

# 使用LC-MS/MS检测特异性肽段区分三种血制品来源

## Determination of Animal Species Origin from Blood Products by LC-MS/MS

张拓<sup>1</sup>; 朱怀恩<sup>1</sup>

Zhang Tuo<sup>1</sup>; Nick Zhu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, China

**Key Words:** Duck blood, Pig blood, Sheep blood, LC-MS/MS

### 实验信息

#### 样品处理

取1 g血制品食品，切碎后放入50 mL离心管中，在离心管中加入5 mL裂解液（7 mol/L尿素，1 mol/L硫脲）。20000转/分钟匀浆30秒，至血块匀浆为细小碎片悬浮于溶液中，4 °C孵育半小时。吸取样品溶液1 mL至1.5 mL离心管中，14000 × g离心30分钟，取上清溶液200 μL至新的1.5 mL离心管中。澄清溶液中加入100 mM TCEP溶液20 μL，60 °C孵育1小时。待溶液冷却至室温后，加入100 mM MMTS溶液20 μL，室温孵育1小时。加入胰酶1 μg，37 °C孵育过夜。加入10%甲酸溶液5 μL终止酶切反应。14000 × g离心10分钟，取上清液100 μL于进样小瓶中，进行质谱检测。

#### LC-MS/MS条件

使用SCIEX ExionLC超高压液相色谱联用SCIEX TripleTOF® 5600高分辨质谱检测样品酶切产物。流动相A为含0.1%甲酸的水溶液，流动相B为含0.1%甲酸的乙腈溶液。流速0.3 mL/min。

梯度洗脱条件：0-1 min：5% B，1-33 min：5%-35%B，33-34 min：35%-80%B，34-37 min：80%B，37-38 min：80%-5%B，38-40 min：5%B。

色谱柱为：Phenomenex Kinetex 1.7 μm C18 100 × 2.1 mm。进样体积10 μL。

GAS1 55，GAS2 55，气帘气CUR 35，源温 650 °C，电压IS 5000V，DP 100，CE 10，采用IDA模式采集。

使用MRM方法在SCIEX ExionLC超高压液相色谱联用SCIEX QTRAP® 4500质谱系统上检测样品。

流动相A为含0.1%甲酸的水溶液，流动相B为含0.1%甲酸的乙腈溶液。流速0.5 mL/min。

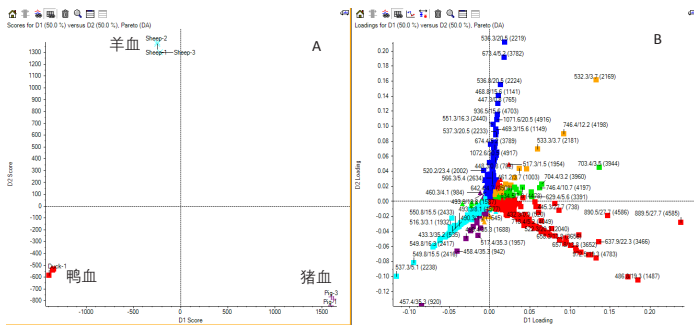
梯度洗脱条件见Table 1。色谱柱为：Phenomenex Kinetex 2.6 μm C18 50 × 3 mm。进样体积5 μL。GAS1 55，GAS2 55，气帘气CUR 35，源温 650 °C，电压IS 5500V。

**Table 1.** MRM检测方法液相梯度洗脱条件。

时间	流速 ( μL/min )	A%	B%
0	500	95	5
0.5	500	95	5
4.5	500	65	35
5.0	500	20	80
5.8	500	20	80
6.0	500	95	5
7.0	500	95	5

### 结果与讨论

采用SCIEX TripleTOF® 5600高分辨质谱检测鸭血，猪血和羊血样品。检测结果经MarkerView™软件分析，PCA图谱（Figure 1）显示三种血制品食品差异明显。经ProteinPilot™软件进行数据库检索，鉴定蛋白并分析序列（Figure 2）。结合两种分析结果，寻找可以区分三种血制品食品的标志物肽段，经BLAST分析，确认这些肽段的序列可用于区分三种血制品食品的种属（Table 2）。



**Figure 1.** MarkerView™软件分析鸭、猪、羊三种样品的PCA评分图 (A) 和特征标志物 (B)。



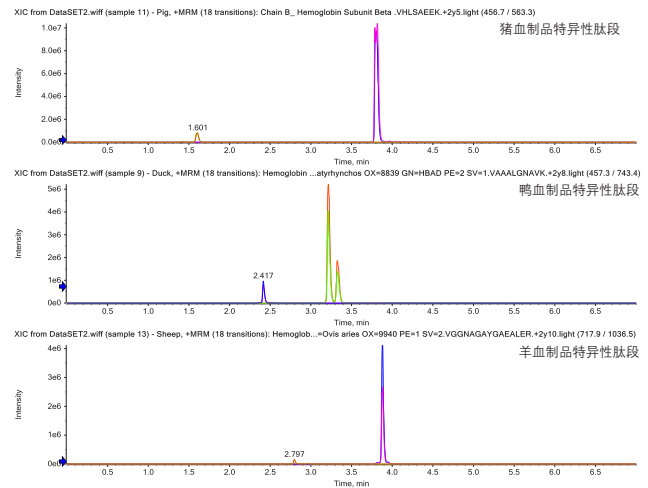
**Figure 2.** ProteinPilot™软件进行数据库检索和序列分析。

**Table 2.** 三种血制品食品的特征标志物MRM离子对。

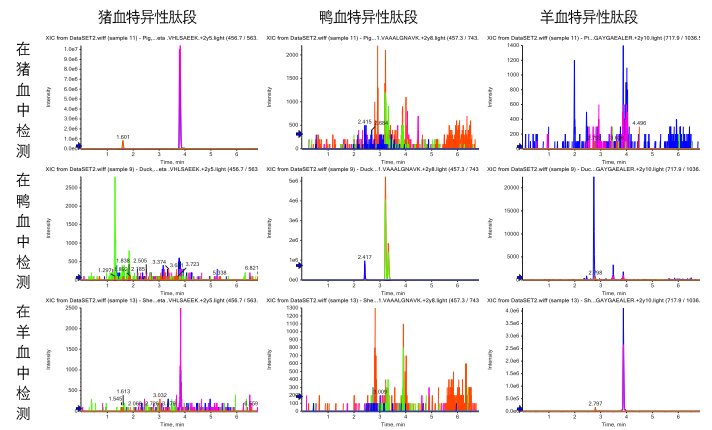
Q1	Q3	Dwell Time	ID	DP	CE
486.78	673.40	10	Pig peptide 1.1	80	22.9
486.78	560.32	10	Pig peptide 1.2	80	22.9
456.74	563.27	10	Pig peptide 2.1	80	21.4
456.74	276.16	10	Pig peptide 2.2	80	21.4
457.28	743.44	10	Duck peptide 1.1	80	21.4
457.28	171.11	10	Duck peptide 1.2	80	21.4
549.79	279.12	10	Duck peptide 2.1	80	25.9
549.79	707.37	10	Duck peptide 2.2	80	25.9
536.28	279.12	10	Sheep peptide 1.1	80	25.3
536.28	680.36	10	Sheep peptide 1.2	80	25.3
717.85	1036.51	10	Sheep peptide 2.1	80	34.2
717.85	908.45	10	Sheep peptide 2.2	80	34.2

根据分析结果，每种血制品食品得到2条特异肽段标志物，每种肽段标志物选取两对离子对，形成MRM方法 (Table 2)。将MRM方法应用于SCIEX QTRAP® 4500 液质联用系统上，检测结果见Figure 3, Figure 4。结果显示三种血制品食品的标志物均具有良好

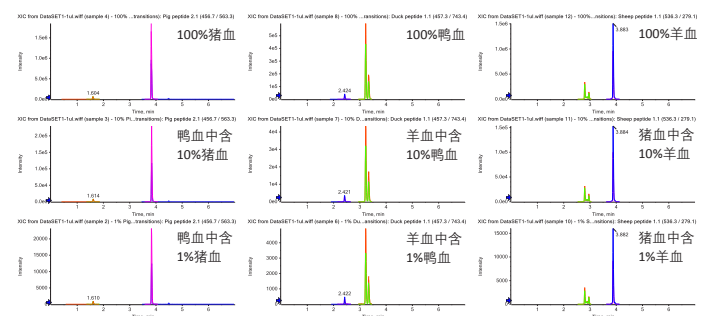
的专属性和特异性，可用于分辨不同的血制品食品。并可用于血制品种属添加的定量检测 (Figure 5)。



**Figure 3.** 三种血制品食品标志物的MRM离子对XIC色谱图。



**Figure 4.** 三种血制品食品特异性肽段分别在不同血制品食品中具有显著的差异。



**Figure 5.** 实际检测添加10%、1%其他种属血的血制食品检测结果。

## 总结

本研究中，获得了鸭、猪和羊三种血制品食品的特异性肽段，并建立了MRM分析方法，可用于血制品食品的种属鉴定和定量。通过对混合样品的验证测定，该方法可在7分钟内检测血制品食品中低至1%的其他种属血制品添加。该方法前处理简单易学，标志物稳定可靠，质谱分析简单快速，可作为一种鉴别血制品食品种属来源检测的通用方法。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd., or their respective owners, in the United States and/or certain other countries.

RUO-MKT-02-10192-ZH-A

AB SCIEX™ is being used under license.

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.



### SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：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

上海公司及亚太区应用支持中心  
地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419 7200  
传真：021-2419 7333

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510 0200  
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488，400 821 3897 网址：[www.sciex.com.cn](http://www.sciex.com.cn) 微博：@SCIEX