

# 牦牛与黄牛肌肉差异蛋白质组及生物信息学分析

左惠心<sup>1</sup> 韩玲<sup>1</sup> 余群力<sup>1</sup> 牛克兰<sup>1</sup> 赵索南<sup>2</sup> 孔祥颖<sup>2</sup>

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070; 2. 海北州畜牧兽医科学研究所, 海北 810200)

**摘要:** 为了建立和优化牦牛肌肉组织蛋白质双向电泳(2DE)体系,结合生物信息学方法进行牦牛、黄牛差异蛋白质通路分析。以牦牛背最长肌为实验材料,对不同裂解液成分、等电聚焦程序、染色方法进行研究,在最优2DE体系参数下,对比分析牦牛、黄牛差异倍数大于2倍且达到显著水平( $P < 0.05$ )的19个蛋白质,通过基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF/TOF)质谱进行鉴定,并对鉴定结果进行了基因本体(GO)注释、京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。结果表明,裂解液II、渐进式快速升压程序、改良的考染法获得的蛋白点匹配率高,牦牛、黄牛2DE图谱蛋白点平均个数分别为479个和553个。通过比较牦牛和黄牛背最长肌中差异蛋白质可知,所得到的差异蛋白质按照功能可分为代谢酶、结构蛋白和应激蛋白3大类。通过KEGG分析可知,牦牛、黄牛差异蛋白质主要集中在细胞代谢过程、碳水化合物代谢通路、遗传信息通路和能量代谢通路中,研究结果可为解释牦牛和黄牛肌肉生物学特性和肉品质差异提供理论依据。

**关键词:** 牦牛; 黄牛; 肌肉组织; 双向电泳; 差异蛋白质组学; 生物信息学

**中图分类号:** TS207.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-1298(2017)04-0313-08

## Proteomics and Bioinformatics Analyses of Differentially Expressed Proteins in Yak and Beef Cattle Muscle

ZUO Huixin<sup>1</sup> HAN Ling<sup>1</sup> YU Qunli<sup>1</sup> NIU Kelan<sup>1</sup> ZHAO Suonan<sup>2</sup> KONG Xiangying<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

2. Institute of Animal and Veterinary Science of Haibei Tibetan Autonomous Prefecture, Haibei 810200, China)

**Abstract:** Yak (*Bos grunniens*) lives at plateau area of more than 3 500 altitude meter, in this case, yak still maintains normal physiological activity. Besides, yak meat is rich in protein and low in fat, which does not contain anabolic steroids. Proteomics research with bioinformatics approach combined with the established two dimensional electrophoresis (2DE) platforms was studied by comparing yak with beef cattle muscle. Aiming to illustrate the causes and pathway of different meat qualities in yak and beef cattle, establish the optimal 2DE system and analyze protein bioinformatics pathways, different lysis buffer components, isoelectric focusing procedures and staining methods were studied by using *longissimus dorsi* muscle of yak. Proteomic profiling by 2DE and mass spectrometry identified 19 proteins that were differentially expressed in *longissimus dorsi* muscle of yak and beef cattle. Then the identified proteins were analyzed by gene ontology (GO) annotations and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway. Results showed that the optimal protein extraction methods were lysis buffer component II, progressive fast boosting program and improved coomassie blue staining method. And protein spots in yak and beef cattle were 553 and 479, respectively. Totally 19 protein spots exhibiting a two fold or more intensity difference in the meantime associated with 5% statistical significance ( $P < 0.05$ ) were considered differentially abundant. The differentially abundant proteins between yak and beef cattle could be divided into three main functional categories: metabolism proteins, structure proteins and stress proteins. The method of GO annotation provided three detailed and structured terms that included cellular component, molecular function and biological process. The differentially expressed proteins in yak and beef cattle muscle were concentrated in cellular processes, carbohydrate metabolism, genetic

收稿日期: 2017-02-14 修回日期: 2017-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460402)和国家现代农业产业(肉牛牦牛)技术体系项目(CARS-38)

作者简介: 左惠心(1988—),女,博士生,主要从事畜产品加工研究,E-mail: likevvhappy@163.com

通信作者: 余群力(1962—),男,教授,博士生导师,主要从事畜产品贮藏加工研究,E-mail: Yuqunli@gsau.edu.cn

information processing and energy metabolism pathways by KEGG pathway analysis. In conclusion, the research result demonstrated the functions of identified proteins and provided a more detailed molecular view of the processes behind meat quality in yak and beef cattle.

**Key words:** yak; beef cattle; muscle tissue; two dimensional electrophoresis; differential proteomics; bioinformatics

## 引言

牦牛分布在平均海拔高度 3 500 m 以上的高山草原,该地区空气含氧量仅为海平面的 70% 左右<sup>[1]</sup>。牦牛长期处于低氧环境,不仅仍然保持正常的生理活动,而且具有特有的肉质性状。蛋白质作为牦牛肉肉质性状的体现者,在宰前宰后的生理生化反应中具有重要的作用。

双向凝胶电泳( Two dimensional electrophoresis, 2DE)是目前蛋白质组学最常用的方法之一<sup>[2]</sup>。不同组织、不同细胞的结构和成分存在特异性差别,因此,对每个研究对象进行双向电泳条件的摸索与技术优化是非常必要的<sup>[3]</sup>。目前研究主要集中在牦牛肉成熟前后蛋白质组学变化<sup>[4]</sup>、生鲜和冷藏牦牛肉蛋白质组学变化<sup>[5]</sup>、不同品种黄牛的蛋白质组学差异<sup>[6]</sup>方面。通过分析牦牛和黄牛肉中差异蛋白质,寻找不同于普通黄牛的牦牛肉特有蛋白质亟待研究。同时,目前结合生物信息学技术中的基因本体(Gene ontology, GO)注释<sup>[7]</sup>、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路<sup>[8]</sup>、蛋白质网络等分析方法研究差异蛋白质组学的报道较少。

本文以牦牛背最长肌为研究对象,通过对不同的裂解缓冲液成分、等电聚焦程序、染色方法进行优化,寻找适合牦牛、黄牛肌肉组织蛋白提取的参数,并结合差异蛋白质组学和生物信息学分析,对比研究牦牛和黄牛的特有蛋白质,以期确定影响牦牛和黄牛肉质性状的蛋白质种类及代谢通路,为解释牦牛和黄牛肌肉生物学特性提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牦牛肉取自甘肃省武威市天祝藏族自治县,为天祝白牦牛品种;黄牛为同一饲养环境下的本地黄牛,品种是西秦杂交肉牛(西门塔尔公牛与本地秦川牛杂交后代)。采用相同的屠宰条件,各采集 6 头 36~38 月龄牛的背最长肌,共 12 个样本。从屠宰场取得刚宰杀的样品,立即用磷酸盐缓冲液清洗表面血迹后转到液氮中,带回实验室于 -80℃ 条件下保存备用。先进行肌肉双向电泳体系的构建,

然后进行比对分析。

固定化 pH 梯度(IPG)胶条(pH 值 3~10,线性,17 cm),载体两性电解质(Bio-lyte)(pH 值 3~10),美国 Bio-rad 公司;3-[ (3-胆酰胺丙基)二乙胺]-1-丙磺酸(CHAPS),二硫苏糖醇(DTT),牛血清白蛋白(BSA),聚乙二醇辛基苯基醚(Triton-X-100), $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA),乙腈(ACN),三氟乙酸(TFA),美国 Sigma 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)等其他生化试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Protean i12 IEF 型双向电泳仪,Protein II 型垂直电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;UV-250 型紫外分光光度计,日本岛津公司;TGL-24MC 型台式高速冷冻离心机,长沙英泰仪器有限公司;CP214 型电子天平,奥豪斯仪器有限公司;DHG9070A 型电热鼓风干燥箱,上海越众仪器设备有限公司;5800 MALDI-TOF/TOF 型质谱仪,AB SCIEX 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 Bradford 法蛋白质浓度测定

以磷酸盐缓冲液为空白,1 mg/mL BSA 为标准蛋白溶液,制作标准曲线。以蛋白质质量(mg)为横坐标,吸光度为纵坐标,对不同样本用 Bradford 法测定蛋白质浓度<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 肌肉组织 2DE 体系的构建

##### (1) 不同裂解液成分

参照 CHAZE 等<sup>[10]</sup>的方法并进行改进,取适量样本组织放入灭菌且预冷的研钵中,用液氮研磨成粉末状,加入适量样品裂解液溶解蛋白。

裂解液 I 成分:7 mol/L 尿素;2 mol/L 硫脲;2 g/(100 mL) CHAPS;60 mmol/L DTT;0.07%  $\beta$ -巯基乙醇;1.5% Bio-lyte 两性电解质(pH 值 3~10)。

裂解液 II 成分:8 mol/L 尿素;2 mol/L 硫脲;2 g/(100 mL) CHAPS;60 mmol/L DTT;0.07%  $\beta$ -巯基乙醇;2% Bio-lyte 两性电解质(pH 值 3~10);2% Triton-X-100。

裂解液 III 成分:8 mol/L 尿素;2 mol/L 硫脲;2 g/(100 mL) CHAPS;60 mmol/L DTT;0.07%  $\beta$ -巯基乙醇;1.5% Bio-lyte 两性电解质(pH 值 3~10);40 mmol/L Tris。

## (2) 不同等电聚焦程序

参照 JIA 等<sup>[11]</sup>的方法并进行改进,按以下程序进行等电聚焦:表面温度为 18℃;胶条最大电流 50 mA。

直接快速升压程序:50 V 主动水化 14 h,1 000 V 快速升压 1 h,9 000 V 线性升压 4 h,聚焦到 80 000 V·h,500 V 保持。

渐进式快速升压程序:50 V 主动水化 14 h,500 V 快速升压 1 h,1 000 V 快速升压 1 h,2 000 V 快速升压,9 000 V 线性升压 6 h,聚焦到 80 000 V·h,500 V 保持。

渐进式缓慢升压程序:50 V 主动水化 14 h,500 V 线性升压 0.5 h,1 000 V 线性升压 0.5 h,2 000 V 快速升压 1 h,9 000 V 线性升压 10 h,聚焦到 80 000 V·h,500 V 保持。

## (3) 不同染色方法

聚焦结束后,进行胶条平衡以及十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)处理,最后凝胶染色。

考马斯亮蓝法(考染法)参照 ZUO 等<sup>[1]</sup>的方法:0.45 g/L 考马斯亮蓝 R-250 溶于甲醇,加入相同体积超纯水、1/3 体积冰醋酸进行凝胶染色 24 h。再用等体积甲醇与冰乙酸配成的脱色液进行凝胶脱色,直到背景清晰为止。

改良的考染法参照饶维桥等<sup>[12]</sup>的方法并改进:0.1 g/L 考马斯亮蓝 R-250,5% 磷酸,0.05 g/mL 硫酸铵,10% 甲醇进行凝胶染色 24 h,再进行凝胶脱色。

银染法参照 CHEVALLET 等<sup>[13]</sup>的方法并改进:40% 无水乙醇、10% 冰乙酸、50% 纯水静置 12 h 固定凝胶,5 g/L 五水合硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、120 g/L 三水合乙酸钠( $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )、30% 无水乙醇致敏 30 min,2.5 g/L 硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )、0.1% 的 37% 甲醛银染 20 min,25 g/L 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、0.1% 的 37% 甲醛显色 5 min,4 g/L 甘氨酸终止显色 20 min,4.94 g/L 铁氰化钾( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ )、12.4 g/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  脱色直到背景清晰为止。

### 1.3.3 凝胶成像

将凝胶放于图像扫描器上,选择透射模式,以 300 dpi 分辨率扫描 16 位灰度图像,以 tif 格式存储。设置优化灵敏度、算符和背景噪声等参数,初步识别凝胶图像中的点。创建参考胶,手工匹配部分蛋白点,由 PDQuest 8.0.1 软件自动匹配后进行手工校正,所得结果进一步在参考胶中验证。

### 1.3.4 质谱鉴定

#### (1) 胶内酶解

将胶粒切碎后转入离心管中,加入 200~400  $\mu\text{L}$

100 mmol/L 碳酸氢铵( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )以及 30% ACN 脱色液(30~50  $\mu\text{L}$ , 30 mmol/L  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 与 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  体积比为 1:1),清洗脱色至透明,吸弃上清,加入 100 mmol  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,室温(20℃)孵育 15 min。吸弃上清冻干,之后加入 5  $\mu\text{L}$  2.5~10 ng/ $\mu\text{L}$  测序级胰蛋白酶溶液(酶与被分析蛋白质质量比一般为 1:100~1:20),37℃ 反应后静置 20 h 左右;吸出酶解液,转移至新离心管中,原管加入 100  $\mu\text{L}$  60% ACN 与 0.1% TFA,超声 15 min,合并酶解液冻干<sup>[1]</sup>。

#### (2) 质谱分析

冻干后的酶解样品,取 2  $\mu\text{L}$  20% ACN 复溶。取 1  $\mu\text{L}$  溶解样品,直接点于样品靶上,让溶剂自然干燥后,再取 0.5  $\mu\text{L}$  过饱和 CHCA 基质溶液(溶剂为 50% ACN 和 0.1% TFA)点至对应靶位上并自然干燥。样品靶经氮气吹净后放入仪器进靶槽并用 AB SCIEX 5800 型串联飞行时间质谱仪进行测试分析,激光源为 355 nm 波长的(钕铝石榴石晶体)Nd:YAG 激光器,加速电压为 2 kV,采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据,一级质谱(MS)扫描范围为 800~4 000 Da,选择信噪比大于 50 的母离子进行二级质谱分析,每个样品点上选择 8 个母离子,累计叠加 2 500 次,碰撞能量 2 kV<sup>[14]</sup>。

### 1.3.5 生物信息学分析

生物信息学在蛋白质组学的数据处理和分析中起着重要作用,包括数据的获取、输入、储存、加工以及数据库之间的联系<sup>[15]</sup>。

#### (1) GO 分析

GO 分析共有 3 个本体,分别描述基因的分子功能(molecular function)、所处的细胞组成(cellular component)、参与的生物过程(biological process),利用在线数据库(<http://www.geneontology.org>)进行 GO 富集分析<sup>[15]</sup>。

#### (2) KEGG 分析

利用在线数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)进行 KEGG 通路分析,在“牛属”范围内筛选差异蛋白质对应的注释,根据 KEGG 注释结果,对差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析<sup>[1,16]</sup>。以所有鉴定到的蛋白质为背景,通过费舍尔精确检验,找出差异蛋白中显著富集的 KEGG 通路,从而得知差异表达蛋白质在哪些通路中呈现富集状态。

### 1.4 数据分析

实验全部数据为重复 4 次的平均值,凝胶图像的比对分析软件为 PDQuest 8.0.1(美国 Bio-Rad 公司),蛋白点丰度差异倍数为 2 倍以上且  $P < 0.05$  判定为差异显著<sup>[17]</sup>。质谱测试文件用 Mascot 2.2

软件检索数据库。利用 blast2GO 2.8 软件(西班牙 Biobam 公司)进行 GO 富集分析,利用 KEGG 在线数据库进行通路富集分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Bradford 法标准曲线制作

本实验采用 Bradford 方法,得出标准曲线  $y = 0.0058x + 0.0387$  ( $R^2 = 0.9877$ )。由标准曲线公式可知,标准曲线线性关系良好,可以用于实验蛋白质含量的测定。

### 2.2 不同裂解液成分对 2DE 图谱的影响

本实验中裂解液 I、II、III 成分分别得到 321、498、335 个点。由图 1 可知,裂解液 II 所得图谱背景最清晰,分辨率最高,拖尾最少,蛋白点最多,说明

8 mol/L 尿素与 2 mol/L 硫脲的配比更适用于牦牛背最长肌肌肉蛋白的提取。尿素和硫脲都是应用广泛的离液剂<sup>[18]</sup>,联合使用不仅对膜蛋白有极为明显的增溶效果,而且对核蛋白等微溶性蛋白质以及对等电点附近蛋白质沉积都有改善。Triton-X-100 是一种非离子型去污剂,研究表明两性离子型去污剂比非离子型去污剂更为有效<sup>[19]</sup>。本实验中裂解液 II 既含有 Triton-X-100,也有两性离子型去污剂 CHAPS,图 1b 说明 Triton-X-100 和 CHAPS 联合使用能更好地提取组织中的蛋白质,同时裂解液中的 DTT 起到了还原作用。两性电解质 Bio-lyte 在一定程度上可以缓解盐离子浓度低的问题,具有在聚焦过程中提供稳定电导的能力,图 1b 说明裂解液 II 中 2% Bio-lyte 进一步增强了蛋白质的溶解性。

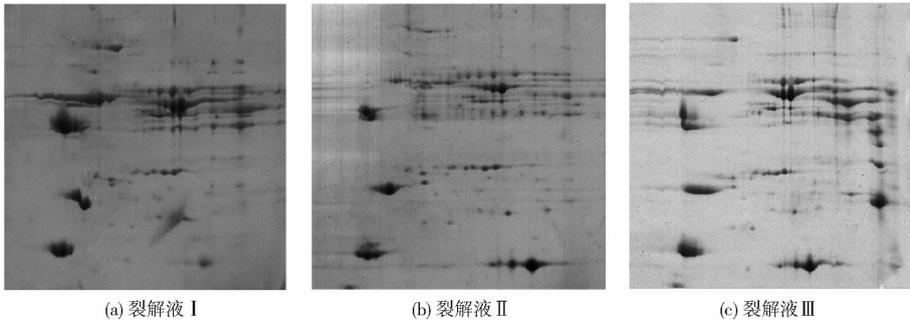


图 1 不同裂解液成分对 2DE 图谱的影响

Fig. 1 Effects of different lysis buffer components on 2DE patterns

### 2.3 不同等电聚焦程序对 2DE 图谱的影响

本实验中,取 Bradford 法测定的 200  $\mu\text{g}$  蛋白样品进行双向电泳,采用 3 种不同的等电聚焦程序,分别得到电泳图,如图 2 所示。结果显示,在 2 组程序都达到 80 000 V $\cdot$ h 时,直接快速升压中,纵向、横向拖尾均较为明显,且蛋白点模糊,不宜进行分析;渐进式缓慢升压由 50 V 起缓慢升压,延长了等电聚焦时间,却又不能快速到达高电压,使蛋白点过少;只有渐进式快速升压程序的图像中横纹明显减少,且蛋白质点清晰,分辨率高。这是因为盐离子在水化过程中容易渗入胶条,使凝胶内电流分布不均,导致 2DE 图谱出现不均一背景和拖带现象<sup>[20]</sup>。本实验

中渐进式快速升压程序从 500 V 到 9 000 V 的升压过程中,各电压区间分段升压,便于蛋白向胶条内转移,可使盐分清除较为完全。这是由于分段快速升压有助于蛋白质等电聚焦,减少蛋白损失,同时低电压条件能有效去除蛋白中的盐分并且促使大分子蛋白质进入胶条<sup>[18]</sup>。因此,选择渐进式快速升压程序作为样本的等电聚焦程序。

### 2.4 不同染色方法对 2DE 图谱的影响

考马斯亮蓝染色法和银染法是双向电泳中最常见的染色方法,本实验在相同的等点聚焦程序下,采用常规考染法、改良的考染法和银染法 3 种染色方法进行比较,分别得到 429、532、490 个点。图 3 显

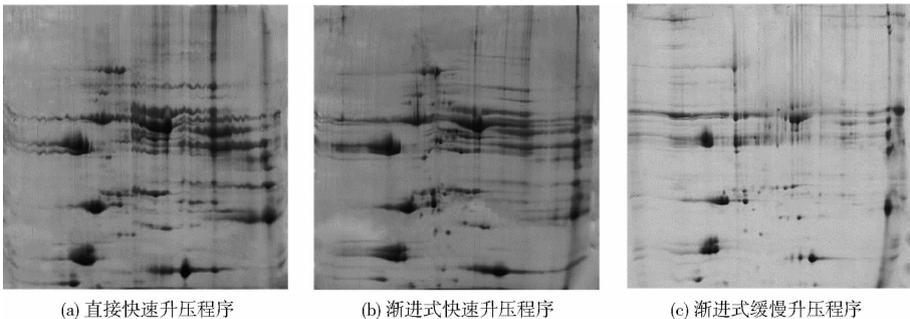


图 2 不同等电聚焦程序对 2DE 图谱的影响

Fig. 2 Effects of different isoelectric focusing procedures on 2DE patterns

示,常规考染法相对灵敏度低,检测出的蛋白点少。银染法的背景较深,高丰度蛋白点较为模糊,不够清晰,给准确判断带来一定的困难。改良的考染法与

常规考染法相比,出现的蛋白点较多;与银染法相比,拖带少,背景较清晰。因此选择改良的考染法进行后续质谱鉴定。

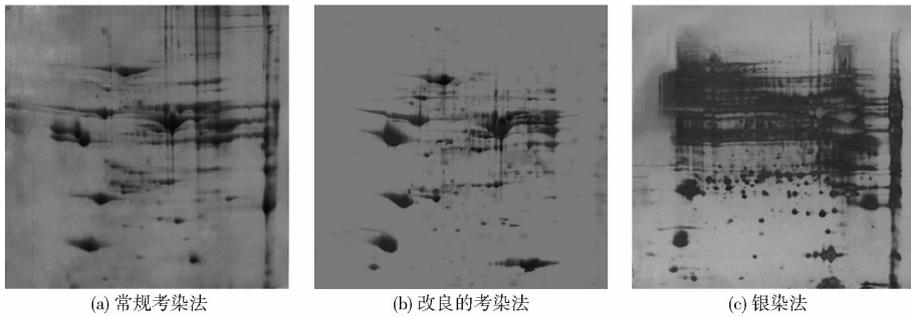


图3 不同染色方法对2DE图谱的影响

Fig. 3 Effects of different staining methods on 2DE patterns

## 2.5 差异表达蛋白点的确定

根据点丰度分析,牦牛和黄牛背最长肌2DE图谱蛋白点个数分别为479和553个。如图4所示,在牦牛和黄牛背最长肌的2DE图谱中确定了19个差异倍数大于2倍且达到显著水平( $P < 0.05$ )的蛋白点。

## 2.6 差异蛋白点质谱鉴定

本研究通过MALDI-TOF/TOF型质谱仪鉴定,共成功鉴定出可信度大于95%的19种蛋白质,点编号、蛋白名称、检索号、数据库来源、分子量、等电点、蛋白表达量和差异倍数如表1所示。其中11个点在牦牛背最长肌中表达量较高,有8个点在黄牛

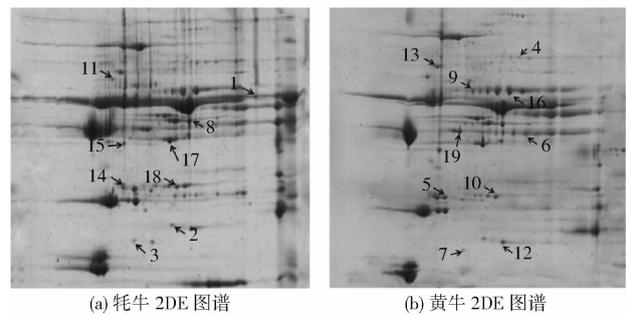


图4 牦牛、黄牛背最长肌2DE差异蛋白点标记

Fig. 4 Differentially expressed proteins marking of 2DE in yak and beef cattle *Longissimus dorsi* muscle

表1 牦牛、黄牛背最长肌差异蛋白质质谱鉴定结果

Tab. 1 Identification result of differentially expressed proteins by MALDI-TOF/TOF in *Longissimus dorsi* muscle of yak and beef cattle

点编号	蛋白名称	检索号	数据库来源	分子量/等电点	蛋白表达量 (牦牛/黄牛)	差异倍数	
2	碳酸酐酶3	gi1440898386	<i>Bos mutus</i>	28 709. 5/7. 82	3 357. 2/1 637. 6	2. 05 <sup>a</sup>	
4	乌头酸水合酶	gi127806769	<i>Bos taurus</i>	86 045. 3/8. 08	93. 8/262. 7	2. 80 <sup>b</sup>	
6	3-磷酸甘油醛脱氢酶	gi177404273	<i>Bos taurus</i>	36 073. 4/8. 5	332. 9/1 238. 3	3. 72 <sup>b</sup>	
8	二氢硫辛酸脱氢酶	gi1555998541	<i>Bos mutus</i>	52 205. 1/8. 05	8 507. 3/3 655. 1	2. 33 <sup>a</sup>	
9	线粒体乌头酸酶2	gi190970312	<i>Bos taurus</i>	79 185. 5/6. 67	1 181. 8/3 493. 7	2. 96 <sup>b</sup>	
代谢酶	11	丙酮酸激酶	gi1440897502	<i>Bos mutus</i>	63 566. 5/7. 26	2 101. 3/5 461. 4	2. 60 <sup>b</sup>
12	腺苷酸激酶同工酶	gi161888850	<i>Bos taurus</i>	21 764. 3/8. 4	6 762. 3/3 074. 1	2. 19 <sup>a</sup>	
16	$\beta$ -烯醇化酶亚型 X1	gi1528994892	<i>Bos taurus</i>	48 136. 9/8. 33	3 762. 3/8 686. 0	2. 31 <sup>b</sup>	
17	果糖二磷酸醛缩酶 A 型 X1	gi1741974489	<i>Bos taurus</i>	39 924. 5/8. 45	6 779. 2/3 173. 7	2. 14 <sup>a</sup>	
18	L-乳酸脱氢酶 A 链	gi1119371323	<i>Bos taurus</i>	36 947. 5/8. 16	7 461. 4/3 712. 1	2. 01 <sup>a</sup>	
19	醛糖还原酶	gi1162652	<i>Bos taurus</i>	34 345. 6/5. 68	1 275. 8/3 304. 3	2. 59 <sup>b</sup>	
1	角蛋白	gi1440896118	<i>Bos mutus</i>	56 362. 4/8. 3	2 515. 4/5 518. 6	2. 19 <sup>b</sup>	
3	肌钙蛋白 I	gi1440899429	<i>Bos mutus</i>	21 127. 9/9. 3	1 631. 8/712. 3	2. 29 <sup>a</sup>	
10	肌钙蛋白 T	gi1741961223	<i>Bos taurus</i>	30 796. 9/6. 12	8 092. 4/3 853. 5	2. 10 <sup>a</sup>	
结构蛋白	13	肌球蛋白-1	gi141386691	<i>Bos taurus</i>	223 763. 8/5. 57	5 700. 6/2 447. 2	2. 33 <sup>a</sup>
14	$\alpha$ -骨骼肌肌动蛋白	gi1555969483	<i>Bos mutus</i>	37 575. 6/5. 27	2 762. 3/1 100. 6	2. 51 <sup>a</sup>	
15	$\alpha$ -骨骼肌肌动蛋白前体	gi1409694	<i>Bos taurus</i>	42 451. 1/5. 31	1 775. 2/3 637. 6	2. 05 <sup>b</sup>	
7	热休克蛋白 $\beta 6$	gi1296477838	<i>Bos taurus</i>	17 525. 2/5. 95	3 913. 9/1 910. 7	2. 05 <sup>a</sup>	
应激蛋白	5	抗增殖蛋白	gi177736091	<i>Bos taurus</i>	29 842. 9/5. 57	7 157. 6/2 111. 4	3. 39 <sup>a</sup>

注: a 表示差异倍数为牦牛与黄牛蛋白表达量之比; b 表示差异倍数为黄牛与牦牛蛋白表达量之比。

背最长肌中表达量较高。这些差异蛋白质的 pI 值(等电点)大多集中在 5~8 之间,分子量在 30~100 kDa 之间。根据质谱鉴定结果,差异蛋白质主要包括三大类:代谢酶、结构蛋白和应激蛋白。大部分的代谢酶在 2DE 凝胶中性或碱性区被发现,并且在多点鉴定出亚型。

3 类差异蛋白均与肉品食用品质及加工品质形成有关。代谢类蛋白在糖酵解、三羧酸循环等生化反应中发挥重要作用。3-磷酸甘油醛脱氢酶等代谢酶是参与糖酵解的关键酶,3-磷酸甘油醛脱氢酶通过催化 3-磷酸甘油醛的氧化磷酸化,影响糖酵解代谢过程<sup>[1]</sup>。烯醇化酶是糖酵解系统和三羧酸循环的一种关键酶,不仅参与催化 2-磷酸甘油酸失水生成磷酸烯醇丙酮酸的反应,也可在糖原合成过程中催化逆向反应,即作为磷酸丙酮酸水合酶<sup>[21]</sup>。糖酵解酶的活性是影响宰后肌肉 pH 值下降速率的主要因素,进而影响着宰后僵直的进程,对肉质具有决定性作用。结构蛋白与构成细胞和生物体有关,是宰后肌肉收缩、能量代谢的基础<sup>[22]</sup>。肌球蛋白、肌动蛋白、肌钙蛋白等都与肌肉收缩有关,结构蛋白直接影响宰后肉品质,如嫩度、保水性、肉色等。应激蛋白被认为是维持肌原纤维蛋白的稳定、防止微丝等细胞骨架蛋白降解的重要调节蛋白,热休克蛋白因其具有高度保守和可以作为分子伴侣的特性,也是影响肉质的重要蛋白质<sup>[23]</sup>。

## 2.7 生物信息学分析

蛋白质组学三大核心技术包括双向电泳技术、生物质谱技术和生物信息学技术<sup>[24]</sup>。蛋白质组学

与生物信息学的结合使在整体、动态、网络的水平上研究蛋白质成为可能。同时,生物信息学作为一门生物学、数学和计算机相互交叉融合而产生的新兴学科,近年来随着基因组学和蛋白质组学的兴起而迅速发展起来<sup>[8]</sup>。与生命科学其他学科相比,生物信息学的高速发展并不主要依赖于理论上的重大突破,生物实验和衍生数据的大量储存以及基于这些数据建立的生物信息数据库在一定程度上是生物信息学发展的动力<sup>[8]</sup>。

### 2.7.1 GO 分析结果

Gene ontology 提供了一套动态更新的标准词汇表来全面描述生物体中基因和基因产物的属性<sup>[15]</sup>。利用 GO 数据库和 Uniprot 数据库对目的蛋白质进行 GO 功能分类和鉴定,并对鉴定到的条目进行 GO 条目注释,基于参与的细胞组成对 19 种蛋白质进行功能分类和鉴定,共得到 156 个注释,见图 5a(图中括号内为注释个数,下同)。基于参与的分子功能对差异蛋白质进行功能分类和鉴定,共鉴定到 70 个注释,见图 5b。基于参与的生物过程进行功能分类和鉴定,共鉴定到 230 个注释,见图 5c。

GO 分析结果与表 1 中鉴定所得差异蛋白质一致。GO 分析显示,代谢过程是造成牦牛、黄牛肉用品质差异的重要生物过程。牦牛肉与黄牛肉相比,糖酵解酶强度增加,可能是因为牦牛为适应高原环境而产生高原习服现象,通过增加糖酵解来支持和维持 ATP 的产生,这可能是牦牛、黄牛肉 2 个品种之间食用品质及加工品质差异的原因之一<sup>[25]</sup>。本实验中牦牛、黄牛虽采自同一饲养环境,但牦牛长期

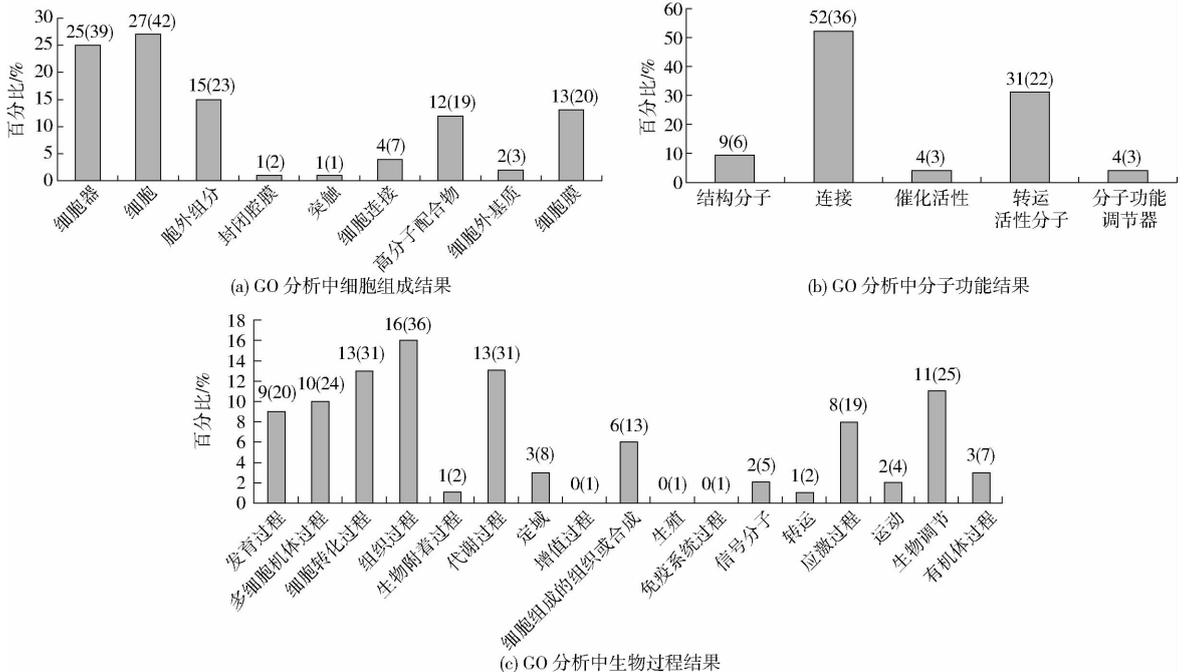


图 5 差异表达蛋白质的 GO 分析结果

生活在高海拔地区,已具有充分利用氧气的的能力,而本地黄牛与牦牛相比,糖酵解酶强度较低,表明其体内仍存在缺氧状况,继续承受着高原环境的选择<sup>[26]</sup>。GO分析显示,组织过程也是造成牦牛、黄牛肉用品质差异的重要生物过程。肌球蛋白、肌动蛋白是构成肌动球蛋白复合体的蛋白,对肉的结构和抗拉强度产生重要影响。MARINO等<sup>[22]</sup>研究证实肌球蛋白轻链在波多利安牛中表现出更高的丰度,肌球蛋白轻链的增加表明在内源酶的作用下,肌球蛋白横桥发生断裂,因此肌球蛋白轻链可作为预测肉嫩度指标的重要蛋白。GO分析显示,应激过程也是影响牦牛与黄牛肉用品质差异的重要生物过程。热休克蛋白可保护微丝等细胞骨架蛋白,防止结构破坏和由于肌肉细胞凋亡引起的蛋白的降解,维持肌原纤维蛋白的稳定性。热休克蛋白 $\beta 6$ 属于小热休克蛋白家族,据推测,HSP $\beta 6$ 丰度的改变可能导致肌动蛋白丝的稳定性降低,这可能与嫩度增加相关<sup>[23]</sup>。由表1可知,热休克蛋白在牦牛肌肉组织中丰度较高,表明牦牛为适应高原环境,产生更为强烈的应激反应。

### 2.7.2 KEGG 通路分析结果

在生物体内,不同蛋白相互协调行使其生物学行为,基于通路的分析有助于更进一步了解其生物学功能。KEGG是有关代谢通路的公共数据库,通过通路分析能确定蛋白质参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径<sup>[16]</sup>。利用KEGG数据库信息和分类体系,分析牦牛、黄牛差异表达蛋白所处的相关代谢通路,共聚集得到7类代谢通路,结果如图6所示。

结合表1和图6的实验结果,说明造成牦牛、黄牛不同物种间肌肉生物学特性差异的主要蛋白质包括代谢酶、结构蛋白和应激蛋白,这些蛋白质主要涉及到的代谢通路包括细胞代谢通路、碳水化合物代谢通路、遗传信息通路、能量代谢通路、氨基酸代谢通路等,涉及这些代谢通路的生理生化反应最终造

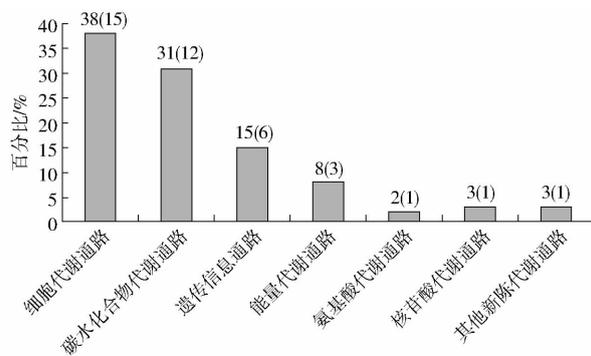


图6 差异表达蛋白质的KEGG通路富集分析图

Fig. 6 Analysis of differentially expressed proteins identified by KEGG pathway enrichment

成了牦牛、黄牛肉用品质的差异。生物体中,蛋白质通过蛋白质相互作用、修饰和调节,构建复杂的网络来实现生理生化功能<sup>[27]</sup>。由图6可知,细胞代谢(38%)、碳水化合物代谢(31%)和能量代谢(8%)相关的蛋白质在代谢通路分类中约占77%,从而进一步确定蛋白质代谢过程在不同种类肉质形成过程中的重要性。蛋白质在遗传信息系统(15%)中的参与表明蛋白质与基因表达状态之间的相关性,为进一步遗传分析提供了重要的目标基因,为通过遗传育种和饲料改良提高肉品质提供理论参考。

### 3 结束语

通过2DE体系的优化,显示裂解液II、渐进式快速升压程序、改良的考染法获得的蛋白点匹配率高。通过差异蛋白质组学分析,鉴定出19个牦牛与黄牛背最长肌之间的差异蛋白,所得到的蛋白主要分为代谢酶类、结构蛋白和应激蛋白。通过生物信息学分析,表明差异蛋白质主要富集在细胞代谢通路、碳水化合物代谢通路、遗传信息通路和能量代谢通路。通过对比研究黄牛和牦牛的蛋白质组差异,旨在解释牦牛适应高原低氧环境的分子生物学基础,为研究牦牛和黄牛肌肉生物学特性和肉品质差异提供理论依据。

### 参 考 文 献

- ZUO H X, HAN L, YU Q L, et al. Proteome changes on water-holding capacity of yak *Longissimus lumborum* during postmortem aging[J]. Meat Science, 2016, 121: 409 - 419.
- PICARD B, BERRI C, LEFAUCHEUR L, et al. Skeletal muscle proteomics in livestock production [J]. Briefings in Functional Genomics, 2010, 9(3): 259 - 278.
- 左惠心,韩玲,牛克兰,等.不同细胞破碎方法对肉牛、牦牛背最长肌双向电泳图谱的影响[J].肉类研究,2015,29(7):11 - 15. ZUO Huixin, HAN Ling, NIU Kelan, et al. Comparison of different cell disruption methods for two-dimensional electrophoresis analysis of beef and yak muscle [J]. Meat Research, 2015, 29(7): 11 - 15. (in Chinese)
- 师希雄,罗天林,余群力.牦牛肉成熟前后差异蛋白质组学分析[J/OL].农业机械学报,2015,46(9):251 - 256. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\_abstract.aspx?flag=1&file\_no=20150937&journal\_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2015.09.037. SHI Xixiong, LUO Tianlin, YU Qunli. Analysis of differential proteomics between fresh and aging yak meat[J/OL]. Transactions

- of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(9): 251–256. (in Chinese)
- 5 贾建磊,张勤文,张红见,等. 青藏高原有机牦牛背最长肌肌肉的差异蛋白质组学[J]. 肉类研究, 2016, 30(6): 15–18.  
JIA Jianlei, ZHANG Qinwen, ZHANG Hongjian, et al. Differential proteomics analysis of fresh and refrigerated *Longissimus dorsi* muscles of organically raised yaks from the Qinghai–Tibetan plateau[J]. Meat Research, 2016, 30(6): 15–18. (in Chinese)
- 6 郝瑞杰. 不同品种/品系/类群牛背最长肌的比较蛋白质组学分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2015.
- 7 周犀. 预测分子相互作用网络及基于网络的系统生物学分析[D]. 杭州:浙江大学, 2013.
- 8 吴祖建,高芳銮,沈建国. 生物信息学分析实践[M]. 北京:科学出版社, 2010: 2–6.
- 9 BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1–2): 248–254.
- 10 CHAZE T, BOULEY J, CHAMBON C, et al. Mapping of alkaline proteins in bovine skeletal muscle[J]. Proteomics, 2006, 6(8): 2571–2575.
- 11 JIA X H, HOLLUNG K, THERKILDSEN M, et al. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*[J]. Proteomics, 2006, 6(3): 936–944.
- 12 饶维桥,肖伟敏,张继远,等. 改良的蛋白质电泳考马斯亮蓝染色方法研究[J]. 生物技术通报, 2014(9): 58–64.  
RAO Weiqiao, XIAO Weimin, ZHANG Jiyuan, et al. The research of an improved method for protein staining in electrophoresis with coomassie brilliant blue[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(9): 58–64. (in Chinese)
- 13 CHEVALLET M, LUCHE S, RABILLOU T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels[J]. Nature Protocol, 2006, 1(4): 1852–1858.
- 14 LIU H, SULTAN M A, LIU X L, et al. Physiological and comparative proteomic analysis reveals different drought responses in roots and leaves of drought-tolerant wild wheat (*Triticum boeoticum*)[J]. Plos One, 2015, 10(4): e0121852.
- 15 ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25–29.
- 16 KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 27–30.
- 17 LI X, YANG B, WANG J, et al. BTH treatment caused physiological, biochemical and proteomic changes of muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit during ripening[J]. Journal of Proteomics, 2015, 120: 179–193.
- 18 牛屹东,冯捷,崔恒,等. 蛋白质双向电泳实验手册[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2006: 8–10.
- 19 DOHERTY M K, MCLEAN L, HAYTER J R, et al. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain[J]. Proteomics, 2004, 4(7): 2082–2093.
- 20 HOPKINSON A, MCINTOSH R S, LAYFIELD R, et al. Optimised two-dimensional electrophoresis procedures for the protein characterisation of structural tissues[J]. Proteomics, 2005, 5(7): 1967–1979.
- 21 WANG Z Y, HE F, RAO W L, et al. Proteomic analysis of goat *Longissimus dorsi* muscles with different drip loss values related to meat quality traits[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(2): 425–431.
- 22 MARINO R, ALBENZIO M, DELLA M A, et al. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds[J]. Meat Science, 2014, 98(2): 178–186.
- 23 POLATI R, MENINI M, ROBOTTI E, et al. Proteomic changes involved in tenderization of bovine *Longissimus dorsi* muscle during prolonged ageing[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 2052–2069.
- 24 ZHOU Y, LI Z Q, TANG F, et al. Proteomics annotate therapeutic properties of a traditional Tibetan medicine—Tsantan Sumtang targeting and regulating multiple perturbed pathways[J]. Journal of Thnopharmacology, 2016, 181: 108–117.
- 25 DING X Z, LIANG C N, GUO X, et al. Physiological insight into the high-altitude adaptations in domesticated yaks (*Bos grunniens*) along the Qinghai–Tibetan Plateau altitudinal gradient[J]. Livestock Science, 2014, 162(1): 233–239.
- 26 QIU Q, ZHANG G J, MA T, et al. The yak genome and adaptation to life at high altitude[J]. Nature Genetics, 2012, 44(8): 946–949.
- 27 ZHENG A J, LIU G H, ZHANG Y S, et al. Proteomic analysis of liver development of lean Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*)[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(17): 5396–5413.