

基于蛋白质/肽组学的三文鱼物种溯源

蒋冰雪¹, 张晓梅², 丁 矛², 王 萍³, 张鸿伟^{2*}, 陈桂东^{1*}

¹中国海洋大学食品科学与工程学院 山东青岛 266003

²青岛海关技术中心 山东青岛 266114

³青岛海关风险防控分局 山东青岛 266114)

摘要 不同三文鱼在外观和物种亲缘关系上都十分相近,本研究旨在建立一种大西洋鲑鱼、大马哈鱼和虹鳟鱼的物种溯源方法。基于质谱鸟枪法蛋白质组学,在 95%置信水平上共鉴定得到 912 个蛋白质。经过对不同三文鱼特征蛋白质相应肽段的检测特异性和物种特异性筛选分析,得到潜在的物种特征肽段生物标志物。通过多反应监测的靶向肽组学,进一步验证物种特征肽段生物标志物,得到了大西洋鲑鱼 10 条物种特征肽段、大马哈鱼 2 条物种特征肽段和虹鳟鱼 3 条物种特征肽段,并对市售的商品三文鱼产品进行了方法应用。结果显示,该方法操作方便、准确可靠、特异性好、适用性强,可在常规分析实验室对商品三文鱼产品进行有效的鉴别分析。

关键词 大西洋鲑鱼; 大马哈鱼; 虹鳟鱼; 特征肽段; 质谱; 蛋白质组学; 物种鉴别

文章编号 1009-7848(2023)10-0273-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.10.027

三文鱼是鲑形目 (Salmoniformes), 鲑科 (Salmonidae) 鱼类的商品名, 生长在高纬度冷海水域, 其肉色呈橘红色, 肉质鲜美, 被誉为“冰海之皇”^[1]。目前, 消费量最大的三文鱼有大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)、大马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)。其中, 大西洋鲑鱼为鲑属 (*Salmo*), 口感鲜美且富含多种氨基酸和不饱和脂肪酸, 被誉为“鱼中至尊”; 大马哈鱼和虹鳟同为大马哈鱼属 (*Oncorhynchus*), 肉质较为粗糙, 且生产成本低, 市场价值与大西洋鲑鱼相差甚远^[2]。经过加工切片的 3 种鱼肉在外观上均为白橘相间, 消费者很难凭肉眼辨别。受利益驱使, 市场上时常出现将大马哈鱼和虹鳟鱼贴签大西洋鲑鱼的现象^[3-4]。

目前针对大西洋鲑鱼、大马哈鱼和虹鳟鱼物种鉴别的技术手段, 大多是通过分子生物学和光谱法^[5-6], 特别是 DNA 分析技术最为常见^[7]。Ras-

mussen 等^[8]对种商业鲑鱼和鳟鱼进行 DNA 测序, 确定细胞色素 c 的标准 650 bp 条形码区域氧化酶亚基 I 基因 (*COI*) 可用于区分三文鱼物种。之后, 团队又开发一种基于 *COI* DNA 条形码序列的物种特异性多重 PCR 方法, 用于快速鉴别三文鱼种属^[9]。Li 等^[10]采用环介导的等温扩增技术并结合自猝灭荧光方法进行三文鱼的物种鉴定。然而, DNA 分析不适合深加工食品样本多通道并行的分析。随着质谱-组学技术的快速发展, 具有多目标高通量、高选择性和高灵敏度等特点的质谱分析, 作为一种可选技术在物种鉴别领域得到推广应用和发展^[11]。Yu 等^[12]采用亲水相互作用色谱串联质谱法建立脂质组学方法, 通过统计分析揭示帝王鲑 (*Oncorhynchus tshawytscha*)、大西洋鲑和虹鳟之间的磷脂分子种类差异, 结果确定 *m/z* 802.8 和 *m/z* 834.8 的磷脂分子可作为物种标志物。同样, 蛋白质作为食品中重要的营养组分, 基于质谱平台的蛋白质/肽组学近些年也成为食品物种鉴别的分析手段之一, 广泛应用于肉类^[13-15]、谷物^[16]、水产品^[17-19]、乳制品^[20]、石斛^[21]、燕窝^[22]等食品的物种溯源分析。数据依赖型采集 (Data dependent acquisition, DDA) 可将理论肽段序列直接和实际谱图匹配, 得到蛋白质和肽段的鉴定信息。基于全理论碎片质谱离子连续窗口采集模式 (Sequential window acquisition of all theoretical

收稿日期: 2022-10-24

基金项目: 海关总署科技计划项目 (2020HK209); 青海省重点研发与转化计划项目 (2022NK132); 青岛海关科研项目 (QK201917, QK202101); 山东省重点研发计划科技示范工程 (2021SFGC0701)

第一作者: 蒋冰雪, 女, 博士生

通信作者: 张鸿伟 E-mail: light04@126.com

陈桂东 E-mail: guidong6385@ouc.edu.cn

mass spectra, SWATH-MS) 的高分辨质谱蛋白组学分析可用于目标样本的特征肽段筛查, 基于特征肽段的多反应监测 (Multiple reaction monitoring, MRM) 采集模式的串联四极杆质谱肽组学分析可用于更精准的定性、定量分析^[23-24]。两者的结合使用可有效实现食品的物种溯源。Qiu 等^[25]基于鸟枪法蛋白质组学和 MRM 肽组学分析方法, 对非可食动物和可食肉动物进行研究, 得到 9 种肽作为区分物种的标志物, 以及能用于区分皮毛动物非食用肉的特征肽段。Fornal 等^[26]通过高分辨质谱寻找特征肽段, 并利用三重四极杆质谱建立准确区分鸡、鸭、鹅种家禽肉类的基于特定肽段的 MRM 分析方法。

本研究基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间 (Ultrahigh-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight, UHPLC-Q/TOF) 质谱和超高效液相色谱-串联四极杆质谱 (UHPLC-tandem quadrupole mass spectrometry, UHPLC-QqQ) 的蛋白质组学/肽组学分析策略, 结合生物信息学工具筛选大西洋鲑鱼、大马哈鱼和虹鳟鱼潜在的物种特征肽段, 建立基于 MRM 的鉴别分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)、大马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 购于青岛麦德龙超市, 具有麦哲达产品追溯二维码; 虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 购于青岛共和县龙羊峡养殖基地。所有样品均经过相关形态学鉴定。

LC-MS 级乙腈, 德国 Merck 公司; LC-MS 级甲酸, 美国 Sigma 公司; 碘代乙酰胺 (Iodoacetamide, IAA) 和二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT), 北京索莱宝公司产品; 尿素和碳酸氢铵, 国药集团化学试剂公司; 测序级胰蛋白酶 (比活 18 523 U/mg), 美国 Promega 公司。

1.2 仪器与设备

5600+ Triple[®] TOF 四极杆/飞行时间质谱仪, 美国 SCIEX 公司; 1290 Infinity 超高压液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 5500 QqQ[®] 三重四极杆质谱仪, 美国 SCIEX 公司; Nexera X2 30A 超高压

液相色谱仪, 日本 SHIMADZU 公司; A11 basic 高速研磨仪, 德国 IKA 公司; Bio Spectrometer basic 核酸蛋白测定仪, 德国 Eppendorf 公司; CR 22G II 高速冷冻离心机, 日本 HATACHI 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品前处理 三文鱼样品清理鱼骨和鱼皮, 液氮浴研磨成粉。蛋白质提取参考 Wiśniewski 等^[27]和 Zhang 等^[28]方法。取 2 g 样品, 加入 20 mL 蛋白提取液 (8 mol/L 尿素和 50 mmol/L 碳酸氢铵), 垂直振荡, 离心取上清。取 400 μ L 上清液于分子质量 10 ku 截留超滤离心管 (Millipore, 爱尔兰), 分别加入 8 μ L 1 mol/L DTT, 于 60 $^{\circ}$ C 静置反应 1 h。待温度降至常温, 加入 40 μ L 1 mol/L I-AA, 室温避光 1 h。12 000 \times g 离心 20 min 后, 加入 200 μ L 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液离心以冲洗膜上蛋白, 重复 3 次。再加入 200 μ L 碳酸氢铵溶液作为缓冲液, 按照酶与底物质量比 1:50 加酶, 37 $^{\circ}$ C 下酶解 16 h。12 000 \times g 离心 20 min 收集膜下肽段待测。

1.3.2 UHPLC-Q/TOF 分析 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Advance Bio Peptide Plus C₁₈ column (150 mm \times 2.1 mm, 130 \AA , 2.7 μ m); 流动相 A 0.1% 甲酸-水, 流动相 B 0.1% 甲酸-乙腈, 流速 0.25 mL/min, 洗脱梯度: 0~2 min, 5% B; 2~27 min, 5%~20% B; 27~37 min, 20%~35% B; 37~39 min, 35%~80% B; 39~42 min, 80% B; 42~46 min, 5% B。进样量 40 μ L, 柱温 40 $^{\circ}$ C。

DDA 分析参数: DuoSpray[™] 离子源, 电喷雾正离子模式 (ESI+); 喷雾电压 5 500 V; 质谱 TOF 质荷比 (m/z) 扫描范围: 350~1 500; 碎片扫描触发条件: 质荷比 (m/z) 扫描范围: 350~1 200, 强度阈值 150 cps; 质量精度阈值: 50 mDa; 碎片离子采集质荷比 (m/z) 扫描范围: 100~1 500; 每次采集循环中监测前 20 个最强离子; 选择高灵敏度模式: 离子源参数条件: 雾化气压力: 413.7 kPa, 辅助加热气压力: 344.75 kPa, 气帘压力: 241.33 kPa, 离子源温度 525 $^{\circ}$ C, 解簇电压 100 V, 子离子扫描碰撞能量随着质荷比 (m/z) 动态变动。

SWATH-MS 分析参数: 目标窗口数: 60; 质荷比范围: 350~1350; 碰撞能量扩展: 15 V。进样量: 30 μ L, 其色谱的参数条件与 DDA 方法一致; 质谱

条件中除采集方法不同外,其参数设置与 DDA 采集参数相同。

1.3.3 UHPLC-QqQ 分析 色谱条件: 色谱柱为 Phenomenex Kinetex C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 100 Å, 1.3 μm); 流动相 A 0.1%甲酸-水, 流动相 B 0.1%甲酸-乙腈, 流速 0.35 mL/min。洗脱梯度: 0~10 min, 10%~10.5%B; 10~10.5 min, 10.5%~45%B; 10.5~13 min, 45%~95%B; 13~13.1 min, 95%~10%B; 13.1~15 min, 10%B。柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子反应模式, 检测方式 MRM, 喷雾电压 5 500 V, 离子传输管温度 575 °C; 雾化气压力 413.7 kPa, 辅助加热气压力 344.75 kPa, 气帘压力 241.33 kPa。

1.4 数据生物信息学分析

ProteinPilot™ 软件(版本 5.0.1, AB Sciex)用于

蛋白质鉴定, 蛋白信息数据库“Salmoniformes”下载于 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 总条目数 678 175 (下载于 2020 年 7 月 26 日)。PeakView 软件(版本 2.1, AB Sciex)用于 SWATH-MS 数据分析; 使用 Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 进行 Venn 分析以寻找特征蛋白; Skyline 软件(版本 3.7.0)用于预测 MRM 传输离子对。

2 结果与分析

2.1 蛋白质鉴定及潜在生物标志物的筛选

基于 UHPLC-Q/TOF 采集的 DDA 数据进行蛋白质鉴定在 95%置信水平上鉴定到 912 个蛋白质, 13 615 个肽段, 用于构建 SWATH-MS 分析质谱库和划分 SWATH-MS 采集窗口。大西洋鲑鱼、大马哈鱼和虹鳟鱼的鉴定结果见表 1。

表 1 三文鱼样本的蛋白质和多肽鉴定结果(95%置信水平)

Table 1 Identification of proteins and peptides from salmon samples (Confidence 95%)

序号	样品名	蛋白条目数	多肽条目数	质谱谱图数
1	大西洋鲑鱼	682	11 808	71 093
2	大马哈鱼	549	8 687	57 142
3	虹鳟	513	8 306	56 316

根据韦恩分析(图 1), 大西洋鲑鱼样本鉴定到特征蛋白质 395 个, 大马哈鱼样本鉴定到特征蛋白质 269 个, 虹鳟鱼样本鉴定到特征蛋白质 218 个。

采用 Peakview 软件对 SWATH-MS 数据进行相对定量分析依据 SWATH-MS 相关特征蛋白质的高分辨率提取离子流 (Extraction ion chromatograms, XIC) 图和定量数据, 选取无明显基质干扰、无检测交叉反应的肽段为初步筛选的物种特征肽段。

2.2 物种特征肽段筛选

使用初步筛选得到的物种特征肽段, 在 NCBI 网站采用 Blastp 检索进行物种特异性的数据库验证, 将与备选的潜在特征肽段氨基酸序列 100% 匹配且对应物种具有唯一性作为肽段特异性筛选规则, 得到备选大西洋鲑鱼特征肽段 18 条, 大马哈鱼特征肽段 5 条, 虹鳟鱼特征肽段 10 条, 详见表 2。

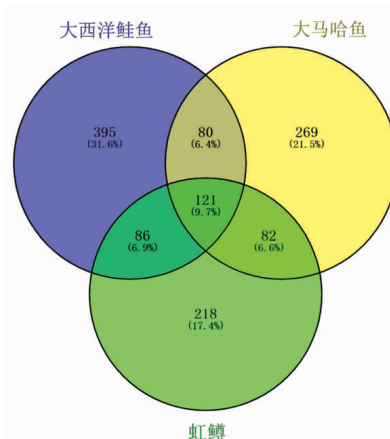


图 1 三文鱼样本蛋白质鉴定结果韦恩图

Fig.1 Venn diagram of protein identification results of salmon samples

2.3 MRM 方法建立

采用 skyline 软件预测上述筛选获得的备选物种特征肽段的 MRM 传输离子对^[29], 基于 UHPLC-

表2 备选肽段信息

Table 2 Information about alternative peptides

序号	肽段	蛋白质 GI 号
	大西洋鲑鱼	
1	VDINEVGPLALAR	gil929076273
2	VEEVDAMDAGK	gil213515556
3	IHSEILVATLTK	
4	YHESVGNIR	gil929275161
5	IVEAPGPPEVVK	
6	EFDDLPSFELQSDAVR	gil929274646
7	AAAPAPAPEPEVVAAPPLDLSTVK	gil213514656
8	VLNNMEIGNSLYDDEGAK	gil929235375
9	VNFMANIPALDLSGDQAMLMEMLKK	gil929123804
10	TGDWFNILEHYAR	gil213511568
11	EEEVEDVLSNLR	gil929094737
12	VPFIVGSPDDVNEFLDFVKK	gil213510876
13	GDVVSILLELQAK	gil431610
14	MIVEDSSLNHEYLPILGLPELR	gil929069360
15	LITHVLVGEPVCSR	gil213510970
16	LFAEHPETLTLFPK	gil221221136
17	INIQDEILSLAGPHSIIGR	gil57908856
18	EQFLVSLPDGSEIHFPNR	gil303660111
	大马哈鱼	
1	AHVSEAVANSVR	gil1695879275
2	VGGTATLTLPLAK	gil1695910459
3	LMLGETNPADSQPGSIR	gil1695931074
4	SHGLQEVYFDSNSWK	gil296040357
5	ISDIDVDLYTEDHGCVVK	
	虹鳟鱼	
1	PAEASGSAFSADQIEDFK	gil1211381006
2	VLAPVVDVLLDIPTYLEVPDFQR	gil1211412383
3	ATDFVVSCKPGTFK	gil642108671
4	DAAPAVAGAPGAPISVK	gil1211256714
5	SAGEIEEYQR	
6	ALDPAVLAVLR	gil1211241119
7	ALANNTLLEIK	gil1211338078
8	LVAESAELVK	gil95931876
9	MLTLTGPDSIIGR	gil642045063
10	RESVFAIQYNIR	gil1211283706

QqQ 质谱建立分析方法, 优化分离梯度洗脱程序和流速确定相关肽段 MRM 采集方法的最佳碰撞能量、解聚电压和保留时间。具体优化参数结果见表 3。基于响应强度、交叉特异性和色谱峰形, 最

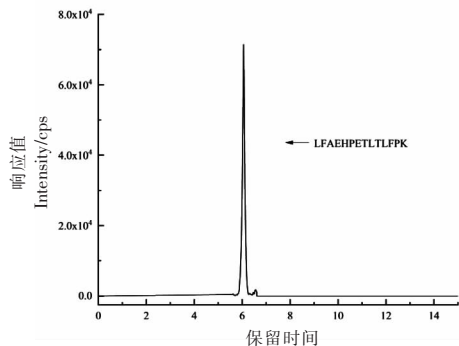
终筛选得到满足质谱鉴别的大西洋鲑鱼物种特征肽段 10 条、大马哈鱼物种特征肽段 2 条、虹鳟鱼物种特征肽段 3 条, 各物种特征肽段组 MRM 提取离子流图, 如图 2、图 3、图 4 所示。

表 3 三文鱼物种特征肽段分析结果及 MRM 参数

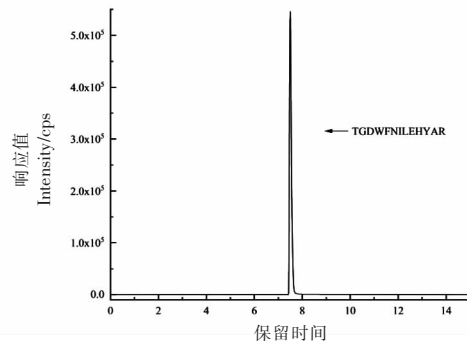
Table 3 Analysis results and MRM parameters of marker peptides of salmon species

序号	肽段(对应物种)	前体离子 (<i>m/z</i>)	碎片离子 (<i>m/z</i>)	碎片 离子 类型	解聚 电压/V	碰撞 能量/V	保留 时间/ min
1	VEEVDAMDAGK(大西洋鲑鱼)	582.266	935.4	y9	73.6	29.8	2.75
			806.4	y8			
			707.3	y7			
2	YIIESVGNIR(大西洋鲑鱼)	582.325	887.5	y8	73.6	29.8	4.83
			774.4	y7			
			645.4	y6			
3	IVEAPGPPEVVK(大西洋鲑鱼)	617.856	822.5	y8	76.2	31.1	3.71
			725.4	y7			
			668.4	y6			
4	EFDDLPSFELQSDAVR(大西洋鲑鱼)	934.439	1 248.6	y11	99.2	42.5	6.44
			1 151.6	y10			
			1 064.5	y9			
5	AAAPAPAPEPEVVAAPPPLDLSTVK(大西洋鲑鱼)	803.441	1 066.6	y10	89.7	41.3	5.81
			969.6	y9			
			872.5	y8			
6	VLNNMEIGNSLYDDEGAK(大西洋鲑鱼)	991.462	1 168.5	y11	103.4	44.5	5.11
			1 111.5	y10			
			997.4	y9			
7	TGDWFNILEHYAR(大西洋鲑鱼)	541.263	901.5	y7	70.6	27	7.50
			788.4	y6			
			675.3	y5			
8	EEEVEDVLSNILR(大西洋鲑鱼)	772.894	1 058.6	y9	87.5	36.7	7.81
			929.5	y8			
			814.5	y7			
9	LITHVLVGEVGSR(大西洋鲑鱼)	492.956	962.6	b9	67.1	24.4	4.17
			833.5	b8			
			701.3	y7			
10	LFAEHPETLTLFPK(大西洋鲑鱼)	548.299	1 045.6	y9	71.1	27.4	6.09
			765.4	y13			
			691.9	y12			
11	AHVSEAVANSVR(大马哈鱼)	620.326	1 031.5	y10	76.3	31.2	2.04
			932.5	y9			
			845.4	y8			
12	VGGGTATLTLPLLAK(大马哈鱼)	706.430	969.6	y9	82.6	34.3	6.74
			868.6	y8			
			755.5	y7			
13	ATDFVSKPGTFK(虹鳟)	466.254	863.5	y8	65.1	23	3.87
			764.4	y7			
			549.3	y5			
14	DAAPAVAGAPGAPISVK(虹鳟)	746.412	967.6	y11	85.5	35.7	3.84
			896.5	y10			
			768.5	y8			
15	SAGEIEEYQR(虹鳟)	591.275	1 023.5	y8	74.2	30.1	2.52
			837.4	y6			
			724.3	y5			

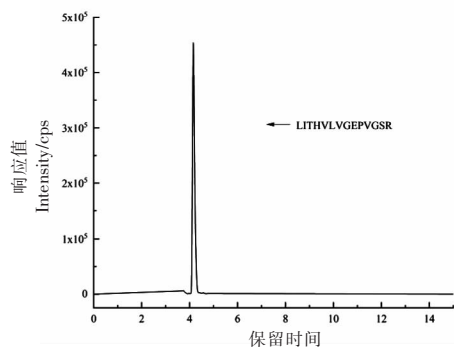
注:驻留时间均为 50 ms。



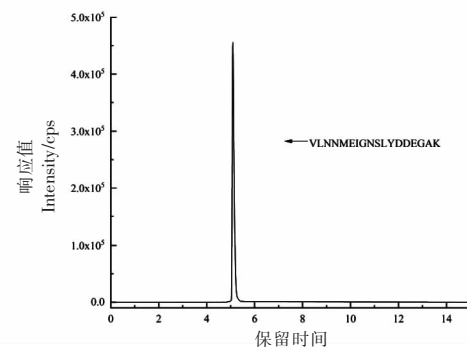
(a)



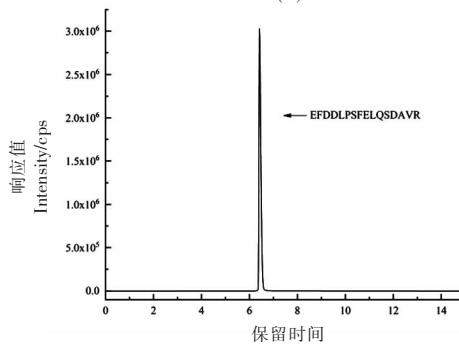
(b)



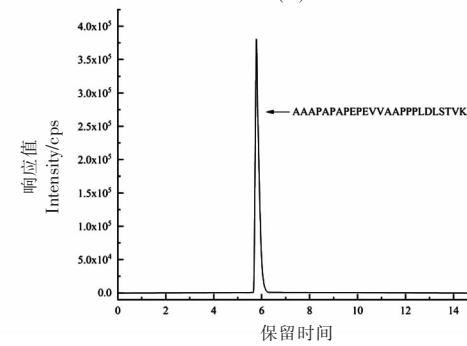
(c)



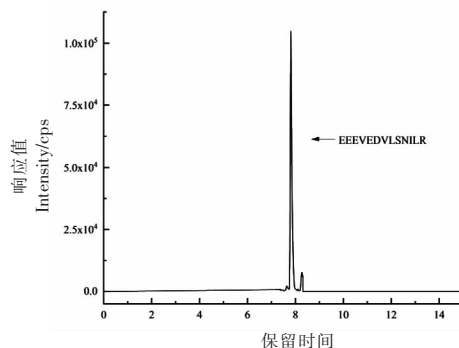
(d)



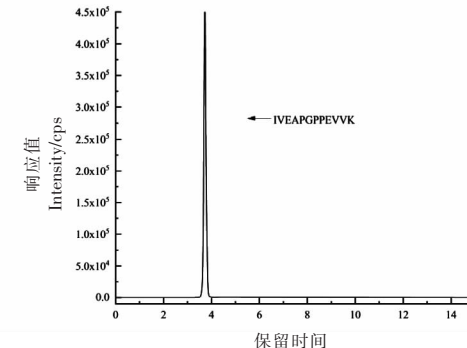
(e)



(f)



(g)



(h)

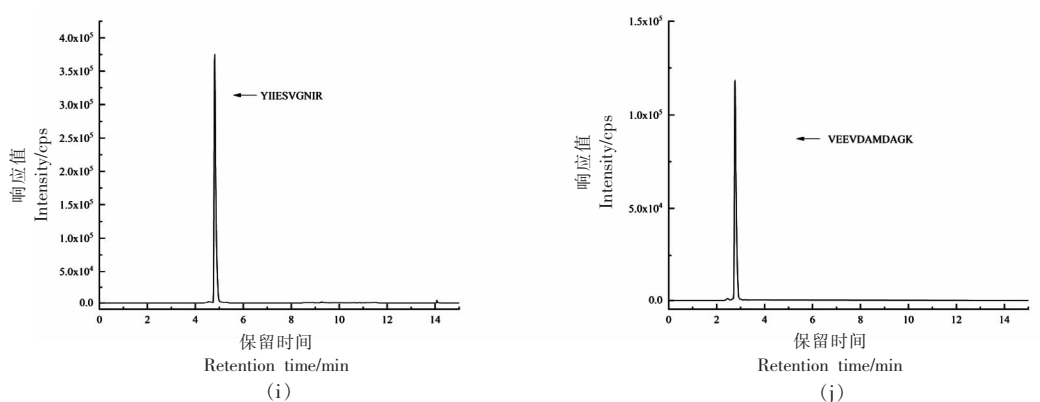


图 2 大西洋鲑鱼物种特征肽段提取离子流图
Fig.2 XICs of marker peptides of *Salmo salar*

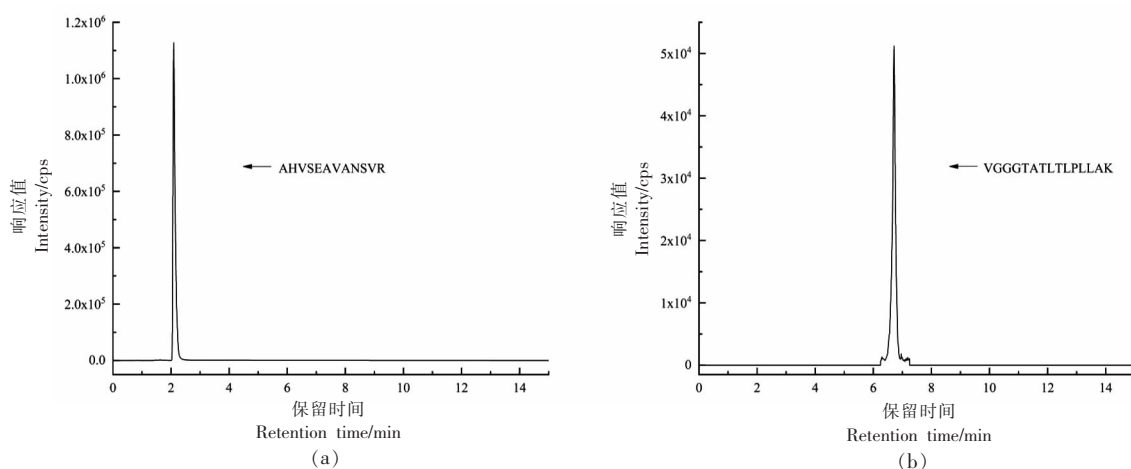


图 3 大马哈鱼物种特征肽段提取离子流图
Fig.3 XICs of marker peptides of *Oncorhynchus keta*

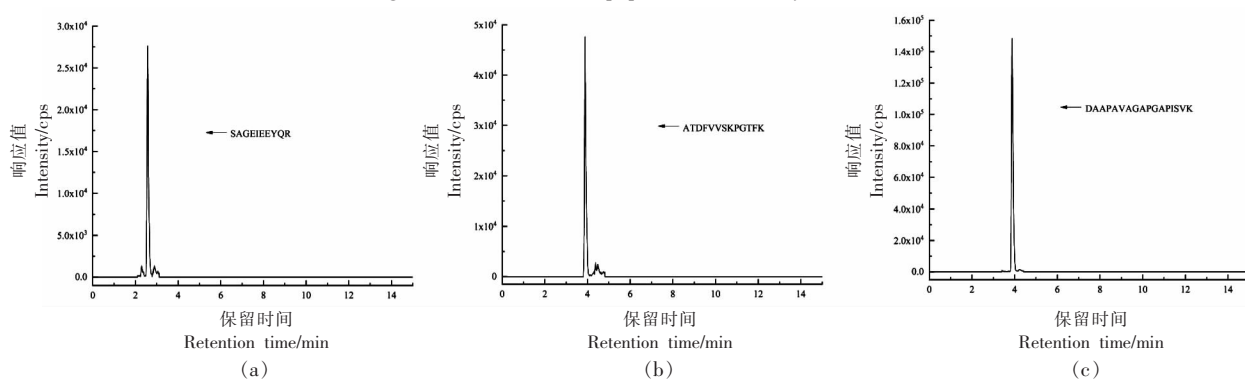


图 4 虹鳟鱼物种特征肽段提取离子流图
Fig.4 XICs of marker peptides of *Oncorhynchus mykiss*

2.4 实际样品的验证

为进一步验证方法的适用性，使用建立的质谱鉴别分析方法对在青岛水产市场随机购买的三文鱼样品进行测定，结果表明市售样品 1 含有大西洋鲑鱼全部特征肽段(图 5)，市售样品 2(图 6)

含有虹鳟鱼全部特征肽段，图中红框表示鉴定到肽段。可能会出现类似肽段 SAGEIEEYQR, 有部分响应峰的假阳性现象，因使用肽段组进行物种判别更加稳定可靠。分析结果证明市场以三文鱼标识的售卖产品中确有不同物种构成，提示建

立相关鉴别分析方法的必要性。

此外,对购于青岛麦德龙超市(具有麦哲达产品追溯二维码)标识来自智利、丹麦、荷兰和挪威的大西洋鲑鱼产品,使用本试验建立的方法进行

鉴别,结果显示相关产品均含有大西洋鲑鱼的相关特征肽段,表明方法不受样本产地的影响,进一步证明所建立的鉴别分析方法可靠。

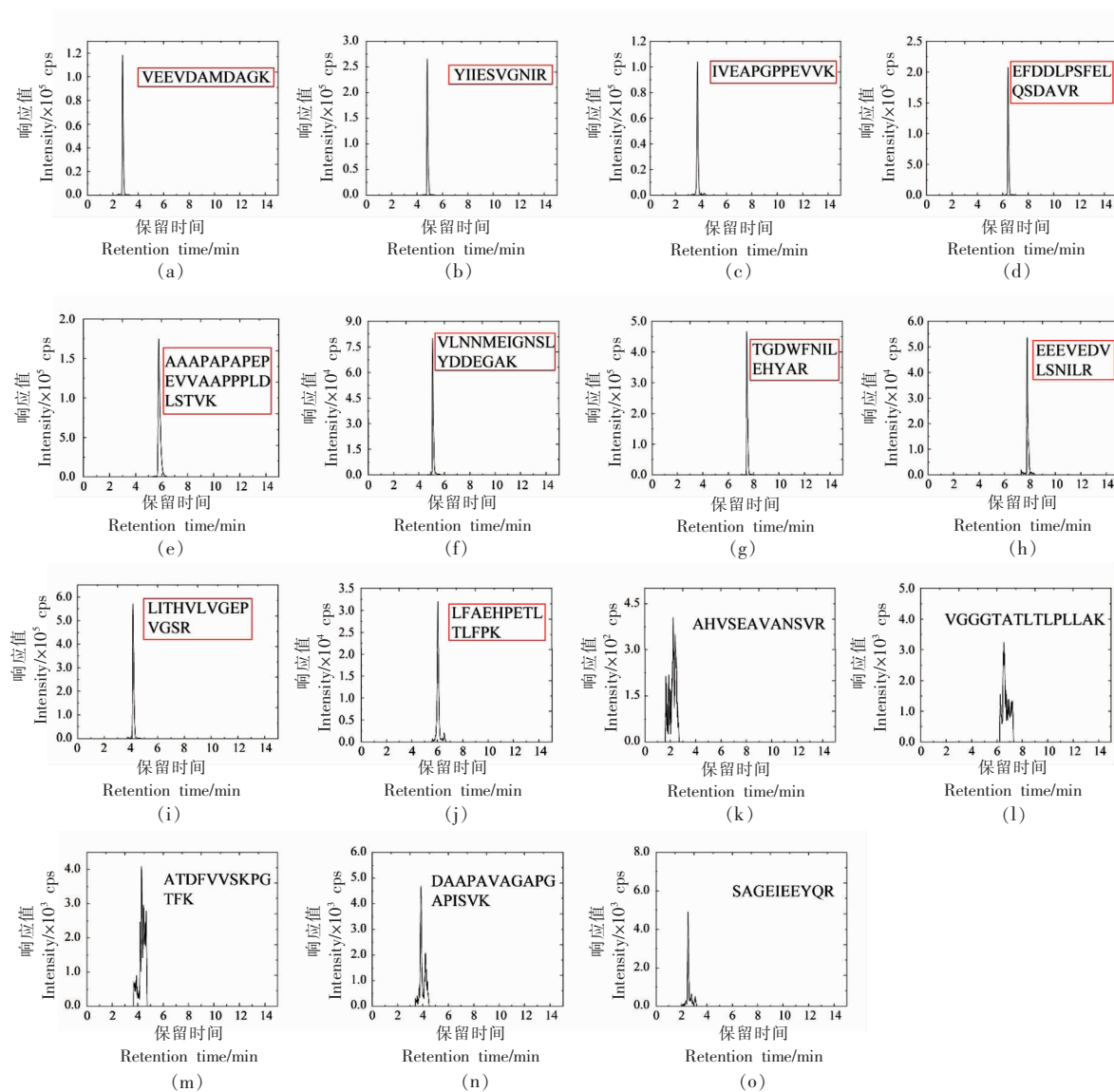
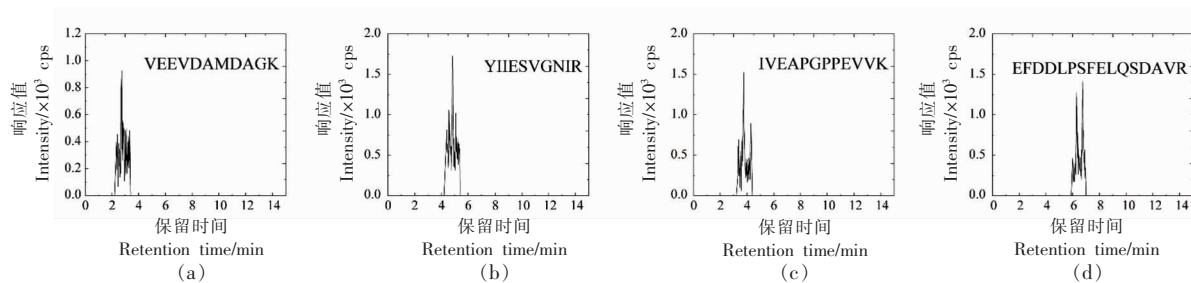


图5 市售样品1特征肽段的提取离子流图

Fig.5 XIC of marker peptides for real-life sample 1



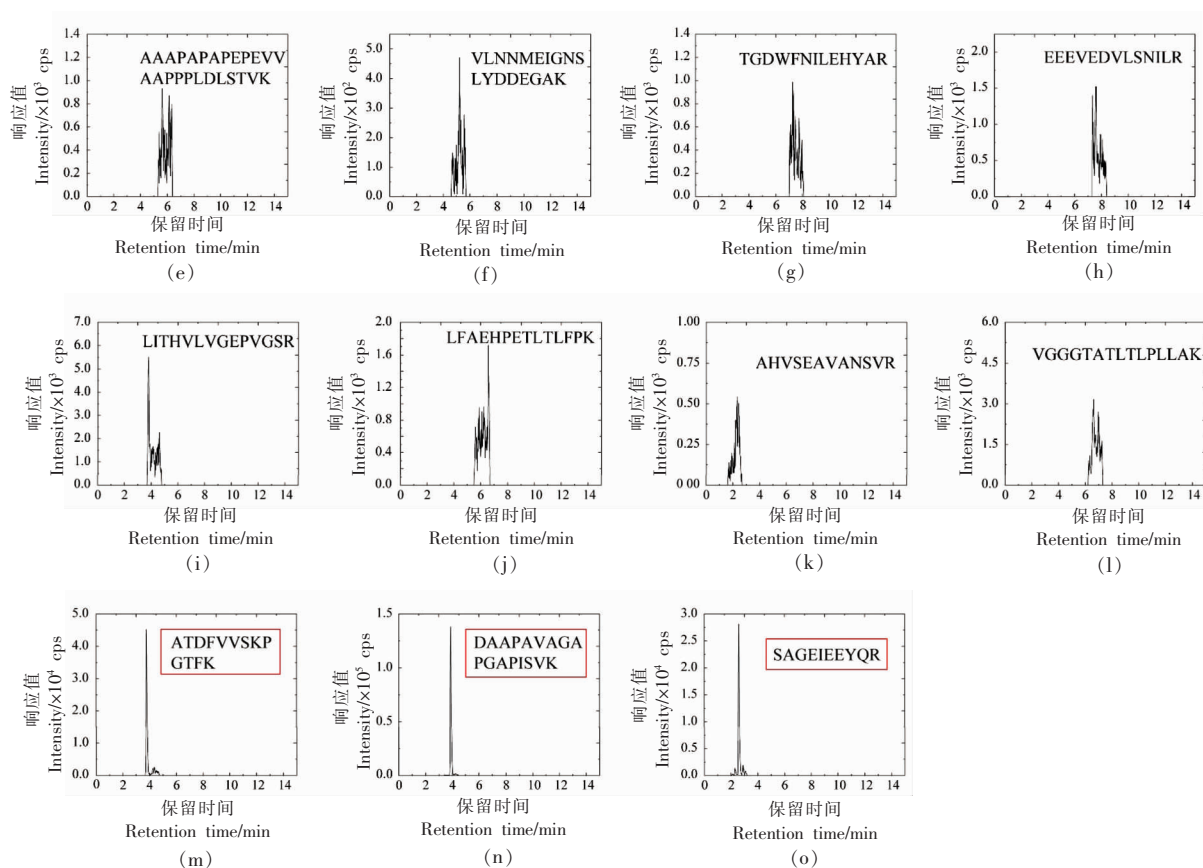


图 6 市售样品 2 特征肽段的提取离子流图

Fig.6 XIC of marker peptides for real-life sample 2

3 结论

本研究基于 UHPLC-Q/TOF 质谱的非靶向蛋白质组学研究,结合生物信息学方法,对大西洋鲑鱼、大马哈鱼和虹鳟鱼进行物种特征肽段的筛选,得到各物种的特征肽段共 15 条,其中大西洋鲑鱼 10 条、大马哈鱼 2 条、虹鳟鱼 3 条。通过靶向肽组学分析使用相应物种特征肽段,采用 UHPLC-QqQ 液质联用技术建立了 MRM 快速鉴别方法,并通过实际样品分析结果显示方法准确可靠特异性好,适用性强,可作为现有 DNA 分析技术方法的有效补充,适于实验室商品三文鱼种属的鉴别。

参 考 文 献

- [1] 邓林, 李华, 江建军. 挪威三文鱼的营养评价[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8): 377-379.
DENG L, LI H, JIANG J J. Nutrition evaluation of Norway salmon[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(8): 377-379.
- [2] 孙大江, 王炳谦. 鲑科鱼类及其养殖状况[J]. 水产学杂志, 2010, 23(2): 56-63.
SUN D J, WANG B Q. Aquaculture of salmonids in China[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2010, 23(2): 56-63.
- [3] CLINE E. Marketplace substitution of Atlantic salmon for Pacific salmon in Washington State detected by DNA barcoding[J]. Food Research International, 2012, 45(1): 388-393.
- [4] HAN C, DONG S, LI L, et al. DNA barcoding and mini-DNA barcoding reveal mislabeling of salmonids in different distribution channels in the Qingdao Area[J]. Journal of Ocean University of China, 2021, 20(6): 1537-1544.
- [5] 吴霆, 钟南, 杨灵. 红外光谱技术的三文鱼肉假冒鉴别[J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(10): 3078-3082, 3149.
WU T, ZHONG N, YANG L. Study on identifica-

- tion of counterfeit salmon meat based on infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2017, 37(10): 3078–3082, 3149.
- [6] 朱逢乐. 基于光谱和高光谱成像技术的海水鱼品质快速无损检测[D]. 浙江大学, 2014.
- ZHU F L. Rapid and non-destructive detection of marine fish quality based on spectroscopy and hyperspectral imaging technique[D]. Zhejiang University, 2014.
- [7] KOTSANOPOULOS K V, EXADACTYLOS A, GKAFAS G A, et al. The use of molecular markers in the verification of fish and seafood authenticity and the detection of adulteration[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(2): 1584–1654.
- [8] RASMUSSEN R S, MORRISSEY M T, HEBERT P D. DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from North America[J]. Journal of agricultural food chemistry, 2009, 57(18): 8379–8385.
- [9] RASMUSSEN R S, MORRISSEY M T, HANNER R H. A multiplex PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) in North America [J]. Journal of food science, 2010, 75(7): C595–C606.
- [10] LI Q P, CHENG Y H, XU W J, et al. Rapid identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) using self-quenching fluorogenic approach[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 105: 104224.
- [11] 蒋冰雪, 张晓梅, 何晓霞, 等. 商品海参溯源分析技术研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 309–318.
- JIANG B X, ZHANG X M, HE X X, et al. Recent advances in analytical techniques for the traceability of commercial sea cucumber[J]. Food Science, 2021, 42(13): 309–318.
- [12] YU X N, LI L Q, WANG H H, et al. Lipidomics study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* and *Salmo salar*) using hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry[J]. LWT, 2020, 121: 108988.
- [13] KIM G D, SEO J K, YUM H W, et al. Protein markers for discrimination of meat species in raw beef, pork and poultry and their mixtures[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 163–170.
- [14] SARAH S, FARADALILA W, SALWANI M, 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: 157–164.
- [15] GUNNING Y, WATSON A D, RIGBY N M, et al. Species determination and quantitation in mixtures using MRM mass spectrometry of peptides applied to meat authentication[J]. JoVE, 2016(115): e54420.
- [16] JIRA W, MÜNCH S. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of barley, maize, oats, rice, rye and wheat proteins in meat products[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 214–223.
- [17] HU L P, ZHANG H W, ZHANG X M, et al. Identification of peptide biomarkers for discrimination of shrimp species through SWATH-MS-Based proteomics and chemometrics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(40): 10567–10574.
- [18] HUANG X, ZHU Z T, FENG H, et al. Simultaneous determination of multi-allergens in surimi products by LC-MS/MS with a stable isotope-labeled peptide[J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126580.
- [19] LÓPEZ J L, MARINA A, ÁLVAREZ G, et al. Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species [J]. PROTEOMICS, 2002, 2(12): 1658–1665.
- [20] NARDIELLO D, NATALE A, PALERMO C, et al. Combined use of peptide ion and normalized delta scores to evaluate milk authenticity by ion-trap based proteomics coupled with error tolerant searching[J]. Talanta, 2017, 164: 684–692.
- [21] FANG C, XIN G Z, WANG S L, et al. Discovery and validation of peptide biomarkers for discrimination of *Dendrobium* species by label-free proteomics and chemometrics[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 182: 113118.
- [22] MA X T, ZHANG J K, LIANG J Z, et al. Authentication of Edible Bird's Nest (EBN) and its adulterants by integration of shotgun proteomics and scheduled multiple reaction monitoring (MRM) based on tandem mass spectrometry [J]. Food Research International, 2019, 125: 108639.
- [23] WU W, DAI R T, BENDIXEN E. Comparing SRM and SWATH methods for quantitation of bovine

- muscle proteomes [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(5): 1608–1618.
- [24] CHEN C H. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 624(1): 16–36.
- [25] QIU W F, ZHANG X M, ZHANG H W, et al. Discrimination of meat from fur-producing and food-providing animals using mass spectrometry-based proteomics [J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109446.
- [26] FORNAL E, MONTOWSKA M. Species-specific peptide-based liquid chromatography-mass spectrometry monitoring of three poultry species in processed meat products[J]. *Food Chemistry*, 2019, 283: 489–498.
- [27] WISNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359–360.
- [28] ZHANG H W, ZHANG X M, ZHAO X, et al. Discrimination of dried sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) products from different geographical origins by sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra (SWATH-MS)-based proteomic analysis and chemometrics[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 592–602.
- [29] PINO L K, SEARLE B C, BOLLINGER J G, et al. The skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2020, 39(3): 229–244.

Traceability Analysis of Salmon Species Based on Proteomics/Peptidomics Analysis

Jiang Bingxue¹, Zhang Xiaomei², Ding Mao², Wang Ping³, Zhang Hongwei^{2*}, Chen Guidong^{1*}

¹College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong

²Technology Center of Qingdao Customs District, Qingdao 266114, Shandong

³Qingdao Customs Risk Prevention and Control Bureau, Qingdao 266114, Shandong)

Abstract Different salmon species are from relative species and very similar in appearance. The aim of this study was to establish a species traceability method for Atlantic salmon, chum salmon and rainbow trout. A total of 912 proteins were identified at 95% confidence level based on mass spectrometry shotgun proteomics. Potential peptide biomarkers derived from different salmon unique proteins were assessed by detection specificity as well as species uniqueness, and the qualified ones were further validated by multiple reaction monitoring (MRM) based peptidomics, resulting in 10 species-specific peptides for Atlantic salmon, 2 species-specific peptides for chum salmon and 3 species-specific peptides for rainbow trout. The results demonstrated that the proposed approach is simple, accurate, reliable, specific and robust, and can be effectively used for the identification and analysis of commercial salmon products in routine analytical laboratories.

Keywords *Salmo salar*; *Oncorhynchus keta*; *Oncorhynchus mykiss*; marker peptides; mass spectra; proteomics; species identification