anti-proliferative effect of a novel anti-oxidative peptide in hanwoo beef on human colorectal carcinoma cells [J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2018, 38(6): 1168-1178
- [36] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(12): 3661-3667

责任编辑：秦梅