



中国食品学报

Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology

ISSN 1009-7848, CN 11-4528/TS

《中国食品学报》网络首发论文

题目: 非标记蛋白组学法鉴别牛肉丸中肉类掺假的方法研究
作者: 王忠合, 胡文梅, 卢燎源, 李伟斌, 李晓婷, 吴家俊, 王军
网络首发日期: 2022-03-22
引用格式: 王忠合, 胡文梅, 卢燎源, 李伟斌, 李晓婷, 吴家俊, 王军. 非标记蛋白组学法鉴别牛肉丸中肉类掺假的方法研究[J/OL]. 中国食品学报.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4528.TS.20220321.1142.006.html>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

非标记蛋白组学法鉴别牛肉丸中肉类掺假的方法研究

王忠合, 胡文梅, 卢燎源, 李伟斌, 李晓婷, 吴家俊, 王军[✉]

(韩山师范学院生命科学与食品工程学院, 广东潮州, 521041)

*通信作者 王军 E-mail: wangjun19811210@163.com

摘要 以猪、牛、鸡、鸭等 4 种肉类的肌肉组织为研究对象, 采用纳升级液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱鉴别肉蛋白, 基于数据依赖型采集模式和多元统计分析对不同的肉蛋白进行相对定量, 探讨非标记蛋白组学法在肉丸掺假鉴定中的应用。结果显示: 液相色谱的洗脱条件影响肽段分离效果和蛋白鉴定数, 从猪、牛、鸡、鸭 4 种原料肉中共分别鉴定出归属于 2715, 889, 659, 1143 种蛋白质的 80554, 33350, 40969, 32923 条特异性肽段。通过序列搜索 (BLAST) 和 UniProt 数据库比对分析, 分别鉴别出猪、牛、鸡、鸭肉源特征肽段 12, 15, 19, 16 条, 主要来源于肌红蛋白、肌球蛋白、清蛋白、载脂蛋白和血红蛋白等。在数据依赖型采集模式下, 4 种肉类来源的 32 条特征肽信号强度高, 重现性好, 可用于肉类种属鉴别和肉蛋白的相对定量。不同蛋白提取剂显著影响牛肉丸中蛋白质的含量以及特征肽段的信号强度 ($P<0.05$), 而色谱分离梯度对特征肽的鉴别及信号强度影响不大。非标记定量蛋白组学测定结果表明: 从不同价位的牛肉丸中鉴别到的主要蛋白含量差异显著 ($P<0.05$)。采用二维正交偏最小二乘判别分析, 可很好地区分纯牛肉和掺假的牛肉丸, 有 69.2% 的牛肉丸样品中含有猪肉或鸡肉, 而鸭肉未检出。

关键词 肉类掺假; 特征肽; 高分辨质谱; 数据依赖型采集

Methods for Quantitative Identification of Meat Adulteration in Beef Meatballs by Label-free Proteomics

Wang Zhonghe, Hu Wenmei, Lu Liaoyuan, Li Weibin, Li Xiaoting, Wu Jiajun, Wang Jun[✉]

(College of Life Science and Food Technology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, Guangdong)

Abstract In this paper, muscle tissues of pig, cow, chicken and duck were selected as research objects, and different meat proteins were identified and quantified by data dependent acquisition mode of nano liquid chromatography-QE high resolution mass spectrometry, and their application in identification of adulterated beef meatball was investigated. Results showed that gradient elution parameters of nano LC significantly affected separation efficiency of peptides and identification of proteins. A total of 80554, 33350, 40969 and 32923 unique peptides belonging to 2715, 889, 659 and 1143 proteins were identified from pig, cow, chicken and duck, respectively. 12, 15, 19 and 16 of marker peptides in pig, cow, chicken and duck meat, mainly from myoglobin, myosin, albumin, apolipoproteins and hemoglobin, were identified by comparison of basic local alignment search tool (BLAST) with UniProt database. In data-dependent acquisition mode, 32 of marker peptides from four different muscle tissues showed high signal intensities and good reproducibility, which indicated that these marker peptides were very suitable for identification of meat species and relative quantification of meat proteins. Different protein buffers significantly affected content of protein and signal intensity of marker peptides ($P<0.05$), while chromatographic separation gradients showed little effect on identification and signal intensity of marker peptides. Label-free quantitative proteomics showed that contents of primary proteins were significantly different in beef meatballs with different price ($P<0.05$), and 69.2% of beef meatballs contained pork or chicken, while duck meat was not detected. Moreover, pure beef and adulterated beef meatballs were easily distinguished on the basis of two-dimensional orthogonal partial least squares discriminant analysis.

Key words meat adulteration; marker peptides; high resolution mass spectrometry; data dependent acquisition

基于三重四极杆的选择反应监测 (Selective reaction monitoring, SRM) 也称为多反应监测

基金项目: 广东省基础与应用基础研究项目 (2018A0303070006); 2020 年度烹饪科学四川省高等学校重点实验室开放基金项目 (PRKX2020Z04)

作者简介: 王忠合 (1980—), 男, 博士, 副教授

网络首发时间: 2022-03-22 10:07:26 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4528.TS.20220321.1142.006.html>

(Multiple reaction monitoring, MRM) 是质谱定量的“金标准”, 在蛋白质定量中广泛使用, 而根据专一性肽段的母离子质量和子离子质量, 最大程度地去除干扰离子, 监测母离子与子离子形成的离子对信号响应, 是目标蛋白验证和绝对定量的有效手段^[1-2]。然而, 随着定量蛋白质组学的深入发展, 样本基质越来越复杂, 目标蛋白丰度越来越低, 容易受到高丰度蛋白的掩盖, 而 SRM 由于质量分辨率低, 难以有效去除复杂基质背景的干扰, 易造成假阳性结果。同时, 随着分析通量的要求越来越高, 一次分析可能需要监测成千上万个离子对, 而由于 SRM 灵敏度的局限, 使得同时监测的离子对数量有限; 此外, 离子对、碰撞能量等条件的优化也费时、费力, 难以满足目标蛋白质组学高通量发展的需要^[3]。四极杆-高分辨串联质谱技术(如 QTOF、QOrbitrap)的发展以及扫描速度的提升, 为目标蛋白定量提供了新的途径。数据依赖型采集(Data dependent acquisition, DDA)方式是一种随机选取丰度最高的前几名离子进行二级碎裂检测, 在非标记蛋白质组学领域具有非常突出的优势, 主要用于过敏原检测^[1,4]、蛋白功能分析^[5]、生物标志物和差异蛋白鉴别等^[6-7]。基于 DDA 策略的非标记蛋白质组学定量方法主要有两种: 一种是信号强度法, 即利用提取一级谱图峰面积或峰强度进行定量; 另一种是谱图计数法, 即通过统计同一蛋白质所有肽段二级谱图总数来确定蛋白质的相对含量, 丰度越高的蛋白质肽段, 被检测到的次数越多, 其得到的二级谱图张数越多; 前者基于一级峰面积或峰强度定量存在共流出肽段干扰定量而影响准确性的问题, 后者基于二级谱图张数定量法则存在低丰度蛋白被掩盖而无法定量的情况。

定量蛋白质组学以定性和定量样本中所有蛋白质为目标, 可分为标记定量和非标记定量, 常用的标记方法为同位素标记试剂法。其中, 同位素标记法准确度高, 而试剂价格昂贵且可标记的样本数量有限; 非标记定量技术无需昂贵的同位素试剂, 耗费低, 对样品酶解产物直接进行质谱分析, 使其最接近原始状态, 能够更好地反映出样品中蛋白质的差异性^[8]。近年来, 肉类掺假事件层出不穷, 随着肉类价格差异不断扩大, 不法商家为了追求利益, 借机用价格低廉的鸡肉、马肉、鸭肉等伪制牛羊肉制品, 使得消费者对肉类及其制品的食品安全问题甚为担忧。要想打击“掺假肉”泛滥的问题, 首先要制定准确、可靠的检测方法。欧盟等国在“马肉风波”后^[9], 批准了对肉制品进行 DNA 检测的分子方法, 其灵敏度高, 操作简易, 检测过程短, 特别适用于原料肉中掺假肉的鉴别。然而, 食品中 DNA 成分复杂, 加之该技术的高灵敏度, 使得应用扩增方法来鉴定物种具有因非特异性扩增而产生假阳性的结果。同时, 由于该方法无法区分同一种属来源的不同产品, 如鸡肉和鸡蛋、牛肉和牛奶等, 因而常采用质谱法鉴别特征肽质量图谱的结果作对比。本文采用纳流液相色谱-四极杆串联轨道阱高分辨质谱仪(nLC-QE)分析肉和肉丸样品, 采用数据依赖型采集模式(DDA)分析筛选肉中的特异性肽段, 定量测定肉蛋白, 对比不同分离条件下特征肽段测定情况, 并根据特征肽鉴别肉的种属以提高鉴别的准确性, 为肉类掺假检测提供技术支持。

1. 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验所用的猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉等购于当地超市, 剔除脂肪和筋膜, 经绞肉机绞碎备用。市售牛肉丸购于当地市场, 自制牛肉丸采用 100%牛肉制成。

质谱级乙腈、甲醇、纯水, Fisher 公司; 碘代乙酰胺(IAA)、测序级胰蛋白酶、质谱级甲酸、色谱级正己烷、二硫苏糖醇(DDT), Sigma-Aldrich 公司; 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、尿素、硫脲、牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G250、碳酸氢铵、三羟甲基氨基甲烷(Tris), 生工生物工程(上海)有限公司; 氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、浓盐酸、无水乙酸钠、冰乙酸、无水乙醇等均为分析纯级; 超纯水(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$), 实验室自制。

1.2 仪器及设备

EASY-nLC 1200 纳升级液相色谱、Q Exactive 四极杆轨道阱高分辨质谱仪(QE), Thermo 公司; JY3002 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 巩义市予华仪器有限责任公司; ZX4 漩涡振荡器, 意大利 VELP 公司; IKA T25 高剪切均质机, IKA 公司; T1901 紫外可

见光分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Direct-Q5 超纯水机, 美国密理博有限公司; SIGMA 2-16P 高速离心机, 西格玛有限公司; Scientz-950E 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技有限公司; HLB 固相萃取柱 (3 mL/200 mg), Waters 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 原料处理及牛肉丸的制备

选择经卫生检疫合格的黄牛后腿肉 1000 g, 剔除脂肪和筋膜, 顺着纹路切成 5 cm×5 cm×5 cm 的立方体, 放入冰箱冷藏至 5 °C。斩拌过程中加入 3 次冰, 添加冰的总质量为所有原料总质量的 15%, 以保证肉糜温度在 10 °C 以下, 加入红薯粉 80 g、味精 4 g、肉弹素 5 g、食盐 25 g 等配料, 斩拌至胶状肉泥。左手抓肉泥, 从拇指和十指间挤出 2.5 cm 左右的肉丸, 右手用调羹接住后放入 35 °C 的温水中, 缓慢升温, 待肉丸中心温度达 80 °C, 肉丸浮起、变色, 捞起。迅速放入 15 °C 水中冷却 15 min。放入冰箱-20 °C 冷冻, 备用。

1.3.2 蛋白提取及含量测定

将瘦肉和肉丸样品切碎, 各取 0.5 g 样品加入 2.5 mL 正己烷, 超声 3 min, 涡旋 5 min, 于 4500 r/min 离心 3 min, 保留沉淀物。重复以上步骤 2 次, 用氮气吹干沉淀物。加入 4 mL 不同的提取液, 旋涡混匀 30 s, 超声处理 3 min, 在 4 °C 下于 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质的含量, 于 4 °C 下保存备用。本实验用的蛋白质提取液主要有以下 3 种, 提取液 1: 0.3 mol/L KCl、0.15 mol/L KH₂PO₄、0.15 mol/L K₂HPO₄; 提取液 2: 6 mol/L 尿素、1 mol/L 硫脲、50 mmol/L Tris-HCl; 提取液 3: 0.1% 三氟乙酸。

1.3.3 蛋白酶解与肽段纯化

取 200 μL 混合溶液或肉丸蛋白酶解液, 加入装有 150 μL 碳酸氢铵 (0.5 mol/L) 的 2 mL 离心管中, 涡旋 30 s, 加入 10 μL DTT 溶液 (500 mmol/L), 混匀后置于 75 °C 水浴中处理 30 min, 以使溶液中的蛋白质变性, 后将提取物冷却至室温。添加 150 mmol/L 碘代乙酰胺使蛋白质烷基化, 最终浓度为 15 mmol/L, 暗处反应 30 min。随后, 添加 50 μL 牛胰蛋白酶溶液 (0.5 mg/L, 用 30 mmol/L NH₄HCO₃ 配制) 和 10 μL 氯化钙溶液 (0.1 mol/L)。立即将酶解液涡旋 1 min, 置于 37 °C 水浴中酶解 12 h。向酶解液中加入 20 μL 甲酸终止反应, 混匀后置于室温中 15 min, 加入水, 使得溶液终体积为 1 mL。取 1 mL 酶解液过活化的 HLB 柱, 并用 0.5 mL 体积分数 1% 的甲酸冲洗空的离心管, 将洗涤液装入小柱, 以定量转移样品^[10]。然后用 2 mL 体积分数 1% 的甲酸水洗涤小柱。最后, 将肽用 1 mL 乙腈/水混合液 (体积比 1:1, 含 0.1% 甲酸) 洗脱到 10 mL 离心管中, 加入洗脱液后将小柱浸泡 10 min, 使得肽能完全洗脱。再加 1 mL 混合洗脱液重复洗脱 1 次。随后, 将全部洗脱液在氮气流中吹干, 色谱分析前将提取物用 0.5 mL 的乙腈/水混合液 (体积比 3:97, 含有 0.1% 甲酸) 复溶, 涡旋 30 s, 过 0.22 μm 有机系滤膜, 上机检测。

1.3.4 色谱及质谱分析条件

将酶切肽段用 Easy-nLC 1200 和 QE 进行 LC-HRMS 分析, 肽段以 800 bar 的压力直接上样到 PepMap 100 C18 分析柱上 (250 mm×75 μm, 2 μm), 再用 300 nL/min 流速进行洗脱, 流动相 A 为体积分数 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为体积分数 0.1% 甲酸和 80% 乙腈混合溶液, 梯度洗脱程序如表 1 所示, 柱温箱温度为 40 °C。离子源为 nano-Flex 纳喷雾离子源; 扫描模式: 正离子; 毛细管电压为 2.0 kV; 离子传输管温度为 320 °C; RF-lens 为 50%; DDA 采集模式, 一级质谱分辨率 70000, 自动增益目标值 (AGC) 为 1×10⁶, 最大注入时间 (IT) 为 100 ms, 扫描范围为 *m/z* 300~1500; 二级谱图分辨率设为 17500, 最大注入时间为 80 ms, 扫描范围为 *m/z* 150~2000, 隔离窗口设为 1.6 u, 归一化碎裂能量 (NCE) 设为 28, 碎裂模式为 HCD, 自动增益值 (AGC) 为 1×10⁵, 采集 top N 设为 20, 其余参数按照默认设置。

表1 纳升级液相色谱分离梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program employed for separation of peptides by nano LC

分离梯度			流动相 A/%	流动相 B/%
梯度 1/min	梯度 2/min	梯度 3/min		
0	0	0	98	2
2	2	2	28	2
40	70	100	68	32
53	83	113	63	37
57	87	117	0	100
60	90	120	0	100

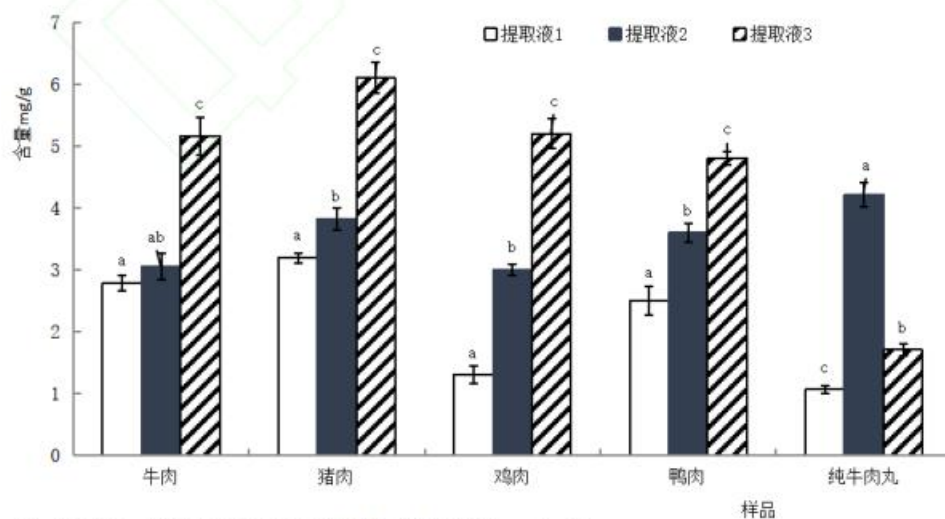
1.3.5 数据库检索及统计分析

试验重复测定 3 次, 结果以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示, 数据统计分析采用 SPSS 17.0 软件进行一维方差分析, 差异显著性采用 Duncan (邓肯) 检验, 检验水平 $P<0.05$ 。肽段 DDA 数据使用 MaxQuant 软件进行搜库鉴定, 检索 UniProt _Bovine (包含 876759 条蛋白序列)、_Chicken (包含 709277 条蛋白序列)、_Pig (包含 709277 条蛋白序列)、_Duck (包含 842876 条蛋白序列) 数据库, 一级质谱中母离子质量误差为: 10 ppm, 二级质谱中碎片离子质量精度: 0.02 u, 酶为胰蛋白酶 (Trypsin), 完全酶切, 漏切数目为 2 个, 固定修饰为半胱氨酸的烷基化 (C, +57.02150 u), 可变修饰为甲硫氨酸的氧化 (M, +15.99492 u), 从鉴定结果中挑选 4 种肉类的特征肽段。非标记定量使用 Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Scientific) 软件的 PWF_QE_Precursor_Quan_and_ LFQ_SequestHT_Percolator 模版搜索和 CWF_Comprehensive_Enhanced Annotation_LFQ_and_ Precursor_Quan 模板组装, 检索 fasta 数据库文件、一级质谱和二级质谱的参数同上, Percolator 结点进行 FDR 值计算, PSM、肽段、蛋白质假阳性率均控制在 1%。非标记定量用 Minora Feature Detector 结点进行色谱峰提取; Feature Mapper 结点进行色谱峰和肽段鉴定结果的匹配, 设置保留时间对齐, 最大的保留时间偏差为 10 min, 最小信噪比为 5; Precursor Ions Quantifier 结点进行定量结果输出, 用 Unique+Razor 肽的母离子信号强度进行定量、蛋白的强度为前三强 (top 3) 肽段强度的总和, 数据输出后导入 SIMCA 13.0 进行主成分分析 (PCA) 和二维正交偏最小二乘判别分析 (O2PLS-DA)。

2 结果与分析

2.1 提取剂对蛋白质提取效果的影响

将牛肉、猪肉、鸡肉、鸭肉 4 种纯肉样品和纯牛肉丸采用不同蛋白质提取剂, 提取得到 5 种蛋白质提取液, 采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量, 结果如图 1 所示。



注: 图中同一样品标注不同小写字母表示差异显著, $p<0.05$

图1 提取剂对不同样品中蛋白质提取效果的影响
Fig.1 Effects of extraction buffer on efficiency of proteins from different samples

由图 1 可知, 纯肉样品的最优提取剂为提取液 3, 而提取液 2 次之, 显著高于提取液 1 的提取效果, 这主要是由于提取液 2 中加入了一定量的尿素, 可促进蛋白质变性, 有助于蛋白质的提取。纯牛肉丸样品的最优提取剂为提取液 2, 而提取液 3 次之, 此结果不同于纯肉样品中蛋白质的提取效果, 可能是由于肉丸加工过程中蛋白质的变性程度大, 并且受到其它组分的影响, 而不利蛋白质的提取。因此, 后续步骤采用提取液 2 提取纯肉和肉丸样品中的蛋白质, 且在处理肉丸样品时增加搅碎时间 3.5 min 和超声强化提取 3 min, 这与已报道文献[11]的纯肉蛋白提取液不适用于肉制品中蛋白提取的研究结果一致。

2.2 蛋白质的分析与鉴别

纯肉样品采用提取缓冲溶液 2 提取蛋白, 酶解后过 HLB 柱, 采用 nLC-QE 高分辨质谱仪分析, 纳升级液相色谱分离系统采用含 2.0 μm 填料的纳米色谱柱, 具有更出色的分离能力, 在更高的压力下缩短了梯度分离时间, 提高了蛋白质和多肽的分析通量和识别率, 将液相不同洗脱时间分离的蛋白质酶解液的质谱数据进行分析, 鉴定结果如表 2 所示。不同液相洗脱梯度对酶解液中蛋白和特异肽的鉴定有显著影响 ($P<0.05$), 在洗脱梯度为 120 min 时, 鉴定到的蛋白质数以及特异肽段数最多, 而不同洗脱梯度对不同种属来源的特征肽数目的鉴定影响不大。本研究建立的数据依赖型采集模式在猪肉、牛肉、鸡肉和鸭肉中分别鉴定到 80554, 33350, 40969, 32923 条特异性多肽, 其中序列相同、修饰不同的肽段视为不同的肽段, 肽段电荷数为 2~7, 这些肽段在蛋白水平上分别归属于 2715, 889, 659, 1143 种蛋白质, 与文献[12]采用纳升级液相色谱-四极杆轨道阱质谱法分离鉴别到的蛋白数量相当, 而远高于文献[13]中采用超高效液相色谱-飞行时间质谱采集的结果。该方法鉴定到的蛋白质有较高的序列覆盖度, 且不同洗脱梯度分离出的特异肽的信号强度分布波动非常小, 如图 2 所示。结果表明该方法的稳定性和重现性较好。由此可知, 非标记定量蛋白质组学技术鉴定到的蛋白质比较全面且可靠, 可用于后续试验。

表2 不同梯度洗脱分离的肉蛋白酶解物中鉴定到的蛋白数和肽段数
Table 2 Identified protein numbers and peptide numbers from meat protein hydrolysates separated by different gradient elution

肉种类	洗脱梯度/min	鉴定的蛋白数	特异肽数
猪肉	60	1352±43 ^a	4161±314 ^a
	90	2019±8 ^b	8361±715 ^b
	120	2294±109 ^b	11969±1733 ^c
牛肉	60	643±83 ^a	2812±155 ^a
	90	695±68 ^a	4265±368 ^b
	120	728±12 ^a	4595±304 ^b
鸡肉	60	405±81 ^a	2818±110 ^a
	90	534±56 ^b	4997±670 ^b
	120	546±25 ^b	5454±145 ^b
鸭肉	60	834±15 ^a	2637±149 ^a
	90	902±53 ^a	3589±327 ^b
	120	947±95 ^a	4216±582 ^c

注: 相同肉类不同梯度下鉴别的蛋白数或肽段数标注的不同小写肩标字母表示具有显著差异, $P<0.05$ 。

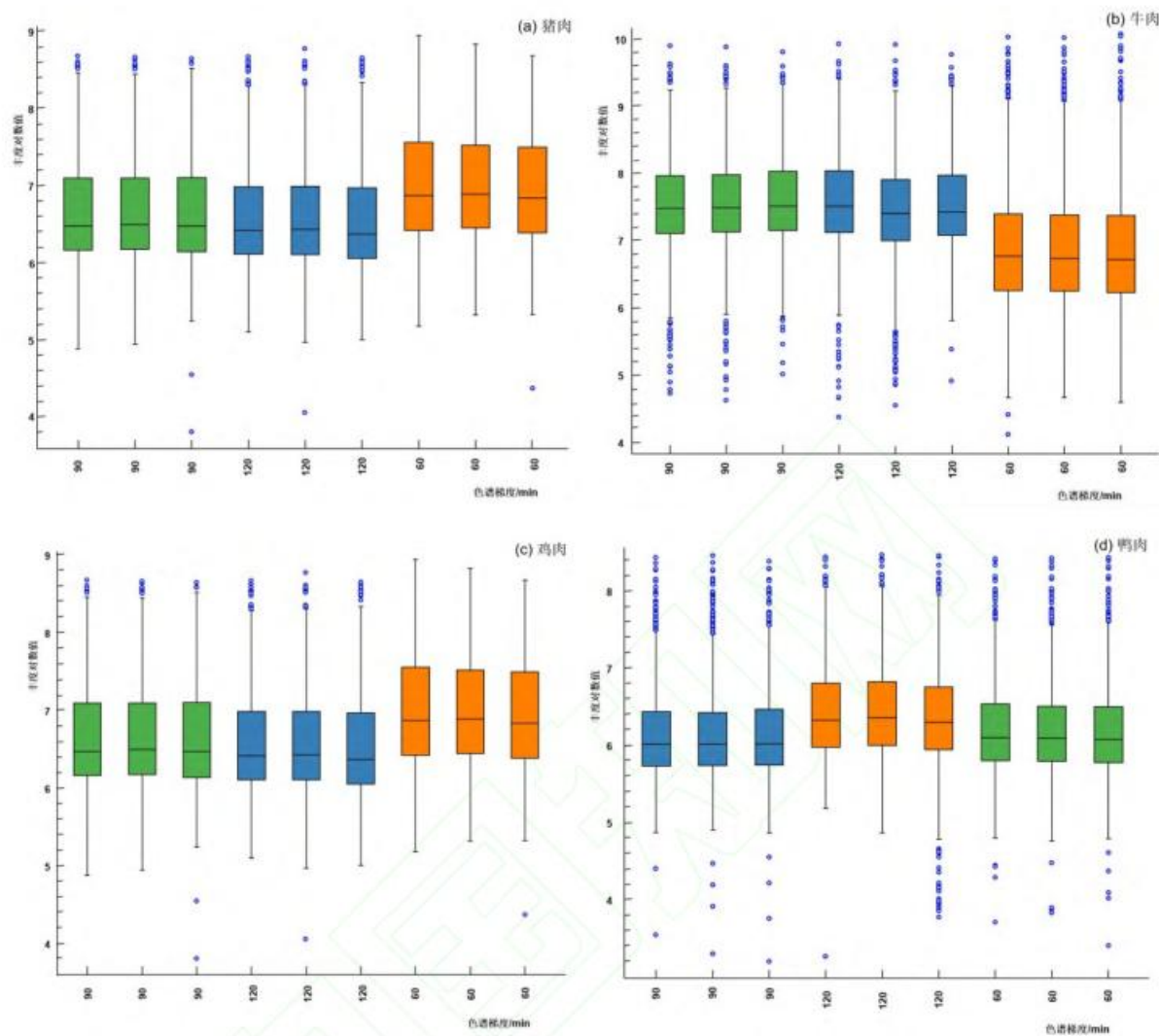


图2 不同洗脱梯度分离的肉类特征肽的丰度分布
Fig.2 Abundance distribution of meat marker peptides separated by different elution gradients

2.3 特征肽的筛选与鉴别

将4种肉类分别用120 min 梯度洗脱重复测定5次建库，用MaxQuant 软件鉴别肽段数据后，将鉴定到的肽段进行UniProt 的BLAST 搜索，分别找出不同种属肉中的特征肽段，结果如表3所示。

表3 特征肽来源及其特性
Table 3 Source and characteristics of marker peptides

特征肽段	蛋白来源	UniProt 登录号	母离子 m/z (偏差/ppm)	保留时间/min	肉种属
AAENTIVVAGNK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	643.3592 ²⁺ (1.7)	20.0	鸡(<i>Gallus gallus</i>)
AAIAQAGYTDK	β -烯醇酶	P07332	554.7858 ²⁺ (0.9)	14.8	
AAPQFLTPLVDR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	664.3721 ²⁺ (1.3)	33.1	
AVNEMGEATTECR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	734.3138 ²⁺ (-6.0)	16.6	
EGGALPAEVQTR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	614.3206 ²⁺ (0.9)	18.9	
GLEDQQVVVGDR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	657.8366 ²⁺ (0.91)	21.8	
LGFSEVEQVMVVDGVK	肌酸激酶 M 型	P00565	932.4797 ²⁺ (2.3)	41.5	
LSVEALNSLEGEFK	肌酸激酶 M 型	P00565	768.401785 ²⁺ (-0.7)	39.1	
LVVELSDPDLPLK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	719.41416 ²⁺ (1.4)	35.6	
NGQLLKPSTK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	543.3193 ²⁺ (2.3)	9.9	
NLTEEMAVLDETIAK	肌球蛋白重链, 成牛骨骼肌	P13538	838.9242 ²⁺ (2.5)	41.1	
NSVEIGADPK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	515.2642 ²⁺ (2.1)	14.5	

SFLEELLTTQCDR	肌球蛋白调节轻链 2, 骨骼肌亚型	P02609	870.4353 ²⁺ (1.3)	41.6	
SPWETEQVDETYVK	肌联蛋白	A6BM71	855.8965 ²⁺ (1.5)	28.8	
SSEGNVLQAFK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	590.3039 ²⁺ (1.6)	25.8	
VAGAALPCAPVK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	612.8421 ²⁺ (0.7)	22.2	
VMIEMDGTEENK	β -烯醇酶	P07322	633.7894 ²⁺ (0.8)	22.1	
VVDVPDPQSVR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	654.3513 ²⁺ (1.2)	22.9	
VVERPGPPQAVR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	P16419	652.8758 ²⁺ (-0.8)	14.6	
ALEDQLSELK	肌球蛋白-1	Q9BE40	573.3061 ²⁺ (0.2)	28.8	
ALPAAIEGPAYNR	热休克蛋白 β -1	A0A1C9EIX3	707.3779 ²⁺ (1.7)	26.6	
DLADEVALVDVMEDK	L-乳酸脱氢酶 A 链	P19858	831.4006 ²⁺ (-0.3)	46.5	
DQLIQNLLK	L-乳酸脱氢酶 A 链	P19858	542.8217 ²⁺ (0)	34.5	
EYEATLEECCAK	清蛋白	A0A140T897	653.3617 ²⁺ (1.3)	21.9	
EYEATLEECCAK	清蛋白	A0A140T897	751.81146 ²⁺ (-0.1)	16.1	
HPSDFGADAQAAMSK	肌红蛋白	A0A1K0FUF3	766.8435 ²⁺ (-1.3)	22.2	
HPSDFGADAQAAMSK	肌红蛋白	A0A1K0FUF3	774.8410 ²⁺ (0.80)	15.9	
LIAPVAEEETR	L-乳酸脱氢酶 B 链	Q5E9B1	614.3326 ²⁺ (-0.1)	21.9	牛(<i>Bos taurus</i>)
LYQGAGGPGAGGFGAQGPK	70 kDa 热休克蛋白 1A	Q27975	845.4208 ²⁺ (-0.3)	24.1	
NALAHALQSAR	肌球蛋白-7	Q9BE39	576.3176 ²⁺ (0.3)	20.3	
NALLQAEVEELR	肌球蛋白重链 15	F1MU39	692.8752 ²⁺ (-0.4)	36.1	
SSGTSYDPVLK	阳离子胰蛋白酶	P00760	577.2904 ²⁺ (0.1)	23.2	
VGGHAAEYGAEALER	血红蛋白 α 亚基	P01966	765.3708 ²⁺ (1.2)	22.1	
YLEFISDAIHVLHAK	肌红蛋白	P02192	935.0171 ²⁺ (0)	46.0	
GEPGPAGSVGPAGAVGPR	I 型胶原 α -2 链	F1SFA7	766.8944 ²⁺ (-1.1)	21.4	
IVDELTAIESNCPR	VI 型胶原 α -3 链	Q1T7A4	808.9011 ²⁺ (-0.4)	30.6	
TSENAVVVVAGNK	肌球蛋白结合蛋白 C2	F1RH20	644.3438 ²⁺ (-2.3)	21.4	
VGGQAGAHGAEALER	血红蛋白 α 亚基	P01965	711.8578 ²⁺ (-1.5)	15.1	
TSGGAGGLGPLR	肌间线蛋白	P02540	521.7866 ²⁺ (-0.7)	35.1	
HFLEELLTTQCDR	未知蛋白	A0A4X1TZM9	831.3991 ²⁺ (1.2)	49.7	
GHHEAELTPLAQSHATK	肌红蛋白	P02189	609.6440 ²⁺ (-0.6)	24.3	
AGTPSPVELSSGLELLR	肌小节结合蛋白 3	A0A287BPK4	863.4748 ²⁺ (-0.3)	82.6	猪(<i>Sus scrofa</i>)
AVEEVEAPPAVPK	肌联蛋白 X6 亚型	A0A480SN35	703.8814 ²⁺ (0.4)	37.2	
AITQDLPGLLGLGLGK	动力型 G 结构域蛋白	A0A4X1VRP4	826.9836 ²⁺ (0.5)	95.8	
SGEGKPEGAGELDFSGLLK	未知蛋白	A0A4X1VUZ8	945.9793 ²⁺ (1.3)	49.5	
SALAHAVQSSR	肌球蛋白-1	Q9TV61	563.8028 ²⁺ (0.7)	25.6	
YGVSPPLVSADVVAK	肌联蛋白	R0K6C9	751.4167 ²⁺ (3.9)	27.6	
VNVADCGAEALAR	血红蛋白 β 亚基	P02115	673.3301 ²⁺ (0.3)	24.6	
VILDKPGPPVGPIR	肌联蛋白	R0K6C9	524.3275 ²⁺ (0.4)	27.7	
VAGHQEEFGSEALQR	血红蛋白 α -D 亚基	P07035	829.4001 ²⁺ (0.9)	19.7	
TYFPHFDLSHGSGQIK	血红蛋白 α -D 亚基	P07035	917.4496 ²⁺ (1.2)	29.1	
DILVAPEIDLDVALR	肌联蛋白	R0K6C9	826.4669 ²⁺ (-0.1)	45.3	
LADNLDLGAATAK	载脂蛋白 A-I	O42296	672.3619 ²⁺ (-0.8)	22.6	鸭 (<i>Anatinae</i>)
TYFPHFDLHPGSEQVR	血红蛋白 α -D 亚基	P07035	965.4663 ²⁺ (1.3)	68.4	
KVAAALVEAVNHIDDIAGALSK	血红蛋白 α -A 亚基	P22740	1103.1160 ²⁺ (0.8)	33.4	
VAAALVEAVNHIDDIAGALSK	血红蛋白 α -A 亚基	P22740	1039.0685 ²⁺ (-0.4)	93.2	
VNVADCGAEALAR	血红蛋白 β 亚基	P02115	644.8198 ²⁺ (1.9)	67.2	
HGVTVLTLQLGK	肌红蛋白	U3IJ58	576.8409 ²⁺ (0.5)	38.1	

FISLLDELQK	载脂蛋白 A-I	O42296	603.3430 ²⁺ (0.7)	26.8
GIPQAAEYQAK	载脂蛋白 A-I	O42296	588.3069 ²⁺ (-0.8)	57.6
DAIAQFEASAVGK	载脂蛋白 A-I	O42296	653.8360 ²⁺ (1.6)	50.2
FMSAVAAVLAEK	α -D-球蛋白	A0A0U2VAM2	683.3583 ²⁺ (0.3)	25.8

肉类掺假鉴别和筛选用的特征肽段要求不易发生修饰，质谱响应强且易被质谱检测到，色谱保留时间适当，氨基酸数在 8~20 之间，热稳定性好，不含半胱氨酸（C）和蛋氨酸（M）的特征肽^[14]，根据条件最终分别筛选出 12 条猪肉、15 条牛肉、19 条鸡肉、16 条鸭肉的特征肽段，各特征肽段的质谱信号较强，峰型较好，图 3 所示为 2 条猪源性特征肽的色谱-质谱图。采用纳升级液相色谱-高分辨质谱法筛选到的特征肽段主要来自肌红蛋白、肌球蛋白、清蛋白、载脂蛋白和血红蛋白等，部分特征肽与文献[2]、[4]、[12]报道的结果一致，部分特征肽为首次鉴别报道，具有物种特异性，可用于肉类掺假鉴别和定量分析不同物种的肉类。

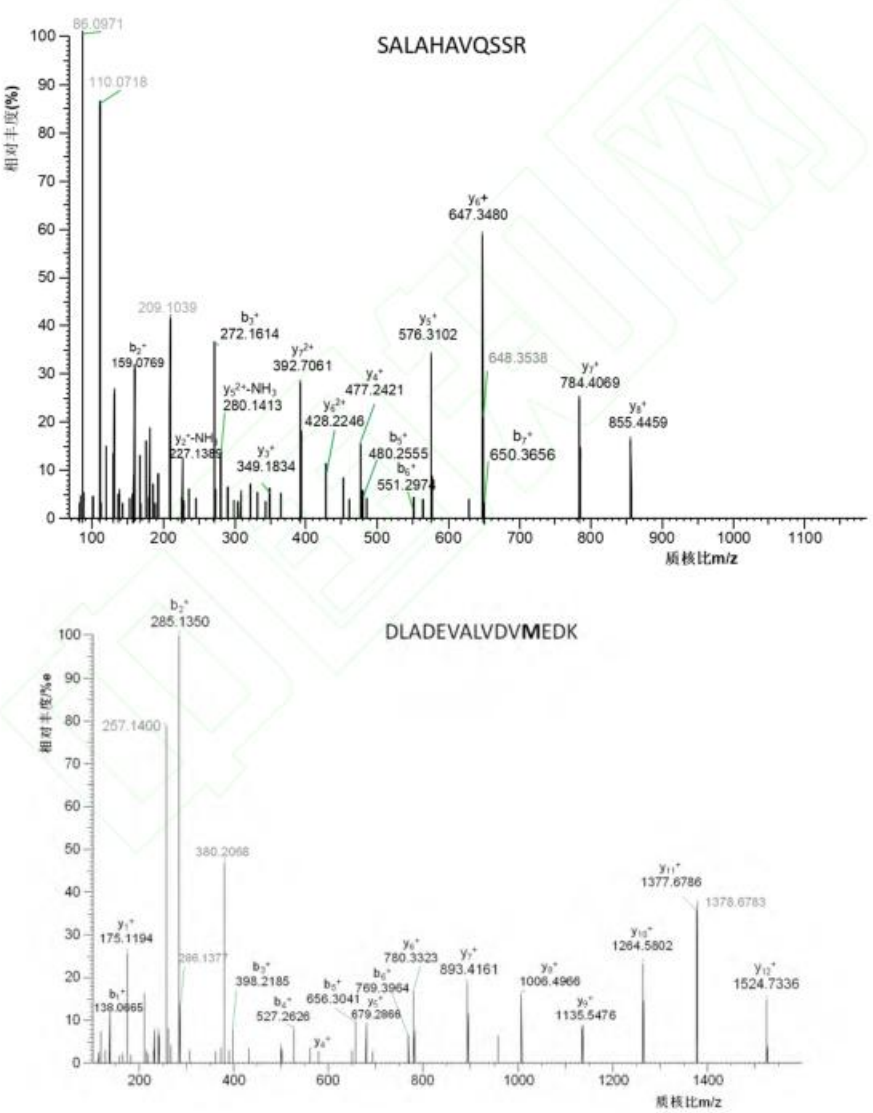


图3 猪源性特征肽 SALAHAVQSSR (m/z 563.8) 和 DLADEVALVDVMEDK (m/z 831.4) 的质谱图
Fig.3 Mass spectrometry of porcine marker peptides SALAHAVQSSR (m/z 563.8) and DLADEVALVDVMEDK (m/z 831.4)

2.4 色谱洗脱梯度及蛋白提取液对特征肽检出数和强度的影响

表4 色谱洗脱梯度对特征肽检出数和强度的影响
Table 4 Effect of elution gradient on identified number and intensity of marker peptides

种属	特征肽序列	蛋白来源	母离子 m/z (偏差/ppm)	idotp	特征肽母离子信号强度($\times 10^7$)		
					梯度 1	梯度 2	梯度 3
猪	GHHEAELTPLAQSHATK	肌红蛋白	913.9608 ²⁺ (0.5)	0.97	-	-	0.54±0.00
	HFLEELLITQCQR	未制蛋白	831.4012 ²⁺ (0.6)	0.98	0.71±0.01	1.40±0.10	8.25±0.13
	SALAHAVQSSR	肌球蛋白-I	563.8018 ²⁺ (1.1)	1.00	12.48±0.03	18.52±0.82	28.02±5.13
	SGEGKPEGAGELDFSGLLK	未知蛋白	945.9758 ²⁺ (1.2)	0.97	-	-	1.40±0.00
	TSENAVVVVAGNK	磷酸甘油酸激酶	644.3488 ²⁺ (1.0)	0.98	1.70±0.00	1.80±0.07	2.45±0.10
	VGGQAGAHGAEALER	异柠檬酸脱氢酶	711.8578 ²⁺ (1.6)	0.98	1.30±0.00	0.78±0.03	1.70±0.03
牛	ALEDQLSELK	肌球蛋白-I	573.3061 ²⁺ (1.0)	1.00	17.54±3.51	20.04±4.27	19.82±2.33
	DLADEVALVDVMDK	L-乳酸脱氢酶	831.4006 ²⁺ (0.6)	0.98	0.65±0.01	0.18±0.00	0.24±0.00
	DQLIQNLLK	肌球蛋白-I	542.8210 ²⁺ (1.6)	0.97	3.89±0.31	3.37±0.21	3.05±0.11
	EYEATLEECCAK	血清白蛋白	751.8105 ²⁺ (0.3)	0.96	1.30±0.95	1.36±0.21	1.06±0.09
	HPSDFGADAQAAMSK	肌红蛋白	766.8435 ²⁺ (0.4)	0.98	12.58±0.64	1.41±1.31	9.70±0.33
	LIAPVAEEETR	L-乳酸脱氢酶	614.3326 ²⁺ (1.2)	0.98	-	0.48±0.02	0.33±0.05
	LYQGAGGPGAGGFGAQGPK	热休克蛋白 70 ku	845.4208 ²⁺ (2.6)	0.95	-	0.44±0.00	0.22±0.00
	NALAHALQSAR	肌球蛋白-7	576.3176 ²⁺ (1.9)	0.98	1.16±0.00	1.81±0.43	0.16±0.02
	AAENTIVVVAGNK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	643.3592 ²⁺ (1.3)	1.00	6.00±0.20	3.70±0.20	3.25±0.15
	AAIAQAGYTDK	β -烯醇酶	554.7853 ²⁺ (1.1)	1.00	17.03±0.82	14.95±0.02	11.32±1.33
	AAPQFLTPLVDR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	664.3721 ²⁺ (0.5)	0.91	2.80±0.13	1.80±0.10	1.55±0.15
	AVNEMGEATTECR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	734.3138 ²⁺ (0.6)	0.97	2.80±0.09	2.20±0.00	1.60±0.00
	EGGALPAEVQTR	肌球蛋白结合蛋白 C	614.3200 ²⁺ (1.5)	0.97	4.00±0.52	3.00±0.00	2.20±0.00
	GLEDDQVVVGDR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	657.8360 ²⁺ (0.5)	0.97	5.00±0.26	2.80±0.20	2.70±0.10
鸡	LGFSEVEQVMVVDGVK	肌酸激酶 M-型	932.4797 ²⁺ (2.3)	0.91	-	0.82±0.02	0.29±0.00
	LSVEALNSLEGEFK	肌酸激酶 M-型	768.4012 ²⁺ (1.3)	0.98	13.04±0.61	10.02±0.03	10.04±0.51
	LVVELSDPDLPLK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	719.4136 ²⁺ (0.1)	0.91	0.12±0.01	0.78±0.00	0.66±0.04
	NLTEEMAVLDETIK	肌球蛋白重链	838.9242 ²⁺ (0.9)	0.98	22.03±0.57	9.00±0.00	6.50±0.10
	NLTEEMAVLDETIK	肌球蛋白重链	846.9217 ²⁺ (0.8)	0.98	0.66±0.02	-	-
	NSVEIGADPK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	515.2642 ²⁺ (1.5)	0.98	2.70±0.19	1.65±0.05	1.21±0.29
	SFLEELLITQCQR	肌球蛋白轻链 2	806.3878 ²⁺ (1.4)	0.99	23.03±1.54	2.55±0.25	2.15±0.45
	SSEGNVLQAFK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	590.3039 ²⁺ (2.2)	0.96	0.90±0.03	0.51±0.01	0.45±0.01
	VAGAALPCAPAVK	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	612.8421 ²⁺ (0.7)	0.98	4.00±0.05	2.45±0.05	2.05±0.05
	VMIEMDGTENK	β -烯醇酶	633.7889 ²⁺ (0.8)	0.99	62.04±3.21	44.01±2.03	38.02±0.04
	VMIEMDGTENK	β -烯醇酶	641.7863 ²⁺ (0.7)	0.96	1.00±0.22	1.20±0.00	0.46±0.00
	VMIEMDGTENK	β -烯醇酶	641.7863 ²⁺ (0.5)	0.94	1.25±0.09	0.78±0.08	0.60±0.00
	VVDVPDPQSVR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	654.3513 ²⁺ (1.1)	0.94	8.20±0.40	4.70±0.30	1.15±0.05
	VVERPGPPQAVR	肌球蛋白结合蛋白 C, 快速型	652.8753 ²⁺ (1.7)	0.98	0.74±0.03	0.63±0.01	0.58±0.08
鸭	LADNLDLGAATAAK	载脂蛋白 A-I	672.3619 ²⁺ (0)	0.98	2.80±0.37	3.07±0.33	2.17±0.39
	TYFPFDLHPGSEQVR	血红蛋白 α -D 亚基	965.4657 ²⁺ (0.6)	1.00	0.31±0.03	0.25±0.02	0.16±0.03
	VAAALVEAVNHIDDIAGALSK	血红蛋白 α -A 亚基	1039.0680 ²⁺ (0.8)	0.91	0.24±0.00	-	-
	VAGHQEEFGSEALQR	α -D-球蛋白	829.4001 ²⁺ (1.0)	0.98	0.20±0.04	1.93±0.17	1.45±0.07
	VNVADCGAEALAR	血红蛋白 β 亚基	673.3301 ²⁺ (0.5)	0.90	1.73±0.13	1.50±0.00	1.08±0.17

注: -, 表示未检出。

由表 4 可知, 不同梯度的色谱分离对 4 种肉类中特征肽的检出数量和信号强度影响不大, 然而随着色谱分离时间的延长, 部分特征肽的信号强度呈下降趋势, 这主要是由于流动相线性变化梯度小、色谱峰展宽所引起。DDA 模式根据设定的阈值, 每次只选择超过阈值的 1 个母离子进行 MS/MS 质谱采集, 离子归属清晰, 然而质谱仪扫描速度有限, 会导致离子漏检。同时, 多肽鉴别重复性分析研究^[15]也表明, 可鉴定出新多肽的速率在 2 次重复样品注射后急剧增加, 而在约 5 次重复注射后逐渐减少, 这主要是由 DDA 采集模式中肽类的半随机取样所引起, 试验中采用多次重复技术采样分析法探讨不同洗脱梯度对特征肽检出及信号强度的影响, 特征肽段的同位素点积值 (idot) 均大于 0.9, 且大

部分肽段的 *idotp* 值接近于 1.0, 与谱图库中的匹配度非常高, 可信度高。猪肉源特征肽主要来自于肌球蛋白、肌红蛋白、酶蛋白, 牛肉源特征肽主要来自于肌球蛋白、血清白蛋白、酶蛋白、热休克蛋白, 鸡肉源特征肽主要来自于肌球结合蛋白 C、酶蛋白、肌球调控蛋白, 鸭肉源特征肽主要来自于载脂蛋白、血红蛋白亚基、球蛋白, 综合考虑特征肽的检出情况与信号强度, 以及缩短分析时间, 提高检测效率等方面, 可选择梯度 1 (60 min) 的色谱分离条件进行肉丸中肉蛋白含量的测定及肉种属鉴定。

2.5 非标记定量蛋白组学法检测肉丸中蛋白的含量及鉴定肉种属

非标记定量蛋白组学不需要经过任何标记, 直接酶解后经过质谱分析采集数据, 利用 Proteome Discoverer 软件对谱图进行归一化后, 可用肽段离子峰强度或峰面积来鉴定和定量蛋白质, 这主要利用了肽段的峰强度或峰面积与其来源的蛋白质的浓度呈正比, 且其定量具有重复性和准确性的优点, 该方法常用于定量分析肉类样品中蛋白质丰度的变化^[16]。采用非标记定量蛋白法鉴别的不同价格牛肉丸样品的结果如图 4 和图 5 所示。纯肉和牛肉丸样品的质谱测定结果经 PD 软件预处理, 导出蛋白的丰度值进行 PCA 聚类分析, PCA 属于无监督的判别分析, 试验中的前 2 个主成分的累计可信度较高, 图 4a 中横坐标为每个样本的第 1 主成分得分值, 纵坐标为每个样本的第 2 主成分得分值, 牛肉和纯牛肉丸样品聚合度很好, 紧密的分布在第 4 象限, 而且不同样品间的差别不大; 猪肉、鸡肉、鸭肉样品的聚合度也很好, 紧密的分布在第 1、2、3 象限, 掺有猪肉和鸡肉的牛肉丸样品分别在第 1、2 象限均匀分布, 部分样品间的聚集度较高, 而部分牛肉丸样品在 PCA 得分图中的区分效果一般, 出现部分混淆情况, 这表明 PCA 方法可以在很大程度上将数据降维, 且降维后的数据能够最大程度地表达原始变量的数据特征而不丢失有效信息, 然而对部分样品的区分效果一般。O2PLS-DA 是常用的有监督判别分析, 是一种多因变量对多自变量的回归建模方法, 在一个算法下实现回归建模 (多元线性回归)、数据结构简化 (主成分分析) 及两组变量之间的相关性分析 (典型相关性分析)^[17-18]。在 PCA 基础上进行 O2PLS-DA 分析的纯肉和不同价格牛肉丸样品的结果如图 5 所示。从图 5a 得分图可知, 猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉和 13 批不同价格的牛肉丸样品可以分成 7 大类, 纯牛肉丸和掺有猪肉或鸡肉的牛肉丸样品可以很好的根据 O2PLS-DA 模型区分开, 且 PCA 中聚集度较差的样品也能可被分开, 13 批样品中共有 4 批为纯牛肉丸样品, 且在检出的掺有其它肉类的样品中有明确标识的仅占 22.2%。由图 5b 载荷图可知, 每 1 个点代表 1 种潜在蛋白标志物, 离中心点和坐标轴越远, 对模型的影响越大, 即对不同样本的分组贡献率越高。

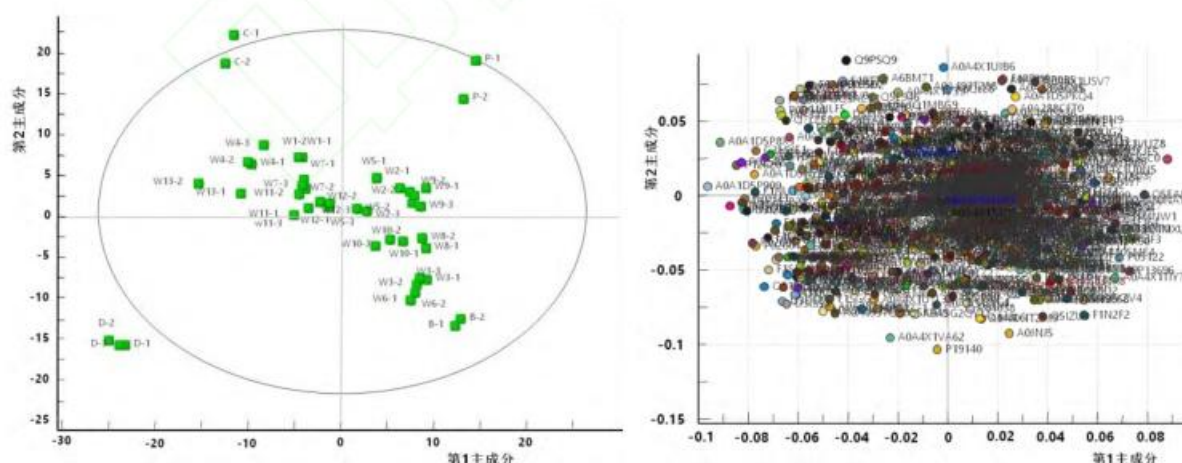


图 4 不同价格牛肉丸样品的蛋白 PCA 得分图 (a) 和载荷图 (b)
Fig.4 Protein PCA scores (a) and load (b) of beef meatball samples with different prices

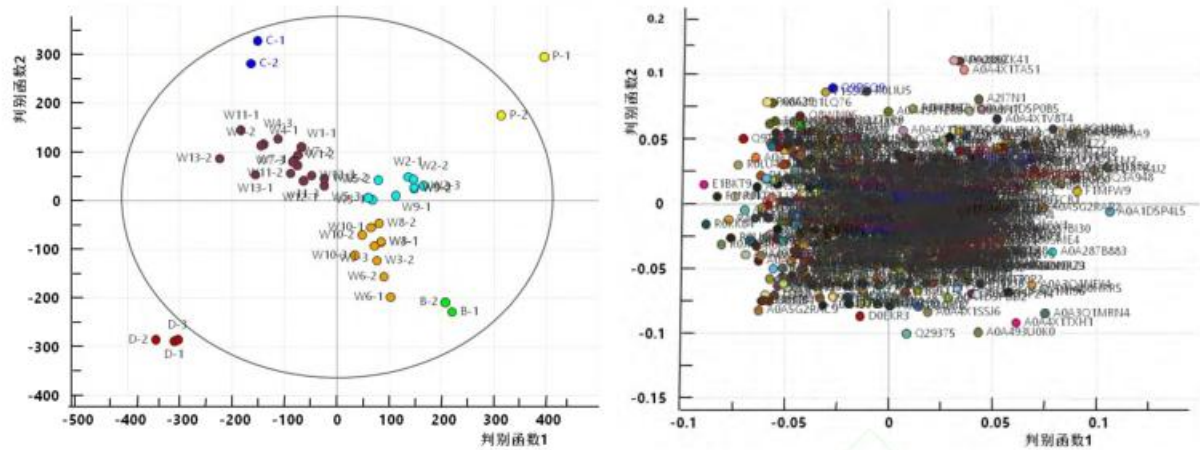


图 5 不同价格牛肉丸样品的蛋白 O2PLS-DA 得分图 (a) 和载荷图 (b)
Fig.5 Protein O2PLS-DA scores (a) and load (b) of beef meatball samples with different prices

从不同种属的肉类样品中筛选出的特征肽段(如表 4)可作为进一步确证肉制品中肉类的来源,从两种牛肉丸样品中鉴别出猪源和鸡源特征肽的色谱-质谱结果分别如图 6 和图 7 所示。牛肉丸样品 W1 中共鉴别出猪源特征肽 3 条,信号强度(NL)非常大,碎片离子中共测得多个 y 离子和 b 离子与理论图谱库匹配程度高,这表明在该牛肉丸样品中混有猪肉成分。牛肉丸样品 W3 中共鉴别出鸡源特征肽 3 条,信号强度(NL)非常大,碎片离子中共测得多个 y 离子和 b 离子与理论图谱库匹配程度高,这表明在该牛肉丸样品中混有鸡肉成分,因此非标记蛋白定量法结合多元统计分析可用于区分样品中肉的种属与分类,特征肽定量法可用于进一步确认鉴别结果与定量分析。

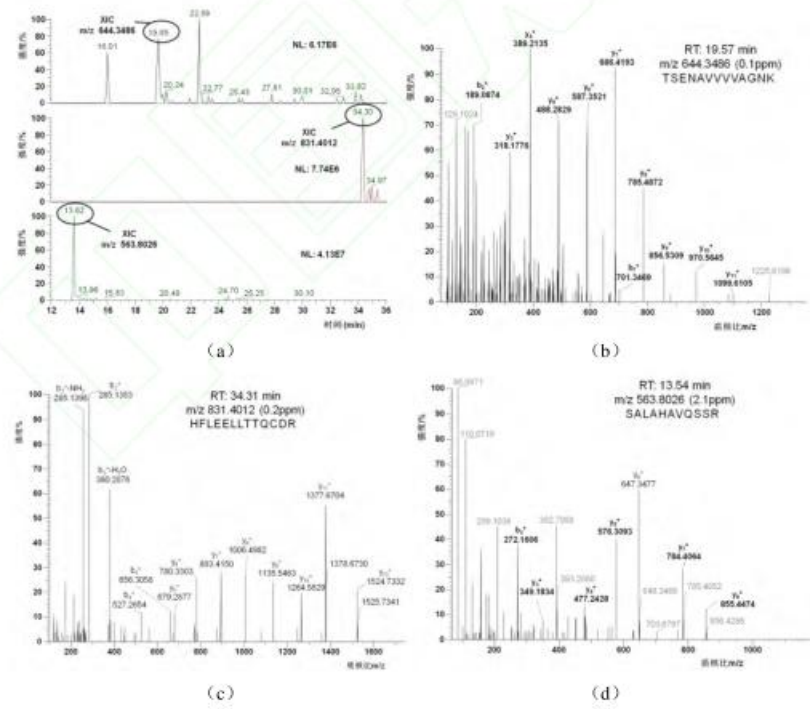


图 6 牛肉丸样品 W1 中鉴别出的猪源特征肽色谱-质谱图
Fig.6 Chromatography-mass spectrometry of porcine-specific peptides identified in beef meatball sample W1

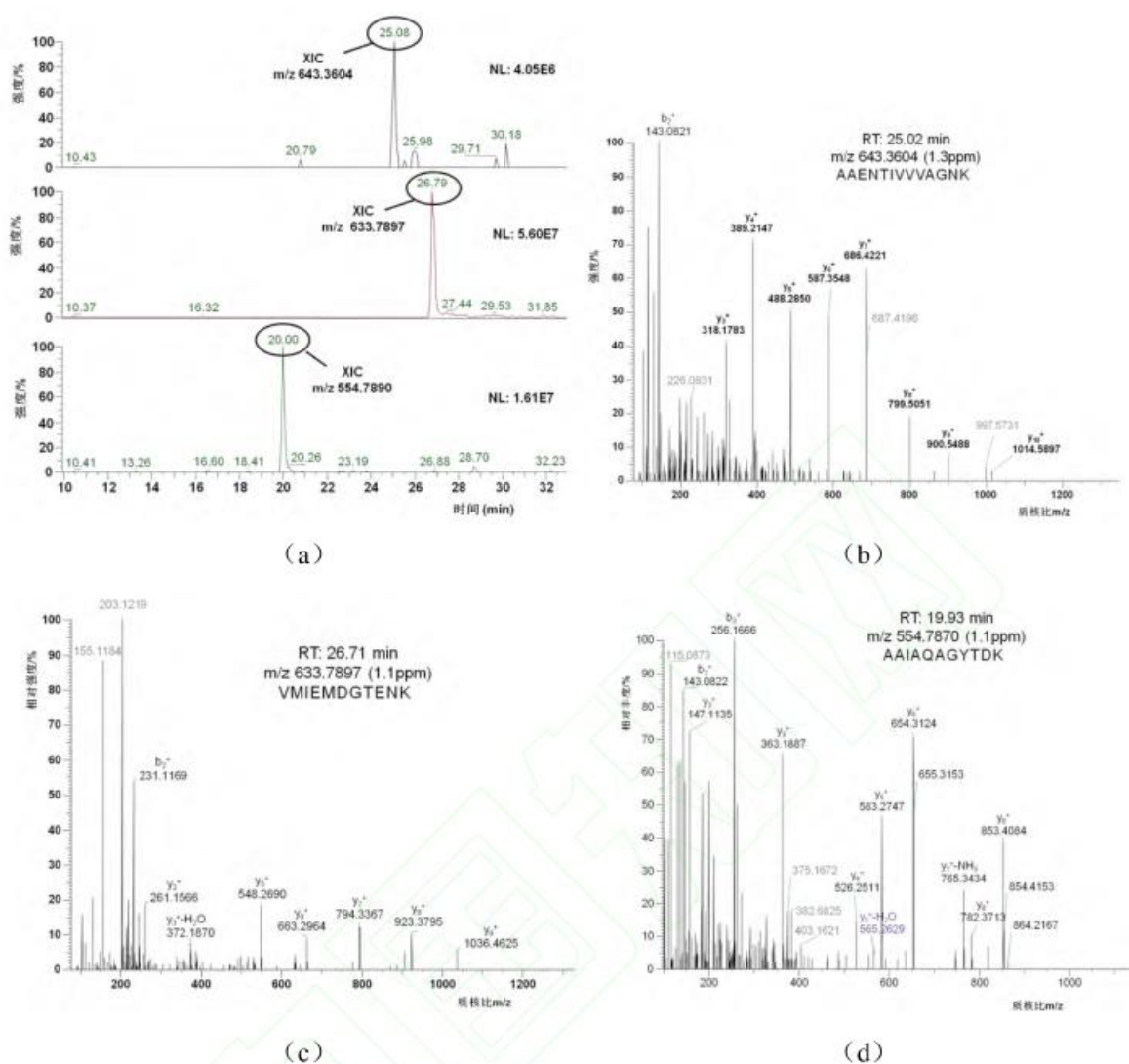


图 7 牛肉丸样品 W3 中鉴别出的鸡源特征肽质谱-质谱图

Fig.7 Chromatography-mass spectrometry of chicken-specific peptides identified in beef meatball sample W3

3. 结论

不同蛋白质提取缓冲液对纯肉和牛肉丸样品中蛋白质的提取效果影响显著 ($P < 0.05$), 且由于牛肉丸在加工过程中蛋白质的变性程度大, 不利于蛋白质的提取, 因此在处理牛肉丸样品时需增加搅碎时间和超声强化提取时间。不同液相洗脱梯度对肉中蛋白数和肽段数的鉴定结果有显著影响 ($P < 0.05$), 在蛋白水平上, DDA 采集模式分别从猪肉、牛肉、鸡肉和鸭肉样品中鉴定出 2715, 889, 659, 1143 种蛋白质, 不同洗脱梯度分离出的特异肽的信号强度分布波动非常小, 表明该方法的稳定性和重现性较好。UniProt 蛋白数据库的 BLAST 算法搜索结果表明, 在猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉中分别鉴定出 12, 15, 19, 16 条不同种属肉类的特征肽段, 不同梯度的色谱分离对 4 种肉类特征肽的检出数量和信号强度影响不大, 在 DDA 采集模式下特征肽的匹配度非常好, 可信度高, 然而部分特征肽的重现性较差。非标记定量结果表明, 纯牛肉丸样品与掺假肉丸样品能很好的鉴别, 所测定的牛肉丸样品中有 69.2% 的样品掺有猪肉或鸡肉, 有明确标识的仅占 22.2%, O2PLS-DA 作为一种有监督的判别分析方法较 PCA 法更适合用于非标蛋白定量法中用于区分牛肉丸样品, 特征肽定量法可进一步确认鉴别结果与定量分析。

参考文献

- [1] ORTEA I, O'CONNOR G, MAQUET A, et al. Review on proteomics for food authentication[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 147(9): 212-225.
- [2] WATSON A D, GUNNING Y, RIGBY N M, et al. Meat authentication via multiple reaction monitoring mass spectrometry of myoglobin peptides[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(20): 10315-10322.
- [3] VIDOVA V, SPACIL Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 964(4): 7-23.
- [4] KORTE R, MONNEUSE J M, GEMROT E, et al. New high-performance liquid chromatography coupled mass spectrometry method for the detection of lobster and shrimp allergens in food samples via multiple reaction monitoring and multiple reaction monitoring cubed[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(31): 6219-6227.
- [5] POLETI M D, MONCAU C T, SILVA-VIGNATO B, et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals muscle contraction and metabolism proteins linked to ultimate pH in bovine skeletal muscle[J]. *Meat Science*, 2018, 145(11): 209-219.
- [6] GALLEGO M, MORA L, CONCEPCIÓN ARISTOY M, et al. The use of label-free mass spectrometry for relative quantification of sarcoplasmic proteins during the processing of dry-cured ham[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196(4): 437-444.
- [7] MONTOWSKA M, FORMAL E. Detection of peptide markers of soy, milk and egg white allergenic proteins in poultry products by LC-Q-TOF-MS/MS[J]. *LWT*, 2018, 87(1): 310-317.
- [8] NEILSON K A, ALI N A, Muralidharan S, et al. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2011, 11(2): 535-553.
- [9] PREMANANDH J. Horse meat scandal - A wake-up call for regulatory authorities[J]. *Food Control*, 2013, 34(2): 568-569.
- [10] BONNET M, SOULAT J, BONS J, et al. Quantification of biomarkers for beef meat qualities using a combination of Parallel Reaction Monitoring- and antibody-based proteomics[J]. *Food Chemistry*, 2020, 317(2): 126376.
- [11] NALAZEK-RUDNICKA K, KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA I, WASIK A, et al. MRM-MS of marker peptides and their abundance as a tool for authentication of meat species and meat cuts in single-cut meat products[J]. *Food Chemistry*, 2019, 283(6): 367-374.
- [12] VON BARGEN C, DOJAHN J, WAIDELICH D, et al. New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in Halal beef[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(49): 11986-11994.
- [13] SARAH S A, FARADALILA W N, SALWANI M S, et al. LC-QTOF-MS identification of porcine-specific peptide in heat treated pork identifies candidate markers for meat species determination[J]. *Food Chemistry*, 2016, 199(10): 157-164.
- [14] HOFFMANN B, MÜNCH S, SCHWÄGELE F, et al. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products[J]. *Food Control*, 2017, 71(1): 200-209.
- [15] BATEMAN N W, GOULDING S P, SHULMAN N J, et al. Maximizing peptide identification events in proteomic workflows using data-dependent acquisition (DDA)[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(1): 329-338.
- [16] GALLEGO M, MORA L, ARISTOY M C, et al. Optimisation of a simple and reliable label-free methodology for the relative quantitation of raw pork meat proteins[J]. *Food Chemistry*, 2015, 182(9): 74-80.
- [17] FONVILLE J M, RICHARDS S E, BARTON R H, et al. The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabonomics and metabolic phenotyping[J]. *Journal of Chemometrics*, 2010, 24(11/12): 636-649.
- [18] 刘晔, 王远兴. 基于 UPLC-QTOF-MS 技术对庐山云雾茶成分分析及真伪判别[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(7): 269-277.
- LIU Y, WANG Y. Analysis of Lu Mountain Clouds-Mist tea's composition and authenticity discrimination based on UPLC-QTOF-MS[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(7): 269-277.