

# 利用 Shotgun 蛋白组学策略分析长白山核桃楸 (*Juglans mandshurica* Maxim) 蛋白

李京京, 刘春雷, 闵伟红, 刘景圣, 李鸿梅, 郑鸿雁

(吉林农业大学食品科学与工程学院, 小麦和玉米深加工国家工程实验室, 吉林长春 130118)

**摘要:** 采用碱溶酸沉法获得长白山核桃楸种仁分离蛋白, 利用胰蛋白酶水解后经柱层析分离并通过 Shotgun 蛋白质组学方法进行鉴定, 共识别出 61 个蛋白质。基于 Gene Ontology 进行分类显示, 61 个蛋白质分子量分布在 1~100 kDa 之间, 其中 21 个蛋白分子量分布在 10~20 kDa 之间; 19 个蛋白质 (31.15%) 等电点分布在 pI 6.00~7.00; 28 个蛋白残基数目在 100~300 之间; 49 个蛋白 GRAVY 值小于 0.00, 为亲水性蛋白; 10 个蛋白有跨膜区; 这 61 个蛋白质按生物途径可分为 13 类, 共有 42 个蛋白质参与代谢过程; 按照细胞定位分类, 有 24 个蛋白质来源于细胞, 16 个蛋白质来源于细胞器; 按其分子功能可分为 6 类, 具有催化活性的蛋白质 34 个, 占 55.74%, 其次是具有结合能力的蛋白质 26 个, 占 42.62%。本研究通过核桃种仁蛋白质质谱分析, 为研究核桃蛋白对机体的作用提供了理论基础和实验数据。

**关键词:** 长白山核桃; 蛋白组学; 鸟枪法

文章编号: 1673-9078(2015)9-256-262

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.042

## Proteomic Analysis of *Juglans mandshurica* Maxim from Changbai Mountain Using Shotgun Sequencing

LI Jing-jing, LIU Chun-lei, MIN Wei-hong, LIU Jing-sheng, LI Hong-mei, ZHENG Hong-yan

(College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, National Engineering Laboratory on Wheat and Corn Further Processing, Changchun 130118, China)

**Abstract:** *Juglans mandshurica* Maxim kernel protein isolates, prepared by alkaline solubilization and acid precipitation, were hydrolyzed with trypsin, isolated through column chromatography, and identified using shotgun proteomics. From the hydrolyzate, 61 proteins were identified. Gene Ontology classification showed that these proteins were mainly distributed in a range of 1~100 kDa. Among them, 21 proteins were in a range of 10~20 kDa and the isoelectric points (pI) of 19 proteins (31.15%) were between 6.00~7.00. The number of residues ranged from 100~300 in 28 proteins. The 49 proteins had GRAVY values <0.00, being of hydrophilic proteins. 10 proteins had transmembrane domains. Walnut proteins could be divided into 13 categories by biological processes, and 42 proteins were related to metabolic processes. Regarding the cellular components, 24 proteins were from cells and 16 were from organelles. Regarding molecular function, the proteins could be classified into six types: 34 proteins (55.74%) exhibited catalytic activities, and 26 proteins (42.62%) possessed binding activities. Through mass spectrometry, the present study provided a theoretical basis and experimental data for the functions of walnut kernel proteins in the body.

**Key words:** Changbai Mountain walnut; proteomics; shotgun sequencing

长白山核桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim)为胡桃楸科胡桃属植物, 落叶阔叶乔木树种, 东北地区三大珍贵阔叶树种之一。核桃楸种仁中含有 70% 左右的油脂(多不饱和脂肪酸)<sup>[1]</sup>, 20% 左右蛋白质(尤其含有丰富的必需氨基酸)以及矿物质<sup>[2]</sup>, 因其高营养

收稿日期: 2015-02-02

基金项目: 国家“863”计划项目 (2013AA102206)

作者简介: 李京京 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向食品科学

通讯作者: 闵伟红 (1971-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事发酵工程、粮油科学与深加工技术研究

及药用价值被确认为功能性食品<sup>[3-4]</sup>。核桃仁具有抵御各种疾病的重要作用, 包括保护机体免受糖尿病或者心血管疾病的困扰<sup>[5-6]</sup>等。目前, 国内关于核桃种仁的研究主要集中于对核桃油脂, 核桃蛋白饮料和各种活性多肽等。如刘晓红等人<sup>[7]</sup>通过正交试验法确定了 4.00% 核桃、6.80% 白砂糖和 0.39% RB2 型稳定剂为原料, pH 为 7.30~7.70, 加热至 70 °C, 均质, 均质压力为 35 MPa/5~10 MPa 为全果核桃蛋白饮料最佳工艺条件; Wang C<sup>[8]</sup>等人水解核桃蛋白得到一种新型的 ACE 抑制肽 P-1a1, 经高效液相法进行纯化, 将纯化后的

肽通过 Edman 降解法进行测序。氨基酸序列为 LPGRPPIKPWPL。ACE 抑制肽表现出高的 ACE 抑制活性的  $IC_{50}$  值为  $128.90\mu\text{g/mL}$  ( $95.20\mu\text{mol/L}$ )；贾靖霖等人<sup>[9]</sup>用核桃多肽给小鼠灌胃,测定其血清和组织中乳酸、肌糖原、肝糖原和尿素氮含量,观察其对小鼠负重游泳实验的影响,结果表明核桃多肽具有较好的抗疲劳功效。而国外关于核桃的研究主要集中于过敏原方面。

Wilkins 在 1996 年首次提出蛋白质组学的概念<sup>[10]</sup>。高压液相色谱分离耦合串联质谱技术已经逐渐成为大规模研究蛋白质组学的常用方法,发展相对成熟,该技术称为鸟枪法(Shotgun 法)蛋白质组学。作为蛋白质组学的有效方法之一,Shotgun 法被广泛应用于疾病,医药以及食品领域等。如蛋白质组学技术在食品中过敏原的检测中的应用。Pedreschi 等<sup>[11]</sup>利用 Shotgun 蛋白质组学方法检测烘烤饼干中花生过敏原,通过检测花生过敏原 Ara h 的 3/4 水解肽段来确定花生过敏原的存在;赵洪岩等人<sup>[12]</sup>通过质谱分析和生物学信息学搜索,最终鉴定出变形链球菌中共 752 种蛋白,建立了变形链球菌蛋白质表达谱,其中具有高可信度的蛋白质有 298 种,可信度较低的蛋白有 454 种。本次研究利用 Shotgun 蛋白质组学方法,检测长白山核桃楸种仁分离蛋白水解物的蛋白质谱,为其进一步研究多肽抗氧化以及多肽抗疲劳机理研究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究材料

长白山核桃楸种仁,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  下压榨去油脂得到核桃楸种仁粕。通过碱溶酸沉法制备分离蛋白(蛋白含量 91.15%)。

### 1.2 主要试剂与仪器

所有试剂均为分析级或色谱级。甲酸、乙腈、盐酸胍、三羟甲基氨基甲烷购自美国 Bio-Rad 公司,胰蛋白酶、二硫苏糖醇、碘乙酰胺购自美国 Promega 公司,咖啡因、四肽 MRFA、聚合物 Ultramark1621 均购自美国 Sigma 公司。反相  $C_{18}$  柱(RP- $C_{18}$ )购自 CTI 公司(Column:  $0.15\text{mm}\times 150\text{mm}$ ), Zorbax 300SB-C18 型 Trap 柱购自 Agilent Technologies 公司,超滤管购自 Millipore 公司。EttanTM MDLC 高效液相色谱购自瑞典 GE healthcare 公司, LTQ 购自美国 Thermo Finnigan 公司, Milli Q 纯水系统购自 Millipore 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品酶解

取制备好的样品  $30.00\mu\text{g}$ , 加入  $30.00\mu\text{L}$  缓冲溶液,沸水浴 5 min 后冷却至室温。加入  $200.00\mu\text{L}$  尿素缓冲溶液(8 M 尿素, 150 mM Tris-HCl pH 8.50) 混匀,转移到 30 kDa 超滤管离心中。加入  $200.00\mu\text{L}$  UA 缓冲溶液,离心 10 min, 弃滤液。加入  $100.00\mu\text{L}$  IAA 振荡 1 min, 避光, 室温孵育 30 min, 离心。加入  $100.00\mu\text{L}$  UA 缓冲溶液,离心,该步骤重复 2 次。加入  $100.00\text{mL}$  25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 离心,该步骤重复 2 次。加入  $40\mu\text{L}$  胰蛋白酶溶液, 600 r/min 振荡 1 min,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 16~18 h。转移到新的收集管中, 14000 r/min 离心 10 min, 取滤液,  $OD_{280}$  肽段定量。

#### 1.3.2 毛细管高效液相色谱法

A 液为 0.10% 甲酸水溶液, B 液为 0.10% 甲酸-乙腈水溶液(乙腈为 100%)。色谱柱以 97.00% 的 A 液平衡后,样品由自动进样器上样至 Trap 柱。色谱梯度为在 0~30 min 时, B 液线性梯度 4.00%~50.00%; 在 30 min~34 min 时, B 液线性梯度 50.00%~100%; 在 34 min~120 min 时, B 液维持在 100%。

#### 1.3.3 质谱数据采集

LTQ Orbitrap XL 质谱分析为 Nanospray 模式,多肽和多肽碎片的质量电荷比按照下列方法采集:每次全扫描后采集 20 个碎片图谱。质谱测试原始文件用 Maxquant 软件检索相应数据库,最后得到鉴定的蛋白质结果。搜库参数如下: Fixed modifications: Carbamidomethyl (C); Max Missed Cleavages: 2; Protein FDR $\leq$ 1.00%, Peptide FDR $\leq$ 1.00%; Min. Peptide Length $\geq$ 7 aa; Variable modifications: Oxidation (M); Acetyl (Protein N-term); Protein FDR $\leq$ 1.00%, Peptide FDR $\leq$ 1.00%。

#### 1.3.4 GO 分析

GO 分析可分为分子功能(Molecular Function), 生物途径(Biological process)和细胞组成(Cellular component)三个部分。蛋白质或者基因可以通过 ID 对应或者序列注释的方法找到与之对应的 GO 号,而 GO 号可对应到 Term,即功能类别或者细胞定位。利用 InterProScan 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)、Web Gene Ontology Annotation Plot (WEGO) 和在线分析(<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>)进行 GO 注释。

## 2 结果与讨论

### 2.1 核桃蛋白肽质谱表征

运用 Shotgun 方法共鉴定出蛋白质共 61 个,表 1

为核桃楸鉴定出的蛋白列表, 本次实验共鉴定出 61 种蛋白, 种类较少, 最主要的原因可能是本次试验所用材料为低温压榨去油后的核桃粕, 经碱溶酸沉法获得的分离蛋白, 在这一系列处理中可能存在蛋白损失。由图 2 可以看出 19 个核桃蛋白等电点分布在 6.00~7.00; 8 个蛋白等电点分布在 5.00~6.00; 9 个蛋白等电点分布在 4.00~5.00; 即 59.01 % 的核桃蛋白偏酸性, 极酸(pH<4.00)和极碱(pH>11.00)的蛋白所占的比例较小。由图 3 可知, 分子量分布在 10~20 kDa 的蛋白质有 21 个; 55 个蛋白质 (90.16%) 分子量分布在 10~70 kDa 。

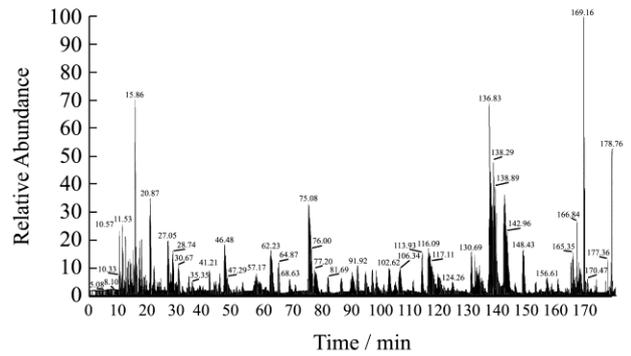


图 1 核桃蛋白多肽 LC-MS 谱图

Fig.1 LC-MS profile of walnut peptides

表 1. 核桃楸蛋白列表

Table 1 List of walnut proteins

编码	类型	编码	类型
1 31321944	巢菜灵种子贮存蛋白[Juglans nigra]	32 427199356	多重剪接 RNA 结合蛋白 [Morella rubra]
2 157384606	巢菜灵 7s 球蛋白, partial [Carya illinoensis]	33 20137323	酰基载体蛋白 1, 叶绿体; Short=ACP 1; Flags: Precursor
3 6580762	巢菜灵类似蛋白前体, partial [Juglans regia]	34 29603157	脱水蛋白, partial [Betula pubescens]
4 56788031	种子贮存蛋白 [Juglans regia]	35 344190166	苹果酸盐脱氢酶 [Corylus heterophylla]
5 1794252	白蛋白种子贮存蛋白前体 partial [Juglans regia]	36 373939132	1,5-核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基, partial (chloroplast) [Fagus sylvatica]
6 158998780	11S 豆球蛋白 [Carya illinoensis]	37 253828400	延长因子 1 alpha, partial [Quercus macrocarpa]
7 257307279	未知蛋白产物 [Corylus avellana]	38 257745202	未知蛋白产物 [Betula pendula]
8 672231724	聚泛素 10 [Fagus crenata]	39 2501187	硫胺素噻唑合成酶,
9 13430170	钙调蛋白, partial [Castanea sativa]	40 15558862	17c 热休克蛋白, partial [Quercus suber]
10 357378944	油质蛋白 [Juglans regia]	41 218684529	脂质转移蛋白 [Castanea mollissima]
11 71793966	乙醇脱氢酶 [Alnus glutinosa]	42 608602180	甘油醛-3 磷酸 脱氢酶, partial [Juglans sigillata]
12 557792009	皮质醇过敏原 [Corylus avellana]	43 734592648	甘油醛-3-磷酸 脱氢酶 [Betula luminifera]
13 357378942	优质蛋白 [Juglans regia]	44 734592644	泛素结合酶, partial [Betula luminifera]
14 339779749	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 c 子单元 1, partial [Quercus virginiana]	45 130975	抑制蛋白-1;
15 19338630	48-kDa 糖蛋白前体 [Corylus avellana]	46 573005958	谷胱甘肽 S-转移酶 [Betula pendula]
16 3023685	烯醇酶	47 28380096	Olee1 样蛋白; Flags: Precursor
17 344190186	烯醇酶 [Corylus heterophylla]	48 1351138	蔗糖核酶;
18 49617323	油质蛋白 [Corylus avellana]	49 638110957	半胱氨酸蛋白酶, partial [Fagus sylvatica]
19 33151040	Em 蛋白 [Quercus robur]	50 638110934	叶绿体伴侣蛋白 like, partial [Fagus sylvatica]
20 38228691	14-3-3 蛋白, partial [Fagus sylvatica]	51 541135563	蔗糖合酶 1 [Betula luminifera]
21 261264941	天冬氨酸蛋白酶 1 [Castanea mollissima]	52 480633493	LEA 蛋白 [Juglans regia]
22 182409985	肌动蛋白 [Betula platyphylla]	53 397701749	9-cis-环氧类双加氧酶, partial [Juglans regia]
23 724800515	肌动蛋白, partial [Betula luminifera]	54 384597555	硫解酶 II [Betula platyphylla]
24 566572561	乙醇脱氢酶 [Quercus suber]	55 7578497	ATP 合酶, B 亚族, partial (chloroplast) [Alnus rubra]
25 614119665	Fe 超氧化物歧化酶, partial [Betula platyphylla]	56 164512764	乙酰辅酶 A 碳酸酵素, partial (chloroplast) [Betula pendula]

转下页

接上页

26	121955995	60S 酸性核糖体 蛋白 P2 [Juglans regia]	57	76782200	假定分支酸合酶[Fagus sylvatica]
27	451172647	SKP1 1A 样蛋白 partial [Quercus ilex]	58	257657623	未知蛋白产物 [Fagus sylvatica]
28	614119692	Mn 超氧化物歧化酶, partial [Betula platyphylla]	59	166244561	MetE, partial [Quercus mongolica subsp. crispula]
29	56900833	质体 β-酮己基 ACP synthase, partial [Betula pendula]	60	112950422	假定锰超氧化物歧化酶, partial [Fagus sylvatica]
30	164685320	atp 1, partial (线粒体) [Quercus subsericea]	61	112950420	假定谷胱甘肽过氧化物酶, partial [Fagus sylvatica]
31	427199418	duf246 包含域蛋白, partial [Morella rubra]			

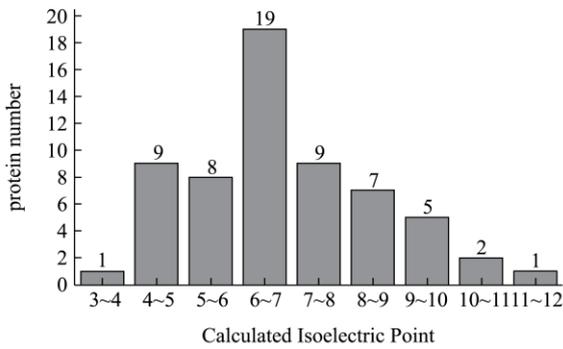


图2 蛋白质等电点分布

Fig.2 pI distribution of proteins

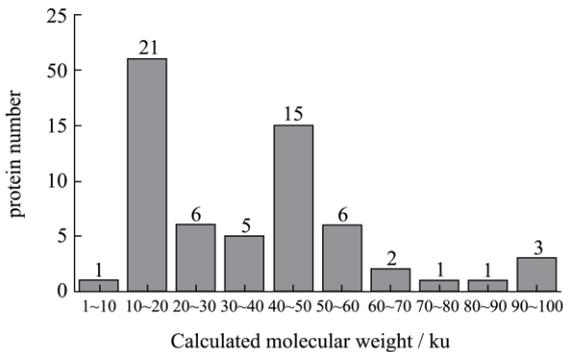


图3 蛋白质分子量分布

Fig.3 Molecular distribution of proteins

图4显示主要残基数目在100~300之间的蛋白数量最多,共有28个,占45.90%,其次是残基数300-500的蛋白,共有21个,占34.43%。根据所鉴定蛋白的氨基酸序列,可以计算出蛋白的GRAVY值, GRAVY数值的正负可以反映蛋白的疏水性。若蛋白的GRAVY值大于0.00,说明该蛋白为疏水性蛋白,数值越大,疏水性越强;反之,若小于0.00,即说明蛋白为亲水性蛋白,数值越小(GRAVY绝对值越大)亲水性越强。所鉴定的61个蛋白的GRAVY值及分布如图5所示。由图5可以看出,核桃蛋白中约80.00%的蛋白的GRAVY值小于0.00,即为亲水性蛋白,疏水性蛋白只占20.00%。在亲水性蛋白中,约55.74%蛋白GRAVY值在-0.6-0之间。有9个蛋白GRAVY值小于-0.8。应用TMHMM v2.0软件对所鉴定的膜蛋白

的跨膜区域进行预测,从图6可以看出共10个蛋白有跨膜区。

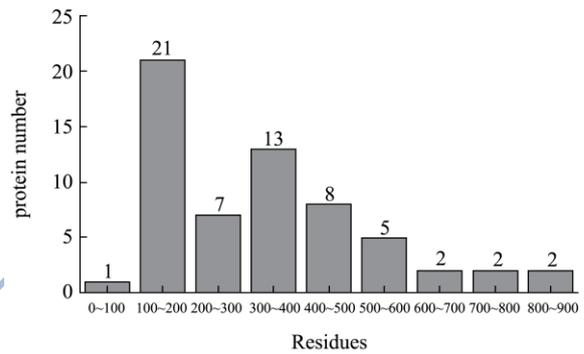


图4.蛋白质残基分布

Fig.4 Residue distribution of proteins

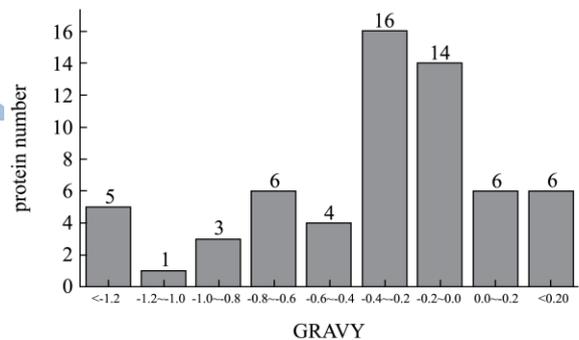


图5蛋白质 GRAVY 分布

Fig.5 GRAVY distribution of proteins

## 2.2 核桃蛋白质的功能分类

我们采用blast(version2.2.23+)将61个蛋白的序列与UniProt (SWISS-Prot 和 TrEMBL)(Release 2014\_02)中已知GO功能的蛋白进行比较,找到30%序列相似度以上且有Gene Ontology功能的蛋白,并通过这个比对上的Hit功能去推测鉴定到蛋白的功能。基于注释结果,我们采用系统的内部Perl程序(a series of in-house Perl scripts)对应到GO号,基于GO数据库(2014\_09)对Biological Process, Molecular Function 和 cellular component 三个大类进行统计。

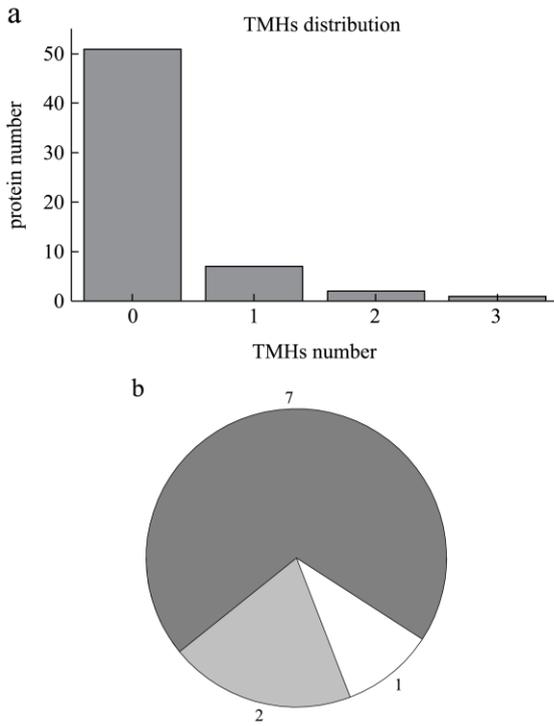


图 6 蛋白质 TMHs 分布

Fig.6 TMHs distribution of proteins

在三个大类中蛋白对应 GO 号的情况如下:

表 2. 蛋白质特有的 GO 号

Table 2 Unique GO number of proteins

	Protein Number	Unique GO Number
Biological Process	48	70
Molecular Function	52	64
Cellular component	25	27

注: 这里的 Unique GO Number 是直接对应的 GO 号, 在统计分析中根据 GO 的层次进行递归统计。

### 2.2.1 核桃蛋白质的生物途径

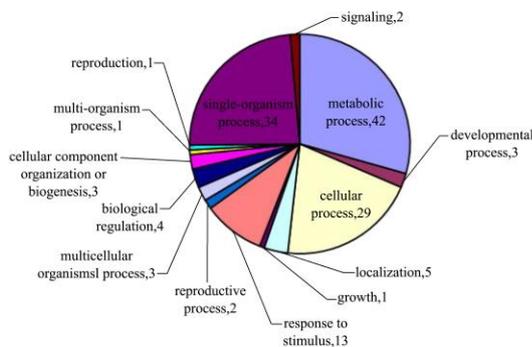


图 7 核桃蛋白质二级生物途径的分类

Fig.7 Classification of walnut proteins based on level 2

#### biological process

图 7 所示, 本研究鉴定出的 61 个蛋白质按照生物途径主要分为 13 类, 分布最多的是与代谢过程相关的 42 个蛋白, 参与单组织途径的蛋白 34 个, 细胞途

径蛋白 29 个, 参与刺激应答途径蛋白 13 个, 定位蛋白 5 个, 生物调节途径蛋白 4 个, 发育途径蛋白 3 个, 多细胞组织途径蛋白 3 个, 细胞成分组织或生物合成 3 个, 生殖过程 2 个, 信号 2 个等。在功能已知的蛋白中, 参与代谢过程 (metabolic process) 的蛋白所占比例最大, 主要涉及到小分子的代谢过程, 这类蛋白主要包括: 参与氨基酸、协同因子、载体、脂肪酸、核苷酸的生物合成与降解的蛋白, 参与能量代谢的蛋白、参与蔗糖代谢的蛋白, 以及参与二羧酸代谢的蛋白等。

### 2.2.2 核桃蛋白质的细胞组件

细胞中的位置指基因产物位于何种细胞器或基因产物组中 (如糙面内质网、核糖体及蛋白酶体等)。图 8 所示, 61 个核桃蛋白质的细胞组件主要分为 6 类, 分别是细胞来源 24 个 (GO:0005623), 意义是所有生物体的基本结构和功能单位。包括质膜和外部封闭结构, 如细胞壁和细胞被膜。细胞器来源 16 个 (GO:0043226), 其意义在于不同形态和功能的组织结构, 包括细胞核、线粒体、叶绿体、液泡、囊泡、核糖体以及细胞骨架, 细胞质膜除外。膜蛋白 6 个 (GO:0016020), 意义是真核生物以及一些细胞器中围绕所有细胞的脂质双分子层; 可能是单层也可能是双层脂质, 包括与之相关的蛋白质。蛋白质复合体 5 个 (GO:0032991), 其意义是两个或两个以上大分子物质组成, 如与组成部分功能相关的蛋白质, 核酸, 碳水化合物或者脂质等。由结果可见, 核桃中鉴定出的蛋白质主要分布于细胞壁以及细胞器中。

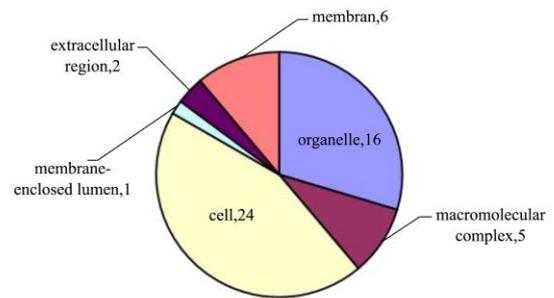


图 8 核桃蛋白二级细胞组件的分类

Fig.8 Classification of walnut proteins based on level 2

#### cellular component

### 2.2.3 核桃蛋白质的分子功能分类

为明确 61 个核桃蛋白质的分子功能, 我们对其进行分类, 图 9 显示可分为 6 类, 分别是具有催化活性的蛋白 34 个 (占 55.74%, GO:0003824)。催化活性是指在生理的温度生物化学反应的催化作用。生物学上的催化反应的反应物是底物, 催化剂产生于酶这种大分子物质。酶拥有与底物特异性结合的位点, 大多数由蛋白质组成, 但是具有催化活性的 RNA 也被

称为酶。核桃蛋白质中活性所占比例最大的是氧化还原活性, 激酶活性、肽酶活性、异构酶活性。其次是具有结合能力的蛋白 26 个(占 42.62%、GO:0005488), 营养储存活性蛋白 7 个, 抗氧化活性蛋白 4 个, 转运活性蛋白 2 个, 结构分子活性蛋白 1 个。可见核桃中已知最多的蛋白质为具有催化功能的蛋白质。该种活性为进一步核桃蛋白酶解工艺研究提供理论基础

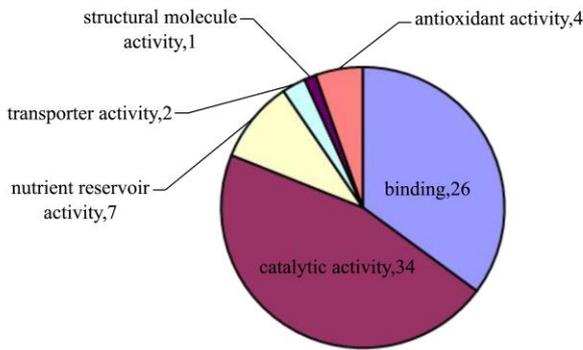


图9 核桃蛋白质二级分子功能的分类

Fig.9 Classification of walnut proteins based on level 2 molecular function

### 2.3 KEGG 通路分析

采用 blast(version2.2.23+) 比对 KEGG 蛋白质库, 根据 30% 相似度进行筛选, 有 39 个蛋白被注释。KEGG 通路可以为核桃蛋白的功能性研究提供理论基础, 例如利用 DAVID 在线分析工具对信号传导路径进行分析, 发现富集在以下路径上: Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway), HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway) cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway) 等; 代谢路径主要富集在次生生物的生物合成与代谢途径 (Biosynthesis of secondary metabolites), 碳代谢 (Carbon metabolism), 以及氨基酸的生物合成 (Biosynthesis of amino acids) 等。PI-3K-AKT 是一信号转导通路。磷脂酰肌醇-3 激酶能使磷脂酰肌醇分子中的 3 位羟基磷酸化。该酶能被多种信号激活 (包括 G 和小 G 蛋白的配体)。PI-3K-PKB 通路不仅在胰岛素调节糖代谢中发挥重要作用, 还能促进细胞存活和抗凋亡, 及调节细胞的变形和运动。TRP 通道引领我们的感觉系统来应对温度, 触觉, 痛觉, 渗透压, 信息素, 味觉以及其他刺激。但是它的作用相较于典型的感官传导更为广泛。它是细胞的传统的感觉系统, 不仅仅在多细胞组织中, 同时也能够对细胞内外的所有刺激做出反应。因此针对 KEGG 通路中某些编码特殊蛋白的基因多态性研究将有助于对核桃蛋白的功能及药理研究, 为核桃蛋白的食用及医用研究提供理论支持。

### 3 结论

本次试验所用材料为低温压榨去油后的核桃粕, 经碱溶酸沉法获得的分离蛋白, 在这一系列处理中可能存在蛋白损失, 因此, 检测的蛋白数量较少。但是为达到核桃副产物的进一步加工利用增加其附加值, 故本次试验对核桃分离蛋白进行蛋白质组学鉴定, 明确其蛋白表达谱。本次试验一共鉴定出 61 个蛋白质, 并经 LC-MS 以及生物信息学进行分析构建蛋白表达谱, 这些蛋白质大多数对人体健康有重要作用, 例如具有催化活性 (占 55.74%, GO:0003824)、结合活性 (占 42.62%、GO:0005488) 以及抗氧化活性的蛋白等。同时采用 blast(version2.2.23+) 比对 KEGG 蛋白质库, 根据 30% 相似度进行筛选, 有 39 个蛋白被注释。KEGG 通路可以为核桃蛋白的功能性研究提供明确的方向。蛋白质谱通过分析其对机体的作用机制的分析为进一步进行抗氧化研究, 抑制氧化应激研究以及小鼠抗疲劳研究等奠定了坚实的理论基础。

### 参考文献

- [1] Martínez M L, Mattea M A, Maestri D M. Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 88(3): 399-404
- [2] Rabrenovic B, Picuric-Jovanovic K, Sobajic S. Physicochemical properties and fatty acid composition of Juglans regia cultivars grown in Serbia [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2008, 44(2): 151-154
- [3] Bouabdallah I, Bouali I, Martinez-Force E, et al. Composition of fatty acids, triacylglycerols and polar compounds of different walnut varieties (Juglans regia L.) from Tunisia [J]. Natural product research, 2014, 28(21): 1826-1833
- [4] Martínez M L, Labuckas D O, Lamarque A L, et al. Walnut (Juglans regia L.): genetic resources, chemistry, by-products [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(12): 1959-1967
- [5] Banel D K, Hu F B. Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis and systematic review [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2009, 90(1): 56-63
- [6] Kendall C W C, Esfahani A, Josse A R, et al. The glycemic effect of nut-enriched meals in healthy and diabetic subjects [J]. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2011, 21: S34-S39
- [7] 刘晓红, 吴胜利, 万剑真, 等. 全果核桃蛋白饮料稳定性研究

- [J].食品工业,2011,9:52-54
- LIU Xiao-hong, WU Sheng-li, WAN Jian-zhen, et al. Study on Stability of Whole Walnut Milk Beverage [J]. The Food Industry, 2011, 9: 52-54
- [8] Wang C, Song W, Jiang L, et al. Purification and identification of an ACE-inhibitory peptide from walnut protein hydrolysate [J]. European Food Research and Technology, 2014, 239(2): 333-338
- [9] 贾靖霖,蒲云峰,李虎,等.核桃多肽抗疲劳作用的研究[J].食品工业科技,2014, 35(7): 340-342
- JIAjing Lin, Yunfeng Pu, Hu Li, et al. The research of walnut anti-fatigue peptide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(7): 340-342
- [10] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it [J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1996, 13(1): 19-50
- [11] Pedreschi R, Nørgaard J, Maquet A. Current challenges in detecting food allergens by shotgun and targeted proteomic approaches: a case study on traces of peanut allergens in baked cookies [J]. Nutrients, 2012, 4(2): 132-150
- [12] 赵洪岩,张志民,周延民,等.利用 shotgun 蛋白组学策略构建变形链球菌蛋白质表达谱[J].口腔医学研究,2010,26(6): 822-824
- ZHAO Hong-yan, ZHANG Zhi-min, ZHOU Yan-min, et al. Establishment of protein expression profile of streptococcus mutans by shotgun proteomics strategy [J]. Journal of Oral Science Research, 2010, 26(6): 822-824