

蛋白质组学技术在牛肉品质研究的应用

马 桢^{1,2}, 闫向民^{1*}

(1. 新疆畜牧科学院畜牧研究所, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要:蛋白质组学已被广泛用于研究不同物种的肌肉生物学和肉质性状。牛肉作为肉牛产业的最终产品,其嫩度、颜色、多汁性是消费者最为关注的指标。牛肉蛋白质组学研究不仅有助于我们清晰理解牛肉从肌肉到肉类转化的机制,而且也为进一步有效利用生物标志物、调控肉质变化关键因素等改善牛肉品质提供科学参考。

关键词:牛肉,嫩度,蛋白质组

中图分类号:S823

文献标识码:A

文章编号:1001-9111(2023)03-0087-04

蛋白质是基因组功能的最终执行者和生命活动的体现者,基于蛋白水平的分析能更加准确地反映细胞活动状态,从而有效地阐明生命过程的分子机制。蛋白质组学(proteomics)由 Wilkins 等人在 1994 年首次提出^[1],该学科主要用来探究生物体蛋白质种类及组成、结构与功能、表达水平、翻译后修饰、蛋白质相互作用等方面,从而揭示细胞或机体在某一特定生理或病理状态下基因组表达的所有蛋白质潜在的结构与功能。目前蛋白质组学技术主要包括:双向凝胶电泳技术(2-DE)^[2]、蛋白质谱技术^[3]、蛋白质芯片技术、体外同位素标记蛋白质定量法、蛋白质非标记定量技术(label-free)^[4]等。

骨骼肌的发育主要涉及成肌过程(即肌细胞增殖和分化)、脂肪形成(即脂肪细胞发育分化)和肌纤维发生(即成纤维细胞发育),这些细胞或组织最初均由间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)分化而来。牛骨骼肌的发育过程主要是,妊娠后 0-60 天(即胚胎 60 天)第一代成肌细胞增殖;60-110 天期间第一代肌管分化和第二代成肌细胞增殖;110-180 天期间第二代肌管分化,肌纤维总数建立;210-260 天为肌纤维分化和成熟阶段^[5,6]。

牛肉作为肉牛产业的最终产品,其大理石花纹、色泽、嫩度、风味以及营养成分指标是消费者选购考虑的重要因素。肌肉的生长、分化以及形成机理对肉产量和肉品质有重要影响。在过去十几年中,蛋白质组学技术已经被应用于肌肉和肉类科学方面^[7,8],现代色谱分离、生物质谱技术的发展极大地促进了蛋白质组学研究的进步,使其在获取样本中差异蛋白及挖

掘生物标志物等方面具有显著优势。蛋白质组学技术在牛肉品质研究方面的应用也愈加广泛。

1 牛肉自身代谢变化机理

1.1 肌肉生成、分化机制

肉牛总肌纤维数在妊娠中期结束时是固定的,在妊娠后期肌纤维发生收缩和代谢分化并发育成熟,妊娠期肌纤维数量减少对产后具有长期、不可逆转的负面生理影响^[5]。与其他哺乳动物相比,牛肌肉组织在出生时已经相对成熟,出生后骨骼肌生长主要通过肌卫星细胞(satellite cells, SCs)增殖和分化使肌纤维体积增大(即单个肌纤维的增大)。蛋白质组学可以研究骨骼肌发育的不同类型细胞的形成机制。建立 C2C12 系的体外模型,在成肌细胞中鉴定出 653 种蛋白质,在肌管中鉴定出 558 种蛋白质,二者之间有 106 个蛋白质显示出不同的丰度。说明不同类型的细胞,其蛋白质丰度存在差异。另外,在分化中起主要作用的蛋白质为 MAPK、Akt、JNK1、CDK5;参与神经元分化的磷酸蛋白,如葡萄球菌素和 LANP 对肌生成也很重要^[9]。在分化过程中,丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpins)、色素上皮衍生因子(PEDF)、膜联蛋白 1(annexin1)、半乳糖凝集素 1(galactin1)细胞迁移中具有重要作用^[10]。肌肉生长抑制素基因(MSTN)内的突变或缺失会产生肌肉肥大的双肌肉表现。Bouley J 等^[11]通过比较纯合 MSTN 基因(DM)、杂合双肌基因(HDM)和纯合非双肌基因(N)的比利时蓝牛,发现双肌肉与 MSTN 中的 11 个碱基对缺失有关。

收稿日期:2023-01-29 修回日期:2023-02-14

基金项目:自治区科技重大专项(2022A02001-1);新疆褐牛联合育种及群体改良项目(2023XJHN)

作者简介:马桢(1986—),女,博士,副研究员,研究方向:肉牛遗传育种。

* 通讯作者:闫向民(1979—),男,博士,研究员,硕士生导师,研究方向:肉牛遗传育种与繁殖。

1.2 牛肉品质生物标志物

在牛肉品质的属性中,嫩度是影响消费者接受度的最重要因素^[12]。Wei Y 等^[13]通过蛋白质组学表明,乳酸脱氢酶(LDH)和热休克蛋白(HSPs)可用作牛肉嫩度的标志物。另外,参与代谢和细胞凋亡的 H2AFX、SUMO₄ 和 TP53 等蛋白质与牛肉的嫩度有关^[14-17]。蛋白质结构的磷酸化、糖基化和泛素化会影响许多酶的活性,从而控制牛肉的嫩度^[18]。运用无标签霰弹枪蛋白质组学分析利穆赞公牛的血浆和背最长肌,发现感官评价(嫩度、多汁性、剪切力)不同的高低组间共有 31 种候选蛋白质存在丰度上的显著差异。这些蛋白质与肌肉结构、能量代谢、热休克蛋白、氧化应激和蛋白水解相关途径有关^[19]。

不同品种的牛其肉质不一样。通过比较夏洛莱、利穆赞等不同品种的公牛、阉牛以及部分奶牛的背最长肌和半腱肌,得到不同组间共有 61 种不同丰度的蛋白;GO 注释显示,这些与肌肉结构、收缩、抗氧化应激、凋亡保护、能量代谢以及热休克蛋白(HSP)和蛋白酶体亚基等在背最长肌更多,认为 PVALB 蛋白是半腱肌嫩度相关的生物标志物,而 HSPA1B 与背最长肌的嫩度关系很密切^[20]。

同一品种牛的不同部位的肉,肉质不一样。通过比较夏洛莱年轻公牛的半腱肌和背最长肌,发现不同部位肉质的嫩度不同。嫩度高的肌肉内含有更多的琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、慢 TnT 亚型的蛋白质,而那些参与快速糖酵解代谢的蛋白质,比如 LDH、烯醇化酶、磷酸葡萄糖变位酶、磷酸三糖异构酶、快速 TnT 亚型蛋白则较少。这反映了肌纤维类型的组成差异^[21]。

同一品种牛相同部位肌肉不同嫩度情况下的可溶性肌肉蛋白丰度不同。研究内洛尔公牛(*Bos indicus*)宰后 24 小时高中低嫩度的背最长肌,嫩度高组比其他两组的代谢蛋白磷酸三糖异构酶(TPI1)、磷酸葡萄糖变位酶 1(PGM1)、结构蛋白细丝蛋白 1(PFN1)、胞质氨基肽酶(LAP3)显著上调;而肌动蛋白结构蛋白(ACTA1、ACTB 和 ACTG1)、氧化应激蛋白过氧化物还原蛋白(PRDX6、PRDX2、PRDX1 和 PARK7)、热休克蛋白亚型和共伴侣蛋白(CDC37 和 STIP1)在嫩度低的两组上调。说明 Nellore 的肉嫩度取决于参与不同生物学途径的一组蛋白质的调节和表达^[22]。

另外还研究了性别对牛肉品质的影响。通过研究背最长肌、半膜肌、腹直肌、肱三头肌、半腱肌五个部位肌肉的嫩度和肌肉脂肪含量,发现存在 20 种蛋白质生物标志物丰度差异。说明参与能量代谢、肌肉收缩、细胞应激的生物标志物丰度会因性别而异。性别效应会因肌肉类型而异,其中半肌腱肌、腹直肌

和胸长肌丰度较大。另外,延长育肥时间可改变肱三头肌中的蛋白质丰度;五个部位的肌肉中小 HSP20 的丰度与屠宰年龄呈正相关^[12]。

1.3 牛肉品质变化机理

牛肉从肌肉到肉类转化的过程是多种酶参与的理化及细胞代谢的结果^[23]。细胞从肉牛活体到宰后的肉类过程中,发生细胞凋亡。这是一种高度组织的程序性细胞死亡,由三种主要途径组成:内在线粒体途径、外源性死亡受体途径、内质网应激途径。细胞凋亡的过程由半胱天冬酶(caspase)系统协调,该系统属于半胱天冬蛋白酶家族,如 caspase-8、caspase-9、caspase-3。内在线粒体通路是由细胞色素 c(cyt c)通过由 Bcl-2 蛋白家族调节的膜通透性转运孔(MPTP)从线粒体释放到细胞质而启动。cyt c 用凋亡活化因子-1(Apaf-1)寡聚化,导致凋亡体的形成。caspase-9 在细胞凋亡体中被激活,活化的 caspase-9 进一步激活 caspase-3 导致细胞凋亡^[23]。Ding 等^[24]将牛背最长肌用 H₂O₂ 处理在 4°C 下储存,检测 0.25d、1d、3d、5d 的蛋白质降解、位置和酶活性。结果表明,氧化促进 HSP27 和 cyt c 从细胞质向细胞膜的易位,降低了 μ -钙蛋白酶(μ -calpain)活性,但通过介导与两种酶的相互作用增加了 caspase-3 的活性。氧化延缓肌钙蛋白-T(troponin-T)降解,但加速肌间线蛋白(desmin)降解,这可能是因为肌原纤维的氧化修饰诱导了不同的蛋白水解敏感性。因此,氧化导致 μ -calpain 和 caspase-3 的不同调节机制,以及肌原纤维蛋白的降解程度,可能通过介导 HSP27 和细胞色素 c^[24]。

钙蛋白酶抑制剂(CASN, calpastatin)是钙蛋白酶活性的内源性抑制剂,具有高浓度的 CASN 的肌肉在屠宰后肌原纤维蛋白水解较慢。通过研究宰后第 0 天、第 1 天、第 7 天阉牛的背最长肌和肱三头肌 CASN 变异的程度,得到宰后成熟过程中 CASN 活性的下降是由于肌肉中 CASN-P2 的减少。屠宰时较高的 CASN-P2 与 μ -calpain 比率与较低的蛋白水解率和延伸有关。与细胞凋亡有关的几种蛋白质,如 HSP 70 和 HSC 71,以及线粒体蛋白 ATP 合酶(亚基 β)和琥珀酰辅酶 A 连接酶在宰后成熟过程中改变了丰度^[25]。

牛肉的品质变化除了嫩度的差异,还有颜色的不同。运用比较蛋白质组学研究荷斯坦牛背最长肌和腰大肌在宰后 4°C \pm 1°C 贮藏温度下的颜色稳定性。发现背最长肌在宰后 4d、9d 有更显著的红色,而腰大肌中高铁肌红蛋白的含量高于背最长肌;同时,背最长肌的抗氧化、修复功能的蛋白质比腰大肌多,这有利于维持颜色的稳定性;腰大肌中三羧酸(TCA)循环和线粒体电子传递链(ETC)中涉及的蛋

白质及其亚基更多,表明ETC复合物的氧化代谢和降解程度更大,因而导致颜色稳定性较差^[26]。

2 加工技术对肉品影响机理

蛋白质组学分析与肉质相关的因素表明,除肉质内在因素外,肉品储存方法、加工技术都会影响肉品质和肉色的稳定性。宰后成熟(Aging)是将肉牛胴体劈半后置于0~4℃排酸库进行吊挂排酸的过程,是改善牛肉品质的一项重要生产工艺。依据市场的不同需求,排酸的时间也不尽相同,一般为24~72h左右(国内)。排酸时间长短会影响牛肉品质,在宰后24h左右,牛肉的pH会达到最低点,接近于肌球蛋白的等电点,此时牛肉的保水性较好;随着排酸时间的延长,牛肉pH开始逐渐回升,而牛肉的保水性开始下降^[27]。

排酸过程会使牛肉得到充分的熟化,这很大程度上是由蛋白水解酶的作用引起的,包括肌间线蛋白(desmin)、肌联蛋白粗丝联接蛋白(titin)、伴肌动蛋白(nebulin)和肌钙蛋白T(TnT)。它们将蛋白质降解为肽类和氨基酸,三磷酸腺苷会分解为磷酸和次黄嘌呤,增加肉的鲜味和香味;同时牛肉的肌纤维结构也发生变化,极大提升了肉嫩度^[27-28]。采用iTRAQ MS/MS方法测定牛背最长肌在4d储存0d、3.5d和7d蛋白质组学谱,发现随着pH值降低,系水力逐渐降低,水分含量逐渐减少。包括苹果酸脱氢酶、细胞质、L-乳酸脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶和丙酮酸激酶在内的糖酵解酶簇以及另一簇参与氧转运和结合的蛋白质(肌红蛋白)和血红蛋白复合物(包括珠蛋白A1和血红蛋白亚基 α)减少。结果表明,糖酵解、氧气和血红素结合活性的降低是导致肉质变化的原因^[18]。

蛋白质组也可用于研究加工肉品的蛋白质变化,这有助于深入了解风味形成、肉类蛋白质的营养价值变化以及肉品消化率。研究显示,生肉和干腌肉在成熟6、10和14个月后肌原纤维蛋白发生修饰。肌动蛋白、原肌球蛋白和MyLC在成熟期消失,12个月后几乎完全水解^[21]。

3 应激反应对肉品质的影响

应激主要包括饲养过程中的应激和宰前应激。饲养过程中的应激主要有炎热或寒冷环境引起的温度应激、营养供应应激以及其它人为应激因素等。研究发现,相较于适宜温度,长期饲养于炎热环境的肉牛更容易生产DFD(干燥、坚硬、暗沉)牛肉^[20],其主要原因是在炎热环境下,肉牛食欲受影响引起采食量下降,肝糖原水平不足以维持机体能量稳态,需要动员肌糖原维持其血糖水平^[29]。同时炎热环

境下,肌糖原降解过程中产生的大量丙二醛及自由基会引起肌肉pH升高,影响钙蛋白酶活性,导致牛肉嫩度较差^[30]。

宰前应激主要指屠宰前肉牛在装车、运输、隔离、禁食及屠宰过程中发生的应激反应。应激一方面会激活其下丘脑-垂体-肾上腺轴系统的活动,导致一系列应激激素(如皮质醇、儿茶酚胺等)的释放,这些激素会加剧肌肉活动对肌肉代谢的影响,包括肌肉糖原分解代谢,从而干扰牛肉的酸化过程,对肉品质产生不良影响;另一方面可能导致肌肉中的糖原消耗。总体能量代谢降低,导致质子的产生减少,从而提高肉的最最终pH值,从而影响嫩度、颜色和持水能力^[31]。

4 其他

除此以外,运用蛋白质组学还研究了饲养条件对肉品质的影响。研究发现,与舍饲牛相比,放牧牛的肌红蛋白和参与有氧代谢的三羧酸循环途径的酶丰度增加、厌氧代谢酶的丰度降低,表明放牧组的氧化代谢增加,这与放牧饲养的牛其肉质红色更鲜艳的表型一致^[32]。

5 小结

肉质是一个复杂的特征,除了品种等遗传因素外,许多外在因素比如饲养条件、屠宰前应激、极端环境温度等都会影响肉牛的肉质变化。蛋白质组学不仅有助于了解肌肉生成、分化、生长的相关机制,而且有助于指导提高改善影响肉质性状的措施。

参考文献:

- [1] SWINBANKS D, Government backs proteome proposal. [J] Nature, 1995. 378(6558): 653-658.
- [2] SEDAGHAT B, HAJJARAN H, SADJJADI F S, et al., Proteomic characterization of hydatid cyst fluid: two-dimensional electrophoresis (2-DE) setup through optimizing protein extraction. [J] BMC Res Notes, 2021. 14(1): 22-30.
- [3] CILENTO E M, JIN L, STEWART T, et al., Mass spectrometry: A platform for biomarker discovery and validation for Alzheimer's and Parkinson's diseases. [J] J Neurochem, 2019. 151(4): 397-416.
- [4] THOMAS S, HAO L, RICKE W A, et al., Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics. [J] Proteomics Clin Appl, 2016, 10(4): 358-370.
- [5] CHAZE T, MEUNIER B, CHAMBON C, et al., Proteome dynamics during contractile and metabolic differentiation of bovine foetal muscle. [J] Animal, 2009, 3(7): 980-1000.
- [6] CHAZE T, MEUNIER B, CHAMBON C, et al., In vivo proteome dynamics during early bovine myogenesis. [J] Proteomics, 2008. 8(20): 4236-4248.
- [7] BENDIXEN E. The use of proteomics in meat science. [J] Meat Sci, 2005, 71(1): 138-149.
- [8] HOLLUNG K, VEISETH E, JIA X, et al., Application of pro-

- teomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. [J] *Meat Science*, 2007, 77(1): 97-104.
- [9] VOLLERT C SUEZT P, The phox homology (PX) domain protein interaction network in yeast. [J] *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(11): 1053-1064.
- [10] CHAN X C, MCDERMOTT J CSIU K W, Identification of secreted proteins during skeletal muscle development. [J] *Journal of Proteome Research*, 2007, 6(2): 698-710.
- [11] BOULEY J, MEUNIER B, CHAMBON C, et al., Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. [J] *Proteomics*, 2005, 5(2): 490-500.
- [12] PICARD B, GAGAOUA M, AL JAMMAS M, et al., Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: Effect of gender and rearing practices. [J] *J Proteomics*, 2019, 200: 1-10.
- [13] WEI Y, LI X, ZHANG D, et al., Comparison of protein differences between high- and low-quality goat and bovine parts based on iTRAQ technology. [J] *Food Chemistry*, 2019, 289: 240-249.
- [14] A P, A M, Z J, et al., Polymorphism of the ADRB2 Rs1042713 Gene is not Associated with Spontaneous Preterm Birth; Analyses in a Slovenian Sample and Meta Analysis. [J] *Balkan Journal of Medical Genetics*, 2017, 20(2): 35-42.
- [15] BAYAT Z, AHMADI-MOTAMAYEL F, PARSAN M S, et al., Potential biomarkers and signaling pathways associated with the pathogenesis of primary salivary gland carcinoma: a bioinformatics study. [J] *Genomics Information*, 2021, 19(4): e42.
- [16] GAO K, LOCKWOOD W W, LI J, et al., Genomic analyses identify gene candidates for acquired irinotecan resistance in melanoma cells. [J] *International Journal of Oncology J Oncol*, 2008, 32(6): 1343-1349.
- [17] PICARD BGAGAOUA M, Meta-proteomics for the discovery of protein biomarkers of beef tenderness: An overview of integrated studies. [J] *Food Research International*, 2020, 127: 108739.
- [18] YANG BLIU X, Application of proteomics to understand the molecular mechanisms determining meat quality of beef muscles during postmortem aging. [J] *PLoS One*, 2021, 16(3): e0246955.
- [19] ZHU Y, GAGAOUA M, MULLEN A M, et al., Shotgun proteomics for the preliminary identification of biomarkers of beef sensory tenderness, juiciness and chewiness from plasma and muscle of young Limousin-sired bulls. [J] *Meat Science*, 2021, 176: 108488.
- [20] PICARD BGAGAOUA M, Muscle Fiber Properties in Cattle and Their Relationships with Meat Qualities: An Overview. [J] *J Agricultural Food Chemistry*, 2020, 68(22): 6021-6039.
- [21] PICARD B, BERRI C, LEFAUCHEUR L, et al., Skeletal muscle proteomics in livestock production. [J] *Brief Funct Genomics*, 2010, 9(3): 259-278.
- [22] MALHEIROS J M, ENRIQUEZ-VALENCIA C E, BRAGA C P, et al., Application of proteomic to investigate the different degrees of meat tenderness in Nelore breed. [J] *J Proteomics*, 2021, 248: 104331.
- [23] FUENTE-GARCIA C, ALDAI N, SENTANDREU E, et al., Caspase activity in post mortem muscle and its relation to cattle handling practices. [J] *J Science Food Agriculture*, 2021, 101(15): 6258-6264.
- [24] DING Z, WEI Q, ZHANG C, et al., Influence of oxidation on heat shock protein 27 translocation, caspase-3 and calpain activities and myofibrils degradation in postmortem beef muscles. [J] *Food Chemistry*, 2021, 340: 127914.
- [25] YU Q, WU W, TIAN X, et al., Comparative proteomics to reveal muscle-specific beef color stability of Holstein cattle during post-mortem storage. [J] *Food Chemistry*, 2017, 229: 769-778.
- [26] M. NARAYANAN NAIR S L, C. BEACH, G. RENTFROW, AND S. P. SUMAN, Aging-Induced Changes in Sarcoplasmic Proteome of 3 Beef Hindquarter Muscles with Differential Color Stability. [J] *Meat and Muscle Biology*, 2019, 1(3): 139
- [27] WARNER R D, KEARNEY G, HOPKINS D L, et al., Retail colour stability of lamb meat is influenced by breed type, muscle, packaging and iron concentration. [J] *Meat Science*, 2017, 129: 28-37.
- [28] HOLMAN B W B, COOMBS C E O, MORRIS S, et al., Effect of long term chilled (up to 5weeks) then frozen (up to 12months) storage at two different sub-zero holding temperatures on beef: 1. Meat quality and microbial loads. [J] *Meat Science*, 2017, 133: 133-142.
- [29] HUGHES J, CLARKE F, PURSLOW P, et al., A high rigor temperature, not sarcomere length, determines light scattering properties and muscle colour in beef M. sternomandibularis meat and muscle fibres. [J] *Meat Science*, 2018, 145: 1-8.
- [30] GONZALEZ-RIVAS P A, DIGIACOMO K, GIRALDO P A, et al., Reducing rumen starch fermentation of wheat with three percent sodium hydroxide has the potential to ameliorate the effect of heat stress in grain-fed wethers. [J] *J Animal Science*, 2017, 95(12): 5547-5562.
- [31] NJISANE Y ZMUCHENJE V, Farm to abattoir conditions, animal factors and their subsequent effects on cattle behavioural responses and beef quality - A review. [J] *Asian-Australas J Animal Science*, 2017, 30(6): 755-764.
- [33] PRACHE S, MARTIN BCOPPA M, Review: Authentication of grass-fed meat and dairy products from cattle and sheep. [J] *Animal*, 2020, 14(4): 854-863.

Application of Proteomics Technology in Beef Quality Research

MA Zhen, YAN Xiang-min*

(1. Institute of Animal Science, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi, Xinjiang 830011 China;

2. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003 China)

Abstract: Proteomics has been widely used to study muscle biology and meat quality traits in different species. As the final product of the beef cattle industry, consumers pay the most attention to beef tenderness, color and juiciness. The study on beef proteomics not only helps us to clearly understand the mechanism of beef conversion from muscle to meat, but also provides scientific reference for further effective use of biomarkers, regulation of key factors of meat quality change and other improvements in beef quality.

Key words: beef; tenderness; proteomics