

УДК 637.5.072/616-0

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.490-499

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОЛИЧЕСТВА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПО БИОМАРКЕРНЫМ ПЕПТИДАМ ПРИ ПОМОЩИ КВАДРУПЛЬНОЙ ХРОМАТО-МАССПЕКТРОМЕТРИИ

Д.В. Хвостов, Н.Л. Вострикова, И.М. Чернуха, А.В. Куликовский

*Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН,
г. Москва, 109316, Россия*

Аннотация

Мировая лабораторная практика в области проверки качества и безопасности продуктов питания свидетельствует о постоянном расширении списка контролируемых показателей. В связи с этим особо актуальной является разработка стандартизованных и аттестованных методик, связанных с проведением глубоких исследований биохимических показателей компонентов употребляемых в пищу продуктов, в том числе мясных. Нами был разработан высокосимметричный анализ на основе метода мониторинга множественных реакций (MRM), а именно определение доли мышечной ткани в многокомпонентных мясных изделиях (не подвергнутых тепловой обработке). Высокопоточная система, использующая сверхвысокую производительность (LC) и тройной квадрупольный масс-спектрометр Agilent 6410, обеспечивала простоту использования и повышала надежность анализа. В анализе, продолжительность которого составила 25 мин, использовали четыре стабильных пептида для количественного определения двух предполагаемых биомаркеров мышечной ткани в мясных фаршах (говяжьим (*Bos taurus*) и свином (*Sus scrofa*)). Разработанный метод позволяет количественно выделить до 5% примеси говяжьей или свиной мышечной ткани в свежих фаршах. Анализы белка MRM, представленные в данной работе, могут вскоре превзойти методологию ELISA в качестве варианта быстрого мультиплексированного анализа белка.

Ключевые слова: биомаркер, прототипические пептиды, MRM, мышечная ткань, количественное определение

Введение

Оценка качества пищевых продуктов включает контроль компонентов готовых изделий, то есть идентификацию их реального состава в соответствии с декларированными нормативными документами. Однако в целом ряде случаев это связано с немалыми трудностями – наиболее сложно определить долю мышечнотканного белка в многокомпонентных мясных продуктах, прошедших термическую обработку. Поэтому в настоящее время актуальным и перспективным направлением является выделение биомаркеров различных компонентов и разработка методов идентификации биохимических изменений пищевого сырья под действием технологических факторов. В настоящей работе представлена методология анализа белков и пептидов на основе последних технологий, которые приобретают всю большую актуальность – MRM-MS.

MRM-MS представляет собой режим MS/MS, который уникален для трехмерных квадрупольных (QQQ) MS-приборов [1]. Режим мониторинга множественных реакций (MRM) позволяет быстро и с высокой чувствительностью определять сотни аналитов в очень сложных матрицах [2]. Системы QQQ также имеют широкий динамический диапазон, охватывающий несколько порядков, что делает их идеальными для анализа протеотипических пептидов. MRM используется в течение десятилетий для количественного определения низкомолекулярных анализируемых веществ (< 1000 Da) в фармацевтических, клинических и экологических исследованиях [2, 3]. Использование изотопно-меченных внутренних стандартов (SIS) позволяет определять концентрации пептидов в белках [4].

1. Материалы и методы

1.1. Реактивы и химикаты. Чистота всех реагентов, использованных при проведении исследования, соответствовала требованиям U.S.P. или превышала их. Все растворители, включая воду, имели маркировку LC/MS.

1.2. Подготовка проб мышечной ткани свинины и говядины для трипсинолиза. На аналитических весах отвешивали смесь фаршей говядины и свинины (общей массой 2000 мг) в следующих процентных соотношениях: 100% и 0%, 75% и 25%, 50% и 50%, 25% и 75%, 5% и 95%, 0% и 100% говяжьего и свиного фаршей соответственно. В каждом случае образцы массой 50 мг разбавляли добавлением 500 мкл 10%-ного дезоксихолата натрия и 25 мМ бикарбоната аммония, после чего перетирали в ступке до полного растворения [5]. Образцы денатурированной мышечной ткани центрифугировали при максимальной скорости в течение 15 мин. при 4 °С, отбирали 10 мкл каждой пробы в 1.5 мл пробирки, добавляли 2 мкл 100мМ ДТТ (дитиотриитол) и нагревали до 80 °С в течение 20 мин. Затем образцы алкилировали добавлением 2.0 мкл 100 мМ иодоацетамида (в 25 мМ аммоний бикарбоната при 50-кратном избытке над плазменным цистеином) и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин в темноте. Оставшийся иодоацетамид нейтрализовали добавлением 2,0 мкл 100 мМ ДТТ (25 мМ в бикарбонате аммония) и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Разводили полученную смесь до объема 95 мкл 25мМ бикарбонатом аммония. Трипсин добавляли к образцам при соотношении субстрата 50 : 1 : фермент (10.5 ± 0.4 мг/мл в 25 мМ бикарбоната аммония). Трипсинолиз проводили в течение 16 ч при 37 °С.

Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты с получением конечной концентрации 0.5%, которая инактивирует трипсин и осаждает дезоксихолат натрия. Затем образцы центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин (23 °С) для осаждения дезоксихолата натрия. Супернатант всех образцов переносили в аналитические виалы для анализа. Концентрация мышечной ткани в исследуемых образцах составила 10 мкг/мкл.

1.3. Анализ ВЭЖХ-MS проб мышечной ткани. Для хроматографического разделения использовали систему ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity с обращенно-фазовой колонкой (50 мм × 2.1 мм id, Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 с быстрым разрешением HD, размером 2.7 мкм). Объем ввода образца составил 10 мкл,

а температура блока термостатирования – 30 °С. Жидкостная хроматография с высокой эффективностью (ВЭЖХ) позволяет максимизировать возможности мультиплексирования и уменьшить время анализа.

В качестве элюентов использовали 0.1%-ную муравьиную кислоту в деионизованной воде (элюент А) и 0.1%-ную муравьиную кислоту в ацетонитриле (элюент В). Для разделения пептидов использовали градиентный режим элюирования – 0 мин: 5% В; 10 мин: 60% В; 15 мин: 100% В; 20 мин: 100% В; 21 мин: 5% В; 25 мин: 5%. Количественный обсчет проводили с помощью системы обработки данных MassHunter Workstation от Agilent (версия В.04.01) в автоматическом режиме. Для анализа подобраны следующие параметры масс-спектрометрического детектирования: капиллярное напряжение – 4000 В; напряжение сопла 300 В; температура источника – 100 °С; температура газа десольвации – 250 °С; скорость потока газа десольвации – 8 л/мин; давление иглы распылителя – 30 фунт/кв. дюйм (206.85 кПа).

1.4. Анализ данных MRM. Все данные MRM обрабатывались с использованием программного обеспечения Agilent MassHunter для количественного анализа (Agilent В.04.00) с алгоритмом Agilent Integrator для набора максимальной интеграции со значениями по умолчанию. Все интегрированные пики были проверены вручную для обеспечения правильного обнаружения пиков и точной интеграции. Линейную регрессию всех калибровочных кривых проводили с использованием стандартного варианта взвешивания $1/x^2$ (x – концентрация мышечной ткани), чтобы минимизировать широкий динамический диапазон [6]. Все пептиды первоначально были определены с использованием трех пар ионов MRM на пептид для проверки времени удерживания и обеспечения отсутствия каких-либо помех сигнала. Для обнаружения помех сравнивали множественные сигналы пары ионов для каждого пептида, гарантируя тем самым, что относительная интенсивность сигнала ионных пар согласуется между тяжелыми и естественными формами всех пептидов. Сообщаемые концентрации основаны на самом высоком уровне сигнала, который был проверен как свободный от помех.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Выбор биомаркеров мышечной ткани свинины и говядины. Потенциальным маркером мышечной ткани выбран миоглобин коровы (*Bos taurus*) и свиньи (*Sus scrofa*). Данные белки различаются по своему пептидному составу. В результате проведенного исследования был в первую очередь произведен выбор уникальных пептидов, которые наблюдаются в протеолитических перевариваниях трипсина и не содержат аминокислот, подверженных химической модификации, на основе информации, присутствующей в таких базах данных, как пептидный атлас и база GPM (глобальная база для протеомов Global Proteome Machine, mrm.thegpm.org/theGPM/cgi/peak_search.pl). Кроме того, эти пептиды используются для определения оптимальных параметров регистрации MRM. Оба белка были представлены двумя или более пептидами SIS (табл. 1, рис. 1). В разработанном методе MRM все фрагменты Q3-кванта квантификационного перехода представляют собой ионы у-ряда (табл. 1).

Табл. 1

Оптимизированные параметры MRM для четырех пептидов, нацеленных на два белка – миоглобин коровы (*Bos taurus*) и свиньи (*Sus scrofa*).

Белок	UniProt №	Целевой пептид	Прекурсор-ион	Продукт-ион	CE, V	Пептидный переход	
Миоглобин (<i>Bos taurus</i>)	NP_776306.1	YLEFISD AIIHVLH AK	623.6805	796.9434	17.7	y14	
			623.6805	732.4221	17.7	y13	
			623.6805	602.3459	17.7	y11	
		HPSDFGA DAQAAM SK	511.5648	635.3181	13.6	y6	
			511.5648	507.2595	13.6	y5	
			511.5648	641.2678	13.6	b6	
			NDMAAQ YK	470.7133	711.3494	15.6	y6
				470.7133	580.3089	15.6	y5
				470.7133	509.2718	15.6	y4
Миоглобин (<i>Sus scrofa</i>)	NP_999401.1	YLEFISE AIIQVLQ SK	627.6838	815.4985	17.8	y7	
			627.6838	702.4145	17.8	y6	
			627.6838	574.3559	17.8	y5	
			627.6838	475.2875	17.8	y4	

Перечисленные массы приведены для естественных форм пептида.

2.2. Выбор пар ионов MRM Q1/Q3 и определение оптимизированных параметров MRM. Для определения наиболее интенсивного состояния заряда предшественника и наиболее распространенных фрагментных ионов для каждого пептида их анализировали с использованием списков ионной пары MRM. Они содержали все возможные $[M+H]^+$ и $[M+2H]^{2+}$ b- и y-ионов ионной последовательности как для состояний зарядов ионов-предшественников 2+, так и для 3+ при одновременном изменении энергии столкновения CE. Интенсивность сигнала от этих ионных пар Q1/Q3 (Q1 – квадруполь 1; Q3 – квадруполь 3) для каждого пептида оценивалась для обеспечения выбора наиболее интенсивной пары предшественников и фрагментов, которые образуют наиболее чувствительную комбинацию для количественного определения на основе MRM. Оптимизированные параметры MRM для четырех пептидов, состоящие из верхней ионной пары Q1/Q3 и напряжений CE, которые максимизируют генерацию каждого иона фрагмента, показаны в табл. 1.

2.3. Мультиплексированный LC-MRM/MS анализ переваривания мышечной ткани и определение специфичности анализа. Для выбора наиболее чувствительной ионной пары MRM для каждого пептида и включения в конечный мультиплексированный метод MRM три наиболее интенсивные пары ионов MRM (определено прямым анализом ввода пробы) далее тестировали в условиях LC-MRM/MS. Так как множественные пики часто наблюдаются для конкретной ионной пары, генерируемой неистребимыми ионами во время LC-MRM/MS, все три пары ионов MRM для каждого пептида использовались для подтверждения идентичности. Это также позволило определить их соответствующие времена удерживания (рис. 1).

Чтобы максимизировать емкость аналита и пропускную способность данного метода мультиплексирования MRM, мы минимизировали количество пар

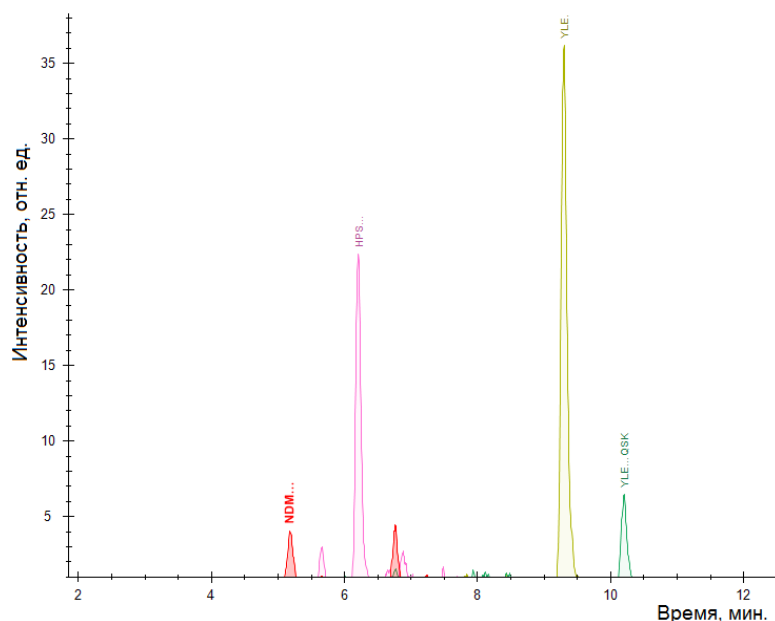


Рис. 1. Хроматограммы выбранных биомаркеров, отвечающих за идентификацию мышечной ткани двух видов животных в модельной смеси: говядина 25 мас. % и свинина 75 мас. %

ионов, используемых на MRM. Для этого относительный отклик пяти наиболее интенсивных ионных пар MRM Q1/Q3 для пептидов сравнивали с помощью ВЭЖХ-MRM-анализа. Выбор ионных пар MRM был произведен таким образом, чтобы они не содержали матричных помех от соэлюирующих ионов, отбрасывая любые переходы, где относительные ответы между естественными и SIS-пептидами и между этими двумя образцами имели коэффициент вариации CV выше 20%. Используя SIS-пептиды в наших анализах MRM вместе с тщательным подбором трех критериев, специфичных для аналита (ион-предшественник m/z , фрагмент-ион m/z и время удерживания), мы получили высоко специфичные ионные пары MRM для анализа. Из 20 самых высоких сигналов, создающих кванторные переходы, только один из них был отброшен из-за возможной помехи сигнала. Это указывает на то, что вероятность значительного ложноположительного сигнала, измеренного после того, как кванторные переходы были проверены с использованием соответствующего SIS-пептида, составляет менее 1%.

2.4. Линейный отклик и предел количественного определения (LOQ) 4-пептидного MRM-анализа. Поскольку, как было показано, увеличение аналитических вариаций в MR-анализе коррелирует с уменьшением интенсивности ионного фрагмента [7], окончательный метод представлял собой наиболее распространенный, эмпирически определенный, интерференционный переход для каждого целевого пептида. С помощью разработанного метода MRM были оценены аналитические параметры анализа. Для анализа были определены критерии приемлемости, такие как линейность и аналитическая точность. Это позволило сравнить результаты анализа MRM и в будущем может представлять особый интерес для идентификации белков в продуктах промышленного производства.

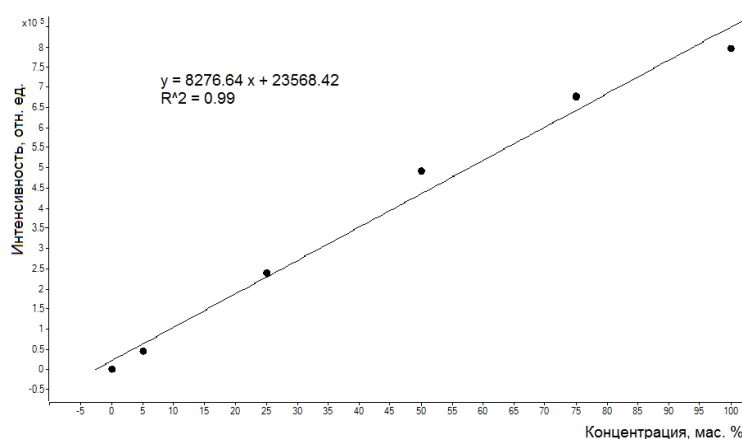


Рис. 2. Градуировочный график для видоспецифического пептида YLEFISDAIPIHVLNAK говяжьей лактатдегидрогеназы

Калибровочные кривые показаны на рис. 2 и охватывают весь диапазон концентраций анализа четырех пептидов. Большинство стандартных образцов попадают в нижний конец кривой, что позволяет использовать уравнение линейной регрессии ($1/x^2$). LOQ представляет собой нижний предел количественного измерения. Для определения LOQ была выбрана самая низкая концентрация на калибровочной кривой, которая в течение пяти измерений давала сигнал с относительной погрешностью 25%. Значение LOQ составило 5% мышечной ткани в фаршах для всех пептидов. Точность аналитического метода определяется как близость полученных средних результатов испытаний к истинному значению аналита, измеренная с использованием минимум пяти определений на стандартную концентрацию. Значения при LOQ и всех других уровнях концентрации не может отклоняться более чем на 25% от «истинного» значения. Точность аналитического метода определялась как близость отдельных измерений в пяти повторках к стандартным образцам, содержащим матрицу и аналит при разных концентрациях. Необходимая точность в LOQ и всех других уровнях концентрации внутри кривой не может иметь $CV > 25\%$.

Степень линейности каждой стандартной кривой определялась как промежуток между конкретной точкой LOQ и верхним пределом количественного определения, который представлял собой проверенную точку наибольшей концентрации, попавшую в пределы точности, указанные выше. Наборы калибровочных точек от нижнего конца и/или верхнего конца кривой последовательно удалялись из линейного регрессионного анализа, пока все точки данных, включенные в регрессионный анализ, не попали в диапазон точности 75–125%. Это обеспечило точное определение линейного диапазона концентраций каждого пептидного анализа.

Линейный динамический диапазон для четырех пептидных анализов MRM варьировался от 100% мышечной ткани до 5% в смеси с другим видом мяса, как для свинины, так и для говядины.

Заключение

Предлагаемый мультиплексированный анализ является отправной точкой для исследования кандидатов-биомаркеров в качестве компонентов животных

белков. Пятикратная повторность анализов одного и того же образца не показала потерю чувствительности (< 25% CV для четырех пептидов) и потерю точности времени удерживания (< 2.5% CV для всех пептидов). Коэффициенты корреляции калибровочной кривой выше 0,98 были получены для всех пептидных мишеней при количественном определении (< 25% CV, точность 75–125%).

Способность быстро количественно оценивать белки с помощью мультиплексированного метода с использованием MRM расширяет возможности применения MRM и позволяет проводить не только качественный, но и количественный анализ содержания мышечной ткани говядины или свинины в бесструктурных фаршах. Целенаправленное одновременное количественное определение 100 мкг белков в одном анализе позволит быстро профилировать экспрессию белков больших ($n > 100$) технологически значимых наборов образцов способом, подобным профилированию экспрессии микрочипов ДНК. Влияние мультиплексированных анализов в области геномики уже привело к увеличению интереса к мультиплексированному количественному определению многих белков в отдельных клинических образцах [8].

Ожидается, что целенаправленный протеомный подход обеспечит большую чувствительность и, следовательно, более вероятное покрытие потенциальных биомаркеров в диапазоне концентраций белка в 11 порядков. Концентрации миоглобина варьируются от 10 мг/мл до нескольких нг/мл. Используя данный целевой подход, можно точно количественно выделить до 5% примеси говяжьей или свиной мышечной ткани в многокомпонентных фаршах.

Использование протеомной стратегии в исследовании молекулярных механизмов формирования качественных показателей мясного сырья является важным шагом на пути получения высококачественной животноводческой продукции и более стабильного ее производства [9, 10].

В результате проведенных работ был сформирован единый методологический подход к определению количества мышечного белка в мясных изделиях методом MRM по подтверждающему белку-маркеру. Данная методология представлена в работе на примере скелетных мышц говядины и свинины, но она применима к любому типу мышц любого вида теплокровного животного.

Из проведенных исследований следует, что применение протеомных технологий наряду с получением новых знаний о мышечных белках открывает путь к созданию новых эффективных методов контроля качества мясной продукции, включающих, в частности, определение содержания в конечных продуктах мышечных белков и их видовую принадлежность.

Благодарности. Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 16-16-10073).

Литература

1. Kondrat R.W., McClusky G.A., Cooks R.G. Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures // *Anal. Chem.* – 1978. – V. 50, No 14. – P. 2017–2021. – doi: 10.1021/ac50036a020.
2. Kiyonami R., Schoen A., Prakash A., Peterman S., Zabrouskov V., Picotti P., Aebersold R., Huhmer A., Domon B. Increased selectivity, analytical precision, and throughput in tar-

- geted proteomics // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2011. – V. 10, No 2, Art. M110.002931. – doi: 10.1074/mcp.M110.002931.
3. *Gergov M., Ojanperä I., Vuori E.* Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring // *J. Chromatogr.*, 2003 – V. 795, No 1. – P. 41–53. – doi: 10.1016/S1570-0232(03)00498-7.
 4. *Addona T.A., Abbatiello S.E., Schilling B., Skates S.J. Mani D.R., Bunk D.M., Spiegelman C.H., Zimmerman L.J., Ham A.J., Keshishian H., Hall S.C., Allen S., Blackman R.K., Borchers Ch.H., Buck Ch., Cardasis H.L., Cusack M.P., Dodder N.G., Gibson B.W., Held J.M., Hiltke T., Jackson A., Johansen E.B., Kinsinger C.R., Li J., Mesri M., Neubert T.A., Niles R.K., Pulsipher T.C., Ransohoff D., Rodriguez H., Rudnick P.A., Smith D., Tabb D.L., Tegeler T.J., Variyath A.M., Vega-Montoto L.J., Wahlander Å., Waldemarson S., Wang M., Whiteaker J.R., Zhao L., Anderson N.L., Fisher S.J., Liebler D.C., Paulovich A.G., Regnier F.E., Tempst P., Carr S.A.* Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma // *Nat. Biotechnol.* – 2009. – V. 27. – P. 633–641. – doi: 10.1038/nbt.1546.
 5. *Proc J.L., Kuzyk M.A., Hardie D.B., Yang J., Smith D.S., Jackson A.M., Parker C.E., Borchers C.H.* A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. // *J. Proteome Res.* – 2010. – V. 9, No 10. – P. 5422–5437. – doi: 10.1021/pr100656u.
 6. *Chace D.H., Barr J.R., Duncan M.W., Matern D., Morris M.R., Palmer-Toy D.E., Rockwood A.L., Siuzdak G., Urbani A., Yergey A.L., Chan Y.M.* Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance: Approved Guideline. – Wayne, Pa., Clin. Lab. Stand. Inst., 2007. – V. 27. – VII, 94 p.
 7. *Kuzyk M.A., Smith D., Yang J., Cross T.J., Jackson A.M., Hardie D.B., Anderson N.L., Borchers C.H.* Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2009. – V. 8, No 8. – P. 1860–1877. – doi: 10.1074/mcp.M800540-MCP200.
 8. *Kingsmore S.F.* Multiplexed protein measurement: Technologies and applications of protein and antibody arrays // *Nat. Rev. Drug Discovery*. – 2006. – V. 5. – P. 310–321. – doi: 10.1038/nrd2006.
 9. *Vostrikova N.L., Chernukha I.M.* Identification of tissue-specific proteins and peptides forming innovative meat products corrective properties to confirm authenticity of meat raw materials // *Foods Raw Mater.* – 2018. – V. 6, No 1. – P. 201–209. – doi: 10.21603/2308-4057-2018-1-201-209.
 10. *Вострикова Н.Л., Чернуха И.М., Хвостов Д.В.* Методологические аспекты идентификации тканеспецифических белков и пептидов, формирующих корректирующие свойства инновационных мясных продуктов // *Теория и практика переработки мяса*. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 36–55. – doi: 10.21323/2414-438X-2018-3-3-36-55.

Поступила в редакцию
02.10.18

Хвостов Даниил Владиславович, младший научный сотрудник лаборатории «Научно-методических работ, биологических и аналитических исследований»

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
ул. Талалихина, д. 26, г. Москва, 109316, Россия
E-mail: d.hvostov@fncps.ru

Вострикова Наталья Леонидовна, доктор технических наук, заведующий лабораторией «Научно-методические работы, биологические и аналитические исследования»

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
ул. Талалихина, д. 26, г. Москва, 109316, Россия
E-mail: n.vostrikova@fncps.ru

Чернуха Ирина Михайловна, доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
ул. Талалихина, д. 26, г. Москва, 109316, Россия
E-mail: imcher@inbox.ru

Куликовский Андрей Владимирович, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории научно-методических работ биологических и аналитических исследований

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН
ул. Талалихина, д. 26, г. Москва, 109316, Россия
E-mail: a.kulikovskii@fneps.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2019, vol. 161, no. 3, pp. 490–499

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.490-499

Identifying the Proportion of Muscle Tissue by Biomarker Peptides Using Quadrupole Chromatography-Mass Spectrometry

D.V. Khvostov^{}, N.L. Vostrikova^{**}, I.M. Chernukha^{***}, A.V. Kulikovskii^{****}*

*V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 109316 Russia*

E-mail: ^{*}d.hvostov@fneps.ru, ^{**}n.vostrikova@fneps.ru, ^{***}imcher@inbox.ru, ^{****}a.kulikovskii@fneps.ru

Received October 10, 2018

Abstract

Current laboratory practices in determining the quality and safety of foodstuffs face a constant expansion of the list of controlled indicators, for the meat industry in particular. Thus, new standardized and certified methods based on in-depth studies of the biochemical indicators of meat and meat products are needed. For this purpose, we developed a highly symmetric analysis relying on the multiple-reactions monitoring (MRM) method, i.e., identification of the proportion of muscle tissues in multi-component meat products (not subjected to heat treatment). The high-flux system with ultra-high performance (LC) and the triple quadrupole mass spectrometer (Agilent 6410) increased the reliability of the analysis. The analysis (25 min long) used four stable peptides to quantify two putative biomarkers of muscle tissues in minced meat (beef (*Bos taurus*) and pork (*Sus scrofa*)). Up to 5% of impurities of either beef or pork muscle tissues in fresh minced meat can be detected with the help of the developed method. The MRM protein assays presented in this paper may soon overtake the ELISA methodology as a variant of multiplexed protein assay.

Keywords: biomarker, prototypic peptides, MRM, muscle tissue, quantitation

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 16-16-10073).

Figure Captions

Fig. 1. Chromatograms of the selected biomarkers responsible for the muscle tissue identification in two animal species in a model mixture: beef 25 wt. % and pork 75 wt. %.

Fig. 2. Calibration chart for the species-specific peptide YLEFISDAIHHVLHAK of beef lactate dehydrogenase.

References

1. Kondrat R.W., McClusky G.A., Cooks R.G. Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. *Anal. Chem.*, 1978, vol. 50, no. 14, pp. 2017–2021. doi: 10.1021/ac50036a020.
2. Kiyonami R., Schoen A., Prakash A., Peterman S., Zabrouskov V., Picotti P., Aebersold R., Huhmer A., Domon B. Increased selectivity, analytical precision, and throughput in targeted proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 2011, vol. 10, no. 2, art. M110.002931. doi: 10.1074/mcp.M110.002931.
3. Gergov M., Ojanperä I., Vuori E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. *J. Chromatogr.*, 2003, vol. 795, no. 1, pp. 41–53. doi: 10.1016/S1570-0232(03)00498-7.
4. Addona T.A., Abbatiello S.E., Schilling B., Skates S.J., Mani D.R., Bunk D.M., Spiegelman C.H., Zimmerman L.J., Ham A.J., Keshishian H., Hall S.C., Allen S., Blackman R.K., Borchers C.H., Buck Ch., Cardasis H.L., Cusack M.P., Dodder N.G., Gibson B.W., Held J.M., Hiltke T., Jackson A., Johansen E.B., Kinsinger C.R., Li J., Mesri M., Neubert T.A., Niles R.K., Pulsipher T.C., Ransohoff D., Rodriguez H., Rudnick P.A., Smith D., Tabb D.L., Tegeler T.J., Variyath A.M., Vega-Montoto L.J., Wahlander Å., Waldemarson S., Wang M., Whiteaker J.R., Zhao L., Anderson N.L., Fisher S.J., Liebler D.C., Paulovich A.G., Regnier F.E., Tempst P., Carr S.A. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat. Biotechnol.*, 2009, vol. 27, pp. 633–641. doi: 10.1038/nbt.1546.
5. Proc J.L., Kuzyk M.A., Hardie D.B., Yang J., Smith D.S., Jackson A.M., Parker C.E., Borchers C.H. A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *J. Proteome Res.*, 2010, vol. 9, no. 10, pp. 5422–5437. doi: 10.1021/pr100656u.
6. Chace D.H., Barr J. R., Duncan M. W., Matern D., Morris M.R., Palmer-Toy D.E., Rockwood A.L., Siuzdak G., Urbani A., Yergey A.L., Chan Y.M. *Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance: Approved Guideline*. Wayne, Pa., Clin. Lab. Stand. Inst., 2007, vol. 27, vii, 94 p.
7. Kuzyk M.A., Smith D., Yang J., Cross T.J., Jackson A.M., Hardie D.B., Anderson N.L., Borchers C.H. Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma. *Mol. Cell. Proteomics*, 2009, vol. 8, no. 8, pp. 1860–1877. doi: 10.1074/mcp.M800540-MCP200.
8. Kingsmore S.F. Multiplexed protein measurement: Technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2006, vol. 5, pp. 310–321. doi: 10.1038/nrd2006.
9. Vostrikova N.L., Chernukha I.M. Identification of tissue-specific proteins and peptides forming innovative meat products corrective properties to confirm authenticity of meat raw materials. *Foods Raw Mater.*, 2018, vol. 6, no. 1, pp. 201–209. doi: 10.21603/2308-4057-2018-1-201-209.
10. Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Khvostov D.V. Methodological aspects of identification of tissue-specific proteins and peptides forming the corrective properties of innovative meat products. *Teor. Prakt. Pererab. Myasa*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 36–55. doi: 10.21323/2414-438X-2018-3-3-36-55.

Для цитирования: Хвостов Д.В., Вострикова Н.Л., Чернуха И.М., Куликовский А.В. Идентификация количества мышечной ткани по биомаркерным пептидам при помощи квадрупольной хромато-масспектрометрии // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 3. – С. 490–499. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.490-499.

For citation: Khvostov D.V., Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Kulikovskii A.V. Identifying the proportion of muscle tissue by biomarker peptides using quadrupole chromatography-mass spectrometry. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 3, pp. 490–499. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.490-499. (In Russian)