

# 基于SCIEX液质联用平台及蛋白质组学技术进行鱼肉打假分析

## Analysis of fish meat adulteration based on SCIEX LC-MS platform and proteomics technology

沈雨萍<sup>1</sup>, 廖建萌<sup>2</sup>, 陈西<sup>3</sup>, 吕小磊<sup>3</sup>, 刘冰洁<sup>3</sup>, 郭立海<sup>3</sup>

Shen yuping<sup>1</sup>, Liao jianmeng<sup>2</sup>, Chen xi<sup>3</sup>, Lv Xiaolei<sup>3</sup>, Liu bingjie<sup>3</sup>, Guo lihai<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 广东海洋大学食品科技学院; <sup>2</sup> 湛江市食品药品检验所; <sup>3</sup> SCIEX中国

<sup>1</sup> College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University; <sup>2</sup> Zhanjiang Institute for Food and Drug Control; <sup>3</sup> SCIEX China

**Key words:** Meat Adulteration; Proteomics; ProteinPilot; Skyline; Characteristic peptide

### 引言

随着社会的发展, 肉类食品的消费量越来越大, 在利益的驱使下, 肉类掺假现象时有发生, 严重损害消费者利益, 同时还有可能引起伦理或宗教信仰等问题。因此有必要建立准确有效的检测方法来确保肉类的真实性, 为规范市场秩序提供技术支撑。

目前, 除传统的感官鉴定外, 肉类鉴定常的方法主要有聚合酶链式反应法 (PCR)、酶联免疫吸附法 (ELISA) 和质谱法 (LC-MS) 等。PCR技术灵敏、高效且适用于多物种的鉴定, 但检测成本高, 且易受DNA降解、复杂基质干扰等问题。ELISA技术特异性强、灵敏度高, 但无法检测变性的蛋白, 且不适用于多个物种的同时检测。LC-MS法是基于蛋白的特征肽的检测方法, 结果不易受加工和外界环境干扰, 且灵敏度和检测通量高, 更适合多物种的同时区分<sup>[1]</sup>。

LC-MS法用于肉类鉴别的难点在于特征肽段的筛选。本文以从六种不同鱼肉中鉴别金鲳鱼为例, 介绍了SCIEX四级杆-飞行时间质谱 (LC-QTOF) 和三重四极杆 (LC-QQQ/QTRAP) 质谱系统联合使用进行特征肽段筛选的工作流程。旨在使复杂的肉类鉴别工作变得更加流程化, 帮助用户更加简单高效的完成肉类打假工作, 维护食品安全。

### 本方案技术特点和优势:

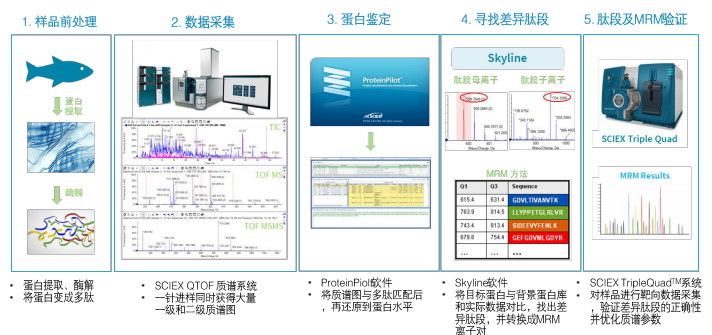


图1. 肉类鉴定通用流程

### 1. 数据全面、有效

利用SCIEX高分辨质谱系统高扫描速度的特点, 加上通过动态背景扣除技术 (DBS) 和带电荷个数过滤可排除系统和基质干扰, 一针进样同时采集到大量特征肽的一级和二级数据, 减少重复进样, 省时省力。

### 2. 强大的软件支撑, 流程简单易操作

ProteinPilot™软件的蛋白检索功能, 可以方便、快速的进行蛋白鉴定。Skyline软件对SCIEX数据兼容性良好, 可直接利用高分辨数据对肽段进行选择, 生成的离子对信息也可直接导入三重四极杆质谱软件建立MRM的数据采集方法。

### 3. 应用范围广

该方法作为一种通用完整流程, 还可以应用于鱼肉以外的其

他肉类的掺假鉴别；并且在找出特征肽段后最终使用三重四极杆进行数据采集，符合更多用户的需求。

## 实验方法

### 1. 样品制备

#### 蛋白提取：

- 分别取金鲳鱼、银骨鱼、腊鱼、鲮鱼、龙利鱼和黄花鱼肉均质后，用正己烷除脂，剩余样品冻干备用；
- 取冻干粉0.1g，加3mL蛋白提取液（7M尿素，2M硫脲，4%CHAPS），超声提取；
- 离心，取上清液，测定溶液中蛋白浓度。

#### 酶解：

- 取100  $\mu$ L蛋白提取液（含蛋白约250  $\mu$ g），置于10K超滤管中，14000 g左右离心约20 min。
- 加入100  $\mu$ L 7M盐酸胍和4  $\mu$ L 1M 二巯苏糖醇（DTT），涡旋震荡使蛋白均匀分布于溶液中，震荡后短时低速离心，使溶液处于管的底部，随后55 $^{\circ}$ C孵育1小时。
- 加入10  $\mu$ L 1M的碘乙酰胺，震荡混匀后低速离心，避光室温放置30 min。
- 14000 g离心至见底，再加入100  $\mu$ L碳酸氢铵溶液（50mM），混匀后，离心至见底。
- 将超滤管取出置于新的接收管中，加入80  $\mu$ L 50 mM碳酸氢铵溶液，加入0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L的胰蛋白酶20  $\mu$ L。之后旋涡震荡，使蛋白溶液均匀分布，短时低速离心至超滤管底部，封口膜封好放置于37 $^{\circ}$ C恒温箱中过夜。
- 离心（14000 g，20min）至见底，再加50  $\mu$ L水，涡旋后，再14000 g离心至见底。取全部滤液至新的1.5 mL离心管中，加入1  $\mu$ L甲酸，混匀后装入进样瓶待分析。

### 2. 数据采集



图2. SCIEX液质联用平台

液相方法：

色谱柱：BioZen Peptide PS-C18 (2.1  $\times$  150mm, 1.6 $\mu$ m)

流动相：A相：0.1%甲酸水溶液

B相：乙腈（含0.1%甲酸）

流速：0.2 mL/min；

洗脱程序：

Time(min)	A (%)	B (%)
0.0	98	2
1.0	98	2
45	65	35
50	5	95
55	5	95
55.1	98	2
60	98	2

### 质谱方法：

离子源：ESI源，正离子模式

扫描模式：TOF MS-IDA-TOF MS/MS ( Peptide )

DP: 80 V

IS电压: 5500 V

CE: Dynamic CE

CES: 5 V

气帘气 CUR: 35 psi

碰撞气 CAD: 7

雾化气 GS1: 45 psi

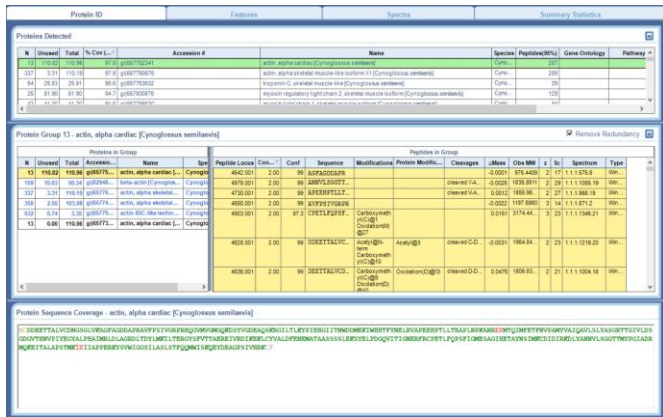
辅助气 GS2: 50 psi

### 3. 蛋白鉴定

从NCBI网站上下载六种鱼的蛋白数据库文件（.fasta格式），使用ProteinPilot™软件对采集的数据进行处理，以龙利鱼为例，1% FDR卡值水平下鉴定到564个蛋白和10644个肽段（图3）。

### 4. 特征肽段寻找

把六种鱼中鉴定出的所有蛋白合并为一个.Fasta格式文件，作为背景谱库；将目标品种鱼肉中鉴定出的蛋白保存为.Fasta格式文件，作为对比谱库；将ProteinPilot™软件生成的.group格式的鉴定结果文件和背景谱库、对比谱库一起导入Skyline软件，软件会根据设置的酶切条件找出特征肽段，并可导出为MRM方法列表（图4）。



Data Level	FDR Type	FDR	ID Yield
Protein	Local	1%	543
		5%	548
		10%	550
Distinct peptide	Global	1%	564
		5%	607
		10%	658
Spectral	Local	1%	8733
		5%	9846
		10%	10359
Spectral	Global	1%	10644
		5%	12179
		10%	13322
Spectral	Local	1%	19405
		5%	21155
		10%	21977
Spectral	Global	1%	22789
		5%	25553
		10%	26297

图3. ProteinPilot™软件蛋白鉴定界面及导出结果表

### 5. 特征肽和特征离子对验证

将导出的MRM方法导入SCIEX Triple Quad™质谱系统，并补充液相条件和源气参数，利用此方法对六种鱼肉样品进行数据采集。采集的数据可以直接导入Skyline软件对数据进行查看和验证（图5），找出确定有差异且无干扰的特征肽段，再次导出为MRM方法列表，用于后期大样本的验证（如有需要，可对方法的质谱和液相条件进行详细优化）。

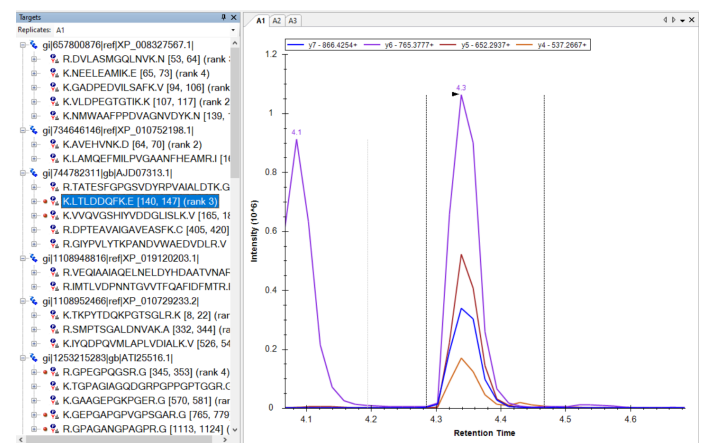
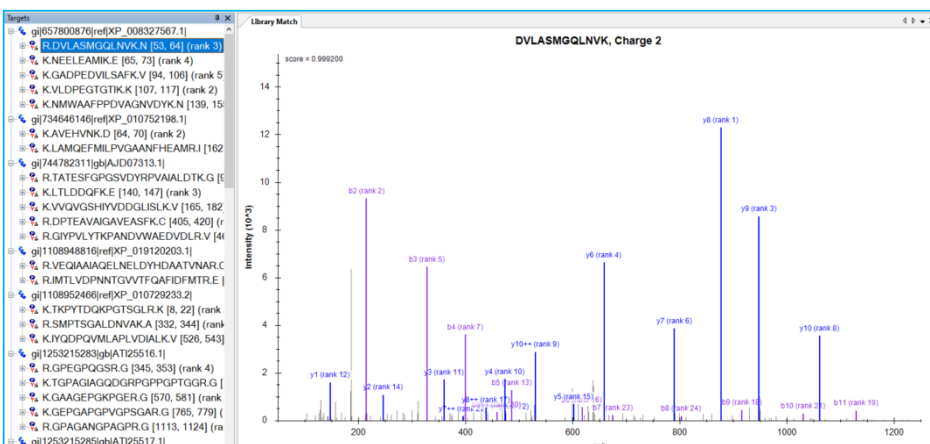


图5. 利用Skyline软件进行数据查看并对特征肽段进行验证



Q1	Q3	Dwell time	ID	DP	CE
485.2391	785.3498	3	gii(657736642)ri	80	22.8
485.2391	670.3229	3	gii(657736642)ri	80	22.8
485.2391	507.2595	3	gii(657736642)ri	80	22.8
485.2391	300.1554	3	gii(657736642)ri	80	22.8
586.3069	959.4541	3	gii(657736642)ri	80	27.7
586.3069	888.417	3	gii(657736642)ri	80	27.7
586.3069	789.3486	3	gii(657736642)ri	80	27.7
586.3069	284.1969	3	gii(657736642)ri	80	27.7
567.7842	1003.521	3	gii(657736642)ri	80	26.8
567.7842	904.4523	3	gii(657736642)ri	80	26.8
567.7842	817.4203	3	gii(657736642)ri	80	26.8
567.7842	589.3093	3	gii(657736642)ri	80	26.8
657.3057	1035.514	3	gii(657736642)ri	80	31.2
657.3057	906.4713	3	gii(657736642)ri	80	31.2
657.3057	819.4393	3	gii(657736642)ri	80	31.2
657.3057	748.4022	3	gii(657736642)ri	80	31.2
555.2955	859.4884	3	gii(657736642)ri	80	26.2
555.2955	746.4043	3	gii(657736642)ri	80	26.2
555.2955	645.3566	3	gii(657736642)ri	80	26.2
555.2955	546.2882	3	gii(657736642)ri	80	26.2
475.2713	836.4512	3	gii(657747015)ri	80	22.3
475.2713	722.4083	3	gii(657747015)ri	80	22.3

图4. 利用Skyline软件进行特征肽段筛选及MRM导出

## 6. 实验结果

以金鲳鱼结果为例，根据上述方法找到金鲳鱼的特征肽段序列为LTLDDQFK，来自pyruvate kinase蛋白，详细信息请见表1。运用该肽段优化后的离子对参数进行六种鱼肉样品的数据采集，从图6可知，六种鱼肉仅金鲳鱼在RT 4.04min出峰，证明该特征肽段可从上述6种鱼类中有效鉴定出金鲳鱼。

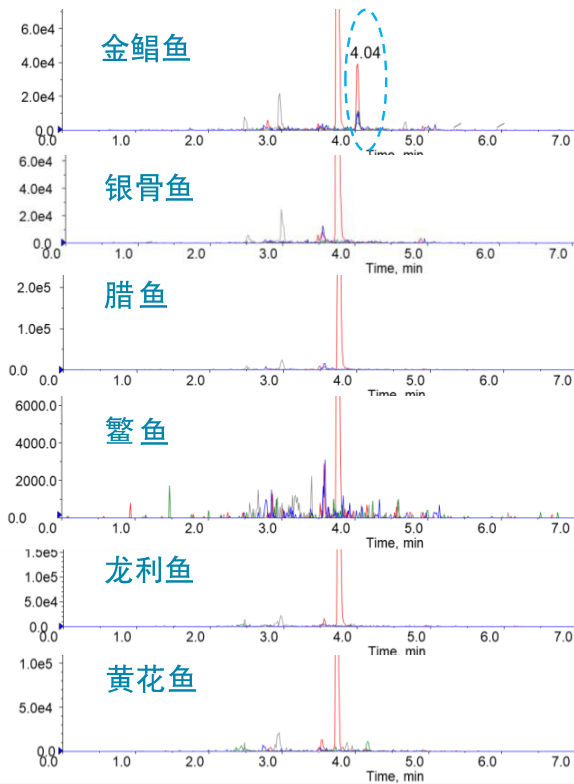


图6. 金鲳鱼特征肽段在六种鱼肉中的提取离子流图 (XIC)

表1. 金鲳鱼的特征肽段信息

蛋白名称	肽段序列	保留时间 (min)	母离子	子离子
pyruvate kinase	LTLDDQFK	4.0	490.3	866.4 765.4 652.3 537.3

## 总结

本文详细介绍了基于SCIEX 四级杆-飞行时间质谱和三重四级杆质谱系统联合使用进行肉类鉴别中特征肽段和MRM离子对的筛选方法。SCIEX高分辨质谱系统灵敏度高、扫描速度快，可以一针进样同时获得足够的高质量的一级和二级质谱数据，为肽段筛选打下了坚实的数据基础。ProteinPilot™软件操作简单功能强大，为蛋白和肽段的鉴定提高效率。本方案详细介绍了从样品前处理到大样本验证的全过程，流程清晰，可操作性强，可以为有肉类鉴定需求的用户提供参考。

## 参考文献

1. 许文娟, 赵曙等. 肉及肉制品掺假鉴别技术研究进展. 肉类工业, 2021年第7期

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15811-ZH-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)