

赛默飞质谱助您辨别“挂羊头，卖狗肉” ——利用 TSQ Quantiva 定量肉类掺假比例

丁小军 顾培明 张伟 周岳 李静
赛默飞世尔科技（中国）有限公司
关键词：肉类掺假；定量分析

引言

“挂羊头，卖狗肉”是日常用的一个熟语。虽然随着时间的发展，这句话已经难以反应最真实的情况，在世界上大部分地方，狗已经不作为食用肉的来源，即使在极少数食狗肉的地方，狗肉的价格也往往比羊肉还高，已经失去了造假的意义。但是，这种商品标识与实际商品的组成不一致的情况，却是长期存在的。自从 2013 年欧盟“马肉风波”之后，中国肉类掺假的现象也屡见报道，进一步加深了人们对肉类真实性的担忧。这种非标明的添加，极大的扰乱的市场次序，影响相关宗教人士、特殊风俗与部分肉类禁食人士的情感与健康，也带来了潜在致病性和疾病控制的难题。目前最常用检测的方法有：基于核酸的聚合酶链式反应技术（PCR），和基于抗体抗原结合的酶联免疫法（ELISA）。前者受到 DNA 降解，复杂基质的干扰和样品提取与扩增方法的影响，干扰了定性和定量的准确性。后者往往受制于抗体的制备，加工过程中蛋白变性，复杂基质和近亲缘种属之间同源干扰导致的假阳性的影响 [1, 2]。

随着生物质谱技术的成熟，大规模的定性和定量研究蛋白表达谱的技术已经很成熟。因此，利用质谱技术寻找不同肉类样品特征性蛋白或者多肽，并进行定量，能够避免现在最常用的 PCR 技术和 ELISA 所面临的上面的种种问题，其优点包括：不受食品加工的过程影响，因为氨基酸序列比核酸序列在加工过程中更容易保存；同时实现定性与定量，避免假阳性且定量结果更加准确可靠；能够同时监测多种掺假 [2]。

猪肉，禽肉，牛肉和羊肉是世界上消耗量最大的四种肉类 [3]。大多数情况下，羊肉最贵，可能比最便宜的禽肉贵到 5 倍以上，在实际生活中，对不法商人具有最大的掺假诱惑力。我们基于超高分辨的 Q Exactive 质谱平台，研究了五种常见肉类彼此之间的特征性专属多肽。选取其中找到的部分多肽，通过人为的将几种不同的肉类进行混合研究，模拟现实中掺假的情况，用 TSQ Quantiva 建立了基于 SRM（Selected Reaction Monitoring）的掺假比例定量方法。整个实验流程如下（图 1）：

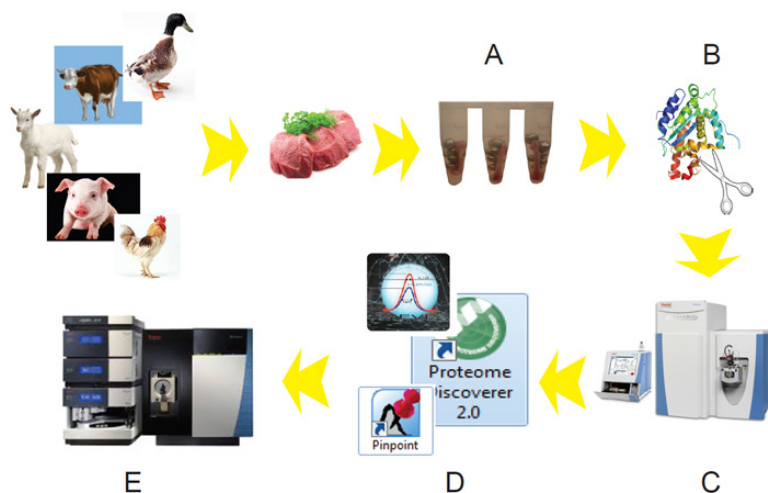


图 1. 基于 Thermo 质谱平台肉类真实性解决方案。（A：样品裂解；B：肉类裂解样品还原烷基化酶切；C：高分辨质谱平台采集每个物种数据；D：Proteome Discoverer 2.0，SEIVE 2.0 软件寻找物种特征性多肽，Pinpoint 软件批量自动生成定量离子对；E：TSQ Quantiva 定量分析）

实验方法：

1.材料与样品制备

本实验所用肉类样品牛肉，猪肉，鸡肉和鸭肉购自于上海某大型超市，羊肉购自于上海某羊肉专卖店。五种肉类样品分别去皮与脂肪取纯肌肉样品约 100 mg，用 RIPA 裂解液裂解后丙酮沉淀，尿素溶解后取部分测浓度，剩余样品还原烷基化，酶切过夜，固相萃取除盐，离心浓缩后用 0.1%FA 溶解后备用。

2.掺假实验

将鸡与鸭的裂解液等比例混合，取羊 1 μg 总蛋白酶切产物六份，分别添加鸡和鸭的裂解酶切产物 1 μg、100 ng、10 ng、5 ng、1 ng、0.1 ng，模拟不同比例的掺假样品，每份样品进样三次。

3.色谱条件

液相 RSLC U3000，流速 0.2 mL/min，流动相 A 相为 0.1% FA/H₂O，流动相 B 相为 0.1% FA/ACN。色谱柱 Accucore-150-C18，100mm*2.1mm。梯度条件为：

表 1. 色谱梯度

Time (min)	A相 (%)	B相 (%)
0	100	0
0.2	90	10
16	60	40
17	20	80
17.5	20	80
18.5	100	0
20	100	0

4.质谱采集方法

质谱离子源参数设置为：喷雾电压 3500 V，鞘气 38 Arb，辅气 15 Arb，反吹气为 0 Arb，离子传输管温度 275℃，离子源雾化温度为 380℃。质谱采集参数为：采集周期为 0.3 s，碰撞气为 1.5mTorr，Q1 和 Q3 分辨率都为 0.7，源内裂解能量为 0。

实验结果

1.种属特征性多肽的确认

种属特征性多肽寻找验证是肉类掺假实验的关键点，因此我们通过高分辨的 Q Exactive 质谱平台，研究了常见的五种肉类。选出每个物种专属性的多肽，去掉含有酶漏切位点的多肽，鉴定到各个物种相对于其他四种物种专属性的多肽条数为：鸡 339 条，鸭 125 条，猪 426 条，牛 337 条，羊 152 条。其中，鸡和鸭都为鸟纲家禽类，羊、牛、猪为哺乳纲真兽亚纲动物，前两者之间的进化亲缘关系更近，我们同时找到了鸡和鸭相对其他三种兽类专属性的多肽 336 条。Pep003 为来源于鸡/鸭的特征性肽段，图 2 为利用 TSQ Quantiva 在不同掺假比例的样本中定量 Pep003 的 XIC (eXtracted Ion Chromatogram) 图：

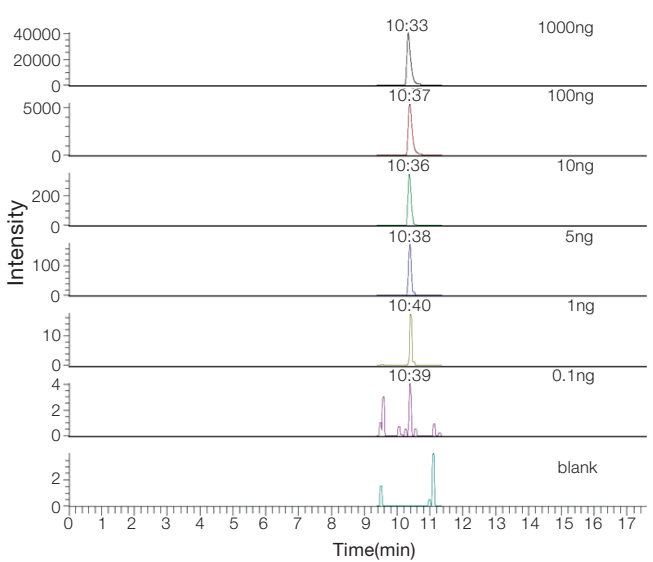


图 2. TSQ Quantiva 在不同掺假比例的样本中定量 Pep003 的 XIC 图

2.定量离子对的选择

依据丰度信息，我们选取了六条鸡与鸭的特征性多肽（不含漏切位点，不含甲硫氨酸，不含 NXS/T 的糖基化基序），导入 Pinpoint 软件，利用 Pinpoint 软件自动导出离子对与碰撞能量信息，先采集一遍样品的信息，利用 Pinpoint 软件生成 schedule 信息，导入仪器自动生成最后的采集方法。方法中的离子对信息见下表：

表 2. 定量离子对和 Schedule 信息

Compound	Retention Time (min)	RT Window (min)	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)
Pep001	8.68	2	Positive	764.9	817.9	29
Pep001	8.68	2	Positive	764.9	919.0	29
Pep001	8.68	2	Positive	764.9	990.1	29
Pep001	8.68	2	Positive	764.9	1089.2	28
Pep001	8.68	2	Positive	764.9	1188.4	27
Pep001	8.68	2	Positive	764.9	1301.5	26
Pep002	10.07	2	Positive	829.9	425.5	32
Pep002	10.07	2	Positive	829.9	912.9	32
Pep002	10.07	2	Positive	829.9	1012.1	31
Pep002	10.07	2	Positive	829.9	1198.3	30
Pep002	10.07	2	Positive	829.9	1297.4	29
Pep003	10.36	2	Positive	997.6	562.6	35
Pep003	10.36	2	Positive	997.6	675.7	35
Pep003	10.36	2	Positive	997.6	1165.2	35
Pep003	10.36	2	Positive	997.6	1264.4	35
Pep003	10.36	2	Positive	997.6	1335.4	34
Pep004	11.01	2	Positive	748.9	432.5	29
Pep004	11.01	2	Positive	748.9	595.7	29
Pep004	11.01	2	Positive	748.9	856.0	29
Pep004	11.01	2	Positive	748.9	1050.2	28
Pep005	13.55	2	Positive	1039.7	475.6	35
Pep005	13.55	2	Positive	1039.7	546.6	35
Pep005	13.55	2	Positive	1039.7	1140.3	35
Pep005	13.55	2	Positive	1039.7	1353.5	35
Pep006	16.92	2	Positive	973.2	404.5	35
Pep006	16.92	2	Positive	973.2	503.6	35
Pep006	16.92	2	Positive	973.2	881.1	35
Pep006	16.92	2	Positive	973.2	994.2	35
Pep006	16.92	2	Positive	973.2	1305.5	35

3. 定量结果与定量下限

通过将鸡肉与鸭肉按不同比例掺加到 1 μg 的羊肉中，利用 SRM 的方法，定量研究能够检测到的最低掺比比例，并利用 Xcalibur 定量模块对上面的多肽分别进行定量，确定线性范围。其中 Pep001 和 Pep003 都能够定量到 5 ng 的最低掺假，剩下的四条能够定量到 10 ng 掺假。即分别能够检测到 0.5% 比例的掺假和 1% 比例掺假，实际标准曲线与线性范围如下：

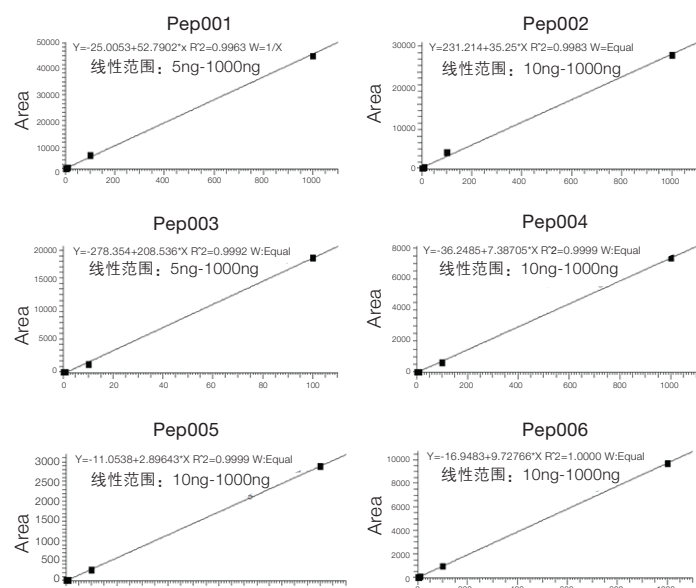


图 3. 定量标准曲线与线性范围

4.利用 QED 进行定性确证

QED (Qualitative Enhanced Data) 扫描功能是指通过监测 SRM 实时采集信号, 利用二级子离子强度触发, 采集对应母离子二级碎裂全扫描谱图, 在定量的同时, 获得更确切的定性信息的功能。通过 QED 技术, 我们采集了 Pep003 的 QED 质谱图, 图 4 为理论多肽 Pep003 实际谱图与理论 b、y 离子匹配结果:

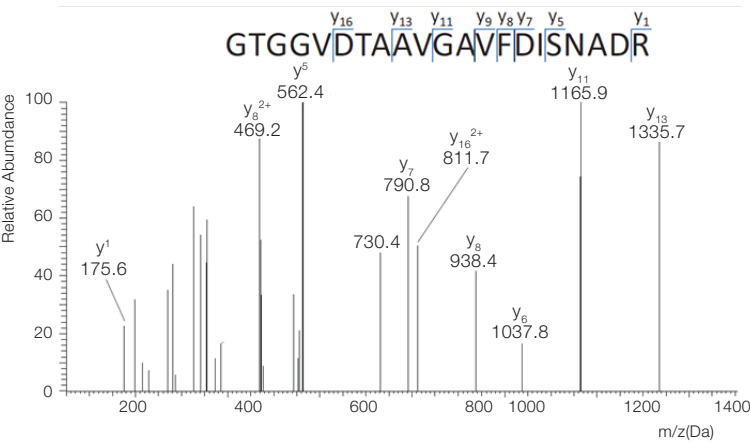


图 4. Pep003 的 QED 全扫描子离子图

讨论

1.监测的专属性多肽的数目

在发现性研究中, 文献中报导的 6 条猪专属性多肽 [4-6], 我们只找到了其中的一条, 还有两条是单氨基酸突变, 另外三条没有找到; 文献中报导的 21 条鸡专属性多肽我们找到了 17 条 [6, 7], 其中有一条文献报道有乙酰化修饰, 而我们检索过程没有加这个修饰。现代家猪由野猪驯化而来, 经过了约 9000 年的长期的驯化与饲养过程中, 亚种间和亚种内核型都发生了很大的差异, 不同的地域或者品系的猪在蛋白表达上都有极大的差异 [8]; 而单氨基酸多态性 (Single amino acid polymorphism, SAP) 是自然界普遍存在的现象, 地域和个体差异都能造成这种结果。基于上面的这些信息, 由于动物基因型的差别, 以及样品处理过程带来的影响, 每一个物种仅选择一条多肽进行定量, 很有可能造成大面积的假阴性的检出结果, 有必要提高每个物种监测的多肽的数目, 降低假阴性的概率。

2.可以利用一些亲缘关系相近的物种之间共有的多肽, 实现同时筛选的目的

鸡与鸭作为常见的肉食性禽类, 相对其他三种肉类来说, 亲缘关系要更近一些, 而且我们确实发现, 它们共有的特异性多肽的条数 (336 条) 甚至大于我们找到的鸭特异性多肽的条数 (125 条)。通过这种方式, 还能够部分的弥补很多物种蛋白数据库不完善的情况 (鸭的蛋白数据库就不全)。同时, 鸡鸭同时共有而又相对兽类特异的多肽, 往往也增加了其他禽类共有的可能性, 一定程度上更经济的部分实现一些未知禽类物种添加的可能性。

结论

我们基于赛默飞全方位的质谱解决方案, 建立了从掺假的发现, 到定量多肽的选择, 以及定量的实现的完整流程, 并对发现的部分多肽进行了掺假实验与定量能力考察。基于实验结果, 对于每一个物种, 我们应该同时监测尽可能多的多肽, 尽量避免假阴性的结果。我们同时选取鸡和鸭的六条特征性多肽, 同时对两种禽类肉掺假进行了监测, 并确定了最低的掺假监测限为 0.5%。考虑到掺假比例的经济性与可操作性, 远远超过了实际监测的需求。

与传统的基于 PCR 和抗体的检测方法相比, 质谱具有大致相当的灵敏度, 但是拥有更好的避免假阴性与假阳性的结果的能力, 且能够避免由于加工所带来的 PCR 或者抗体相关的空间结构破坏所带来的影响。

与上述掺假相比, 还有一种相对来说, 更为严重, 性质更恶劣的掺假——病死肉的掺假。基于上述的思路, 我们认为, 通过进一步系统的研究, 质谱也能够成为一种监测病死肉的手段, 斩断病死肉流入餐桌的魔爪, 与我们全方位的农残筛查与检测手段一起, 为食品安全提供全方位的保障。同时, 利用这种研究方法, 我们还能助力有机肉类产品生产商, 提供从肉类良种选择依据到肉类质量标准建立的可能性。

参考文献:

1. Nakyinsige, K., Y.B. Man, and A.Q. Sazili, Halal authenticity issues in meat and meat products. Meat Sci, 2012. 91(3): p. 207-14.
2. Sentandreu, M.A. and E. Sentandreu, Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. Meat Sci, 2011. 89(3): p. 280-5.
3. <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html>.
4. von Barga, C., et al., New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef. J Agric Food Chem, 2013. 61(49): p. 11986-94.
5. von Barga, C., J. Brockmeyer, and H.U. Humpf, Meat authentication: a new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. J Agric Food Chem, 2014. 62(39): p. 9428-35.
6. Montowska, M., et al., Rapid detection of peptide markers for authentication purposes in raw and cooked meat using ambient liquid extraction surface analysis mass spectrometry. Anal Chem, 2014. 86(20): p. 10257-65.
7. Sentandreu, M.A., et al., A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. J Proteome Res, 2010. 9(7): p. 3374-83.
8. Ramos-Onsins, S.E., et al., Mining the pig genome to investigate the domestication process. Heredity (Edinb), 2014. 113(6): p. 471-84.



Orbitrap 组
学俱乐部



赛默飞小分子质
谱应用技术群

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

上海（中国总部）
上海浦东新金桥路27号7号楼

北京
北京市安定门东大街28号
雍和大厦西楼7层

广州
广州东风中路410-412号
时代地产中心2405-2406, 3001-3004

成都
成都市武侯区临江西路1号
锦江国际大厦1406

沈阳
沈阳市沈河区惠工街10号
卓越大厦3109室

香港
香港新界沙田, 沙田乡事会路138号
新城市中央广场第一座九楼911-915室

武汉
武汉东湖高新技术开发区
高新大道858号A7楼

全国服务热线: 800 810 5118 400 650 5118 (支持手机用户)

AN_C_LCMSMS_7_201506Y

Thermo
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand