

人乳与牛乳乳脂肪球膜蛋白质组的对比研究

杨梅¹, 彭秀明¹, 武俊瑞¹, 孙悦¹, 乌日娜¹, 刘彪², 岳喜庆¹

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳, 110866)(2. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 内蒙古呼和浩特, 010050)

摘要: 人乳是婴幼儿生命初始阶段唯一能够摄入的食物, 蛋白质是人乳中重要的营养成分, 而牛乳作为代替人乳的常用原料已经被广泛的应用于婴幼儿食品中。本研究利用 SDS-PAGE 电泳和 LC-MALDI-TOF 蛋白组学方法将人乳与牛乳中乳脂肪球膜蛋白进行分离, 能够发现人乳与牛乳脂肪球膜蛋白存在较大的差异。牛乳脂肪球膜中已鉴定出 488 种蛋白, 人乳脂肪球膜中鉴定出的蛋白为 1545 种。牛乳脂肪球膜具有 173 种特异性蛋白, 人乳脂肪球膜具有 1230 种特异性蛋白, 在人乳与牛乳中存在 315 种同源蛋白。从蛋白质的 GO (Gene Ontology) 功能注释上来看, 人乳脂肪球膜蛋白参与的生物过程有 37% 为代谢过程; 具有的分子功能 55% 为结合作用; 34% 为参与细胞器构成。人乳脂肪球膜中有 24 种蛋白参与免疫相关的通路, 主要为抗原加工和呈递。与牛乳相比, 对人乳中乳脂肪球膜蛋白质在组成及功能上的研究, 能够促进深入地了解人乳蛋白, 并为以牛乳为原料的婴幼儿产品添加功能性蛋白提供参考。

关键词: 人乳; 牛乳; 乳脂肪球膜; 蛋白质鉴定; 功能分类分析

文章编号: 1673-9078(2016)8-284-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.043

Comparative Study on Milk Fat Globule Membrane Proteomes in Human and Bovine Milk

YANG Mei¹, PENG Xiu-ming¹, WU Jun-rui¹, SUN Yue¹, WU Ri-na¹, LIU Biao², YUE Xi-qing¹

(1. College of Food Sciences, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

(2. Inner Mongolia Yili Industrial Group co. Ltd, Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Human milk is the sole food source in the initial stage of an infant's life. Protein is an important nutrient in human milk, and cow's milk has been widely used in infant formula as a raw material to replace human milk. In this study, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (LC-MALDI-TOF) proteomic methods were used to isolate and identify the milk fat globule membrane proteins (MFGPs) from human and bovine milk, and significant differences between the MFGPs in the two types of milk were found. The results showed that 488 and 1545 different protein species were identified in milk fat globule membranes of bovine and human milk, respectively. Among these proteins, there were 173 unique proteins in bovine milk fat globule membranes, 1230 unique proteins in human milk fat globule membranes, and 315 proteins found in both human and bovine milk. According to gene ontology (GO) annotations, 37% of biological processes involving human MFGPs were metabolic processes, 55% of molecular functions were for combination, and 34% of human MFGPs participated in constituting cell organelles. Twenty-four human MFGPs were involved in the immune related pathways, mainly for antigen processing and presentation. By comparing with bovine milk, studying the composition and functions of human MFGPs can improve our understanding of the proteins present in human milk, and provide a reference for adding functional proteins to infant formula products.

Key words: human milk; bovine milk; milk fat globule membrane; protein identification; functional category analysis

人乳是婴幼儿生命初始阶段能够摄入的食物, 人乳中含有机体生长发育所需的全部营养成分, 因此人乳在婴幼儿生长发育过程中起着至关重要的作用。而蛋白质是人乳中重要的营养成分, 其组成、含量、功能又是决定乳质量的重要指标^[1]。人乳蛋白中的酪蛋

收稿日期: 2015-10-13

基金项目: "十二五"农村领域国家科技计划课题(2013BAD18B03-02)

作者简介: 杨梅(1989-), 女, 博士, 研究方向: 动物性食品科学利用技术

通讯作者: 岳喜庆(1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工

白、乳铁蛋白、免疫球蛋白、酶等在机体内作为生物活性物质能够增强婴幼儿的免疫力、促进组织和器官发育^[2-3]。牛乳作为人们日常生活中较为理想的营养补充品, 能够为人体提供重要的蛋白质, 是目前最接近完美的食品^[4-5]。牛乳主要是由水、蛋白质、脂肪、乳糖、矿物质等组成, 而乳蛋白是牛乳中最为重要的营养成分^[6]。

乳脂肪球(Milk fat globule, MFG)主要是以一种直径大约为 0.2~15 μm 膜包围的球状物存在于乳

中, 这层薄膜被称为乳脂肪球膜 (Milk fat globule membranes, MFGM)^[7]。MFGM 蛋白(Milk fat globule membrane proteins, MFGPs)是膜结合的蛋白, 这些蛋白质主要是吸附在 MFG 的表面。MFGPs 主要是由黄嘌呤氧化还原酶 (XOR)、嗜乳脂蛋白 (butyrophilin, Btn)、乳脂肪球表面生长因子 8 (MFG-E8) 这 3 种膜蛋白构成^[8]。由于 MFGPs 具有抗癌、防止幽门螺杆菌感染以及提高自身免疫的作用, 已经作为原料被应用于食品加工中^[9-11]。MFGM 蛋白作为乳蛋白中的一部分, 在机体能发挥着重要的生物学作用。

近年来, 国内外对 MFGPs 的研究刚刚起步, 而对人乳与牛乳中 MFGPs 在蛋白质组成及功能上的差异几乎没有报道。本研究利用 SDS-PAGE 电泳将人乳与牛乳中的 MFGPs 进行分离, 将酶解后的蛋白进行质谱鉴定, 将鉴定后的结果通过 GO 功能注释以及 KEGG 代谢通路进行分析, 为日后生产婴幼儿乳粉及功能性食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料

采集 30 份健康奶牛的牛乳低温运回实验室, 并在实验前进行混合, 由沈阳辉山乳业奶牛场提供。

采集 30 份泌乳期为 1~3 个月健康母亲的人乳低温运回实验室, 并在实验前进行混合, 沈阳市妇婴医院。

牛血清蛋白, 北京索莱宝科技有限公司; 测序级胰蛋白酶, 上海雅心生物有限公司; 丙酮、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、冰醋酸、考马斯亮蓝 G-250、DTT、碳酸氢铵、甲酸、乙腈, 北京鼎国生物试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机, 上海翼控机电有限公司; 超声波清洗器, 北京佳源兴业科技有限公司; 真空冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司; 小型垂直电泳槽: 美国 Bio-Rad 公司; 毛细管高效液相色谱, 美国 Agilent; LTQ VELOS 质谱仪-赛默飞世尔科技。

1.3 实验方法

1.3.1 人乳与牛乳中不同部分蛋白质提取

分别取人乳与牛乳各 50 mL 样品分离乳脂肪球膜蛋白 (MFGPs)^[12], 在 4 °C, 10000 r/min 离心 15 min, 分离获得乳脂肪部分。将上层的乳脂肪用 PBS 清洗三次, 每次清洗时 80 W 超声 15 min。将清洗后的乳脂部分在 4 °C, 12000 r/min 离心 30 min, 收集上层样品, 即为乳脂肪球膜(MFGM)样品, 然后加入适

量预冷的丙酮沉淀, 收集沉淀为 MFGPs 样品, 冻干待用。

1.3.2 人乳与牛乳中不同部分蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分析^[13,14]

将提取的 MFGPs 分别加入裂解液并置于冰盒上裂解, 裂解后的蛋白利用 Bradford 法进行定量, 牛血清蛋白为标准蛋白。分别取 10 μL 上样, 采用 5%的浓缩胶、12%的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。

1.3.3 蛋白样品酶解

每组样品中的粗蛋白取 200 μg 进行酶解^[15,16], 使用 HU buffer 调整样品体积为 40 μL。加入 DTT 至终浓度为 10 mM, 37 °C 孵育 1.5 h 后加入 IAA 至终浓度 50 mM, 600 r/min 振荡 1 min, 避光室温 30 min。每个样本加入 100 μL 25 mM 碳酸氢铵溶液, 混匀后加入 2 μg 的 Lysyl C, 室温反应 3 h。再向反应体系中加入 250 μL 25 mM 碳酸氢铵溶液, 加入 10 μL Trypsin (20 μg Trypsin in 50 μL Dissolution buffer), 600 r/min 振荡 1 min, 37 °C 16 h, 使用 C18 柱进行脱盐, 脱盐样本取 1 μL 进行 MALDI TOF 质谱分析。样本脱盐冻干之后使用 0.1%的 FA 复溶, OD₂₈₀ 肽段定量, 取 3 μg 样本进行后续 ESI 质谱鉴定实验。

1.3.4 毛细管高效液相色谱^[17]

液相 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 0.15×150 mm (RP-C18) (Column Technology Inc.) 以 95%的 A 液平衡。样品由自动进样器上样到 Zorbax 300SB-C18 peptide traps (Agilent Technologies, Wilmington, DE), 再经色谱柱分离, 相关液相梯度如下: 0~50min, B 液线性梯度从 4%到 50%; 50~54 min, B 液线性梯度从 50%到 100%; 54~60 min, B 液维持在 100%。

1.3.5 ESI 质谱鉴定及数据分析^[18]

酶解产物经毛细管高效液相色谱脱盐及分离后用 LTQ VELOS 质谱仪 (Thermo Finnigan, San Jose, CA) 进行质谱分析。进样方式: Microspray, 毛细管温度: 200 °C, 检测方式: 正离子。多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照下列方法采集: 每次全扫描 (full scan) 后采集 20 个碎片图谱 (MS2 scan)。

利用 Proteome Discoverer 1.4 和 Sequest 软件搜索相应的数据库, 最后得到鉴定的蛋白质结果。搜索使用的数据库为 uniprot, 结果过滤参数为: charge=1, XCorr≥1.5; charge=2, XCorr≥2.0; charge=3, XCorr≥2.25, Delta cn<0.1。

1.3.6 GO 功能注释及 KEGG 代谢通路分析

MFGPs 的注释按 Gene Ontology (GO)数据库方法进行^[19,20], 其中包括生物过程(Biological Process)、分

子功能 ((Molecular Function) 和细胞组成 (Cellular Component) 三方面的功能信息。利用 DAVID Bioinformatics Resources 在线工具进行数据库查询及检索, 得到 GO 功能信息及 KEGG 代谢通路结果。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 电泳结果分析

将人乳与牛乳混合样品中提取的 MFGM 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果如图 1 所示。

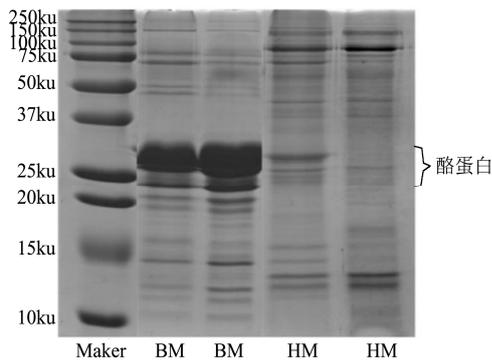


图 1 人乳与牛乳中 MFGM 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 SDS-PAGE patterns of MFGM proteins in the bovine and human milk

注: BM: 牛乳脂肪球膜蛋白质; HM: 人乳脂肪球膜蛋白质。

由人乳与牛乳中 MFGPs 的电泳图可以看到, 人乳与牛乳中 MFGPs 在组成及含量上存在较大的差异。其中牛乳 MFGPs 中酪蛋白含量明显高于人乳, 而牛乳 MFGM 蛋白中酪蛋白含量较高, 可能会掩盖了一些低丰度蛋白的表达。

2.2 人乳与牛乳中蛋白质酶解后的鉴定结果分析

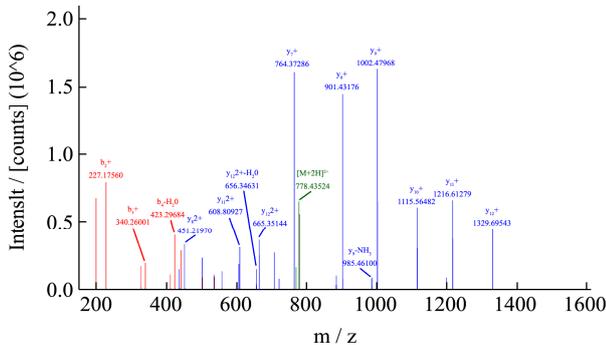


图 2 Q4TZH2-LILTLHTGAVCTR 的二级质谱图

Fig.2 Two-stage mass spectrogram of the Q4TZH2-LILTLHTGAVCTR

图 2 所示是 Uniprot 登录号为 Q4TZH2 (脂肪酸结合蛋白) 的二级质谱图。将人乳与牛乳中蛋白酶解后的肽段进行液质联用分析, 然后进入数据库进行比对, 鉴定结果如图 3 所示。研究表明, 具有 Unique Peptides 完整肽段的蛋白质鉴定结果具有极高的可信度。

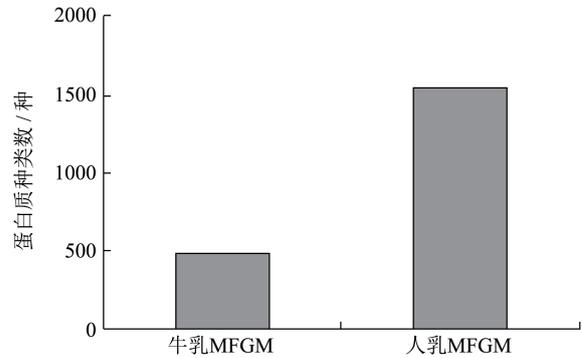


图 3 人乳与牛乳中 MFGM 蛋白组成

Fig.3 Composition of MFGM proteins in bovine and human milk

经过鉴定, 人乳 MFGM 中 Unique Peptides ≥ 1 的鉴定出 1545 种蛋白, 牛乳 MFGM 中鉴定出 488 种蛋白, 人乳 MFGM 蛋白的种类高于牛乳 MFGM 蛋白, 大约是牛乳 MFGM 蛋白种类数的 3.17 倍。这可能是由于牛乳中酪蛋白含量过高, 导致影响一些低丰度蛋白的表达的原因。牛乳并不能完全代替人乳, 可能是人乳中含有一些特异性表达蛋白, 而这些蛋白在人体内发挥着至关重要的作用。

2.3 人乳与牛乳中 MFGM 蛋白质的组成分析

如图 4 所示, 人乳中有 1230 种特异性蛋白, 牛乳中有 173 种特异性蛋白, 人乳与牛乳 MFGM 中共有 315 种相同蛋白。人乳中特异性蛋白种类远远高于牛乳。一方面说明人乳与牛乳 MFGM 在蛋白质组成上存在较大的差异。另一方面也说明人乳 MFGM 蛋白在机体内可能发挥着更重要的作用。

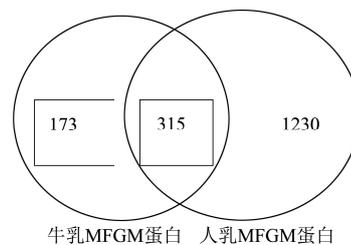


图 4 人乳与牛乳中 MFGM 蛋白的维恩图

Fig.4 Venn diagram of MFGM proteins found in bovine and human milk

2.4 GO 功能注释分析

2.4.1 牛乳中蛋白质不同组成部分参与的生物过程分析

以牛乳 MFGPs 作为参照, 将人乳中 MFGPs 特异性的 1230 种蛋白通过 ID 进行在线 DAVID 数据库检索。将匹配的蛋白进行 GO 功能注释分析, 并将注释结果进行分类。

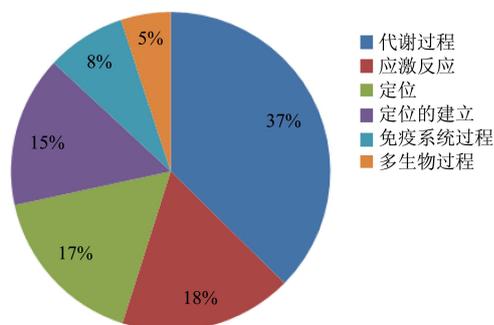


图5 以牛乳为参照, 人乳 MFGM 特异性蛋白参与的生物过程
Fig.5 Biological processes involving proteins specific to human MFGM

通过 GO 注释中的生物过程分析, 可得到如图 5 所示的结果。与牛乳 MFGM 蛋白相比, 人乳 MFGM 特异性表达蛋白在生物过程中主要参与的是代谢过程、应激反应、定位、定位的建立、免疫系统过程以及多生物过程, 分别占总生物过程的 37%、18%、17%、15%、8%、5%。其中人乳 MFGM 特异性蛋白参与最多的为代谢过程, 而代谢是生物体内维持生命的有序的化学反应。说明与牛乳 MFGM 相比, 人乳 MFGM 蛋白对与维持生命活动具有更为重要的作用。

2.4.2 人乳中特异性蛋白参与的分子功能分析

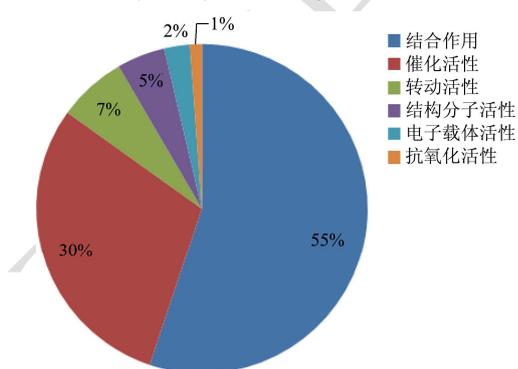


图6 以牛乳为参照, 人乳 MFGM 特异性蛋白具有的分子功能
Fig.6 Molecular functions of proteins specific to human MFGPs

通过 GO 注释中的分子功能分析, 可得到如图 6 所示的结果。与牛乳 MFGM 相比人乳 MFGM 特异性表达蛋白具有的分子功能为结合作用、催化活性、转动活性、结构分子活性。电子载体活性、抗氧化活性, 分别占总的分子功能的 55%、30%、7%、5%、2%、

1%。其中, 人乳 MFGM 特异性表达蛋白主要具有结合作用, 蛋白质的结合作用可以将单纯蛋白质与其他物质相结合形成结合蛋白, 在生命过程中发挥重要作用。

2.4.3 人乳中特异性蛋白参与的细胞组成分析

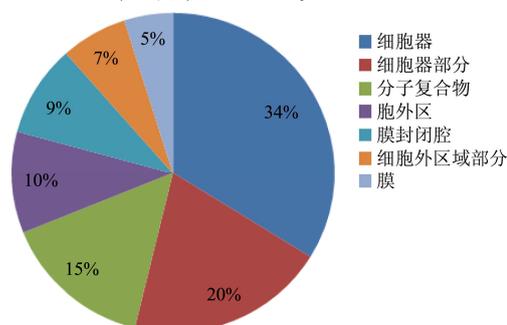


图7 以牛乳为参照, 人乳 MFGM 特异性表达蛋白参与的细胞组成

Fig.7 Cellular components of proteins specific to human MFGPs

通过 GO 注释中的细胞组成分析, 可得到如图 7 所示的结果。与牛乳 MFGM 相比人乳 MFGM 特异性表达蛋白参与形成的细胞组成有细胞器、细胞器部分、分子复合物、胞外区、膜封闭腔、细胞外区域部分、膜, 分别占细胞组成的 34%、20%、15%、10%、9%、7%、5%。

2.5 参与免疫相关的蛋白及 KEGG 通路分析

由于新生儿的免疫系统尚未成熟, 不具备完善的免疫能力, 而通过摄入母乳来获得一些与免疫相关的蛋白来提高自身的免疫力^[21], 因此人乳中与免疫相关的蛋白质对婴幼儿来讲尤为重要。通过在线 KEGG 通路检索, 如表 1 所示人乳 MFGM 特异性表达蛋白中有 24 种蛋白参与免疫相关的途径-抗原加工和呈递。抗原加工和呈递是指抗原呈递细胞摄取抗原并加工成肽分子, 而 MHC-肽复合物在 T 细胞表面识别表达的过程。而这些蛋白主要是 MHC I 类抗原和 MHC II 类抗原。

如图 8 所示, 人乳 MFGM 特异性蛋白主要参与的是 MHC I 类和 MHC II 类途径, 这两条途径又是抗原加工和呈递的经典途径。抗原加工和呈递能够实现免疫系统对非己抗原的免疫监视, 从而达到免疫调节的作用^[22]。在这两个途径中起到识别、加工、合成、递呈等作用, 是抗原加工和呈递过程中不可缺少部分。因此人乳 MFGM 特异性蛋白在婴幼儿的免疫调节中起着非常重要的作用, 是牛乳蛋白不可替代的部分。

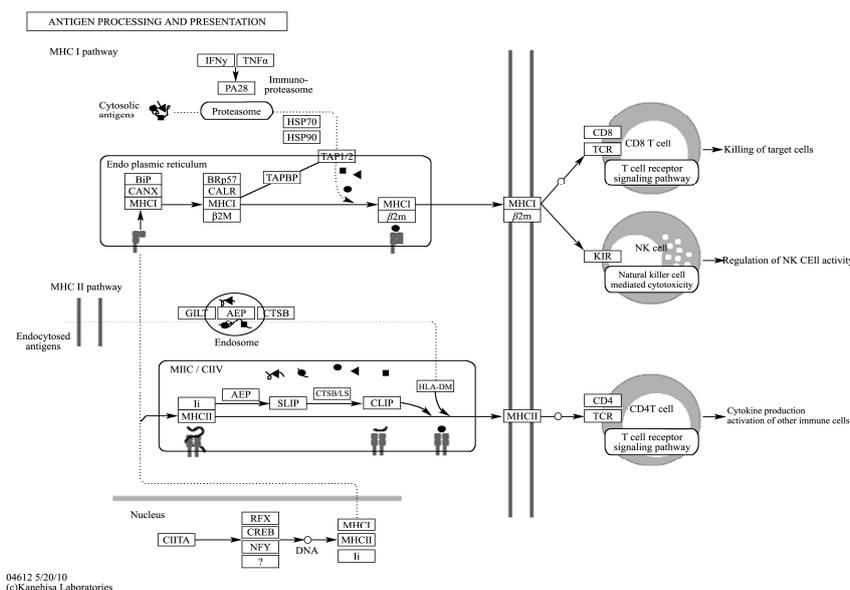


图 8 人乳特异性 MFGPs 在抗原加工和呈递 (Antigen processing and presentation) KEGG 通路中得分分布

Fig.8 Human-specific MFGPs involved in antigen processing and presentation

表 1 参与抗原加工和呈递 (Antigen processing and presentation) KEGG 通路的蛋白

Table 1 Specific proteins involved in the antigen processing and presentation KEGG pathway in human MFGPs compared with bovine MFGPs

Uniprot 登录号	蛋白名称	蛋白质评分	分子量 /ku	等电点 /PI
P04233	HLA 类 II 组织相容性抗原 γ 链	115.52	33.5	8.44
Q6P1N7	TAPBP 蛋白	52.71	16.4	8.84
P61769	β -2 微球蛋白	136.26	13.7	6.52
P27824	钙联接蛋白	450.41	67.5	4.60
P25774	组织蛋白酶 S	52.11	37.5	8.34
Q860B3	MHC I 类抗原	80.29	21.2	6.60
Q4W6C4	MHC I 类抗原	49.10	31.6	6.30
Q29700	HLA-B 蛋白	49.10	40.4	6.30
Q5NTB0	MHC I 类抗原	49.10	31.6	5.82
Q4F7G6	MHC I 类抗原	49.10	31.7	6.09
Q8MGZ8	MHC I 类抗原	49.10	31.6	5.94
Q1XG70	MHC I 类抗原	49.10	31.6	5.97
P01903	HLA 类 II 组织相容性抗原	152.62	28.6	5.00
Q3LAA4	MHC II 类抗原	50.11	21.2	5.39
Q9TQD9	MHC II 类抗原	92.50	27.2	6.95
Q3LAB5	MHC II 类抗原	84.59	21.3	5.78
Q5Y7G6	MHC II 类抗原	55.16	30.2	7.18
Q9BCQ0	MHC II 类抗原	67.67	10.2	6.15
Q3LAA8	MHC II 类抗原	90.91	21.2	5.94

Q3LAA7	MHC II 类抗原	50.11	21.3	6.33
Q3LAB6	MHC II 类抗原	132.60	25.6	6.55
Q000J6	MHC II 类抗原	92.69	10.8	8.03
Q06323	蛋白酶激活剂复合物亚基 1	85.84	28.7	6.02
Q9H4M2	TAP2 蛋白	63.44	12.5	5.91

3 结论

3.1 利用 SDS-PAGE 电泳将人乳与牛乳中 MFGM 蛋白进行分离, 发现人乳与牛乳 MFGM 蛋白存在较大的差异。在牛乳 MFGM 中鉴定出 488 种蛋白, 人乳 MFGM 中鉴定出 1545 种蛋白。以牛乳 MFGM 蛋白作为参照, 将人乳 MFGM 特异性蛋白进行数据库检索。从 GO 功能注释上发现, 人乳 MFGM 特异性蛋白在生物过程中主要参与代谢过程; 在分子功能上主要具有结合作用; 在细胞组成上主要参与细胞器的组成。在这些蛋白中有 24 种蛋白与免疫相关, 主要参与免疫通路为抗原加工和呈递。牛乳 MFGM 与人乳 MFGM 在蛋白质组成上存在较大的差异, 这也说明牛乳虽然与人乳较为相似却并不能完全代替人乳。通过人乳 MFGM 特异性蛋白的 GO 功能注释分析可知, 人乳 MFGM 特异性蛋白在生物过程、分子功能、细胞组成上具有特殊的功能, 并且在免疫过程中同样存在特定的作用。

3.2 目前, 婴幼儿乳品的种类繁多, 但是真正能够称得上完全接近人乳的产品少之又少。因此, 对人乳 MFGM 在蛋白质组成及功能上以及与牛乳 MFGM 蛋白对比寻找差异蛋白进行深入研究, 不但能够增加牛

乳的利用率及利用价值,还能够为以牛乳为原料的婴幼儿产品添加功能性蛋白提供理论依据。

参考文献

- [1] 吴伟宗,王晓秋,王军军.母乳蛋白质组成研究进展[J].动物营养学报,2009,21(6):809-815
WU Wei-zong, WANG Xiao-qiu, WANG Jun-jun. Milk proteins is reviewed [J]. Journal of Animal Nutrition, 2009, 21(6): 809-815
- [2] 王静,王航雁,张成岗.母乳中生物活性物质研究进展[J].中国乳品工业,2005,33(9):47-50
WANG Jing, WANG Hang-yan, ZHANG Cheng-gang. Research progress in breast milk bioactive substances [J]. China's Dairy Industry, 2005, 33(9): 47-50
- [3] Hamosh M. Bioactive factors in human milk [J]. *Pediatr. Clin. North Am.*, 2001, 48(1): 69-86
- [4] 陈腾山,徐世常.乳品市场新宠一羊奶[J].牧业观察, 2008, 1:102
CHEN Tengshan, XU Shichang. The goat dairy market darling [J]. *Animal Husbandry Observation*, 2008, 1: 102
- [5] 唐萍,田晶,余振宝.奶制品中蛋白质测定的毛细管电泳法研究[J].分析科学学报,2006,22(1): 5-8
TANG Ping, TIAN Jing, SHE Zhen-bao. Study dairy protein assay by capillary electrophoresis [J] *Analytical Science*, 2006, 22 (1): 5-8
- [6] 宋宏新,毛跟年,薛海燕,等.现代食品营养与安全[M].北京:化学工业出版社,2007
SONG Hong-xin, MAO Gen-nian, XUE Hai-yan, et al. *Modern food nutrition and safety* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007
- [7] D'Alessandro A, Scaloni A, Zolla L. Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview [J]. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(7): 3339-3373
- [8] 都军霞,韩立强,乔新安等.乳脂肪球膜主要膜蛋白功能的研究进展[J].中国畜牧兽医,2007,34(10):63-65
DU Jun-xia, HAN Li-qiang, QIAO Xin-an, et al. Advances in milk fat globule membrane main membrane protein function [J] *China Animal Husbandry and Veterinary*, 2007, 34(10): 63-65
- [9] Spitsberg V L, Gorewit R C. Isolation, purification and characterization of fatty-acid-binding protein from milk fat globule membrane: effect of bovine growth hormone treatment [J]. *Pak. J. Nutr.*, 2002, 1: 43-48
- [10] Ito O, Kamata S, Hayashi M, et al. Inhibitory effect of cream and milk fat globule membrane on hypercholesterolemia in the rat [J]. *Anim. Sci. Technol.*, Japan, 1992, 63:1022-1027
- [11] Wang X, Hirno S, Millenr, et al. Inhibition of helicobacter pylori infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model [J]. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, 2001, 20:275-281
- [12] Reinhardt T A, Lippolis J D. Bovine milk fat globule membrane proteome [J]. *J. Dairy Res.*, 2006, 73(4): 406-416
- [13] Bradford M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7(1):52-54.9
- [14] Singh, H. The milk fat globule membrane e a biophysical system for food applications [J]. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2006, 11(2-3): 154-163
- [15] Thien L, Griet D, William G, et al. Distribution and isolation of milk fat globule membrane proteins during dairy processing as revealed by proteomic analysis [J]. *International Dairy Journal*, 2013, 32: 110-120
- [16] Vanderghem C, Blecker C, Danthine S, et al. Proteome analysis of the bovine milk fat globule: enhancement of membrane purification [J]. *International Dairy Journal*, 2008, 18: 885-893
- [17] Affolter M, Grass L, Vanrobaeys F, M.et al. Qualitative and quantitative proling of the bovine milk fat globule membrane proteome [J]. *Journal of Proteomics*, 2010, 73: 1079-1088.
- [18] Vanderghem C, Bodson P, Danthine S, et al. Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization [J]. *Biotechnologie, Agronomic, Société et Environnement*, 2010, 14: 485-500
- [19] Le T, Van C, Pascual P, et al. Physical properties and microstructure of yoghurt enriched with milk fat globule membrane material [J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21: 798-805
- [20] Yalin Liao, Rudy Alvarado, Brett Phinney, et al. Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period [J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10: 3530-3541
- [21] 崔县伟,万俊,付子毅,等.母乳中蛋白成分的营养与生理意义[J].国际儿科学杂志,2013,40(3):268-271
CUI Xian-wei, WAN Jun, FU Zi-yi, et al. Nutrition and physiological significance of human milk protein ingredient [J] *International Journal of Pediatrics*, 2013, 40(3): 268-271
- [22] 张笑人,魏海明.抗原加工和提呈的研究进展[J].国外医学免疫学分册,1997,20(1):1-5
ZHANG Xiao-ren, WEI Hai-ming. Advances in antigen processing and presentation of [J]. *International Journal of*

现代食品科技