



利用 SCIEX QTRAP[®] 4500 系统建立假羊肉的检测方法

Method Development for FakeLamb Meat Detection using SCIEX QTRAP[®] 4500 system

郭立海, 程海燕, 王海鉴, 靳文海, 刘华芬
SCIEX, 北京, 中国

引言

近年来, 已报道的市场上出售的部分羊肉卷中掺有大量的鸭肉, 甚至有老鼠肉, 商家通过掺假赚取非法利润, “挂羊头卖狗肉” 欺骗消费者, 侵犯消费者合法权益, 这种现象在中国已经是行业内潜规则。目前有效准确的检测方法特别有限, 只有个别检测机构利用聚合酶链式反应技术 (PCR) 扩增这些物种特有的DNA, 但这种方法并不能直接检测肉类的主要成分—蛋白质, 而且肉类处理加工过程会轻易地破坏和除掉这些DNA。这样一来, 就算食品样品中含有大量的鸭或老鼠组织和其他一些污染物都无法被检测到。还有一种补充方法—酶联免疫吸附法 (ELISA) 也可以进行蛋白质检测, 但是这种方法一次只能检测单个蛋白质, 不能一次实验同时检测多个物种, 反应特异性也不好。

肉类来源物种检测最大的困难是如何找到特定物种的特异蛋白质或肽, 由于以上两种方法特异性并不高, 可能会存在假阳性结果, 所以急需开发一种快速、准确和特异性更高的方法。

本文我们首先采用高灵敏度、高扫描速度的 SCIEX TripleTOF[®] 5600 质谱系统鉴定各肉类的蛋白质, 通过比较分析寻找各肉类物种蛋白质特异的肽, 经过blast进一步筛查和确认, 然后再在 SCIEX QTRAP[®] 4500 系统上利用MIDAS[™] 工作流程建立起多重反应监测 (MRM) 检测假羊肉的方法。我们的目的就是建立一种简单易用的MRM检测假肉

的方法, 不再需要复杂的方法开发过程, 而且该方法可以很方便的将新的需要检测的物种MRM离子对加进去, 在一个方法里可以同时检测多个特征肽和多个物种。另外QTRAP[®] 质谱可以利用MRM触发的增强离子扫描方式进一步确认蛋白质/肽序列, 从而可以有效的去除可能的假阳性, 增加检测结果的可靠性。最终我们的检测方法可以利用纯鸭肉或鸡肉样品来绘制标准曲线, 从而很容易计算出掺入假肉的比例和量。所以质谱检测方法要比PCR、ELISA或其他非直接检测方法更简单易用、更准确和更可靠。

方法

材料

本文所用的肉类样品鸭肉、鸡肉、羊肉、牛肉、猪肉、兔肉是从市场购买的, 掺假样品羊肉卷是从某大型超市购买, 大鼠肉来自实验用大鼠腿部肌肉。

样品制备

首先取2 g肉样均质, 加入液氮研磨成粉状, 然后加入蛋白提取液 (7 M 尿素, 2 M 硫脲, 4% CHAPS), 离心取0.1 mL上清液并转移到超滤管中, 加入二硫苏糖醇在60 °C条件下保持60分钟还原二硫键, 然后加入碘乙酰胺室温避光反应30分钟进行烷基化, 加入200 μL 50 mmol/mL碳酸氢铵溶液, 14,000 g离心20分钟, 重复3次, 最后加入100 μL含有胰蛋白酶的50 mmol/mL碳酸氢铵溶液震荡混匀, 40 °C酶解3小时。



特征肽的找寻

采用EksigentnanoLC-Ultra[®]液相系统和SCIEX TripleTOF[®] 5600质谱系统鉴定各物种肉类蛋白质，每个样品上样2 μg总蛋白。采用75 μm内径柱子30分钟梯度分析时间。用ProteinPilot[™]软件进行蛋白质数据库检索，所用数据库是NCBI nr全库，选用了氨基酸替换搜索功能。

通过详细比较在各个物种肉类鉴定的蛋白质和肽列表，找到只在鸭肉或鸡肉样品里鉴定的特异肽，即这些肽可以作为鸭或鸡的特异标志物，且这些肽对应的蛋白质必须是几个物种里都能鉴定到的，只是肽的氨基酸序列有差别，并且尽量选用高丰度蛋白质对应的肽。最后将这些特征肽再在NCBI网站上进行blast分析，进一步确认其特异性，即这些肽的氨基酸序列不能与其他几个物种的100%匹配。

MIDAS[™]工作流程建立MRM检测方法

采用Shimadzu 20AD XR液相系统和SCIEX QTRAP[®] 4500质谱系统构建MIDAS[™]工作流程、建立MRM检测方法。每个肉类样品取2 μg总蛋白，采用22分钟的液相梯度条件分离（表1），其中的A相为0.1%甲酸的水溶液，B相为0.1%甲酸的乙腈。色谱柱采用Phenomenex Kinetex 4.6 mm × 100 mm, 2.6 μm, 100A反向C18色谱柱，流速0.4 mL/min, 40°C柱温。

MIDAS[™]工作流程

质谱检测是在配有电喷雾电离源（ESI）的SCIEX QTRAP[®] 4500质谱平台上完成的。MRM触发EPI方法是基于MIDAS[™]（见图1）工作流程开发完成。

基本思路是首先利用Skyline软件构建鸭和鸡的特征肽的MRM离子对和QTRAP[®]的MRM触发EPI实验方法。然后在7个肉类样品中逐一进行筛选和

表 1. MRM 检测液相分离条件

Time (min)	A (%)	B (%)
1	90	10
15	65	35
16	10	90
18	10	90
18.1	2	10
22	98	10

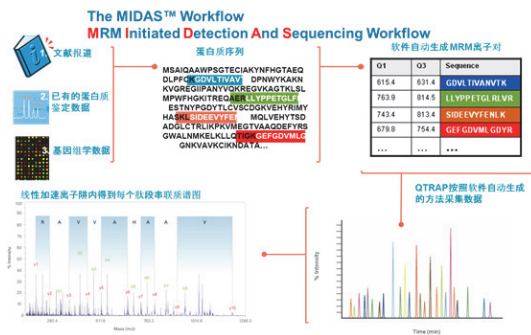


图1. MIDAS[™]工作流程。

确认，根据同一个肽的MRM离子对的保留时间和MSMS质谱碎片离子与鉴定实验的匹配性去掉在其他肉类出现的MRM离子对，保留特异的MRM离子对。并进一步优化DP、CE等质谱参数。

最终确定的质谱方法中，Turbo V[™]离子源参数为：gas1, gas2和气帘气为50psi，源温度设为350°C，喷雾电压为5500V。采用Scheduled MRM[™]算法进行检测：MRM检测窗口设置为30秒，扫描时间设置为0.6秒。EPI扫描速度10000 Da/s，扫描质量范围：250-1200 Da，DP电压50 v，CE能量40 ± 15 V。

掺入最低定量检测限LLOQ

将鸭肉和鸡肉蛋白样品按比例稀释加入到羊肉蛋白样品中，羊肉蛋白总量都维持在2 μg，以此确定鸭肉和鸡肉掺入羊肉中的最低定量检测限。用MultiQuant[™]软件自动积分并绘制标准曲线并计算CV值和准确度。



结果

鸭和鸡特征肽找寻

肉类鉴定的方法开发最关键的是找寻某一物种特征肽，众所周知，一些物种亲缘关系比较接近，蛋白序列差别很小，比如鸡和鸭、羊和牛等。还有一些物种的蛋白数据库非常欠缺，比如鸭和羊，这样找寻这些物种特征肽还是有一定的难度的，所以我们采用TripleTOF®质谱系统和ProteinPilot™软件先鉴定这些物种肉样品包含的蛋白质，充分利用TripleTOF®质谱系统强大的蛋白质鉴定能力和ProteinPilot™软件优越的蛋白同源分析能力和物种分组能力。而且我们检索NCBI中所有物种的蛋白库，这样我们很容易在ProteinPilot™软件中确定一些物种同源的蛋白质和肽，并且比较容易地找到某物种特异的肽，即使鸭或羊的数据库不全，也可以通过ProteinPilot™软件氨基酸替换检索方式找到鸭的特征肽序列。最后在全的蛋白数据库NCBI网站做blast分析，进一步确认这些特征肽的物种特异性，将非特异的肽淘汰掉，保留特异肽。

我们从某大型超市里随机购买的羊肉卷里就鉴定出了大量的禽类来源的蛋白质，由于鸭蛋白质数据库不全，加上鸭和鸡亲缘关系比较接近，所以显示的蛋白来源物种基本是原鸡（见图2），这已经提示这些羊肉卷里确实掺入了某种禽类肉，但无法确定具体是掺入什么肉。但通过我们寻找的特征构建的MRM方法检测最终显示这些羊肉卷里主要掺入了鸭肉而非鸡肉（结果见图5）。这就提示MRM方法比蛋白鉴定方法结果特异性更好，所以最后我们决定开发MRM检测方法。

MIDAS™工作流程确认特征MRM离子对

SCIEX QTRAP®系列质谱最大的优势是将串联四级杆的高选择性MRM扫描和离子阱高灵敏度的碎片离子扫描即EPI组合在一起，从而可以实现

MIDAS™工作流程，这样MRM峰可以得到二级图谱的进一步确认，有效消除假阳性的MRM峰。比如我们就在用鸡的特征MRM方法分析兔肉样品时，在15.5分钟出现很明显的MRM峰，但其触发的二级图谱去做图库检索发现此MRM峰匹配到另外一个肽，并不是设定的鸡的特征肽，如图3。这说明单纯的MRM峰并不一定能判定兔肉中有鸡肉成分，需要MS/MS图谱进一步确认。

Protein ID				Species			
N	Unseqd	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptide(s)
5	59.66	59.66	44.4	gi11939947	PREDICTED: similar to myosin II (Gallus gallus)	Gallus gallus	871
11	62.66	107.26	43.7	gi11939947	PREDICTED: similar to Titin (Connectin) (Phallomyosinoma antigen)	Gallus gallus	86
10	44.36	44.36	46.9	gi4036408	M-protein, vitellin (Gallus gallus)	Gallus gallus	189
17	44.23	63.36	33.4	gi11939949	PREDICTED: similar to Titin (Connectin) (Phallomyosinoma antigen)	Gallus gallus	20
18	43.89	44.03	60.9	gi32603448	PREDICTED: troponin alpha-1 (chicken-like isoform 2) (Meleagris gallopavo)	Gallus gallus	36
19	43.67	43.67	79.1	gi11939927	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (Gallus gallus)	Gallus gallus	277
20	36.36	73.43	43.2	gi11939949	PREDICTED: similar to titin subunit beta-1 (Gallus gallus)	Gallus gallus	61
32	28.99	28.99	68.4	gi80788110	PREDICTED: similar to Myosin heavy chain 2, troponin (Meleagris gallopavo)	Gallus gallus	18
34	26.07	26.07	84.7	gi11939949	troponin heavy chain (Troponin heavy chain) (Gallus gallus)	Gallus gallus	148
36	25.05	74.95	66.1	gi11939949	PREDICTED: similar to titin subunit beta-2 (Gallus gallus)	Gallus gallus	86
38	24.12	24.12	38.8	gi34760728	6-phosphogluconase, muscle type (Gallus gallus)	Gallus gallus	20
44	21.58	21.58	46.2	gi11939949	vimentin (Gallus gallus)	Gallus gallus	144
47	20.96	43.97	29.9	gi11939949	PREDICTED: similar to connectin (Gallus gallus)	Gallus gallus	38
48	20.41	20.41	67.6	gi4048903	voltage-dependent anion-selective channel subunit 2 (Gallus gallus)	Gallus gallus	12
60	19.16	19.16	57.1	gi11939949	phosphogluconase muscle 1 (Gallus gallus)	Gallus gallus	18
66	17.08	43.21	26.3	gi11939949	PREDICTED: similar to connectin (Gallus gallus)	Gallus gallus	36
67	16.26	37.81	73.0	gi4036376	creatine kinase M-type (Gallus gallus)	Gallus gallus	46
68	16.10	16.11	44.3	gi4048441	ubiquitin-conjugation elongation factor 1 alpha 2 (Gallus gallus)	Gallus gallus	10
69	13.43	13.63	62.2	gi32603448	desmin (Gallus gallus)	Gallus gallus	12

图2. ProteinPilot软件显示超市购买羊肉卷里鉴定出大量禽类蛋白质。

鸭肉和鸡肉的最终特征MRM检测方法的确立

通过以上流程我们确定的鸭的特征MRM检测方法在纯鸡肉、纯羊肉、纯牛肉、纯猪肉、纯兔肉和纯大鼠肉样品中都没有检测出相应的MRM峰，在纯鸭肉样品中检测出强度很高的MRM峰，证明了该方法的专一性和可靠性，见图4。但在超市购买的羊肉卷里检测出很强的MRM峰，与在纯鸡肉里出现的MRM峰一致，证明此羊肉卷确实是掺入了鸭肉，是假羊肉卷，见图5。

通过以上流程我们确定的鸡的特征MRM检测方法在纯鸭肉、纯羊肉、纯牛肉、纯猪肉、纯兔肉和纯大鼠肉样品中都没有检测出相应的MRM峰，在纯鸭肉样品中检测出强度很高的MRM峰，证明了该方法的专一性和可靠性。同样在超市购买的假羊肉卷里没有检测到鸡的特征MRM峰，证明此羊肉卷里没

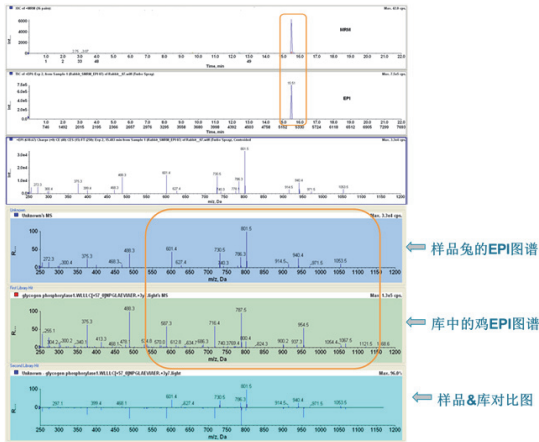


图3. 鸡的特征MRM方法在兔肉样品的MRM触发EPI数据。

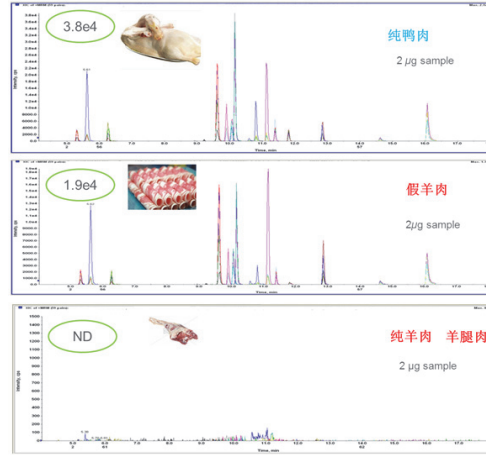


图5. 超市购买假羊肉卷里检测出很强的鸭特征MRM峰。

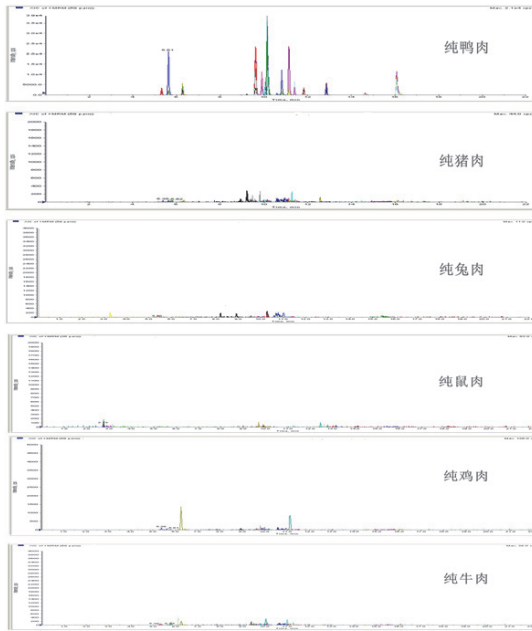


图4. 在其他样品里没有检测到鸭的特征MRM峰。

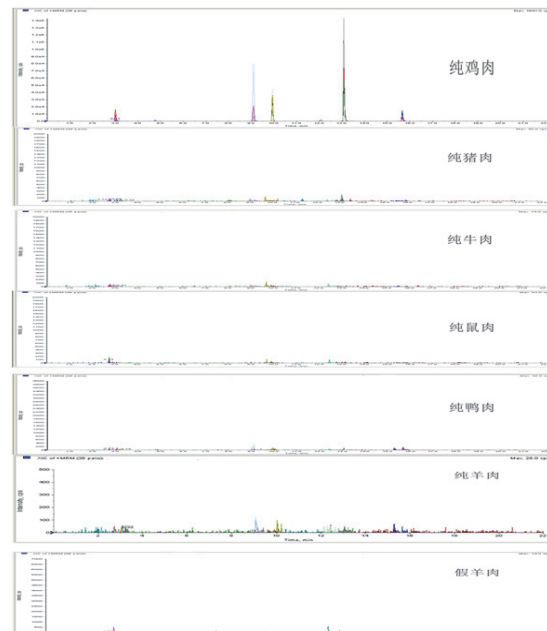


图6. 在其他样品里没有检测到鸡的特征MRM峰。



有掺入鸡肉。

羊肉中掺入鸭肉和鸡肉最低定量检测限

我们人为的将鸭肉和鸡肉蛋白按比例依次稀释加入到 $2\mu\text{g}$ 的羊肉蛋白里，用最终确定的鸭肉特征MRM方法和鸡肉特征MRM方法来确定最低定量检测限，鸭肉和鸡肉蛋白从 $2\mu\text{g}$ 开始掺入，每个稀释重复3次。最终确定鸭肉最低定量检测限可以达到 4 ng ，最低掺入比例为 0.2% ，从 4 ng 到 2000 ng 呈现良好的定量线性（见图7）。鸡肉最低定量检测限达到 20 ng ，最低掺入比例为 1% ，从 20 ng 到 2000 ng 呈现良好的定量线性，见图8。定量重现性

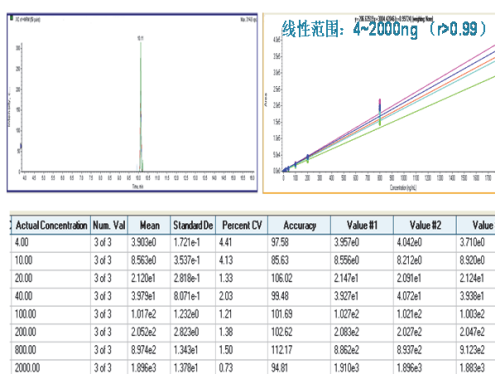


图7. 鸭肉掺入羊肉的最低定量检测限。

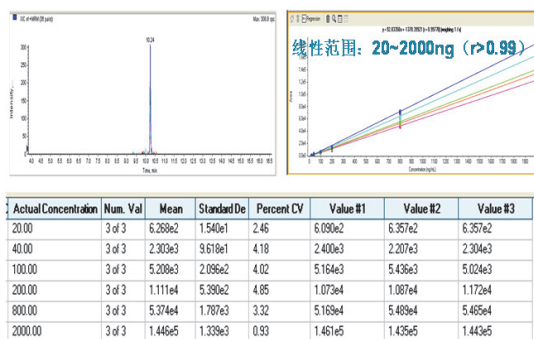


图8. 鸡肉掺入羊肉的最低定量检测限。

良好，在最低浓度条件下，CV在5%以内。这样的最低定量检测限和最低掺入比例完全可以满足日常的肉类商检测的需要。并可以非常容易地以此标准曲线测得假羊肉里掺入鸭肉或鸡肉的比例和掺入的绝对量。

结论

液质联用技术为肉类物种来源检测提供了一种快速、稳定、灵敏、特异的方法。本方法的灵敏度可以媲美任何现有的ELISA方法或PCR方法。而且液质联用的方法可以同时检测多种生物物种，远远好于ELISA每次只能分别检测某种生物。使用MIDAS™工作流程可以在定量的同时，进行QTRAP®二级全扫描获得定性确认信息，与其他检测方式相比大大减少了假阳性的概率。

本文给出了肉类物种来源分析的一种通用流程，即用SCIEX TripleTOF®系列快速采集质谱系统和ProteinPilot™软件鉴定各个物种蛋白质，然后分析找到某些物种的特征肽，再进行blast分析筛选确定特征肽，然后转到SCIEX QTRAP®质谱系统上进行MIDAS™流程，确定最终的特征肽MRM检测方法。

本文建立了鸭肉和鸡肉物种来源检测的MRM方法，实验表明此方法具有很高的灵敏度、特异性、重现性和极低的线性定量检测限，并且在市场上出售的假羊肉卷样品中得到实际应用，表明此方法完全可以应用在日常的羊肉卷掺入鸭肉或鸡肉的实际检测中。最终可以通过绘制标准曲线很容易计算出在羊肉卷里掺入的鸭肉和鸡肉比例和绝对量。

本文建立的MRM检测方法简单易用，不需要再进行复杂繁琐的方法开发过程，可以直接用来检测羊肉中掺入的鸭肉和鸡肉，并且该方法具有很好的扩充性，可以很方便的加入新的需要监测的物种MRM离子对，一个方法里可以同时检测多个物种。