

非标记蛋白定量方法在掺假肉鉴别中的应用

金绍明, 宁霄, 曹进*, 丁宏

(中国食品药品检定研究院食品检定所, 北京 100050)

摘要: 目的 建立一种非标记蛋白定量法鉴别牛肉或羊肉中是否掺假。**方法** 采用四极杆串联飞行时间高分辨质谱分析各种肉类蛋白酶解之后的样品, 找到每种肉类特异的肽段, 再用串联四极杆质谱测定特异肽段的定量结果, 判定样本中是否有这种肉类存在。**结果** 在测定的牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉和鸭肉样本中, 均找到每种肉类的特异肽段 5~7 条, 从每种肉中选择 3 条肽段进行定量分析, 可以很好地鉴别出牛羊肉中掺杂的其他肉类。**结论** 该方法操作简便, 结果可靠, 灵敏度高, 可用于在牛肉或羊肉中掺杂其他肉类的鉴别。

关键词: 非标记蛋白定量方法; 肽段; 四极杆串联飞行时间质谱; 串联四极杆质谱; 肉类掺假

Application of non-labeled protein quantification method in the identification of adulterated meat

JIN Shao-Ming, NING Xiao, CAO Jin*, DING Hong

(Institute for Food Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a non-labeled protein quantitative method for identification of adulteration in beef or mutton. **Methods** Quadrupole tandem time-of-flight high-resolution mass spectrometry was used to analyze the enzymatic hydrolyzed samples of various meat proteins and find the specific peptides of each meat. Quantitative results of the specific peptides were determined by quadrupole tandem mass spectrometry to identify whether the meat was present. **Results** In the samples of beef, mutton, pork, chicken and duck, 5-7 specific peptides were found for each kind of meat. Three peptides were selected from each kind of meat for quantitative analysis, which could be very good to identify the beef and mutton adulterated with other meat. **Conclusion** The method is simple, reliable and sensitive, which can be used for the identification of beef or mutton adulterated with other meat.

KEY WORDS: non-labeled protein quantification method; peptides; quadrupole tandem time-of-flight mass spectrometry; triple quadrupole tandem mass spectrometry; meat adulteration

1 引言

肉类食品的消费量与日俱增, 在利益的驱使下, 掺假肉事件屡禁不止, 严重危害了人民群众的切身利益, 监管部门有责任寻找有效的监测方法, 鉴别肉类的不同种属, 及时发现掺假肉, 杜绝此类事件的发生^[1]。蛋白质组学发

展至今, 已经有将近 20 年的历史, 在食品领域也广泛应用, 可以用来分析不同种属乳制品中的蛋白差异^[2,3], 也可以鉴别肉类食品的新鲜程度等^[4], 将质谱技术应用于蛋白质组学研究也有近十年的发展历史^[5]。质谱技术的发展和推广使其在蛋白质的身份鉴定^[6]、氨基酸序列信息分析^[7]、翻译后修饰分析^[8]、量化信息提取^[9]、生物标记物发现

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金(2014C8)

Fund: Supported by the Research Foundation for Youth Development of CIFDA (2014C8)

***通讯作者:** 曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品检测。E-mail: caojin@tsinghua.org.cn

***Corresponding author:** CAO Jin, Ph.D, Professor, Institute for Food Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@tsinghua.org.cn

[10,11]与疾病诊断建模[12,13]等过程中的应用越来越广泛。但是,从质谱得到的数据是大量的复杂数据,如何从这些数据中得到真实有用的信息,就需要涉及到统计分析、数据挖掘、数据前后处理算法等与计算相关的问题。

除了基于质谱技术进行肉类鉴别之外,还有基于抗体抗原反应的酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和基于核酸扩增的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)等技术[14,15]。ELISA 技术针对已经发现的特异抗原进行检测,无法对含有未知抗体的肉类进行检测;PCR 技术受样本 DNA 的限制,在储存及运输的过程中容易发生降解,而且也易受到复杂基质的干扰,在实际的使用过程中容易得到阴性的结果。

本研究利用蛋白质组学的研究思路,运用非标记蛋白定量技术,将不同种属的肉类样本酶解处理后,先用高分辨质谱采集数据[16],利用软件分析各个不同种属肉类的数据差异[17],找出每种肉类的特异性标志肽段[18],建立多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)定量质谱方法进行筛查鉴别,为相关检测工作提供参考。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

鸡肉、牛肉、羊肉、鸭肉、猪肉,市售。

胰蛋白酶(测序级)(≥ 10000 BAEE units/mg protein, 美国 Sigma-aldrich 公司); SMART Digest 试剂盒酶(美国 Thermo Fisher 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Meker 公司); 二硫苏糖醇(生化级,美国 Promega 公司); 三氟乙酸、尿素、碘乙酰胺(生化级,美国 Sigma 公司)。

2.2 仪器与设备

1290-6460 超高效液相色谱串联四极杆质谱联用仪,配有电喷雾(electrospray ionization, ESI)离子源(美国 Agilent 公司); 1290-6540 超高效液相色谱四极杆串联飞行时间质谱仪,配有电喷雾离子源并有在线质量校正功能(美国 Agilent 公司); 恒温混匀仪(德国 Eppendorf 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 蛋白酶解方法

蛋白提取:分别称取 2 g 匀质之后的肉样,加入提取液 5 mL(0.05 mol/L Tris-HCl、7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、pH 8.0),冰水浴均质 1 min,再用 5 mL 提取液冲洗刀头之后合并,12000 r/min 离心 20 min。

还原及烷基化:吸取 100 μ L 上清液,加入 10 μ L 的二硫苏糖醇溶液(50 mmol/L),56 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 h。放置室温,加入 20 μ L 的碘乙酰胺溶液(100 mmol/L),暗处反应 30 min。再加入 15 μ L 的二硫苏糖醇溶液(50 mmol/L),暗处反应 15 min。

酶解反应:加入 750 μ L 25 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl,缓冲溶液,加入 20 μ g 胰蛋白酶,调节 pH 至 8.0,37 $^{\circ}$ C 反应过夜。

除盐:平衡至室温后,加入 0.4%三氟乙酸终止反应,并加入 1 mL 水溶液准备上样。依次用乙腈、50%乙腈-水、0.1%三氟乙酸活化小柱,上样,再依次用 0.1%三氟乙酸、0.5%乙酸清洗,最后用 1 mL 60%乙腈 + 0.5%乙酸洗脱,过 0.22 μ m 滤膜,准备质谱分析。

2.3.2 高分辨液质条件

色谱柱:Agilent Poroshell(2.1 mm \times 100 mm, 5 μ m); 流动相: A 为含 0.1%甲酸的水溶液, B 为含 0.1%甲酸的乙腈溶液,梯度洗脱: 0~1 min, 70%A, 1~13 min, 70%A~50%A, 13~27 min, 50%A~10%A, 27~29 min, 10%A, 29~29.1 min, 10%A~70%A, 29~32 min, 70%A, 平衡 3 min; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 2 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

质谱条件: 离子源: ESI 源, 正离子采集模式, 干燥气温度, 300 $^{\circ}$ C; 干燥气流速, 6 L/min, 雾化气压力 30 psi, 鞘气温度, 350 $^{\circ}$ C; 鞘气流量 11 L/min; 毛细管电压, 3500 V; 采集模式: Auto MS/MS; 扫描范围: 50~1700 m/z; 采集速度: 10 Hz; 存储格式: profile。

2.3.3 数据分析方法

将采集好的数据带入软件进行分析,找出各个样品之间的差异,这个过程分为两步,第一步先对整个采集好的数据寻找分子特征,这个主要用 Agilent MFE 软件,找出分子特征之后,将这些内容带进第二个组学分析软件,找出各个样本间的差异,这个过程主要使用 Agilent MPP 软件,在分析过程中有许多参数需要控制,比如分子所带的价态,差异的最低比例,特异肽段出现的唯一性等。

2.3.4 串联四极杆液质条件

液相色谱的条件与高分辨液质的条件一致。MRM 条件来自于高分辨数据分析之后得到的每种肉类的特异肽段,然后从这些肽段的子离子中找出响应强度最高的 2 个碎片建立 MRM 离子对。每种肉类选择 3 条。

3 结果与分析

3.1 特异肽段

根据高分辨质谱采集的数据,用 Agilent MFE 软件提取出分子特征,然后导入 Agilent MPP 软件进行统计,其中能够根据二级质谱特异性区分的肽段,共找出 30 条,再将这些肽段带入 uniprot 数据库检索,匹配出对应的肽段信息,鸡肉有 5 条,牛肉有 5 条,鸭肉有 7 条,羊肉有 6 条,猪肉有 7 条。如表 1 所示。

3.2 定量离子对

从每种肉类的特异肽段中选择 3 个,再找出其响应强度高的 2 个碎片,建立的定量质谱的离子对如表 2 所示。

表 1 每种肉类的特异性肽段
Table 1 Specific peptides for each kind of meat

猪肉	鸭肉	羊肉	鸡肉	牛肉
PLGPGLKPPEER	YLEFISDAK	EDQLSELK	VAEQLDATER	TLAFLFASGGTK
AGIAQVSVDK	VVETMQTR	ASNVTISK	DQGTVEGLR	EASTVFLNMFGEK
AVFEELSLK	IYVDLQVK	PTGDSEASGGTK	GADPEDGAFK	HPSDQAAMSK
FAGGNLDVVK	FLSSVSK	VVETMLDAEIR	TVSVGALAK	GQNVVYAK
SDTESILASLK	HGTGILK	SALAHAVQSSR	TLALLFATYGGGK	ALLSELK
TPLAQSHATK	VEADIALIR	GVTGEAEAGGTK		
PEVLLGILPGAGGTQR	GLSDGEVWGK			

表 2 肉类鉴别时所用的 MRM 离子对
Table 2 MRM ion pairs for meat identification

种类	肽段	母离子(m/z)	子离子 1(m/z)	子离子 2(m/z)	保留时间/min
猪肉	AVFEELSLK	518.3	448.2	572.4	2.123
	FAGGNLDVVK	517.3	741.4	676.3	6.507
	TPLAQSHATK	527.3	384.2	400.2	6.971
鸭肉	IYVDLQVK	489.2	863.4	601.3	2.552
	FLSSVSK	384.2	506.2	551.3	4.537
	HGTGILK	363.2	370.2	429.3	5.877
羊肉	HGHRTSASTGDDK	684.4	275.2	429.3	3.072
	PTGDSEASGGTK	553.8	648.3	361.2	5.389
	VVETMLDAEIR	638.3	416.2	715.4	3.933
鸡肉	DQGTVEGLR	561.3	572.3	719.4	7.075
	GADPEDGAFK	503.7	358.1	665.3	7.885
	GQTVSVGALAK	515.8	401.3	646.3	8.994
牛肉	TLAFLFASGGTK	606.8	666.3	868.4	1.138
	EASTVFLNMFGEK	736.9	610.3	332.2	5.539
	HPSDQAAMSK	536.2	454.2	506.3	5.903

3.3 液相色谱条件优化

蛋白质组学研究时液相色谱的条件一般是从高比例的水相过渡到高比例的有机相的过程, 因此在研究起始时, 选用 90%水相做为起始流动相, 但分离的效果并不好, 大部分的样品集中在最后的三分之一时间段, 因此调整了初始的流动相中水相的比例, 从 90%调整到了 80%, 分离的效果有较大的改善, 又调整到 70%以后, 分离的效果达到了最好, 所以最终选择 70%比例的水相作为初始流动相。3 种不同比例的洗脱结果见图 1 所示。

3.4 实际样本检测

运用此方法对从超市, 菜市场 and 互联网购买的 9 批次标示为牛肉和 13 批次标示为羊肉的样品进行检测, 结果在从菜市场购买的 1 批次羊肉样品中, 检测出含有鸭肉的特异肽段, 色谱图见图 2 所示, 说明本方法用来对牛肉或

羊肉中的掺假肉进行鉴别时有效且可行的。

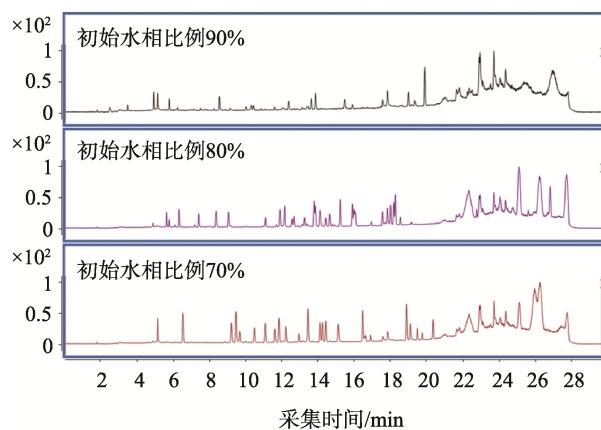


图 1 3 种起始水相比例流动相的洗脱结果
Fig. 1 Results of elution of 3 kinds of initial water-phase mobile phases

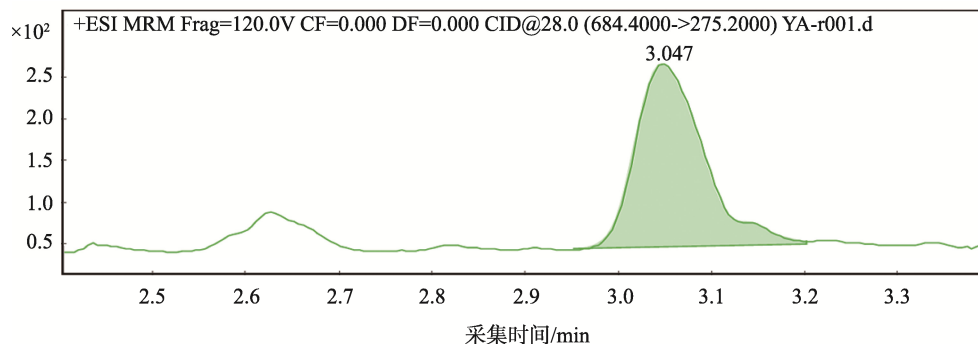


图2 从羊肉中鉴别出的鸭肉的特异肽段的提取色谱图

Fig. 2 Extraction chromatogram of specific peptides of duck meat identified in mutton

4 结论

本研究应用非标记蛋白准确定量的方法,在高分辨质谱上寻找各种来源的肉类样本的特异肽段,并且定量分析了这些不同动物来源的肉类样本的特异性肽段,利用这种方法,可以快速准确的分析掺假肉类的掺假种类。利用每种肉类的特异肽段建立的高灵敏定量质谱检测方法,能够鉴定出羊肉中掺杂了的鸭肉成分。说明本方法切实有效,可以用来鉴定牛肉或羊肉的掺假。

参考文献

- [1] 李欣南, 关一夫. 掺假肉检验技术发展现状[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(5): 189-193.
Li XN, Guan YF. Development status of adulterated meat inspection technology [J]. Food Res Dev, 2016, 37(5): 189-193.
- [2] O'Donnell R, Holland JW, Deeth HC, *et al.* Milk proteomics [J]. Int Dairy J, 2004, 14(12): 1013-1023.
- [3] Manso MA, Léonil J, Jan G, *et al.* Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products [J]. China Dairy Ind, 2005, 15(6): 845-855.
- [4] Bendixen E. The use of proteomics in meat science [J]. Meat Sci, 2005, 71(1): 138-149.
- [5] D'Alessandro A, Zolla L. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology [J]. J Proteom, 2013, 78(1): 558-577.
- [6] Krufft V, Eubel H, Jänsch L, *et al.* Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. [J]. Plant Physiol, 2001, 127(4): 1694-1710.
- [7] Krissinel E. On the relationship between sequence and structure similarities in proteomics [J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 717.
- [8] Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry [J]. Curr Opin Chem Biol, 2004, 8(1): 33-41.
- [9] Schwarz E, Levin Y, Wang L, *et al.* Peptide correlation: A means to identify high quality quantitative information in large-scale proteomic studies [J]. J Separat Sci, 2015, 30(14): 2190-2197.
- [10] Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery [J]. Mole Oncol, 2009, 3(1): 33-44.
- [11] Srinivas PR, Verma M, Zhao Y, *et al.* Proteomics for cancer biomarker discovery [J]. Clin Chem, 2002, 48(8): 1160-1169.
- [12] Orti V, Mertens B, Vialaret J, *et al.* Data from a targeted proteomics approach to discover biomarkers in saliva for the clinical diagnosis of periodontitis [J]. Data Brief, 2018, (18): 294-299.
- [13] O'Reilly J, Lindsey ML, Baugh JA. Physiological proteomics of heart failure [J]. Curr Opin Physiol, 2018, 1: 185-197.
- [14] 任秀, 骆海朋, 崔生辉. 酶联免疫吸附法和 DNA 检测法在肉类鉴别中的应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(1): 93-97.
Ren X, Luo HP, Cui SH. Application of ELISA and DNA detection methods in meat identification [J]. Chin J Food Hyg, 2015, 27(1): 93-97.
- [15] 王守云, 袁明美, 封聪, 等. 肉类掺假鉴别技术研究进展[J]. 肉类研究, 2017, 31(4): 56-61.
Wang SY, Yuan MM, Feng C. Recent advances in identification techniques for meat adulteration [J]. Meat Res, 2017, 31(4): 56-61.
- [16] Cox J, Mann M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology [J]. Ann Rev Biochem, 2011, 80(1): 273-299.
- [17] Dowd A. Elucidating cellular metabolism and protein difference data from DIGE proteomics experiments using enzyme assays [J]. Method Mol Biol, 2018, (1664): 261-278.
- [18] Lopez JL, Marina A, Alvarez G, *et al.* Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species [J]. Proteomics, 2015, 2(12): 1658-1665.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



金绍明, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: myjackyming@126.com



曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: caojin@tsinghua.org.cn