

不同年龄驼肉蛋白质组成的差异分析

斯仁达来¹, 何静¹, 明亮¹, 伊丽¹, 吉日木图^{1,2,*}

(1. 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古中哈骆驼研究院, 内蒙古 阿拉善 737300)

摘要: 采用串联质谱标签定量蛋白质组学与液相色谱-串联质谱联用技术分析不同年龄组驼肉之间蛋白质组成差异, 筛选与驼肉品质相关的关键蛋白。结果发现, 蛋白质的差异表达对骆驼不同年龄肉品质的差异有重要影响。在3个年龄组(3~4、6~7岁和9~10岁; 分别以I、II和III表示)骆驼背最长肌中共检测到差异显著蛋白质311种; I vs II组、II vs III组以及I vs III组差异蛋白质数分别为245、16个和139个, 其中上调蛋白质分别为194、1个和110个, 下调蛋白质分别为51、15个和29个。基因本体论功能注释分析表明, 结构蛋白质、代谢蛋白质和热应激蛋白质可以作为驼肉不同年龄的标志蛋白质。京都基因与基因组百科全书通路分析表明, 差异蛋白质主要参与了脂肪酸代谢、糖酵解/葡萄糖生成、氨基酸的生物合成和低氧诱导因子-1信号通路; 蛋白质相互作用分析表明, 代谢酶类蛋白质是影响驼肉的关键连接蛋白质; 相关性分析表明, 共有16个差异蛋白质与嫩度品质有显著相关性, 3个年龄组驼肉嫩度品质主要受肌动蛋白、组蛋白和蛋白激酶类的影响。本研究结果可为驼肉的分级评定、屠宰年龄的选择以及驼肉品质特性研究提供科学依据。

关键词: 蛋白质组学; 不同年龄; 驼肉; 品质特性

Differential Analysis of Proteomes among Camel Meat from Different Ages

SI Rendalai¹, HE Jing¹, MING Liang¹, YI Li¹, JI Rimutu^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. CHN-KAZ Camel Research Institute of Inner Mongolia, Alxa 737300, China)

Abstract: The differences in the proteomes of camel meat from different age groups were analyzed by tandem mass tag (TMT)-based quantitative proteomics and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to identify the key quality-related proteins of camel meat. The results showed that differentially expressed proteins (DEPs) had an important effect on the quality of camel meat. A total of 311 DEPs were identified in the *longissimus dorsi* muscle of camels from three age groups, 3–4 (I), 6–7 (II), and 9–10 (III) years old. Altogether 245 DEPs were identified in groups I versus II, 16 in groups II versus III, and 139 in groups I versus III. In addition, 194, 1, and 110 DEPs were up-regulated, and 51, 15, and 29 DEPs were down-regulated in the three comparison groups, respectively. Gene Ontology (GO) functional annotation analysis indicated that structural proteins, metabolic proteins, and heat stress proteins could be used as biomarkers for discrimination among camel meat from different ages. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis showed that the DEPs were mainly involved in fatty acid metabolism, glycolysis/glucose production, amino acid biosynthesis, and the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway. Protein-protein interaction (PPI) analysis showed that metabolic enzyme proteins were key network-connecting proteins that affect camel meat from different ages. Correlation analysis showed that 16 DEPs were correlated closely with meat tenderness. The tenderness of camel meat from the three age groups was mainly influenced by actin, histone and protein kinases. The results of this study can provide a scientific basis for the grading and evaluation of camel meat, the selection of optimal slaughter age, and the study of camel meat quality characteristics.

Keywords: proteomics; different ages; camel meat; quality characteristics

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230503-009

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0218-11

收稿日期: 2023-05-03

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2020YFE0203300); 内蒙古自治区科技计划项目(2019GG359)

第一作者简介: 斯仁达来(1989—)(ORCID: 0000-0003-3171-1473), 男, 博士研究生, 研究方向为农畜产品加工。

E-mail: sirendalai_imaui@163.com

*通信作者简介: 吉日木图(1965—)(ORCID: 0000-0002-5020-9529), 男, 教授, 博士, 研究方向为农畜产品加工。

E-mail: yeluotuo1999@vip.163.com

引文格式:

斯仁达来, 何静, 明亮, 等. 不同年龄驼肉蛋白组成的差异分析[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 218-228. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230503-009. <http://www.spkx.net.cn>

SI Rendalai, HE Jing, MING Liang, et al. Differential analysis of proteomes among camel meat from different ages[J]. Food Science, 2024, 45(2): 218-228. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230503-009. <http://www.spkx.net.cn>

双峰驼适应干旱和半干旱地区的严寒、酷暑以及高辐射等恶劣环境, 其养殖和产品加工一直是我国戈壁沙漠地区牧民的重要经济来源^[1-3]。近年来, 随着人们对肉制品消费量的增加, 高营养、高品质的肉制品得到广泛重视^[4-5]。驼肉是一种高蛋白质、低脂肪、低胆固醇, 富含多种不饱和脂肪酸及氨基酸的瘦肉型肉类, 受到越来越多消费者的喜爱^[6]。然而, 目前对驼肉品质的研究还不够系统和深入, 最佳屠宰年龄的选择和优质部位肉的价值鲜有研究, 驼肉的特色营养功能尚未被充分挖掘, 导致其经济效益较低, 制约了荒漠地区特色畜牧业的发展。

蛋白质组学技术是一种研究肉类科学的有效方法, 利用组学技术识别生物标志物以评价肉品质量, 解释不同肉质性状潜在的生物学途径和分子机制^[7-8]。蛋白质组学研究主要包括高通量测序、蛋白质的分离鉴定和生物学信息的分析。在差异蛋白质组学的研究中, 通常运用双向电泳结合质谱技术分离和鉴定差异蛋白质^[9]。凝胶电泳在蛋白质组学研究中是一种常见的蛋白质分离技术^[10], 其中差异凝胶电泳技术比传统双向电泳技术的重复性好, 能够显著提高分析结果的准确性^[11]。质谱技术是一种常用的蛋白质鉴定方法, 也是蛋白质组学的核心部分^[12-14]。研究者通过蛋白质组学发现肌钙蛋白T、肌动蛋白、热休克蛋白(heat shock protein, HSP) β -1、肌酸激酶、肌钙蛋白C、肌球蛋白重链等具有多种抗应激功能, 这些蛋白质与肉品质有高度相关性, 可作为肌肉嫩度的生物标志物^[15-16]。Mao Yanwei等^[17]利用蛋白质组学研究了牛肉的脂肪含量, 结果表明HSPB1与肌肉脂肪沉积高度相关, 可作为肌肉脂肪沉积的标志蛋白质。Zhang Muhan等^[18]研究了不同滴水损失水平的两组肉样, 成功筛选出与肌肉保水性能有较大关系的结构蛋白质、代谢酶、抗氧化酶和应激反应蛋白质等21个差异蛋白质。Joseph等^[19]利用蛋白质组学技术分析牛背最长肌和腰大肌的颜色稳定性, 发现肌浆蛋白质中差异蛋白质含量与肉的颜色相关, 其中抗氧化蛋白质和伴侣蛋白质含量差异最显著, 可作为2种肌肉颜色的标志蛋白质。闫忠心^[20]利用串联质谱标签(tandem mass tags, TMT)蛋白质组学技术与液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)联用技术研究了牦牛宰后不同部位蛋白质组的变化, 共鉴定出88个差异蛋白质, 结果表明热激蛋白质和结构蛋白质可以作为牦牛肉不同部位嫩度的标志蛋白质。因此, 应用蛋白质组学作为一种新兴的技术, 能够

探寻蛋白质组表达差异的原因, 评价宰前宰后各因素对肉品品质的影响, 对提高肉品品质具有重要意义。

为了解不同年龄阿拉善双峰驼肉差异蛋白质与品质特性的相关性, 进而阐明不同年龄驼肉的异质性机制, 本研究选取不同年龄组驼肉, 采用TMT蛋白质组学方法分析差异蛋白质, 并进行相关通路富集分析, 探讨不同年龄组驼肉品质差异的机制, 旨在为进一步改善驼肉品质提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

骆驼背最长肌 阿拉善左旗利发农牧业有限公司。

二硫苏糖醇、脱氧胆酸钠、碳酸氢铵、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、蛋白质酶抑制剂、三氟乙酸、甲酸 美国Sigma-Aldrich公司; 乙腈 上海安谱实验科技股份有限公司; TMT试剂盒、BCA定量试剂盒 美国Thermo公司; 胰蛋白酶 美国Promega公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、丙酮 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

uflc-20A高效液相色谱仪 日本岛津公司; QE-xactive HFX质谱仪 美国Thermo公司; XBridge BEH C₁₈ XP色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μ m) 美国Waters公司; FS-1200N细胞超声破碎仪 苏州海纳科技有限公司; TPS1000恒温混匀仪 杭州瑞诚仪器有限公司; Spectra max 190全波长酶标仪 美谷分子仪器(上海)有限公司; 13111-V-220涡旋仪 北京智杰方远科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集

以自然放牧条件下发育正常、健康的阿拉善双峰骆驼为研究对象, 选取3~4、6~7岁和9~10岁年龄段雄性骆驼(每组3峰, 共9峰)的背最长肌进行蛋白质组学分析。样品采集后均置于冻存管中, 标记编号并立即放入液氮中, 随后转至-80℃保存。I、II、III分别代表3~4、6~7岁和9~10岁年龄段组。

1.3.2 样品前处理

1.3.2.1 蛋白质的提取

3个年龄段组(I、II和III组)每组3个重复。每个样品中提取2 mL蛋白质溶液, 使用SDT裂解法(加入RIPA工

作液(质量分数1% SDS、质量分数1% NP-40裂解液、质量分数1%脱氧胆酸钠、15 mmol/L NaCl、25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6), 在4 °C、12 000×g离心处理15 min) 提取蛋白质。

1.3.2.2 肽段酶解

采用FASP酶解法对提取的蛋白质酶解, 胰蛋白酶干粉溶于50 mmol/L碳酸氢铵中, 按照蛋白:酶=50:1的质量比加入胰蛋白酶; 用封口膜密封超滤管, 置于37 °C烘箱中孵育16~18 h。之后使用C₁₈固相萃取小柱对肽段进行脱盐, 再进一步将样品冻干后加入体积分数0.1%甲酸溶液进行复溶, 随后BCA法进行定量分析。

1.3.2.3 TMT标记

按照TMT标记试剂盒说明书进行标记。

1.3.2.4 反向分级

将TMT标记的每组肽段复溶后, 使用反相超高效液相色谱在碱性条件下进行分级。具体参数如下: 色谱柱: 150 mm×2.1 mm (XBridge BEH C₁₈ XP); 流动相A: 10 mmol/L乙酸铵, pH 10; 流动相B: 10 mmol/L乙酸铵, 10%水, 90%乙腈, pH 10; 梯度洗脱程序: 0~2 min, 95% A、5% B; 2~42 min, 95%~70% A、5%~30% B; 42~52 min, 70%~60% A、30%~40% B; 52~56 min, 60%~10% A、40%~90% B; 56~58 min, 10% A、90% B; 58~60 min, 98% A、2% B。1 min收集1个组分, 持续循环收集, 合并成12个组分, 真空干燥后-80 °C冻存。

1.3.3 LC-MS/MS分析条件

每个样品经过LC-MS/MS液相系统EASY nLC1200进行分离后联用配备纳升离子源的质谱仪进行数据采集。色谱柱采用反相色谱柱(Reposil Pur 120 C₁₈ AQ)(100 μm×15 cm, 1.9 μm)。流动相采用乙腈-水-甲酸联合体系。其中流动相A为0.1%甲酸-98%水溶液(乙腈为2%), B相为0.1%甲酸-80%乙腈溶液(水为20%)。上样时, 先用流动相A平衡色谱柱, 再经色谱柱梯度分离, 流速为300 nL/min, 梯度洗脱程序: 0~2 min, 98%~95% A、2%~5% B; 2~70 min, 95%~78% A、5%~22% B; 70~86 min, 78%~55% A、22%~45% B; 86~88 min, 55%~5% A、45%~95% B; 88~90 min, 5% A、95% B。

质谱分析使用数据依赖性采集模式, 参数如下: 质谱扫描范围为 m/z 350~1 600; 分辨率: 120 k; 自动增益控制: 3×10^6 ; 最大离子注入时间: 30 ms; 四极杆隔离窗口: m/z 0.7; 标准化碰撞能为32%; 二级质谱扫描范围固定起点: m/z 110; 动态排除时间: 45 s。

1.4 数据处理与分析

1.4.1 数据处理

先对原始数据的缺失值进行筛选, TMT保留在所有样本中均检测到的蛋白质; 其次, 对所属蛋白质的唯一肽段数进行筛选, 保留唯一肽段数 ≥ 1 。蛋白质表达量在

差异倍数(fold change, FC) >1.5 且 $P<0.05$ 时, 表现为上调, 当 $FC<0.67$ 且 $P<0.05$ 时, 表现为下调^[21]。

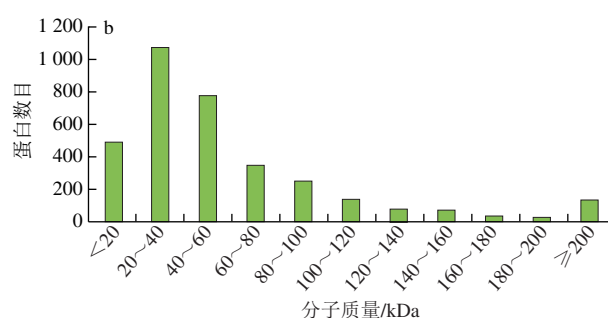
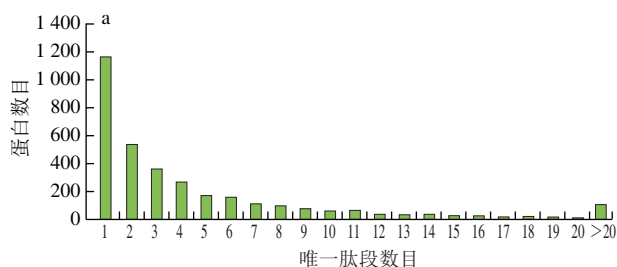
1.4.2 生物信息学分析

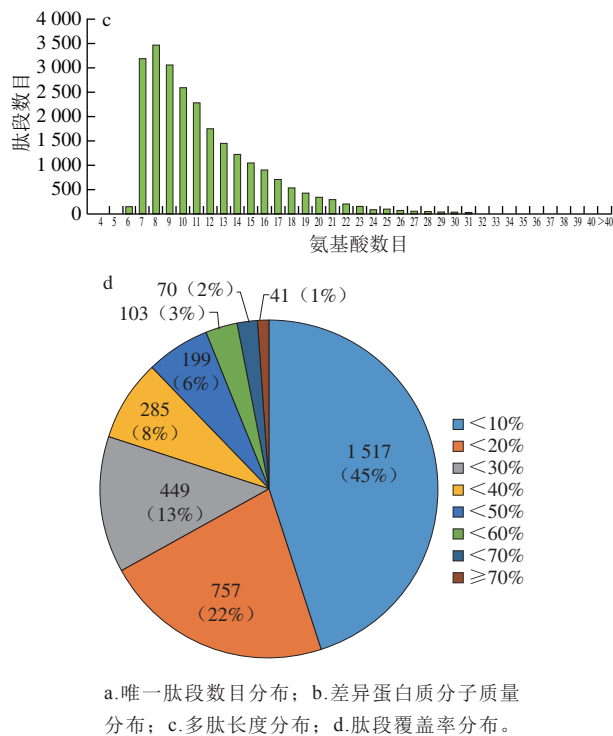
将鉴定到的不同年龄驼肉蛋白质序列与基因本体(Gene Ontology, GO)数据库、直系同源集(Cluster of Orthologous Groups, COG)数据库和亚细胞定位数据库等进行比对, 获得差异蛋白质在各数据库的功能注释信息; 再利用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) Pathway数据库(www.kegg.jp/kegg/pathway.html)对不同年龄组驼肉的差异蛋白质进行通路分析。最后, 用STRING数据库(<http://string-db.org/>)分析差异蛋白质之间的相互作用对应关系, 并运用CytoScape软件(Version 3.2.1)绘制蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interactions, PPI)关系网络图。

2 结果与分析

2.1 不同年龄组驼肉蛋白质的鉴定和定量

共鉴定到3 421个蛋白质和23 989条多肽。唯一肽段数分布见图1a, 随着唯一肽段数目的增多, 累计占比呈现缓慢增多的趋势, 说明鉴定到越来越多的可靠蛋白, 符合实验结果的要求。分子质量在20~120 kDa之间的蛋白占大多数, 其中位于20~40 kDa之间的蛋白最多(图1b)。多肽长度分布主要在7~23个氨基酸的长度, 随着长度增加肽段数量逐渐减少, 表明肽段长度比较合理, 酶切结果比较理想(图1c)。蛋白质鉴定到的肽段覆盖率分布如图1d所示, 已鉴定的蛋白质序列覆盖率相对较低, 其中45%蛋白质的肽段覆盖率低于10%。





a.唯一肽段数目分布; b.差异蛋白质分子质量分布; c.多肽长度分布; d.肽段覆盖率分布。

图1 不同年龄组骆驼肉蛋白质的鉴定和定量

Fig. 1 Identification and quantification of proteins in camel meat from different age groups

2.2 不同年龄组骆驼肉主成分分析 (principal component analysis, PCA)

使用SIMCA软件对定量的蛋白质数据进行对数和中心化处理, 建立PCA模型(图2)。结果表明, 各组蛋白质谱在PC1和PC2方向上存在差异, 总贡献率达到67.1%。3个不同年龄段I、II和III组样本间有明显的分离趋势, 表明3个年龄段间蛋白质谱有明显变化, 且均有显著差异。

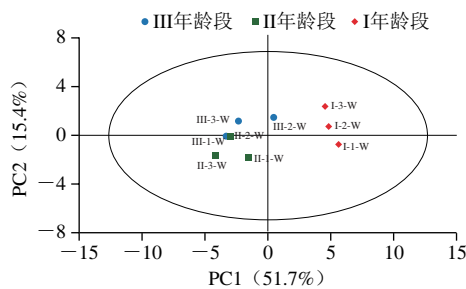


图2 不同年龄组骆驼肉蛋白质的PCA得分散点图

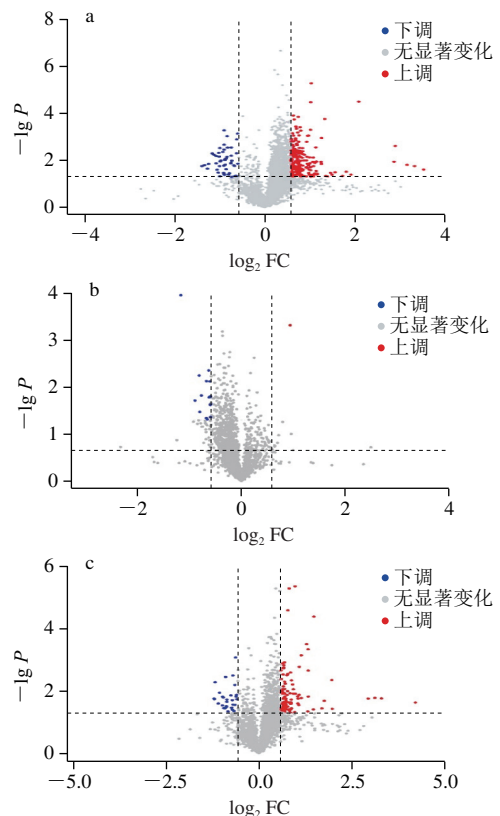
Fig. 2 PCA score plot of proteins in camel meat from different age groups

2.3 不同年龄组骆驼肉蛋白质差异表达分析

由图3可知, 在I vs II组、II vs III组以及I vs III组中, 差异蛋白质数分别为245、16个和139个, 其中上调蛋白质分别为194、1个和110个, 下调蛋白质分别为51、15个和29个。

从年龄组间观察到结构蛋白质、代谢蛋白质、细胞防御和应激蛋白质的丰度变化较大。年龄主导变化的结

构蛋白质主要有肌动蛋白质、角蛋白、肌球蛋白、肌钙蛋白质、锌指蛋白质318等; 代谢蛋白质主要有甘油醛-3-磷酸脱氢酶、乳酸脱氢酶、肌酸激酶等。研究表明, 这些蛋白质与肌肉的嫩度、蒸煮损失和肌肉有序结构密切相关^[22]。其中, 3-磷酸脱氢酶是糖酵解途径中的关键酶, 与ATP的合成密切相关^[23-24]; 本研究中3-磷酸脱氢酶在III组中上调表达, 这可能是大年龄组糖酵解活性较高的原因。有研究表明, 肌肉中肌酸激酶含量与其pH值正相关^[25-26]; 本研究中肌酸激酶在III组中高表达, 这可能是大年龄肉品质变差的主要原因。核糖体RNA加工蛋白7同源物A对调节大脑发育、神经信号发生和细胞增殖起重要作用, 本研究中I组中其表达量为III组的18.06倍, 表明幼龄骆驼机体需要更多的营养素支持肌肉生长, 尤其是大脑发育和神经细胞增长, 这与文献^[27]研究结果一致。钙/钙调蛋白质依赖性丝氨酸蛋白激酶 (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase, CASK) 对细胞骨架的蛋白质降解起重要作用, 且在肌肉嫩度变化过程中也发挥重要的影响^[28], CASK在I组中表达丰度较高, 这也是I组嫩度优于III组的主要原因之一。此外, 相关研究表明, HSP能保持肌肉细胞的完整性, 防止肌原纤维蛋白质分解, 这直接影响肌肉的嫩度^[29], 本研究中HSPB7和HSPB8在I组中高表达。



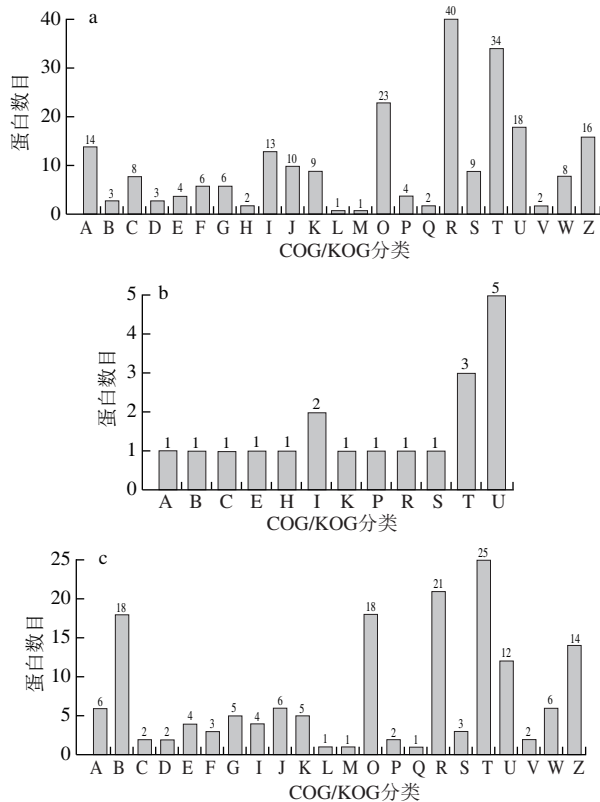
a. I vs II组; b. II vs III组; c. I vs III组; 图4、5、8、9同。

图3 不同年龄组骆驼肉差异蛋白质火山图

Fig. 3 Volcano maps of differentially expressed proteins in camel meat from different age groups

2.4 不同年龄组驼肉差异蛋白质的COG功能分类

为分析各组差异蛋白质的潜在功能,进行了COG功能分析^[30]。I vs II组中(图4a),差异蛋白质的信息主要定位在信号转导机制(34个),细胞内运输、分泌和囊泡运输(18个),脂质运输和代谢(13个)等生物学功能上。II vs III组中(图4b),差异蛋白质的信息主要定位在细胞内运输、分泌和囊泡运输(5个),信号转导机制(3个)和脂质运输和代谢(2个)等生物学功能上。I vs III组中(图4c),差异蛋白质的信息主要定位在信号转导机制(25个)、染色质结构和动力学(18个)和细胞骨架(14个)等生物学功能上。从差异蛋白质COG分析可知,差异蛋白质的生物学功能主要集中在信号转导机制,染色质结构和动力学,翻译后修饰、蛋白质周转与伴侣蛋白,细胞骨架,细胞内运输、分泌和囊泡运输等功能上。



A. RNA加工和修饰; B.染色质结构和动力学; C.能源生产和转换; D.细胞周期控制、细胞分裂、染色体分裂; E.氨基酸运输和代谢; F.核苷酸运输和代谢; G.碳水化合物运输和代谢; H.辅酶运输和代谢; I.脂质运输和代谢; J.翻译、核糖体结构与生物发生; K.转换; L.复制、重组和修复; M.细胞壁/膜/包膜生物发生; O.翻译后修饰、蛋白质周转与伴侣蛋白; P.无机离子转运和代谢; Q.次级代谢产物生物合成、转运和分解代谢; R.一般功能预测; S.功能未知; T.信号转导机制; U.细胞内运输、分泌和囊泡运输; V.防御机制; W.细胞外结构; Z.细胞骨架。

图4 不同年龄组驼肉差异蛋白质COG分析结果

Fig. 4 COG analysis of differentially expressed proteins in camel meat from different age groups

2.5 不同年龄组驼肉差异蛋白质的亚细胞定位分析

CELLO亚细胞定位预测结果表明, I vs II组中的差异蛋白质定位到12个条目上(图5a), 主要是细胞质蛋白质102个、分泌蛋白质47个、细胞核蛋白质41个等; II vs III组中的差异蛋白质定位到6个条目上(图5b), 主要是细胞质蛋白质5个、线粒体蛋白质5个、细胞核蛋白质3个等; I vs III组中的差异蛋白质定位到8个条目上(图5c), 主要是细胞质蛋白质63个、分泌蛋白质23个、线粒体蛋白质11个等。从结果可以看出, 不同年龄间差异蛋白质主要的细胞定位为细胞质、线粒体和分泌等场所, 这有可能导致了不同年龄肌肉之间的品质特性差异^[31]。

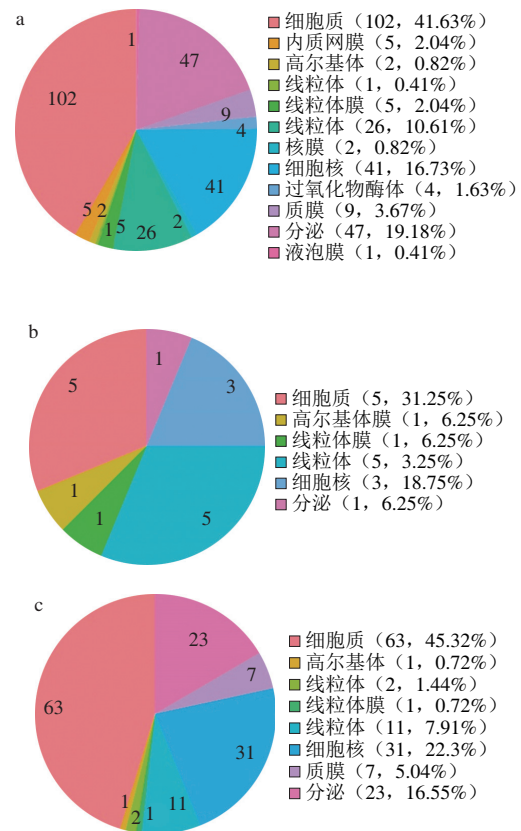


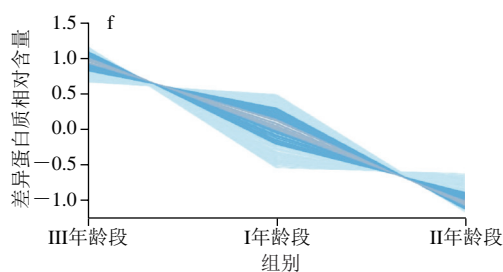
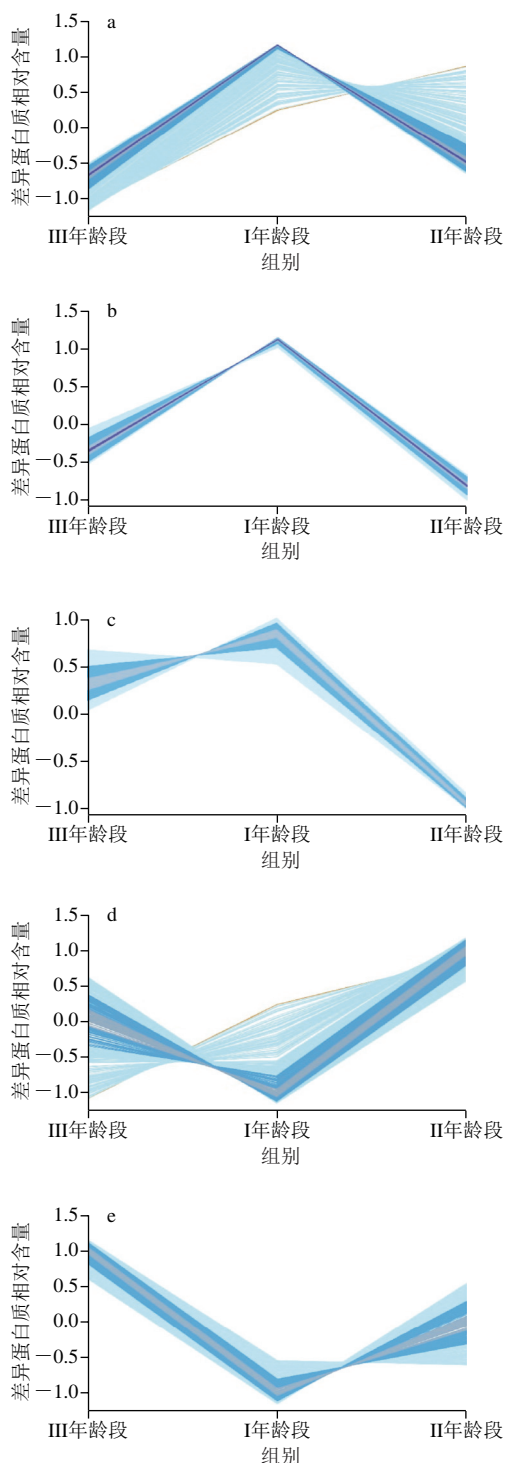
图5 不同年龄组驼肉差异蛋白质亚细胞定位分析饼状图

Fig. 5 Subcellular localization analysis of differentially expressed proteins in camel meat from different age groups

2.6 不同年龄组驼肉差异蛋白质的K-means分析

为研究不同年龄组驼肉差异蛋白质的相对含量变化趋势, 对其相对含量进行K均值(K-means)聚类分析^[32]。由图6可知, 3个年龄组中的差异蛋白质相对含量变化趋势可以被归纳成6个Cluster。Cluster 1中, 678个蛋白质在I组中的含量最多, 而在III组中的含量最

低。Cluster 2中, 853 个蛋白质在I组中的含量最多, 而在II组中的含量最低。Cluster 3中, 602 个蛋白质在I组中的含量最多, 而在II组中的含量最低。Cluster 4中, 394 个蛋白质在II组中的含量最高, 而I组中的含量最低。Cluster 5中, 399 个蛋白质在III组中的含量最高, 而在I组中的含量最低。Cluster 6中, 397 个蛋白质在III组中的含量最高, 而在II组中的含量最低。



a~f. Cluster 1~6。

图6 不同年龄组驼肉差异蛋白质的K-means图
Fig. 6 K-means plot of differentially expressed proteins in camel meat from different age groups

2.7 不同年龄组驼肉差异蛋白质的GO功能分析

GO富集功能分析主要包含分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 和细胞成分 (cellular component, CC) 三方面功能信息。图7a和7b分别表示I vs II组和I vs III组差异蛋白质富集到的GO功能分类 (前10行); 而II vs III组差异蛋白质数量较少, 未注释到GO功能上。GO功能富集分析结果显示, 在BP分类中, 差异蛋白质主要参与肌肉细胞发育、骨骼肌组织发育、糖酵解过程、细胞骨架组织、肌肉纤维发育等重要等功能。上述与肌肉发育相关功能中特别活跃表达的蛋白质有Kelch样家族蛋白质KLHL40和KLHL41, 这两个蛋白质在幼龄肉中高丰度表达, 它们在免疫应答、骨骼肌维持及大脑发育等多种生命活动中发挥着重要的生物学功能^[33]。同时, 磷酸甘油酸激酶、2-磷酸-D-甘油酸氢裂解酶、磷酸甘油酸激酶等代谢蛋白质均参与糖酵解过程、丙酮酸生物合成过程、嘌呤核苷二磷酸代谢过程、核糖核苷二磷酸代谢过程, 并在幼龄组中下调表达。在CC分类中, 差异蛋白质主要集中在细胞内、细胞质、线粒体和蛋白质复合体上。其中线粒体通过降低高铁肌红蛋白质含量和氧分压影响肉色的稳定和形成^[34]。在MF分类中, 3 个年龄组中结合蛋白质和代谢酶活性占优势, 表明这些蛋白质对各年龄驼肉品质的变化有显著影响, 尤其是细胞骨架结合蛋白质、肌动蛋白质、磷酸甘油酸激酶活性等功能上显著性富集。

综上所述, 不同年龄组驼肉差异蛋白质的生物学功能有一定差异, 这些差异蛋白质具有不同的生物学功能, 对肉品质有不同的影响。

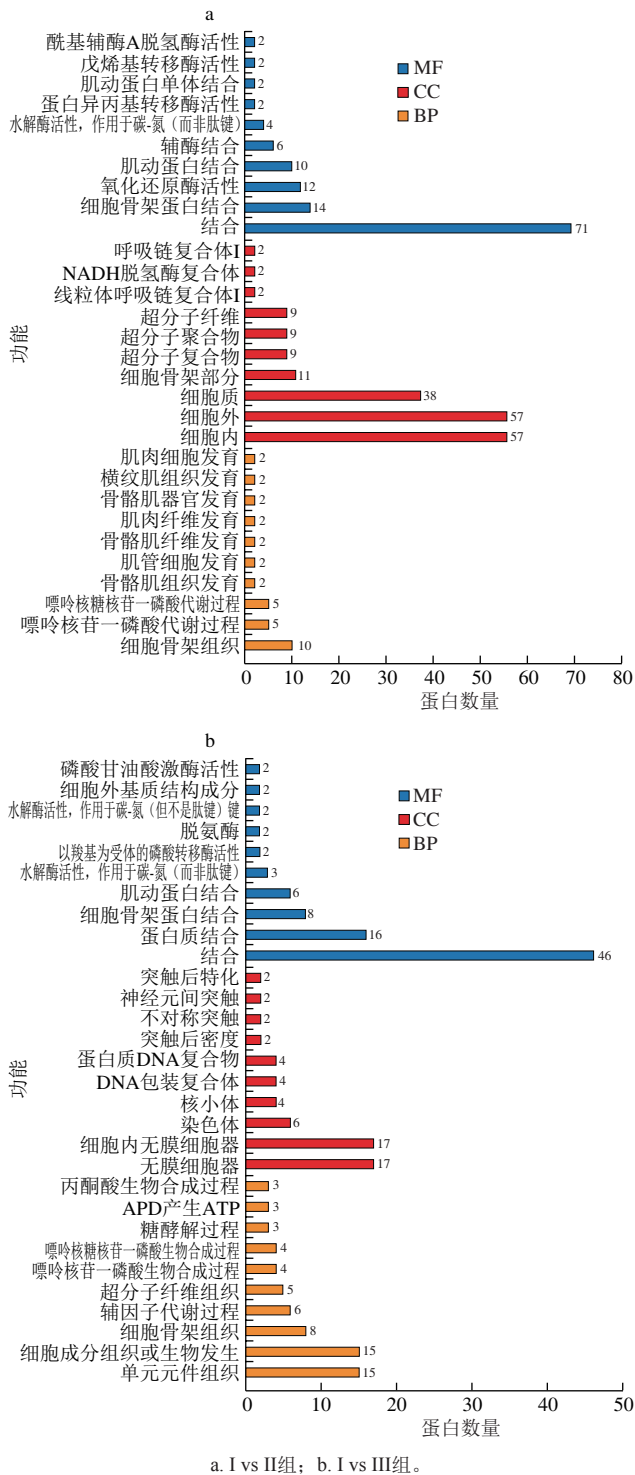


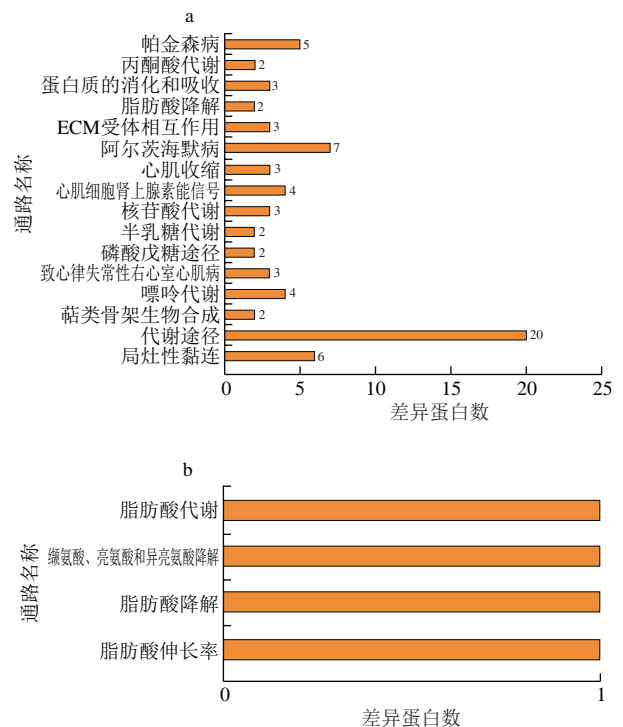
图7 不同年龄组驼肉差异蛋白质GO富集分析分类图(前10行)
 Fig. 7 GO enrichment analysis of differentially expressed proteins in camel meat from different age groups (Top 10)

2.8 不同年龄组驼肉差异蛋白质的KEGG通路分析

KEGG通路显著性分析以 $P < 0.05$ 作为显著性富集的条件。从图8a和图9a可知, 在I vs II组中KEGG显著性富集的代谢通路有16个, 主要有局灶性黏连、嘌呤代谢、磷酸戊糖途径、半乳糖代谢等。从图8b和图9b可知, 在

II vs III组中KEGG显著性富集的代谢通路有4个, 分别为脂肪酸伸长率, 脂肪酸降解, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解, 脂肪酸代谢, 以上代谢通路的差异对2个年龄肌肉的品质差异有很大影响。从图8c和图9c可知, 在I vs III组中KEGG显著性富集的代谢通路有8个, 主要有碳代谢、糖酵解/葡萄糖生成、氨基酸的生物合成、低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路等。研究表明, 影响牛肉差异蛋白质的信号通路为HIF-1信号通路^[35-36], 但是HIF-1的表达被哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路抑制^[37]。糖酵解代谢通路可能是形成肉质的主要途径之一, 因为该通路影响肌肉pH值的变化, 而pH值的变化直接或者间接影响肌肉的色泽、嫩度和保水性等特性。肌肉品质和肌原纤维蛋白质的表达均受糖酵解的影响; 糖酵解代谢还会破坏肉色的稳定性, 影响肌红蛋白质氧化还原的稳定性。其中, 乙酰辅酶A酰基转移酶2在脂肪酸降解, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解与脂肪酸代谢等通路中显著富集, 并在幼龄肉中下调表达。磷酸甘油酸激酶1、烯醇化酶2、磷酸甘油酸激酶2等差异蛋白质在碳代谢、糖酵解/葡萄糖生成、氨基酸的生物合成、HIF-1信号通路等通路上均显著富集, 并在老龄肉中上调表达。

综上分析, 每个年龄组KEGG通路富集的差异蛋白质不同, 3个年龄组差异蛋白质的显著性差异通路主要集中在脂肪酸代谢、糖酵解/葡萄糖生成、氨基酸的生物合成、碳代谢、HIF-1信号通路等。KEGG通路显著性分析进一步证明, 这些差异蛋白质的代谢途径可能是导致不同年龄驼肉品质不同的主要原因。



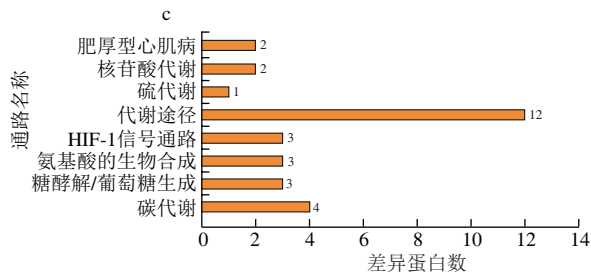


图8 差异蛋白质的KEGG代谢通路柱状图

Fig. 8 Bar chart of KEGG metabolic pathway of differentially expressed proteins

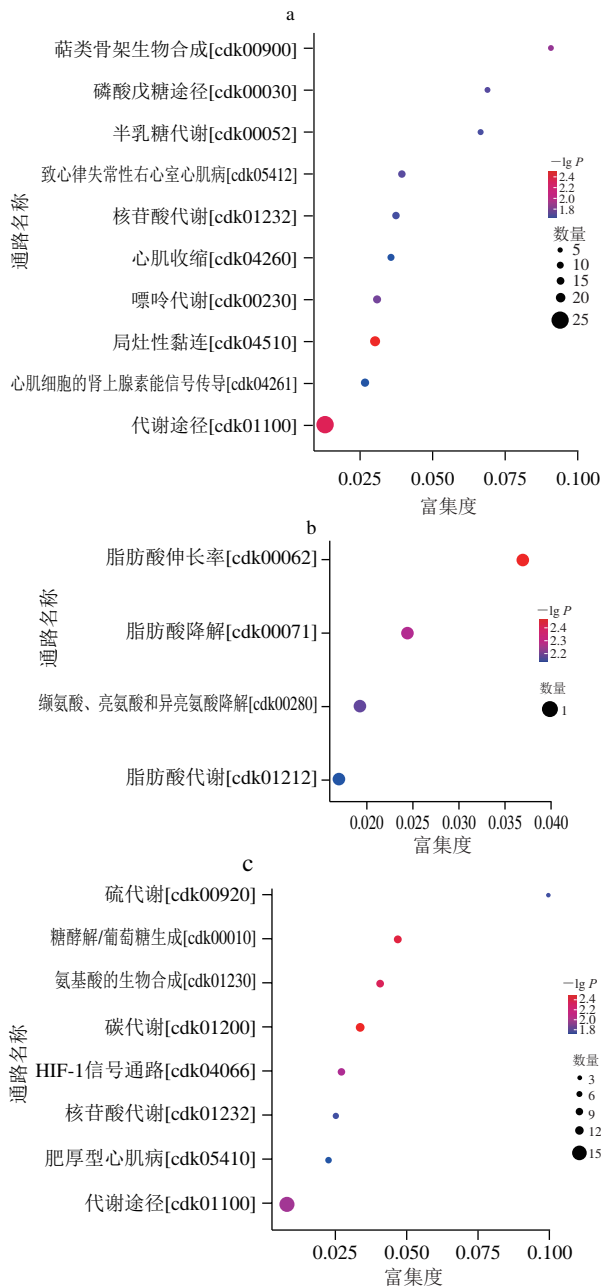


图9 不同年龄组驼肉差异蛋白质的KEGG代谢通路富集分析气泡图
Fig. 9 Bubble diagram of KEGG metabolic pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins in camel meat from different age groups

2.9 不同年龄组驼肉差异蛋白PPI分析

利用STRING网络数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 分析不同年龄骆驼肉组间差异蛋白质的相互作用, 并建立PPI网络。如图10所示, 在I vs II组中, 差异蛋白质PPI网络包含30个节点和42条连线, 即30个蛋白质和42个相互作用关系。其中, 核糖体蛋白质S2 (A0A5N4BZF6) 与4种蛋白质相互作用关系最强, 其余蛋白质的相互作用关系较弱, 仅有不超过2~3种互作蛋白质。

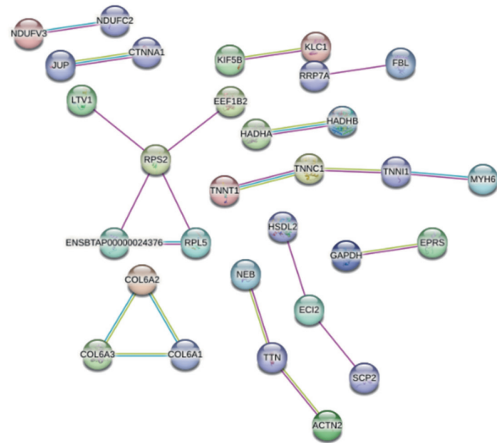


图10 I vs II组差异蛋白质相关作用网络图
Fig. 10 Interaction network diagram of differentially expressed proteins in groups I versus II

由图11可知, 在II vs III组中, 显示了4个蛋白质和6个相互作用关系。对驼肉品质调节影响的关键蛋白质为S9XIQ2和S9XSI2, 其中, S9XSI2蛋白质为谷氨酰胺合成酶, 对胎儿皮肤成纤维细胞增殖至关重要^[38]。这种酶属于谷氨酰胺合成酶家族, 能催化谷氨酰胺和γ-氨基丁酸的产生。

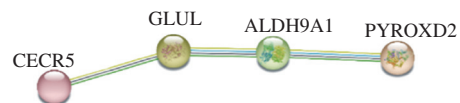


图11 II vs III组差异蛋白质相关作用网络图
Fig. 11 Interaction network diagram of differentially expressed proteins in groups II versus III

由图12可知, 在I vs III组中, 显示了29个蛋白质和53个相互作用关系。其中A0A5N4C1R0与7种蛋白质有互作关系, S9WZF5、S9WG06、S9Y0N1、A0A5N4C6G2、T0NSQ3和A0A5N4C286蛋白质均与3种蛋白质有较强的互作关系。A0A5N4C1R0蛋白质为甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 具有甘油醛-3-磷酸脱氢酶和亚硝化酶活性, 从而分别在糖酵解和核功能中发挥作用^[39]。

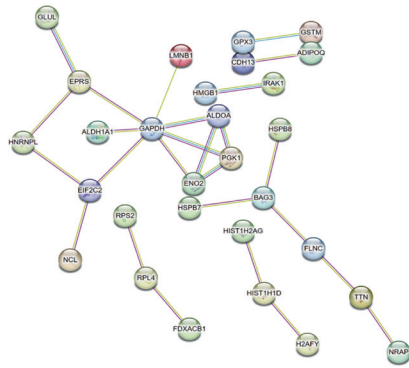


图 12 I vs III组差异蛋白质相关作用网络图

Fig. 12 Interaction network diagram of differentially expressed proteins in groups I versus III

2.10 相关性分析

2.10.1 不同年龄组驼肉品质指标与显著差异蛋白的相关性分析

表 1 显著差异蛋白质与不同年龄组驼肉品质的相关性分析

Table 1 Pearson's correlation between significantly differentially expressed proteins and quality traits of camel meat from different age groups

序号	蛋白质名称	蛋白质描述	剪切力	pH值	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
1	A0A5N4EHM9	双特异性激酶	-0.917**	0.783*	0.317	-0.767*	-0.494
2	A0A5N4C1R0	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	0.850**	-0.800*	-0.283	0.700*	0.561
3	A0A5N4DJL3	星云相关锚定蛋白亚型1	-0.900**	0.800*	0.500	-0.700*	-0.477
4	A0A5N4E8Z5	锌指蛋白	0.937**	-0.828**	-0.033	0.803**	0.571
5	A0A5N4CQI7	组蛋白H4	-0.833**	0.867**	-0.083	-0.783*	-0.377
6	A0A5N4CLT3	核蛋白	0.917**	-0.883**	-0.350	0.717*	0.385
7	A0A5N4C9P6	多巴胺脱羧酶	0.917**	-0.867**	-0.033	0.783*	0.636
8	S9Z0D9	铁蛋白	0.867**	-0.650	-0.200	0.850**	0.728*
9	S9XF73	未知蛋白	-0.867**	0.833**	0.417	-0.717*	-0.393
10	S9XGN3	肌动蛋白结合重复序列的蛋白质1	-0.933**	0.850**	0.400	-0.750*	-0.444
11	T0NQR8	肌动蛋白结合重复序列的蛋白质2	-0.900**	0.800*	0.500	-0.700*	-0.477
12	S9YDB6	星云相关锚定蛋白亚型2	-0.900**	0.800*	0.500	-0.700*	-0.477
13	S9WZF5	果糖二磷酸酯酶	0.917**	-0.933**	0.000	0.867**	0.494
14	S9Y0N1	含有PAZ结构域的蛋白质	-0.883**	0.883**	0.867**	-0.867**	-0.510
15	S9XPU1	含有H15结构域的蛋白质	-0.933**	0.917**	-0.033	-0.883**	-0.527
16	A0A5N4CP29	组蛋白H3	-0.833**	0.867**	-0.083	-0.783*	-0.377

注: **. $P < 0.01$; *. $P < 0.05$ 。

对I vs II、II vs III和I vs III组显著差异蛋白的相对含量值与课题组之前的研究结果(剪切力、pH值、亮度*L**、红度*a**和黄度*b**)进行Pearson相关性分析。如表1所示, 筛选获得与驼肉剪切力极显著相关的16个差异蛋白质, 其中与6个差异蛋白质正相关, 10个差异蛋白质负相关。pH值与15个差异蛋白质显著相关, 其中与9个差异蛋白质正相关, 6个差异蛋白质负相关。*a**与16个差异蛋白质显著相关, 其中与6个差异蛋白质正相关, 10个差异蛋白质负相关。此外, *L**仅与差异蛋白质S9Y0N1显著相关($r=0.867$; $P < 0.01$), 而*b**仅与差异蛋白质S9Z0D9显著相关($r=0.728$, $P < 0.05$)。

结果表明, 肉品质指标剪切力、pH值和*a**主要受结构蛋白的影响, 主要与A0A5N4DJL3、A0A5N4E8Z5、A0A5N4CQI7、S9XGN3、T0NQR8、S9WZF5、A0A5N4CP29等差异蛋白有显著相关性。肌球蛋白、肌钙蛋白、肌动蛋白、角蛋白等与肌肉嫩度、蒸煮损失等品质指标密切相关。也有研究表明, 结构蛋白、肌钙蛋白和肌球蛋白等与肌肉的有序结构相关^[22]。

2.10.2 不同年龄组驼肉显著相关差异蛋白质分析

由表2可知, 16种与驼肉品质指标显著相关性的差异蛋白质的相对定量值在不同年龄组之间存在显著差异, 这些显著差异蛋白质可能是影响I、II与III组肉品质特征的关键蛋白质。I组中差异蛋白A0A5N4C1R0、A0A5N4E8Z5、A0A5N4C9P6和S9Z0D9相对定量值显著小于II和III组($P < 0.05$), 与II和III组相比相对定量值表达为下调。此外, I组中差异蛋白A0A5N4EHM9、A0A5N4DJL3、A0A5N4CQI7、S9XF73、S9XGN3、T0NQR8、S9YDB6、S9Y0N1、S9XPU1、A0A5N4CP29相对定量值显著高于II和III组($P < 0.05$), 与II和III组相比相对定量值表达为上调。因此, 与II和III组相比, 可能是在I组中显著相关差异关键蛋白A0A5N4C1R0、A0A5N4E8Z5、A0A5N4CLT3、A0A5N4C9P6、S9Z0D9和S9WZF5的相对含量下降引起剪切力下降, 使其具有较好的嫩度。

表 2 显著相关差异蛋白质的相对定量值与表达方式
Table 2 Relative quantitative values and expression patterns of differentially expressed proteins significantly correlated with meat quality traits

序号	显著性相关差异蛋白质	相对定量值			上调或下调		
		I	II	III	I vs II	II vs III	I vs III
1	A0A5N4EHM9	90.55 ± 0.45 ^a	64.70 ± 1.76 ^b	58.80 ± 5.80 ^b	上调	NA	上调
2	A0A5N4C1R0	298.70 ± 94.30 ^b	464.33 ± 34.77 ^a	493.53 ± 52.01 ^a	下调	NA	下调
3	A0A5N4DJL3	29 633.80 ± 7 195.60 ^b	13 735.20 ± 5 155.28 ^b	9 234.77 ± 1 057.29 ^b	上调	NA	上调
4	A0A5N4E8Z5	72.65 ± 9.35 ^b	103.97 ± 13.74 ^{ab}	131.23 ± 25.04 ^a	NA	NA	下调
5	A0A5N4CQI7	7 628.85 ± 1 164.45 ^a	5 739.23 ± 463.69 ^b	4 804.80 ± 705.20 ^b	上调	NA	上调
6	A0A5N4CLT3	65.80 ± 3.30 ^b	109.23 ± 16.02 ^b	205.77 ± 60.18 ^a	NA	下调	下调
7	A0A5N4C9P6	1 673.55 ± 66.35 ^b	1 809.57 ± 89.84 ^b	2 526.73 ± 345.27 ^a	NA	下调	下调
8	S9Z0D9	499.14 ± 67.95 ^b	613.26 ± 170.39 ^b	923.67 ± 98.81 ^a	NA	下调	下调
9	S9XF73	185.80 ± 65.10 ^a	65.76 ± 24.83 ^b	42.26 ± 4.92 ^b	上调	NA	上调
10	S9XGN3	528.60 ± 113.60 ^a	266.03 ± 100.11 ^b	137.30 ± 30.83 ^b	上调	NA	上调
11	T0NQR8	20 647.35 ± 454.75 ^a	12 884.07 ± 4 790.07 ^b	8 521.23 ± 1 761.57 ^b	上调	NA	上调
12	S9YDB6	1 243.50 ± 404.90 ^a	560.77 ± 234.56 ^b	370.30 ± 67.04 ^b	上调	NA	上调
13	S9WZF5	56.25 ± 5.85 ^b	75.00 ± 3.55 ^b	119.36 ± 30.95 ^a	NA	下调	下调
14	S9Y0N1	25.09 ± 0.10 ^a	20.07 ± 2.41 ^b	15.70 ± 2.69 ^b	上调	NA	上调
15	S9XPU1	879.045 ± 126.34 ^a	673.53 ± 39.30 ^b	352.37 ± 36.31 ^b	上调	上调	上调
16	A0A5N4CP29	3 308.10 ± 392.59 ^a	2 397.70 ± 201.02 ^b	2 106.56 ± 188.92 ^b	上调	NA	上调

注: 同行不同字母表示差异显著($P < 0.05$); NA.表达量在同一水平。

3 结论

采用TMT标记蛋白质组学与LC-MS/MS联用技术研究驼肉不同年龄蛋白质组的变化。蛋白质组的差异表达是造成驼肉不同年龄肉质差异的重要因素。3个年龄组中共鉴定出311种差异蛋白质；结构蛋白质、代谢蛋白质和热应激蛋白质可以作为驼肉不同年龄的标志蛋白质；其中差异蛋白质主要参与了脂肪酸代谢、糖酵解/葡萄糖生成、氨基酸的生物合成和HIF-1信号通路；PPI分析表明，代谢酶类蛋白质是影响驼肉的关键连接蛋白质。同时，本研究还筛选出锌指蛋白、组蛋白、肌动蛋白等16个与驼肉嫩度有着强相关性的差异蛋白质。研究结果探讨了造成不同年龄驼肉品质差异的机制，可为进一步研究驼肉品质的改善提供理论参考。

参考文献：

- [1] 王励行, 任玉霞. 阿拉善骆驼产业高质量发展的路径[J]. 中国国情国力, 2020(1): 72-75. DOI:10.13561/j.cnki.zggqgl.2020.01.023.
- [2] 孙树远, 何静, 吉日木图. 不同部位双峰驼肉的营养成分分析[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(9): 46-56. DOI:10.3969/j.issn.1673-1689.2022.09.006.
- [3] 包青玲. 阿拉善戈壁驼肉品质测定和化学成分分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022: 19-23. DOI:10.27229/d.cnki.gnmnu.2022.000654.
- [4] KADIM I T, AL-AMRI I S, ALKINDI A Y, et al. Nutritional values and health benefits of dromedary camel meat[J]. Animal Frontiers, 2022, 12(4): 61-70. DOI:10.1093/af/vfac051.
- [5] RAIYMBEK G, KADIM I T, ISSA S A, et al. Concentrations of nutrients in six muscles of bactrian (*Camelus bactrianus*) camels[J]. Journal of Camel Practice and Research, 2018, 25(1): 109-114. DOI:10.5958/2277-8934.2018.00016.4.
- [6] AKHMETSADYKOVA S H, KONUSPAYEVA G, AKHMETSADYKOV N. Camel breeding in Kazakhstan and future perspectives[J]. Animal Frontiers, 2022, 12(4): 71-77. DOI:10.1093/af/vfac048.
- [7] 李蕾蕾, 黄增文, 顾亚玲, 等. 蛋白质组学技术在动物科学中的研究进展[J]. 西昌学院学报(自然科学版), 2023, 37(1): 1-5. DOI:10.16104/j.issn.1673-1891.2023.01.001.
- [8] CAIYAN H, CHENGLI H, MUAWUZ I, et al. Proteomics discovery of protein biomarkers linked to meat quality traits in post-mortem muscles: current trends and future prospects: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105(2): 416-432. DOI:10.1016/j.tifs.2020.09.030.
- [9] 张颖颖, 康超娣, 张明悦, 等. 蛋白质组学在肉类真实性鉴别中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(5): 286-294. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201206-065.
- [10] YU M M, FAN Y C, ZHANG X R, et al. Effect of boiling on texture of abalone muscles and its mechanism based on proteomic techniques[J]. Food Chemistry, 2022, 388(1): 133014. DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133014.
- [11] MELEADY P. Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE[J]. Methods in Molecular Biology, 2023, 2596: 3-15. DOI:10.1007/978-1-0716-2831-7_1.
- [12] 白建瑞. 基于生物质谱技术的蛋白质组学研究[J]. 现代农业研究, 2023, 29(4): 145-147. DOI:10.19704/j.cnki.xdnyyj.2023.04.025.
- [13] KOMURCU-BAYARAK E, OZSAIT B, ERGINEL-UNALTUNA N. Isolation and analysis of genes mainly expressed in adult mouse heart using subtractive hybridization cDNA library[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(8): 8065-8074. DOI:10.1007/s11033-012-1653-5.
- [14] DUBOIS E, GALINDO A N, DAYON L, et al. Assessing normalization methods in mass spectrometry-based proteome profiling of clinical samples[J]. Biosystems, 2022, 216: 104661. DOI:10.1016/j.biosystems.2022.104661.
- [15] BELDARRAIN L R, ALDAI N, PICARD B, et al. Use of liquid isoelectric focusing (OFFGEL) on the discovery of meat tenderness biomarkers[J]. Journal of Proteomics, 2018, 183: 25-33. DOI:10.1016/j.jpro.2018.05.005.
- [16] KIM N K, CHO S, LEE S H, et al. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality[J]. Meat Science, 2008, 80(4): 1068-1073. DOI:10.1016/j.meatsci.2008.04.027.
- [17] MAO Y W, HOPKINS D L, ZHANG Y M, et al. Beef quality with different intramuscular fat content and proteomic analysis using isobaric tag for relative and absolute quantitation of differentially expressed proteins[J]. Meat Science, 2016, 118: 96-102. DOI:10.1016/j.meatsci.2016.03.028.
- [18] ZHANG M H, WANG D Y, XU X L, et al. Comparative proteomic analysis of proteins associated with water holding capacity in goose muscles[J]. Food Research International, 2018, 116: 354-361. DOI:10.1016/j.foodres.2018.08.048.
- [19] JOSEPH P, SUMAN S P, RENTFROW G, et al. Proteomics of muscle-specific beef color stability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(12): 3196-3203. DOI:10.1021/jf204188v.
- [20] 闫忠心. 不同部位牦牛肉品质特性差异及机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022: 21-28.
- [21] LIU X M, WANG J, GAO L L, et al. iTRAQ-Based proteomic analysis of neonatal kidney from offspring of protein restricted rats reveals abnormalities in intraflagellar transport proteins[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 44(1): 185-199. DOI:10.1159/000484626.
- [22] WANG J B, LI W B, XIAO J H, et al. Hydroxyapatite-embedded monolithic column for selective on-line solid-phase extraction of adenosine triphosphate and its phosphorylated metabolites[J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2019, 1128: 121769. DOI:10.1016/j.jchromb.2019.121769.
- [23] WEI H, MOVAHEDI A, YANG J, et al. Characteristics and molecular identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in poplar[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 219: 185-198. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.08.001.
- [24] SIROVER M A. The role of posttranslational modification in moonlighting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure and function[J]. Amino Acids, 2021, 53(4): 507-515. DOI:10.1007/s00726-021-02959-z.
- [25] 边立立, 董玉明. 肌酸激酶升高原因研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(78): 23-26. DOI:CNKI:SUN:WMIA.0.2017-78-011.
- [26] JIANG S W, QUAN W, LUO J, et al. Low-protein diets supplemented with glycine improves pig growth performance and meat quality: an untargeted metabolomic analysis[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2023, 10: 1170573. DOI:10.3389/fvets.2023.1170573.
- [27] FAROOQ M, LINDBK L, KROGH N, et al. RRP7A links primary microcephaly to radial glial cells and dysfunction of ribosomal biogenesis, neurogenesis and ciliary resorption[J]. Cold Spring Harbor Laboratory, 2019, 3(1): 7-14. DOI:10.1101/793877.

- [28] LONERGAN E H, ZHANG W, LONERGAN S M. Biochemistry of postmortem muscle-lessons on mechanisms of meat tenderization[J]. Meat Science, 2010, 86(1): 184-195. DOI:10.1016/j.meatsci.2010.05.004.
- [29] MALHEIROS J M, BRAGA C P, GROVE R A, et al. Influence of oxidative damage to proteins on meat tenderness using a proteomics approach[J]. Meat Science, 2018, 148: 64-71. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.08.016.
- [30] SEVERINO M, GAGAOUA M, BALDASSINI W, et al. Proteomics unveils post-mortem changes in beef muscle proteins and provides insight into variations in meat quality traits of crossbred young steers and heifers raised in feedlot[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20): 12259. DOI:10.3390/ijms232012259.
- [31] YU C S, LIN C J, HWANG J K, et al. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions[J]. Protein Science, 2004, 13: 1402-1406. DOI:10.1110/ps.03479604.
- [32] 张馨予. 基于K-means算法的北京市食品冷链农产品市场聚类分析[J]. 中国物流与采购, 2013(23): 68-69. DOI:10.16079/j.cnki.issn1671-6663.2013.23.013.
- [33] 肖枫, 宋宏涛, 魏群. 哺乳动物中Kelch超家族蛋白的结构与功能[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(3): 210-217. DOI:10.3724/SP.J.1206.2010.00334.
- [34] LIU Y V, SEMENZA G L. RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 α degradation vs. stabilization[J]. Cell Cycle, 2007, 6(6): 67-72. DOI:10.4161/cc.6.6.3981.
- [35] LI Z, LI X, GAO X, et al. Phosphorylation prevents *in vitro* myofibrillar proteins degradation by μ -calpain[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 455-462. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.048.
- [36] YANG Y Y, HAN L, YU Q L, et al. Phosphoproteomic analysis of *longissimus lumborum* of different altitude yaks[J]. Meat Science, 2020, 162: 108019. DOI:10.1016/j.meatsci.2019.108019.
- [37] HIROSHI H, SATOSHI I, SHINAE K K, et al. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 α protein in a glucose-and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(8): 5332-5342. DOI:10.1016/j.meatsci.2019.108019.
- [38] 刘芸菲, 薛栋升, 宫春杰. 谷氨酰胺合成酶研究进展[J]. 山东化工, 2021, 50(5): 97-101. DOI:10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2021.05.036.
- [39] 禹焘文, 李清明. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的应用进展[J]. 农产品加工(学刊), 2014, 352(9): 51-53. DOI:10.3969/j.issn.1671-9646(X).2014.05.018.