



# 利用 AB SCIEX QTRAP® 4500 系统建立假羊肉的检测方法

## Method Development for Fake Lamb Meat Detection using AB SCIEX QTRAP® 4500 system

### AB SCIEX QTRAP® MIDAS™ 工作流程在假肉检测中的优势

郭立海, 程海燕, 王海鉴, 靳文海, 刘华芬

AB 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 AB 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 AB 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 2g 肉样均质, 加入液氮研磨成粉状, 然后加入蛋白提取液 (7M 尿素, 2M 硫脲, 4%CHAPS), 离心取 0.1mL 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 200µL 50 mmol/mL 碳酸氢铵溶液, 14,000g 离心 20 分钟, 重复 3 次, 最后加入 100µL 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 Eksigent nanoLC-Ultra® 液相系统和 AB SCIEX TripleTOF™ 5600 质谱系统鉴定各物种肉类蛋白质, 每个样品上样 2µg 总蛋白。采用 75µm 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 AB 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 2µg 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 4.6mm\*100mm,

2.6um, 100A 反向 C18 色谱柱, 流速 0.4mL/min, 40°C 柱温。

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

## MIADS™ 工作流程

质谱检测是在配有电喷雾电离源 (ESI) 的 AB 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。

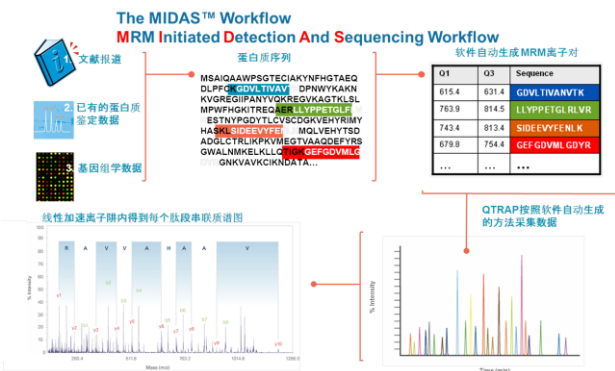


图 1. MIDAS™ 工作流程

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 550°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 2µg, 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

Protein ID	Sequence	Species	Protein Name			
11	88.88	98.88	44.4	PREDICTED: similar to ribonuclease (Gallus gallus)	Gallus gallus	27.1
11	82.58	107.28	43.7	PREDICTED: similar to Tumor Necrosis Factor (TNF) (Gallus gallus)	Gallus gallus	88
16	44.98	48.98	46.9	g1110000468	g1110000468	88
17	44.23	43.38	37.4	g1110000468	g1110000468	88
18	43.98	48.03	46.9	g1110000468	g1110000468	88
18	43.87	43.87	43.8	g1110000468	g1110000468	88
25	38.38	73.48	41.2	g1110000468	g1110000468	88
32	28.98	28.98	28.9	g1110000468	g1110000468	88
34	38.87	28.87	28.8	g1110000468	g1110000468	88
36	28.08	14.88	48.1	g1110000468	g1110000468	88
38	28.13	28.13	28.1	g1110000468	g1110000468	88
44	27.88	27.88	27.8	g1110000468	g1110000468	88
47	28.98	43.87	28.9	g1110000468	g1110000468	88
48	48.41	28.41	28.4	g1110000468	g1110000468	88
50	18.18	18.18	18.1	g1110000468	g1110000468	88
56	17.08	43.21	28.3	g1110000468	g1110000468	88
57	18.28	37.81	37.8	g1110000468	g1110000468	88
58	18.12	18.12	18.1	g1110000468	g1110000468	88
59	18.47	18.47	18.4	g1110000468	g1110000468	88

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

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 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。最后在最全的蛋白数据库 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

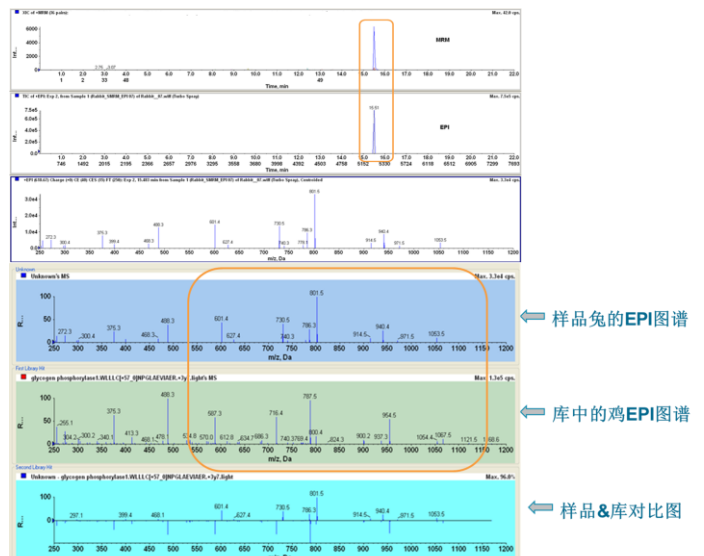


图 3. 鸡的特征 MRM 方法在兔肉样品的 MRM 触发 EPI 数据

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

AB 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

### 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

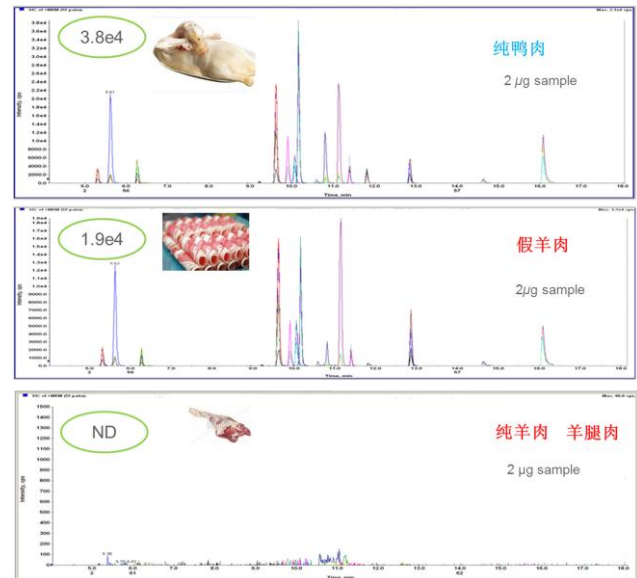


图 5. 超市购买假羊肉卷里检测出很强的鸭特征 MRM 峰

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

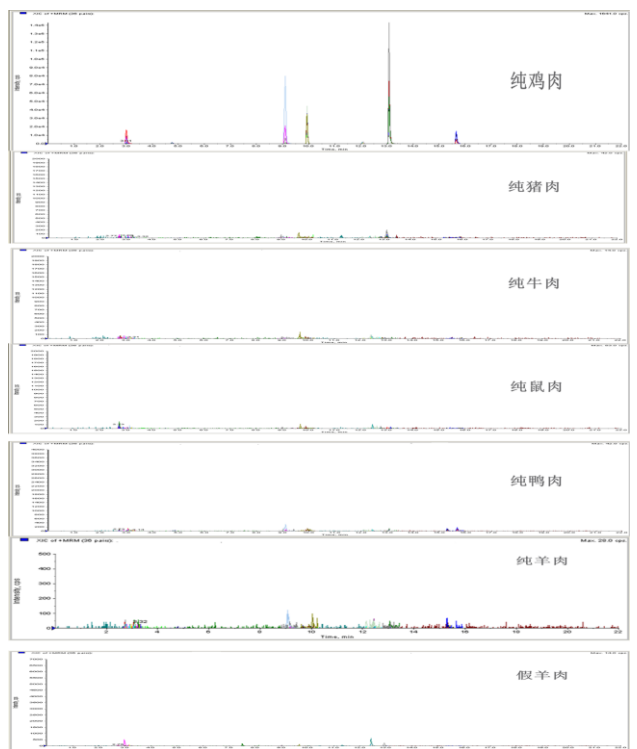


图 6. 在其他样品里没有检测到鸡的特征 MRM 峰

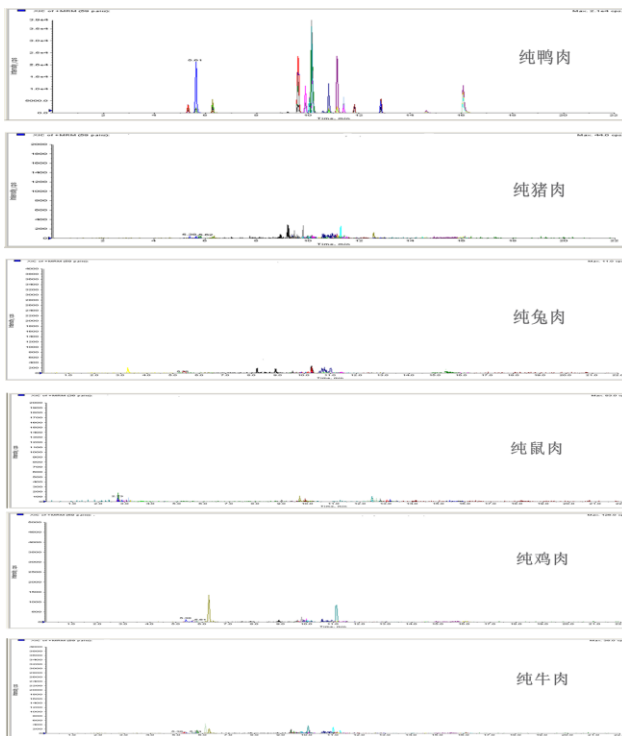


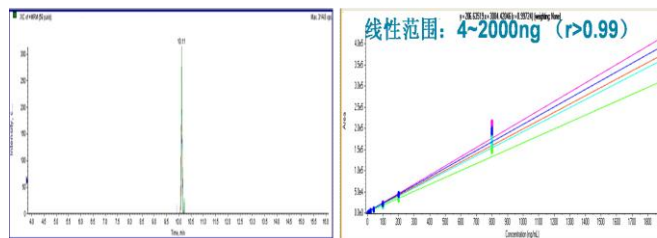
图 4. 在其他样品里没有检测到鸭的特征 MRM 峰

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 MSMS 图谱进一步确认。



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

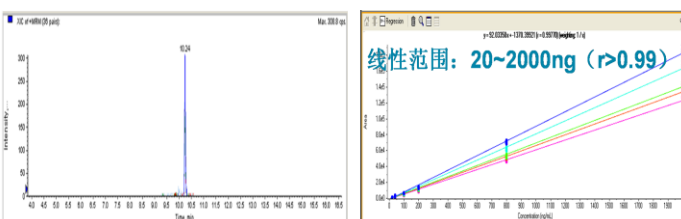


Actual Concentration	Num. Val	Mean	Standard De	Percent CV	Accuracy	Value #1	Value #2	Value #3
4.00	3 of 3	3.903e0	1.721e-1	4.41	97.58	3.957e0	4.042e0	3.710e0
10.00	3 of 3	8.563e0	3.537e-1	4.13	85.63	8.556e0	8.212e0	8.920e0
20.00	3 of 3	2.120e1	2.818e-1	1.33	106.02	2.147e1	2.091e1	2.124e1
40.00	3 of 3	3.979e1	8.071e-1	2.03	99.48	3.927e1	4.072e1	3.938e1
100.00	3 of 3	1.017e2	1.230e0	1.21	101.69	1.027e2	1.021e2	1.003e2
200.00	3 of 3	2.052e2	2.823e0	1.38	102.62	2.083e2	2.027e2	2.047e2
800.00	3 of 3	8.974e2	1.343e1	1.50	112.17	8.862e2	8.937e2	9.123e2
2000.00	3 of 3	1.896e3	1.378e1	0.73	94.81	1.910e3	1.896e3	1.883e3

图 7. 鸭肉掺入羊肉的最低定量检测限

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，证明此羊肉卷里没有掺入鸡肉。

### 羊肉中掺入鸭肉和鸡肉最低定量检测限



Actual Concentration	Num. Val	Mean	Standard De	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3
20.00	3 of 3	6.269e2	1.540e1	2.46	6.090e2	6.357e2	6.357e2
40.00	3 of 3	2.303e3	9.618e1	4.18	2.400e3	2.207e3	2.304e3
100.00	3 of 3	5.208e3	2.096e2	4.02	5.164e3	5.436e3	5.024e3
200.00	3 of 3	1.111e4	5.390e2	4.85	1.073e4	1.087e4	1.172e4
800.00	3 of 3	5.374e4	1.787e3	3.32	5.169e4	5.489e4	5.465e4
2000.00	3 of 3	1.446e5	1.339e3	0.93	1.461e5	1.435e5	1.443e5

图 8. 鸡肉掺入羊肉的最低定量检测限

我们人为的将鸭肉和鸡肉蛋白按比例依次稀释加入到 2 $\mu$ 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 $\mu$ 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 4ng，最低掺入比例为 0.2%，从 4ng 到 2000ng 呈现良好的定量线性（见图 7）。鸡肉最低定量检测限达到 20ng，最低掺入比例为 1%，从 20ng 到 2000ng 呈现良好的定量线性，见图 8。定量重现性良好，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 AB 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 AB 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，并且该方法的通量高，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。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

© 2013 AB SCIEX. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

Publication number:



Headquarters  
500 Old Connecticut Path, Framingham, MA 01701 USA  
Phone 508-383-7700  
[www.absciex.com](http://www.absciex.com)

International Sales  
For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at  
[www.absciex.com/offices](http://www.absciex.com/offices)