

牛乳中不同部分蛋白质的组成及功能分析

杨梅¹, 武俊瑞¹, 彭秀明¹, 王骏逸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: 本研究通过 SDS-PAGE 电泳将牛乳中不同蛋白质组成部分进行分离鉴定发现, 乳脂肪球膜中存在 201 种蛋白, 乳清中存在 96 种蛋白, 酪蛋白中存在 21 种蛋白, 乳粒中存在 43 种蛋白, 其中有 27 种相同表达的蛋白。通过 GO 功能注释分析发现, 在生物过程中乳脂肪球膜蛋白发挥的作用大于乳清、乳粒蛋白, 尤其是生物的调控作用; 在分子功能上, 牛乳蛋白的主要分子功能是结合作用, 其中乳脂肪球膜蛋白的结合作用最强; 而乳粒蛋白参与的转运活性分子功能大于乳脂肪球膜、乳清蛋白。在细胞组成上, 与乳清、乳粒蛋白相比乳脂肪球膜蛋白参与的细胞组成均较多, 而在细胞膜的组成上乳粒蛋白参与较多。通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路分析可知, 乳脂肪球膜、乳清、乳粒中的蛋白均参与过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路。对牛乳蛋白质组成进行研究, 不仅能够增加牛乳的利用率, 并且为日后以乳脂肪球膜、乳粒蛋白作为原料生产乳制品提供理论依据。

关键词: 牛乳脂肪球膜; 蛋白; 鉴定; 功能分析; 京都基因与基因组百科全书代谢通路

文章编号: 1673-9078(2018)04-11-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.003

Analysis of the Composition and Function of Different Part Protein in Milk

YANG Mei¹, WU Jun-rui¹, PENG Xiu-ming¹, WANG Jun-yi¹, LIU Biao², YUE Xi-qing¹

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

(2. Inner Mongolia Yili Industrial Group Company Limited, Hohhot 010050, China)

Abstract: In this study, SDS-PAGE was used for separating of different component protein parts in milk, and mass spectrometry was used for identifying. It found that there were 201 kinds of protein in milk fat globule membrane, 96 kinds of protein in whey, and 43 kinds of protein in exosome and in these proteins, there were 27 kinds of the same expression protein. It found that the function of milk fat globule protein in the process of biological process was higher than whey protein and milk exosome protein, especially in biological regulation through the functional analysis of GO. In the molecular function, the main molecular function of different proteins in milk is the combination, and the function of milk fat globule proteins is the strongest. Exosome proteins involved in the molecule function of transport activity are greater than the milk fat globule membrane and whey proteins. Milk exosome involving in more cellular composition is the membrane, compared with whey and milk exosome, MFGM protein involved in cellular composition are more. KEGG pathway analysis shown that milk fat globule membrane, whey, milk exosome involved in metabolic pathways are not the same, metabolic pathways involved in the three parts was the peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathway. Studying on milk protein can not only increase the utilization rate of milk, and the milk fat globule membrane, milk protein particles could provide a theoretical basis for producing dairy products as a raw material in the future.

Key words: Bovine milk fat globule membrane; proteins; identification; functional analysis; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway

牛乳中含有丰富的营养物质, 这些营养物质能够很好的被人体消化和吸收。牛乳中所含有的功能性营养成分不仅可以促进婴幼儿的生长发育, 还能够提高

收稿日期: 2015-07-03

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, 研究方向为: 动物性食品科学利用技术

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

机体的免疫能力, 被广泛应用在乳制品及功能性产品中^[1-3]。乳蛋白是牛乳中的最重要的成分之一, 其含量约为 3.0%~3.7%, 是目前人类膳食蛋白质的重要来源^[4-5]。牛乳中的蛋白质含有人体生长发育所需要的全部必需氨基酸, 数量充足, 比例适当, 能够维持人体的健康^[6]。牛乳中的蛋白质具有较高的营养价值, 并且这些蛋白存在多种潜在的生物学功能。因此, 牛乳蛋白是评价牛乳质量的重要指标。牛乳蛋白可以分

为乳脂肪球膜 (Milk fat globule membranes, MFGM) 蛋白、乳清蛋白、酪蛋白、乳粒蛋白, 这些蛋白质在组成上各不相同^[7-9]。

乳脂肪球 (MFG) 是以一种微小的球状物存在于乳中, 其直径大约为 0.2~15.0 μm , 外面被一层很薄的膜包围, 这层膜被称之为乳脂肪球膜 (MFGM) ^[10]。MFGM 中含有 25%~60% 的蛋白质, 这些蛋白质占牛乳中总蛋白的 1%~2% 左右^[11-12]。牛乳中的 MFGM 蛋白具有抗癌^[13-15]、降低胆固醇^[16-17]、防止幽门螺杆菌感染^[18]、提高脑脊髓炎自身免疫^[19]等作用。

乳清蛋白约占牛乳蛋白质的 20% 左右, 而乳清中的蛋白质主要包括: β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、蛋白酶、免疫球蛋白等^[20]。由于乳清蛋白具有较高的吸收性、完整的氨基酸成分、低脂肪、低胆固醇, 还浓缩了牛乳中大多数的营养成分, 不仅能够促进身体健康, 还可以抗衰老、促进心脏健康、抗癌、提高免疫力、提高骨质和控制体重, 是目前最食用的蛋白质补充产品^[21-22]。而酪蛋白能够防止钙的流失和沉淀, 并且能够帮助人体更好吸收钙元素。

乳粒是来源于细胞分泌的直径为 40~100 nm 内吞作用的膜囊泡^[23]。乳粒中主要含有蛋白质、脂肪、mRNA、miRNA, 这些物质能够转移到细胞内并赋予细胞新的功能及信号转导^[24]。乳粒作为细胞外的细胞器, 在细胞内的信息传递、免疫功能以及作为疾病的生物标记物的来源上具有重要的作用^[25]。而乳粒蛋白作为乳粒的主要成分之一, 同样具有非常重要的作用。

近年来, 对牛乳的研究主要是集中在乳清蛋白, 而对 MFGM 蛋白以及乳粒蛋白的研究却很少, 对这些蛋白进行深入研究不但能够提高牛乳的利用率, 还能够了解牛乳中蛋白质的功能性质。因此, 本研究利用 SDS-PAGE 电泳将牛乳中的 MFGM 蛋白、乳清蛋白、乳粒蛋白进行分离, 并经过酶解后质谱鉴定, 将鉴定后的结果通过 GO 功能注释以及 KEGG 代谢通路分析, 深入了解牛乳中不同部分蛋白质的组成及功能差异。

1 材料与方法

1.1 原料

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

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、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、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 牛乳中不同部分蛋白质提取^[7, 26]

取 50 mL 乳样, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 r/min 离心 15 min, 分离获得乳脂肪部分 (MFGM) 和下层乳清、乳粒部分。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 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 30 min, 收集上层样品, 即为 MFGM 样品, 然后加入适量预冷的丙酮沉淀, 收集 MFGM 蛋白样品, 冻干待用。下层的样品即乳清、乳粒部分, 继续在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 45 min, 收集上清样品, 沉淀即为乳粒样品的粗提物。上清样品利用等电点法除去酪蛋白后, 即为乳清部分。加入适量预冷的丙酮沉淀, 收集乳清蛋白样品, 冻干待用。

将乳粒粗提物加入 10 mL PBS 重悬, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 离心 45 min 收集沉淀, 此过程重复三次, 清洗过后的沉淀即为乳粒。将乳粒加入适量预冷的丙酮沉淀, 收集乳粒蛋白样品, 冻干待用。

1.3.2 牛乳中不同部分蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分析

将提取的 MFGM、乳清、乳粒蛋白分别加入裂解液 (含 8 M 尿素, 2 M 硫脲, 4% CHAPS) 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^[27]。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^[28]。

1.3.3 蛋白样品酶解

每组样品取 200 μg 进行酶解, 使用 HU buffer 调整样品体积为 40 μL 。加入 DTT 至终浓度为 10 mM, 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 小时。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 $^{\circ}\text{C}$ 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

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 mm*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 min-50 min, B 液线性梯度从 4% 到 50%; 50 min-54 min, B 液线性梯度从 50% 到 100%; 54 min-60 min, B 液维持在 100%。

1.3.5 ESI 质谱鉴定及数据分析

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 度, 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

Gene Ontology (GO) 数据库包含了生物过程 (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

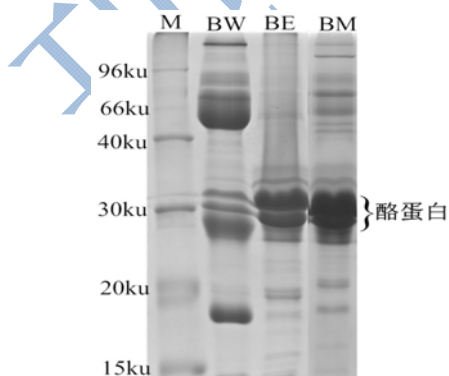


图 1 牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE chart of MFGM, whey, exosome protein in milk

注: M:marker; BM:MFGM蛋白质; BW:乳清蛋白; BE:乳粒蛋白

将提取的牛乳中 MFGM 蛋白、乳清蛋白、乳粒蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析^[9], 结果如图 1 所示。由牛乳中蛋白质不同组成部分的电泳图可以看到, 蛋白质在组成及含量上并不完全相同。而 MFGM、乳清、乳粒蛋白中酪蛋白含量较高, 掩盖了一些低丰度蛋白的表达, 可能是由于酪蛋白存在于 MFGM、乳粒中^[29]。在牛乳中 MFGM、乳清、乳粒含有一些相同表达蛋白, 如果将 MFGM、乳粒蛋白充分利用在乳制品加工中能够增加牛乳的利用率与利用价值。

2.2 牛乳中蛋白质不同组成部分酶解后的鉴定结果分析

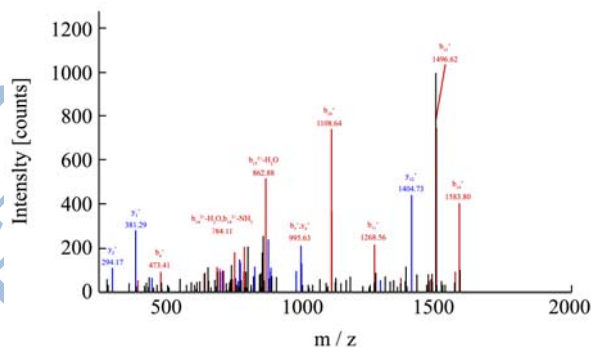


图 2 A1YQB2-DDQNP HSSNICNISCD 的二级质谱图

Fig.2 Two stage mass spectrometry of the A1YQB2-DDQNP HSSNICNISCD

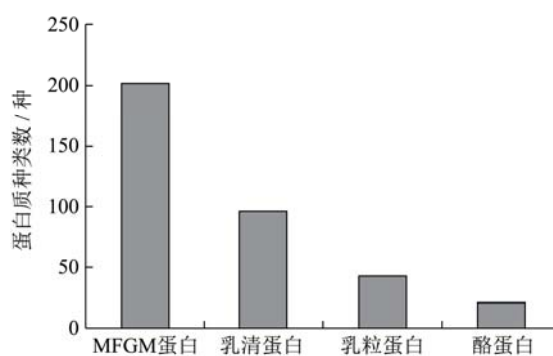


图 3 牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白组成

Fig.3 Compositions of MFGM, whey, exosome protein in milk

将牛乳中蛋白质不同组成部分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。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^[30]。图 2 所示是 Uniprot 登录号为 A1YQB2 (α -乳白蛋白) 的二级质谱图。本文中牛乳蛋白的 Unique Peptides≥1 的总共鉴定出 244 种蛋白, 其中牛乳的 Unique Peptides 最多可达到 43 种, 说明

本实验的鉴定结果具有较高的可信度。如图 3 所示，MFGM 鉴定出 201 种，乳清鉴定出 96 种，酪蛋白鉴定出 21 种，乳粒中鉴定出 43 种。结果表明，MFGM 蛋白质的种类明显高于乳清、乳粒蛋白。虽然乳清蛋白是目前应用最为广泛的乳制品原料，但是 MFGM、乳粒作为原料同样具有较高的利用价值。

2.3 牛乳中蛋白质不同组成部分组成对比分析

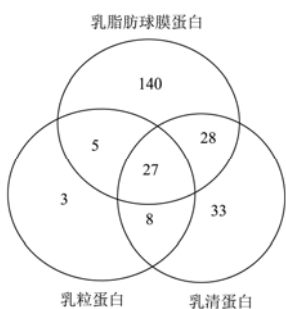


图 4 牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白的维恩图

Fig. 4 The Venn diagram of MFGM, whey, exosome protein in milk

如图 4 所示，有 27 种蛋白质在这三部分都有表达，MFGM 中有 140 种特异性表达蛋白，乳清中有 33 种特异性表达蛋白，乳粒中有 3 种特异性表达蛋白。这也说明，牛乳中 MFGM、乳清、乳粒在蛋白质组成上并不完全相同，而 MFGM 蛋白中含有特异性表达蛋白种类较多。这与 Timothy 的分类及比较方法类似，从不同角度诠释的牛乳中蛋白质的组成^[7]。因此对牛乳中不同组成部分蛋白质的组成进行深入研究，能够为日后利用 MFGM、乳粒蛋白为原料生产乳制品提供理论依据。

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

如图 5 所示，通过对牛乳中蛋白质数据库的检索，选择主要的生物过程。牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白的生物过程主要是生物调控 (biological regulation)、细胞组成 (cellular component)、细胞定位 (localization)、细胞定位的建立 (establishment of localization)、传导 (transport)，而牛乳中酪蛋白主要参与细胞定位、细胞定位的建立以及传导。通过对生物过程的分析可知，牛乳中 MFGM 蛋白在生物过程中发挥的作用要高于乳清和乳粒蛋白，尤其体现在生物调控中的作用。Timothy 同样将乳中不同部分蛋白

质进行生物过程归类分析，并进行比较，分析了不同部分蛋白质在生物过程中发挥作用的差异^[7]。

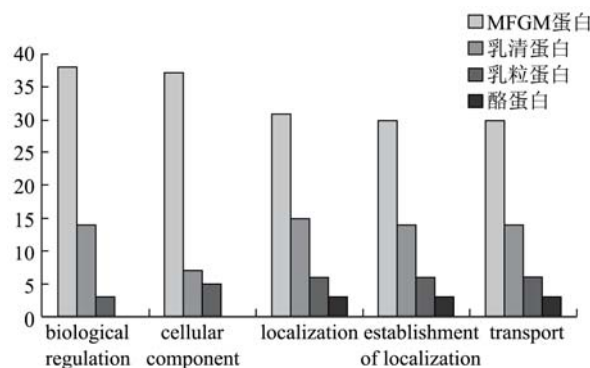


图 5 牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白的生物过程

Fig. 5 Biological processes of MFGM, whey, exosome protein in milk

2.4.2 牛乳中蛋白质不同组成部分参与的分子功能分析

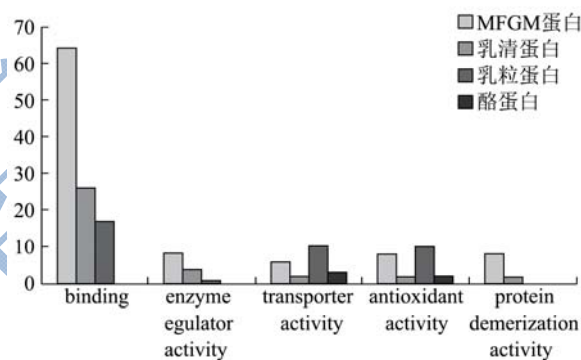


图 6 牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白的分子功能

Fig. 6 Molecular Function of MFGM, whey, exosome protein in milk

如图 6 所示，牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白的分子功能主要为结合 (binding)、酶调节活性 (enzyme regulator activity)、转运活性 (transporter activity)、抗氧化活性 (antioxidant activity)、蛋白二聚体活性 (protein dimerization activity)，酪蛋白主要参与转运活性和抗氧化活性。其中结合作用是牛乳中不同部分蛋白质的主要的分子功能，而 MFGM 蛋白的结合作用最高，可能 MFGM 蛋白参与膜的结合作用有关。而乳粒蛋白参与的转运活性分子功能高于 MFGM、乳清蛋白，可能与乳粒的转运作用有关。

2.4.3 牛乳中蛋白质不同组成部分的细胞组成分析

如图 7 所示，牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白主要参与的细胞组成为膜 (membrane)、细胞内部分 (intracellular part)、细胞外部分 (extracellular region)、蛋白质-脂类复合物 (protein-lipid complex)、细胞表面 (cell surface)，而酪蛋白主要参与细胞外

部分。其中乳粒蛋白参与较多的细胞组成为膜，这与乳粒本身为膜囊泡有关。与乳清、乳粒蛋白相比 MFGM 蛋白参与的细胞组成均较多，这也说明了 MFGM 蛋白具有较高的利用价值。

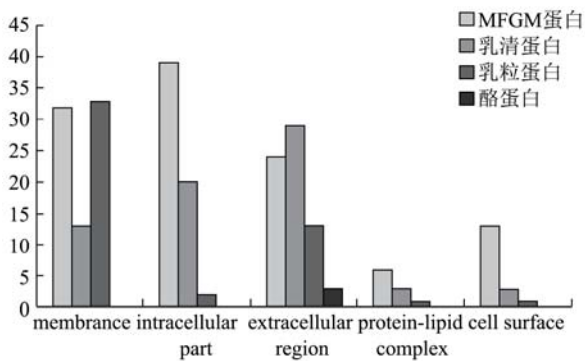


图 7 牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白参与的细胞组成

Fig.7 Cellular Component of MFGM, whey, exosome protein in milk

2.5 牛乳中蛋白质不同组成部分的 KEGG 代谢通路分析

如表 1, 表 2 所示, 牛乳中蛋白质不同组成部分中有 22 种蛋白参与 KEGG 代谢通路, 包括: 过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路 (PPAR signaling pathway)、补充和凝血结合 (Complement and coagulation cascades)、半乳糖代谢 (Galactose

metabolism)、囊泡运输中 SNARE 相互作用 (SNARE interactions in vesicular transport)、钙信号通路 (Calcium signaling pathway)、长时程增强 (Long-term potentiation)。MFGM 蛋白参与的代谢通路为 PPAR 信号通路、囊泡运输中 SNARE 相互作用、钙信号通路、长时程增强; 乳清蛋白参与的代谢通路为 PPAR 信号通路、补充和凝血结合、半乳糖代谢; 乳粒蛋白参与的代谢通路为 PPAR 信号通路。MFGM、乳清、乳粒蛋白均参与的代谢通路为 PPAR 信号通路, 如图 8 所示。这也是从代谢角度说明了牛乳中不同部分蛋白质组成有相同的一部分, 也有较多的不同。

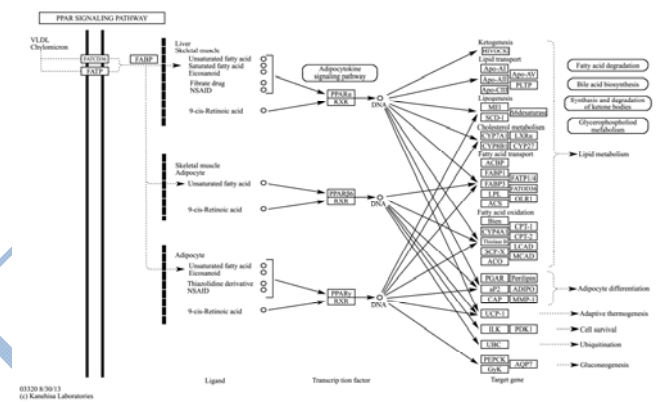


图 8 MFGM、乳清、乳粒蛋白均参与的 PPAR 信号通路

Fig. 8 Proteins involved in PPAR signaling pathway of different component protein parts in milk

表 1 牛乳中蛋白质不同组成部分的 KEGG 代谢通路

Table 1 KEGG Pathway of the different component protein parts in milk

KEGG Pathway Name	MFGM 蛋白		乳清蛋白		乳粒蛋白		酪蛋白	
	count	Percent/%	count	Percent /%	count	Percent /%	count	Percent /%
PPAR signaling pathway	7	7.5	4	10.5	2	10.5		
Complement and coagulation cascades			3	7.9				
Galactose metabolism			2	5.3				
SNARE interactions in vesicular transport	3	3.2						
Calcium signaling pathway	5	5.4						
Long-term potentiation	3	3.2						

表 2 参与 KEGG 代谢通路的蛋白

Table 2 Proteins involved in KEGG pathway

Uniprot 登录号	蛋白名称	蛋白质的氨基酸数	分子量/ku	等电点/PI
P26201	血小板糖蛋白	472	52.9	5.20
Q0VCZ8	酰基-CoA 合成酶	699	78.2	7.21
P15497	载脂蛋白 A-I	265	30.3	5.97
P81644	载脂蛋白 A-II	100	11.2	8.10
P19035	载脂蛋白 C-III	96	10.7	5.11
P10790	脂肪酸结合蛋白	133	14.8	7.34

转下页

接上页

P11151	脂蛋白脂酶	478	53.3	8.51
Q32PA1	CD59 分子, 补体调节蛋白	121	13.7	7.75
A6QPX7	纤维蛋白原 β 蛋白	330	37.9	6.68
Q3SZZ9	纤维蛋白原 γ 蛋白	435	49.1	5.87
P34955	α -1-抗蛋白酶	416	46.1	6.52
Q3T000	突触同源 YKT6 蛋白	198	22.5	6.58
Q2T9M8	突触相关蛋白同种型 SNAP23A	211	23.2	4.83
Q0II86	突触相关蛋白	258	28.5	5.47
P04896	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白	394	45.7	5.71
Q3SYS6	钙调磷酸酶 B 同源蛋白	195	22.4	5.10
Q08E45	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II α	478	54.1	7.08
P38408	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 α 亚基	355	41.5	6.07
P30546	组胺 H1 受体	491	55.9	8.97
P61223	Ras 相关蛋白 Rap-1b 蛋白	184	20.8	5.78
P08037	β -1,4-半乳糖转移酶	402	44.8	9.31
P00711	α -乳清蛋白	142	16.2	5.14

3 结论

3.1 牛乳中 MFGM、乳清、酪蛋白、乳粒中的蛋白质在组成及含量上存在一定的差异, MFGM 中鉴定出 201 种蛋白质, 乳清中鉴定出 96 种蛋白质, 酪蛋白中鉴定出 21 种蛋白, 乳粒中鉴定出 33 种蛋白质。其中只有 27 种相同的蛋白, 说明牛乳中不同部分蛋白组成存在较大的差异。通过分别对 MFGM、乳清、酪蛋白、乳粒中的蛋白质的 GO 功能注释及 KEGG 代谢通路分析表明, 牛乳中 MFGM、乳清、酪蛋白、乳粒中的蛋白质在生物学过程、分子功能、细胞组成及代谢通路上同样存在较大的差异。其中, MFGM 蛋白参与的功能及代谢通路要高于乳清与乳粒, 这说明牛乳 MFGM 蛋白具有较高的利用价值, 可能会作为原料为日后生产乳制品提供参考依据。对牛乳中蛋白质不同组成部分进行探究, 能够深入的了解牛乳中的蛋白质分布情况, 以及不同组成部分蛋白质的功能, 有利于提高牛乳的利用率。然而, 通过 SDS-PAGE 的结果显示, MFGM、乳清、乳粒中酪蛋白含量较高, 这样会影响一些低丰度蛋白的表达。因此, 想要更深入的了解牛乳中不同部分蛋白质在组成及含量上的差异还有待更进一步的研究。

3.2 目前, 母乳并不能完全满足婴幼儿的需求, 市场上以牛乳为替代品, 主要是由于牛乳中乳蛋白的价值较高。而当前主要是以乳清蛋白中几种功能性蛋白为主, 但是越来越多的研究发现单一的乳清蛋白并不能完全满足婴幼儿的需要^[31]。因此, 对牛乳中 MFGM、乳清、乳粒蛋白质在组成上全面的研究也越来越重要。

通过鉴定结果可以看出牛乳中不同部分蛋白质在组成上差异较大, 主要是由于高丰度蛋白的存在, 大大影响到了一些低丰度乳蛋白的表达^[32]。

3.3 牛乳中 MFGM 蛋白质的种类明显高于乳清与乳粒蛋白, 这说明 MFGM 蛋白在机体内发挥的作用可能更加重要, 所以对 MFGM 蛋白的加工与利用尤为重要。而乳粒蛋白种类比较低, 这可能与乳粒表面的酪蛋白没有完全除去有关, 掩盖了乳粒中低丰度蛋白的表达。MFGM 蛋白参与的生物调控过程较多, 说明 MFGM 蛋白主要在生物大分子间的相互识别与相互作用。乳粒蛋白参与的转运活性的分子功能较高, 这可能与乳粒本身能够将蛋白质转运到细胞内并进行信号传导有关。而乳清蛋白在 GO 功能中的作用较为全面, 比例较为适中。牛乳中不同部分蛋白质参与的 PPAR signaling pathway 主要是通过调节靶基因的表达产生生物效应, 能够调节脂肪细胞分化和能量代谢的关键性转录因子。因此牛乳中蛋白质参与的 PPAR signaling pathway 在机体内起着非常重要的作用。

参考文献

- [1] Barbano D M, Ma Y, Santos M V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. [J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(1): E15-19
- [2] Forsback L, Lindmark-Mansson H, Svennersten-Sjaunja K, et al. Effect of storage and separation of milk at udder quarter level on milk composition, proteolysis, and coagulation properties in relation to somatic cell count. [J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(11): 5341-5349

- [3] Forsback L, Lindmark-Mansson H, Andren A, et al. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. [J]. *Animal*, 2010, 4(4): 617-626
- [4] Gagnaire V, Jardin J, Jan G, et al. Proteomics of milk and bacteria used in fermented dairy products: from qualitative to quantitative advances [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(3): 811-825
- [5] 陈静廷, 马露, 杨晋辉, 等. 差异蛋白质组学在乳蛋白研究中的应用进展[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(8): 1683-1688
CHEN Jing-ting, MA Lu, YANG Jin-hui, et al. Differential proteomics application in milk protein research [J]. *Animal Science*, 2013, 25(8): 1683-1688
- [6] Anna Haug, Arne T.H stmark, Odd M Harstad, et al. Bovine milk in human nutrition-a review [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2007, 6(25): 1-16
- [7] Timothy A, Reinhardt, Randy E, et al. Bovine milk proteome: Quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis [J]. *Journal of proteomics*, 2013, 82: 141-154
- [8] Timothy A, Reinhardt, John D, et al. Bovine milk exosome proteome [J]. *Journal of proteomics*, 2012, 75(5): 1486-1492
- [9] 石磊, 刘晓梅, 程舸, 等. 人乳中蛋白质的组成分析[J]. *应用化学*, 2010, 27(9): 1099-1104
SHI Lei, LIU Xiao-mei, CHENG Ge, et al. The analysis of human milk protein composition [J]. *Applied Chemistry*, 2010, 27(9): 1099-1104
- [10] 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
- [11] D'Alessandro A, Zolla L, Scaloni A. The bovine milk proteome: cherishing, nourishing and fostering molecular complexity. An interactomics and functional overview [J]. *Molecular Biosystems*, 2010, 7(3): 579-597
- [12] Davies C R, Morris V, Griffiths V, et al. Proteomic analysis of the mouse mammary gland is a powerful tool to identify novel proteins that are differentially expressed during mammary development [J]. *Proteomics*, 2006, 6(21): 5694-5704
- [13] 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(1): 43-48
- [14] Spitsberg V L, Gorewit R C. Breast ovarian cancer susceptibility protein (BRCA1) in milk, tissue and cells [J]. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80: 60-69
- [15] Vesper H, Schmel E M, Nikolova D L, et al. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition [J]. *J. Nutr.*, 1999, 129(7): 1239-1250
- [16] 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*, 1992, 63: 1022-1027
- [17] Noh S K, Koo S L. Milk Sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats [J]. *J. Nutr.*, 2004, 134(10): 2611-2616
- [18] Wang X, Hirno S, Millen R, et al. Inhibition of helicobacter pylori infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model [J]. *J. Med. Microbiol.*, 2001, 50(5): 430-435
- [19] Stefferl A, Schubri A, Storch M, et al. Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic t cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J. Immunol.*, 2000, 165(5): 2859-2865
- [20] Alomirah H F, Alli I. Separation and characterization of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from whey and whey protein preparations [J]. *Inter. Dairy J.*, 2004, 14(5): 411-419
- [21] Krissansen G.W. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. [J]. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2007, 26(6): 713S-723S
- [22] Marshall K. Therapeutic applications of whey protein [J]. *Alternative Medicine Review*. 2004, 9(2): 136-156
- [23] Hata T, Murakami K, Nakatani H, et al. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs [J]. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 2010, 396(2): 528-533s
- [24] Lasser C, Seyed Alikhani V, Ekstrom K, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contains RNA: uptake by macrophages [J]. *J. Transl. Med.*, 2011, 9(9): 2-8
- [25] Lakkaraju A, Rodriguez-Boulant E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity [J]. *Trends. Cell. Biol.*, 2008, 18(5): 199-209
- [26] Reinhardt T A, Lippolis J D. Bovine milk fat globule membrane proteome [J]. *J. Dairy Res.*, 2006, 73(4): 406-416
- [27] 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
- [28] 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
- [29] Ye A, Singh H, Taylor M W, et al. Interactions of fat globule surface proteins during concentration of whole milk in a pilot-scale multiple effect evaporator [J]. *Journal of Dairy Research*, 2004, 71(4), 471-479
- [30] 魏开华,应天翼,胡良平,等蛋白质组学实验技术精编北京: 化学工业出版社,2010
- [31] Mange A, Bellet V, Tuillon E, et al. Comprehensive proteomic analysis of the human milk proteome: contribution of protein fractionation [J]. *J. Chromatogr B. Analyt. Technol. Biomed Life Sci.*, 2008, 876(2): 252-256
- [32] Smolenski G, Haines S, Kwan F.Y, et al. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach [J]. *J. Proteome Res.*, 2007, 6(1): 207-215

现代食品科技