基于肌浆蛋白质组研究黑切牛肉的形成机制

吴 爽[1]，王 磊[1]，杨啸吟[1]，罗 欣[1,2]，李 航[3]，朱立贤[1,*]，张一敏[1,2,*]
（1.山东农业大学食品科学与工程学院，山东 泰安 271018；2.江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心，江苏 南京 210095；3.国家肉牛牦牛产业技术体系丰都综合试验站，重庆 408216）

摘 要：本研究通过比较黑切牛肉（黑切组，极限pH 6.54）和正常牛肉（正常组，极限pH 5.59）在宰后45 min和24 h的肌浆蛋白质组，确定黑切牛肉与正常牛肉的差异表达蛋白，从蛋白质水平上探究了黑切牛肉形成的相关机制。结果显示，两个处理组在宰后45 min和24 h共有20 个差异表达蛋白，其中9 个为代谢酶、4 个为抗氧化蛋白、4 个为伴侣蛋白。能量代谢酶类中，仅腺苷酸激酶1的表达量在宰后24 h后的黑切组高于正常组，腺苷酸激酶、肌酸激酶M、磷酸酶、琥珀酸-辅酶A连接酶、磷酸酯尿苷基转移酶和*S*-腺苷高半胱氨酸均在正常组表达量较高；两种糖酵解酶（肌肉磷酸化酶和葡萄糖磷酸变位酶1）也在正常组中表达量较高；抗氧化蛋白、热休克蛋白B1和B6均在正常组中表达量高，而*α*-晶状体蛋白则在黑切组中表达量较高。本研究发现，黑切组中一些参与糖代谢和腺嘌呤核苷三磷酸合成和代谢的酶类的低量表达，可能是黑切肉形成的最直接原因。另外，琥珀酸-辅酶A连接酶、热休克蛋白B1和*α*-晶状体蛋白可以作为识别黑切肉发生的蛋白质生物标签。

关键词：黑切牛肉；肌浆蛋白质组；代谢酶；抗氧化蛋白；伴侣蛋白

Understanding the Formation Mechanism of Dark Cutting Beef Based on Sarcoplasmic Proteomics

WU Shuang[1], WANG Lei[1], YANG Xiaoyin[1], LUO Xin[1,2], LI Hang[3], ZHU Lixian[1,*], ZHANG Yimin[1,2,*]
(1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;
2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Quality and Safety Control, Nanjing 210095, China;
3. Fengdu Station of China Agriculture Research System (Beef), Chongqing 408216, China)

Abstract: The present study explored the mechanism of the occurrence of dark cutting beef through comparing the sarcoplasmic proteomics of normal pH (5.59) and dark cutting beef (pH 6.54) at 45 min and 24 h post-mortem and analyzing the differentially expressed proteins. The results revealed that 20 differentially expressed proteins were identified. Of these proteins, 9 were metabolic enzymes, 4 were antioxidant proteins and 4 were chaperones. Compared with dark cutting beef, all energy-related enzymes (adenylate kinase 1, creatine kinase M chain, Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase, succinate-CoA ligase, UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, and *S*-adenosylhomocysteine hydrolase) except adenylate kinase 1 (which was overexpressed in dark cutting beef) at postmortem 24 h, and the glycometabolic enzymes (phosphoglucomutase 1 and myophosphorylase) were overexpressed in normal pH beef. All antioxidant proteins, and heat shock protein beta-1 and beta-2 were overexpressed in normal pH beef, while alpha-crystallin B chain was overexpressed in dark cutting beef. The development of dark cutting beef could be directly explained by lower abundances of glycometabolic enzymes and energy-related enzymes when compared to normal pH beef. Moreover, succinate-CoA ligase, heat shock protein beta-1 and alpha-crystallin could be employed as biomarkers to identify dark cutting beef.

Keywords: dark cutting beef; sarcoplasmic proteomics; metabolic enzymes; antioxidant protein; chaperones
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181231-368
中图分类号：TS251.5 文献标志码：A 文章编号：1002-6630（2020）05-0001-07

收稿日期：2018-12-31
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（31601528）；现代农业产业技术体系建设专项（CARS-37）；山东省牛产业创新团队项目（SDAIT-09-09）

第一作者简介：吴爽（1993—）（ORCID: 0000-0001-6801-0000），女，硕士研究生，研究方向为肉品科学。
E-mail: 627711860@qq.com
*通信作者简介：朱立贤（1975—）（ORCID: 0000-0002-1252-4720），女，教授，博士，研究方向为肉品科学。
E-mail: zhlx@sdau.edu.cn
张一敏（1985—）（ORCID: 0000-0001-5240-7126），女，副教授，博士，研究方向为肉品科学。
E-mail: zhang@sdau.edu.cn

引文格式：
吴爽, 王磊, 杨啸吟, 等. 基于肌浆蛋白质组研究黑切牛肉的形成机制[J]. 食品科学, 2020, 41(5): 1-7. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181231-368. http://www.spkx.net.cn
WU Shuang, WANG Lei, YANG Xiaoyin, et al. Understanding the formation mechanism of dark cutting beef based on sarcoplasmic proteomics[J]. Food Science, 2020, 41(5): 1-7. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181231-368. http://www.spkx.net.cn

动物的宰前应激是一个非常复杂的特性，受到很多内在因素（如基因、性别和年龄）和外在因素（运输和管理）的影响[1-2]。宰前应激会消耗动物肌肉内的糖原储备，进而影响宰后肌肉向食用肉转变过程中的生化反应进程[3]，其中一个重要的过程是腺嘌呤核苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP）的再生和水解。当宰后肌肉供血不足时，肌肉的有氧代谢会转变为无氧酵解，无氧酵解产生的乳酸和ATP会水解产生H^+，H^+在肌肉中积累导致肌肉的pH值降低[4]，而宰后肌肉pH值的下降速率和极限pH值对肉的品质有很大影响[5-6]。黑切牛肉的产生通常被认为是由于宰前消耗糖原和牛个体间理化性质差异所导致的，其较高的极限pH值增加了肌肉的保水性和线粒体的活性，导致肉表面的散射光较少，并且脱氧肌红蛋白含量较高，因此产生较暗的肉色[7-8]。黑切肉的颜色发暗会使其品质大打折扣，降低消费者购买欲；此外，微生物更容易在高pH值肌肉中生长繁殖，导致冷鲜肉的货架期严重缩短[9]。在2000年，美国黑切牛肉的发生率为2.7%，却给肉类工业造成了1.65～1.72亿 美元的经济损失[10]，而黑切牛肉在我国东北、西北、华北3 个肉牛产区的发生率均比较高，其中山东省黑切牛肉的发生率高达19.2%[11-12]。因此，探明黑切牛肉的发生机制并对其进行控制，对于提高我国肉牛产业的行业竞争力具有重要意义。

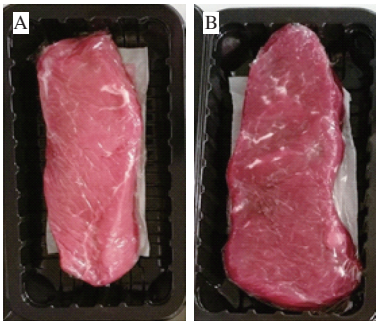
屠宰后肌肉向食用肉的转变，即活体动物组织到最终可食用肉的转变，是影响肉品质的关键过程[13]。基于双向电泳（two-dimensional electrophoresis，2DE）的蛋白质组学可以鉴定和识别这一转变过程发生变化的蛋白，从蛋白水平上来研究宰后早期的代谢生化过程，从而更好地解释肉品质存在差异的内在机制。自21世纪初，利用蛋白质组学来探究牛肉的肉色、嫩度、保水性等品质的变化过程及差异正逐步成为肉品研究领域的热点，并发现了一些决定肉品品质优劣的关键蛋白生物标签[14-16]。目前，有关肉色蛋白质组的研究多集中于不同部位肉之间以及牛肉在贮藏期间的蛋白质组差异和表达量变化上，同时发现一些代谢酶类、伴侣蛋白、过氧化物还原酶和抗氧化蛋白等是调控肉色稳定性的关键蛋白质[17-22]。Gagaoua等[23]利用免疫斑点印迹探究了阿吉斯坦公牛宰后早期与嫩度、pH值下降和颜色有关的蛋白生物标记，发现苹果酸脱氢酶1、烯醇酶3和乳酸脱氢酶等糖酵解酶与宰后pH值降低和宰后24 h的肉色有关。

牛肉宰后初期的糖酵解和能量代谢等生化进程对牛肉pH值下降速率的影响至关重要，鉴于肌浆蛋白调控着与宰后pH值下降直接相关的生化反应，其在黑切牛肉的形成机制中起着举足轻重的作用。目前有关不同极限pH值牛肉宰后早期的肌浆蛋白质组的变化尚不明确。有学者研究了宰前应激有关的蛋白质组变化，发现7 种结构收缩蛋白和3 种代谢酶在宰后24 h的正常和黑切胸背最长肌中存在差异[3]。最近还有学者研究了黑切牛肉与正常肉之间宰后24～48 h的蛋白质组学差异，发现热休克蛋白B1与α-晶状体蛋白在黑切肉中表达量较高，而过氧化物还原酶则在正常肉中表达量较高[24]。然而，宰后初期（24 h内）作为决定黑切肉形成与否的关键时期，对于这一时期正常牛肉与黑切牛肉的差异表达蛋白以及它们变化规律的研究却鲜有报道。

因此，本研究对宰后45 min和24 h的正常牛肉和黑切牛肉进行了肌浆蛋白质组学分析，拟寻找两组牛肉在宰后最初（45 min）和24 h时的差异表达蛋白，以便更好地理解黑切牛肉形成的机制，并寻找可预测黑切牛肉发生的关键标记蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂



A.正常牛肉（pH 5.59）；B.黑切牛肉（pH 6.54）。

图1 典型的黑切牛肉与正常牛肉

Fig. 1 Appearance of typical dark cutting beef and normal ultimate pH beef

实验所用的样品来自于山东省某企业的鲁西黄牛与西门塔尔杂交牛（24 月龄、500 kg左右）。分别在宰后

45 min和24 h，测定右半胴体第12～13根肋骨间背最长肌的pH值，并在腰背最长肌的前表面（靠近眼肉一端）取约200 g肉块，液氮冷冻，－80 ℃保存，用于后续的肌浆蛋白质提取。根据宰后24 h的pH值，将样品分为正常（pH 5.4～5.8，n＝3）和黑切组（pH＞6.1，n＝3）（典型的黑切牛肉见图1），每头牛取两个平行，因此每组有6 个平行样品。

尿素、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐、硫脲、二硫苏糖醇（*DL*-dithiothreitol，DTT）、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、碘乙酰胺、乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）、十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）、丙烯酰胺、碘代乙酰胺、过硫酸铵、甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝、四甲基乙二胺、琼脂糖、硫酸铵、考马斯亮蓝G-250　北京索莱宝科技公司；丙三醇、正丁醇、甲醇、无水乙醇、冰乙酸、磷酸　国药集团化学试剂公司；非干扰型蛋白浓度测定试剂盒　生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2　仪器与设备

SenvenGo pH计　瑞士梅特勒-托利多公司；T18高速分散机、KS 501低平型摇床　德国IKA公司；5804R冷冻离心机　德国Eppendorf公司；EPOCH-2全自动酶标仪　美国Bio Tek公司；Ettan IPGphor 3等电聚焦仪、Ettan DALTsix垂直电泳仪、ImageScanner III图像扫描仪美国通用电气公司；5800 MALDI-TOF/TOF质谱仪美国SCIEX公司。

1.3　方法

1.3.1　pH值的测定

利用便携式pH计测定右半胴体12～13 根肋骨间肌肉组织的pH值，深度约6 cm，每个胴体测定3 个位置，取其平均值。

1.3.2　肌浆蛋白的提取

参照Joseph等[18]的方法，取2 g样品，加入5 倍体积的提取液（40 mmol/L Tris base、2 mmol/L EDTA，调pH值至8.0）和120 μL的DTT（2 mol/L），冰浴条件下匀浆（5 500 r/min匀浆30 s后停30 s，共进行4 次），4 ℃下10 000×g离心15 min，取上清液，即为肌浆蛋白，利用非干扰型蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度定量，分装冻藏（－80 ℃）备用。

1.3.3　双向凝胶电泳

1.3.3.1　一向等电聚焦电泳

在等电聚焦电泳之前，先对Immobiline Dry Strip干胶条进行上样水化，上样量为800 μg（每组的每个样品单独进行双向电泳），水化溶胀时间为24 h。将泡胀好的胶条转移至Manifold胶条槽内，设定IPGphorIII电泳仪聚焦程序（300 V、1 h；1 000 V、1 h；grd 4 000 V、1 h；10 000 V、2.5 h；grd 10 000 V至80 000 V·h；grd 300 V、10 h），然后对胶条进行等电聚焦电泳。

1.3.3.2　双向聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚焦后胶条分别用含有1 g/100 mL DTT和4.5 g/100 mL碘乙酰胺的平衡缓冲液（6 mol/L尿素、2 g/100 mL SDS、体积分数30%甘油、0.002 g/100 mL溴酚蓝）先后室温平衡15 min。将平衡好的胶条转移至提前制好的SDS聚丙烯酰胺凝胶面上，待琼脂糖封胶液完全凝结后，将装有SDS聚丙烯酰胺凝胶的胶盒装入含有电泳液的电泳槽中。设定电泳槽温度为15 ℃和电泳仪参数为：100 V电泳1 h，然后300 V至溴酚蓝指示线即将到达电泳槽底部时关闭电泳仪开关。2DE结束，将聚丙烯酰胺凝胶取出，进行考马斯亮蓝G-250染色，1 g/100 mL醋酸脱色至背景清晰。

1.3.3.3　图像扫描和质谱鉴定

采用图像扫描和凝胶图像分析（PDQuest 8.0软件）对双向电泳凝胶上的蛋白点进行检测分析，找出正常组和黑切组两组间蛋白表达量相差1.5 倍以上并有显著差异（P＜0.05）的蛋白点确定为差异表达蛋白。然后对差异表达蛋白的胶点进行质谱分析，数据库（Uniprot）检索，确定蛋白种类。

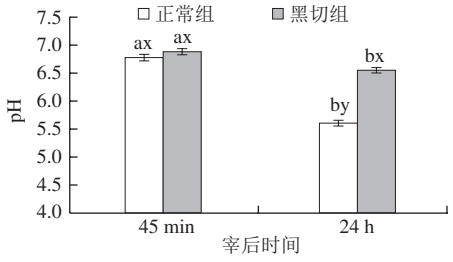
1.4　数据分析

在本实验中，pH值采用SAS 9.0软件中混合模型分析，并采用SigmaPlot 12.5软件作图。采用String 10.5软件进行差异表达蛋白互作分析。

2　结果与分析

2.1　宰后45 min和24 h的pH值

极限pH值与宰后时间的交互作用对肌肉pH值影响显著。由图2可知，宰后45 min的正常和黑切牛肉的pH值相似（P＞0.05），宰后24 h两组肌肉的pH值均显著降低，但是正常牛肉的pH值（5.59）显著低于黑切牛肉的pH值（6.54）。



a、b.不同字母表示不同宰后时间，组内差异显著（P＜0.05）；
x、y.不同字母表示同一宰后时间，组间差异显著（P＜0.05）。

图 2　正常和黑切组宰后45 min和24 h的pH值

Fig. 2　pH of normal pH and dark cutting beef at 45 min and 24 h postmortem

2.2 宰后45 min及24 h正常组牛肉与黑切组牛肉的差异表达蛋白

通过对正常和黑切组宰后45 min（初始点）和宰后24 h样品的蛋白点分析，共鉴定出26 个差异表达蛋白点，其中宰后45 min有10 个，24 h有16 个（两个时间点共有的差异点为6 个），这些蛋白点的位置如图3所示。在宰后45 min的10 个差异表达蛋白点（9 种蛋白）中，有8 种蛋白在正常组中表达量高（以正常组胶图上的一个蛋白点与黑切组同一蛋白点的强度比值大于1.5 倍或小于0.667 倍且满足显著性小于5%（$P<0.05$）为差异蛋白，小于0.667 倍为在正常组表达量高），只有1 种蛋白在黑切组中表达量高（大于1.5 倍表示在黑切组表达量高）。这些差异表达蛋白按照其功能可划分为代谢酶类、抗氧化蛋白、伴侣蛋白和其他蛋白（表1）。其中腺苷酸激酶1、琥珀酸-辅酶A连接酶、肌酸激酶M和磷酸酶属于代谢酶，参与能量代谢过程。抗氧化蛋白包括过氧化物还原酶1和过氧化物还原酶2。而两种伴侣蛋白（热休克蛋白B1和α-晶状体蛋白），分别在正常组和黑切组中表达量高。此外，还鉴定出一种结构蛋白，为肌球蛋白轻链1。

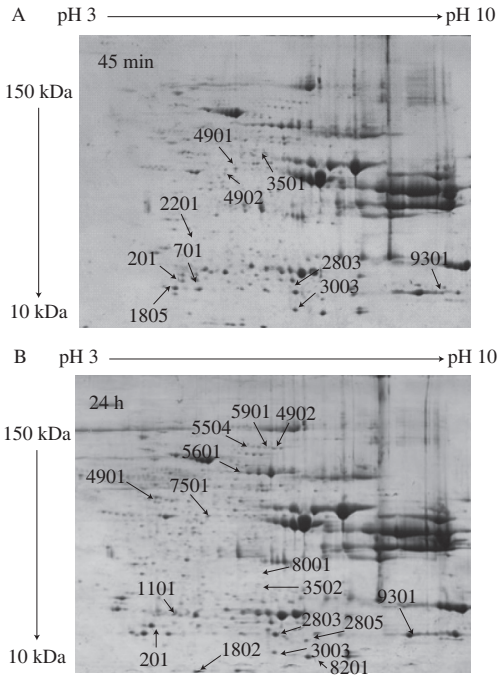


图 3 宰后45 min和24 h的差异表达蛋白2DE图

Fig. 3 Differentially expressed proteins in beef at 45 min and 24 h postmortem

宰后24 h的16 个差异表达蛋白点鉴定出了14 种蛋白，除腺苷酸激酶1和α-晶状体蛋白外，其余蛋白均在正常组表达量高。这些差异表达蛋白主要为代谢酶类、抗氧化蛋白、伴侣蛋白、转运蛋白和结构蛋白，其中所占比例最高的差异表达蛋白为代谢酶类，包括3 种糖酵解酶（肌肉磷酸化酶、葡萄糖磷酸变位酶1、磷酸甘油酸变位酶2）和4 种能量代谢酶（琥珀酸-辅酶A连接酶、肌酸激酶M、磷酸酯尿苷基转移酶、*S*-腺苷高半胱氨酸水解酶）。本研究鉴定出的3 种抗氧化蛋白包括磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶、氧化物还原酶1、氧化物还原酶2，3 种伴侣蛋白包括热休克蛋白B1、热休克蛋白B6和α-晶状体蛋白。另外3 个差异点中，其中两个蛋白点均鉴定为转铁运蛋白，属于转运蛋白的一种，另一个是肌球蛋白轻链1，属于结构蛋白。这些蛋白的具体信息如表1所示。

表 1 宰后45 min及24 h正常组牛肉相对于黑切组牛肉差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins in normal pH beef at postmortem 45 min and 24 h when compared with dark cutting beef

点编号	蛋白名称	蛋白简称	理论等电点	相对分子质量	序列覆盖率/%	MS	差异倍数	
							45 min 正常/黑切组	24 h 正常/黑切组
	代谢酶类							
2803	腺苷酸激酶1	AK1	8.40	21.664	61	692	↑1.8	↓0.62
5601	肌肉磷酸化酶	PYGM	6.65	97.293	20	684	—	↑1.7
8001	葡萄糖磷酸变位酶1	PGM1	6.36	61.589	28	626	—	↑7.2
8201	葡萄糖磷酸变位酶1	PGM1	6.36	61.589	25	875	—	↑1.5
4901	琥珀酸-辅酶A连接酶	SUCLA2	6.73	50.130	15	340	↑2.5	↑2.0
4902	肌酸激酶M	CKM	6.63	42.971	31	755	↑1.5	↑1.5
7501	磷酸酯尿苷基转移酶	UGP2	7.18	55.640	34	888	—	↑2.5
2201	磷酸酶	LHPP	5.35	29.180	44	384	↑3.3	—
4801	*S*-腺苷高半胱氨酸水解酶	AHCY	5.88	47.638	25	729	—	↑1.6
	抗氧化蛋白							
3502	磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶	GPX4	6.00	25.067	47	644	—	↑1.7
701	过氧化物还原酶 2	PRDX2	5.37	21.946	35	874	↑2.3	—
1805	过氧化物还原酶 2	PRDX2	5.37	21.946	33	634	↑2.0	—
9301	过氧化物还原酶 1	PRDX1	8.59	22.210	58	490	↑1.6	↑1.7
	伴侣蛋白							
1101	热休克蛋白B1	HSPB1	5.77	22.679	23	605	—	↑1.5
3501	热休克蛋白B1	HSPB1	5.98	22.393	72	475	↑1.7	—
1802	热休克蛋白B6	HSPB6	5.95	17.479	58	667	—	↑1.6
3003	α-晶状体蛋白	CRYAB	6.76	20.037	52	617	↓0.29	↓0.28
	其他							
5504	转铁蛋白	TF	6.75	77.739	18	602	—	↑1.6
5901	转铁蛋白	TF	6.75	77.739	20	702	—	↑1.7
201	肌球蛋白轻链1	MYL1	4.72	18.683	52	489	↑5.02	↑1.89

注：MS. Mascot score；↓和↑.分别表示相对于黑切组样品低和高表达（$P<0.05$）；—.蛋白表达量差异不显著（$P>0.05$）或正常/黑切低于1.5 倍且大于0.667 倍。

在鉴定出的代谢酶中，腺苷酸激酶1、肌酸激酶M、磷酸酶、琥珀酸-辅酶A连接酶、磷酸酯尿苷基转移酶和*S*-腺苷高半胱氨酸水解酶参与ATP的合成和代谢过程。腺苷酸激酶-1能够催化ATP和腺嘌呤核糖核苷酸末端磷酸基的可逆转移，在维持细胞能量稳态和腺嘌呤核苷酸代谢中起重要作用。Yu Qianqian等[22]比较了宰后早期的牛背最长肌和腰大肌蛋白质组差异，发现腺苷酸激酶1在背最长肌中表达量高于腰大肌，而较高的腺苷酸激酶1表达量可以反映更高的能量代谢水平。肌酸激酶是维持肌肉内能量正常运转和ATP再生的关键酶[19]，当肌肉中ATP被消耗殆尽时，它会催化肌酸磷酸生成ATP和肌酸。

Mahmood等[24]发现正常肉中的肌酸激酶M表达量高于黑切肉，与本研究的结果一致。此外，有研究发现肌酸激酶M型与宰后贮藏期间肉的红度值呈正相关[16,18]，并且肌酸因具有清除自由基的能力而具有抗氧化作用[17]。在呼吸作用降低时，琥珀酸-辅酶A连接酶会调控底物水平磷酸化和三磷酸鸟苷/ATP的产生[4]，它的表达量与肌肉的能量需求有关。Poleti等[25]认为琥珀酸辅酶A-连接酶可以为宰后肌肉的pH值下降提供能量，以促使肌肉维持正常的pH值，并发现它与宰后24 h的pH值呈显著负相关（$r=-0.576$）。另外，本实验中鉴定出的*S*-腺苷高半胱氨酸水解酶在核苷酸和核酸代谢中具有重要作用，Wu Wei等[20]则发现它在背最长肌中的表达量高于腰大肌，且与a^*值呈正相关。磷酸酯尿苷基转移酶是参与糖原合成的主要酶，与本实验结果一致，Poleti等[25]同样发现这个蛋白在正常组的表达量高于黑切组，并推测它可能有利于糖原的储备；因此，容易发生黑切肉的动物可能是由于其本身糖原储备能力低于不易发生黑切肉的动物。本研究鉴定出的两种糖酵解酶是肌肉磷酸化酶和葡萄糖磷酸变位酶1，其中肌肉磷酸化酶具有糖原磷酸化的作用，催化糖原转变为葡萄糖-1-磷酸，是糖代谢的关键限制酶，调控着宰后能量的主要来源。葡萄糖磷酸变位酶1可以催化葡萄糖-1-磷酸转变为葡萄糖-6-磷酸，是糖酵解过程中的关键酶，它的表达量增加会导致较高的糖酵解活性[14]，这可能会影响宰后牛肉的最终极限pH值。值得注意的是，有两个蛋白点均为葡萄糖磷酸变位酶，这可能是宰后蛋白质碎片化或翻译修饰的结果[16,21]。相较于黑切牛肉，这些能量代谢类和糖代谢酶在正常肉中的高表达量，意味着肌肉能量代谢水平更高，产生更多的H^+，可以保证宰后pH值的降低和肌肉的正常极限pH值，它们在黑切肉的表达量低可能是黑切肉形成的直接原因，而且琥珀酸-辅酶A连接酶可以作为识别pH值差异的生物标记。

在本研究中，所有的抗氧化蛋白在正常组表达量高。磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶是细胞内必不可少的抗过氧化物酶，它可以直接还原磷脂氢过氧化物，保护细胞膜不受自由基导致的氧化损伤，在保护细胞免受氧化应激反应中起关键作用。同时，它还具有谷胱甘肽过氧化物酶的活性，可以通过还原氢过氧化物，降低自由基对一些关键酶的损害。有研究发现谷胱甘肽过氧化酶和具有谷胱甘肽过氧化酶活性的过氧化物酶6与牛肉红度呈正相关[23,26]，这可能有助于揭示正常肉肉色好于黑切肉的内在原因。过氧化物酶又称硫氧还蛋白过氧化物酶，是一类普遍存在于生物体内的抗氧化蛋白，它通过硫氧还蛋白还原细胞内代谢产生的氢过氧化物，清除超氧化物自由基和降低细胞的氧化应激，具有保护细胞的抗氧化作用[27]。本研究检测出了过氧化物酶1和过氧化物酶2，这些抗氧化蛋白在宰后45 min正常组的高表达量，表明动物屠宰后正常组快速开始细胞凋亡，产生氧化应激也更为强烈，这可能间接反映正常组代谢水平高于黑切组；另一方面，研究发现硫氧还蛋白过氧化物酶与线粒体呼吸控制速率呈正相关[28]，在本实验中它的高表达量说明正常组宰后45 min时的呼吸作用更强，间接说明ATP代谢水平更高，更有利于肌肉pH值的降低。此外，Gagaoua等[23]认为宰后45 min抗氧化蛋白表达量较高预示着较低的极限pH值，这与本实验的结果一致，因此宰后45 min的抗氧化蛋白表达量是影响黑切牛肉形成的关键因素之一。

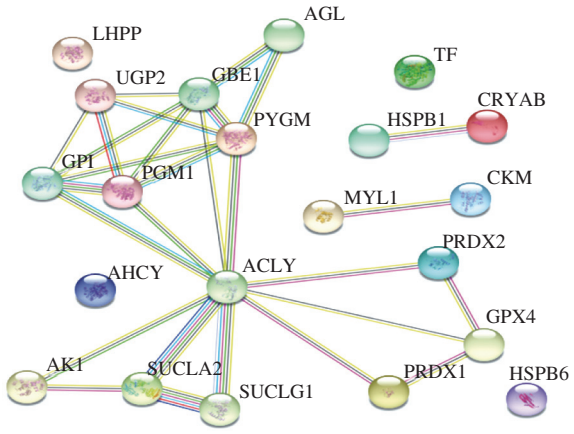
本研究检测到的两种小热休克蛋白（热休克蛋白B1和热休克蛋白B6）属于热休克蛋白家族的一员，是细胞内重要的伴侣蛋白。研究发现当细胞处于过热、低氧或有害氧化环境时，小热休克蛋白（15～43 kDa）表达量就会增加，阻止蛋白发生不可逆聚集和变性，保护和维持细胞内一些重要蛋白酶的结构和功能，以及降低氧自由基，具有保护细胞免受氧化应激和抗细胞凋亡的作用[29]。相较于黑切肉组，小热休克蛋白B1和B6在正常组中较高的表达量，可能是对宰后牛肉pH值快速降低做出的应答反应。Gagaoua等[23]曾报道宰后45 min较高的小热休克蛋白B1表达水平间接反映了牛肉的快速代谢，并预示着宰后较低的pH值。Mahmood等[24]也发现热休克蛋白B1在正常肉的表达量高于黑切肉，这与本实验的结果一致。此外，检测到的α(B)-晶状体蛋白也属于小热休克蛋白家族，在机体处于感染、缺氧、应激等状态下，α(B)-晶状体蛋白的表达量就会上调。与本研究结果相似，前期研究发现α-晶状体蛋白在黑切牛背最长肌中的表达量高于正常肉[24,30]，此外，Gagaoua等[23]发现α(B)-晶状体蛋白与宰后24 h的亮度呈负相关，这正好与黑切肉颜色暗的现象相对应。因此，热休克蛋白B1和α(B)-晶状体蛋白可以作为识别黑切牛肉的潜在生物标记。

此外，本研究还检测到转运蛋白（转铁蛋白）在宰后24 h的正常组中表达量高于黑切组，转铁蛋白表达量高可以解释为当供血不足，对细胞内铁补偿的机制，Sayd等[31]曾报道转铁蛋白在更亮的猪肉组中表达量高于暗色猪肉组，并认为其在糖酵解型肌肉中的表达量高。肌球蛋白轻链1可以调控肌球蛋白的轻链，有研究发现它可以预测宰后24 h的肌肉pH值，其表达量越高预示着极限pH值越低[23]，这与本研究的蛋白质组和pH值的结果一致。

2.3 蛋白质互作分析结果

本研究将检测到差异表达蛋白和数据库中与这些差异表达蛋白相关的蛋白进行蛋白质互作预测分析，如图4所示。与差异表达蛋白连接最多的节点为ATP-柠檬酸合酶（ATP-citrate synthase，ACLY），它可以催化产生乙酰辅酶A和ATP，并参与三羧酸循环和丁酮戊二酸的代谢

过程。与ACLY有联系的差异表达蛋白包括所有抗氧化蛋白和大多数代谢酶，说明这些差异表达蛋白直接或间接参与了能量代谢过程。另外，热休克蛋白B1和α-晶状体蛋白两个伴侣蛋白相互联系，却与热休克蛋白B6分离，说明这两种热休克蛋白可能并不参与同一生化反应体系。以上蛋白质互作分析结果进一步印证了代谢酶和抗氧化蛋白可能通过参与能量代谢过程使宰后pH值降低，进而导致黑切肉的形成。此外，ACLY在蛋白互作中的核心位置，表明它可能也参与黑切肉的形成。



节点表示差异表达蛋白或与差异表达蛋白相关的蛋白；连接线表示蛋白与蛋白之间有联系（亮蓝色线.来自数据库；紫色线.实验测得；绿色线.基因相邻；红色线.基因融合；蓝色线.基因共现；黄色线.数据挖掘；黑色线.共同表达）。

图 4 蛋白质互作网络预测图

Fig. 4 Predicted protein-protein interaction networks

3 结 论

本研究中，宰后24 h正常组的肌肉pH值为5.59，黑切组的pH值为6.54。正常组和黑切组牛肉在宰后45 min和24 h时的差异表达蛋白主要为代谢酶类、抗氧化蛋白和伴侣蛋白等，除了α-晶状体蛋白和宰后24 h的腺苷酸激酶1在黑切组表达量高外，其他蛋白均在正常组表达量高。其中代谢酶类可以通过调节ATP的再生代谢与糖酵解进程来影响宰后肌肉中H^+的产生和积累，进而影响宰后肌肉pH值的降低速率和最终极限pH值，它们在宰后早期的低表达量是导致黑切牛肉形成的关键因素。抗氧化蛋白类表达量高，是对宰后代谢水平高的反应，蛋白质互作也说明抗氧化蛋白与能量代谢有关，它们在黑切组中表达量低，进一步说明黑切肉宰后的低代谢水平。热休克蛋白表达量与宰后氧化应激和不利环境相关，其中热休克蛋白B1和B6均在正常组中表达量高，而α-晶状体蛋白在黑切组中表达量高，这也影响了宰后牛肉pH值的下降。综上所述，本研究发现宰后初期较低的代谢水平是导致黑切牛肉产生的直接原因，可将琥珀酸-辅酶A连接酶、热休克蛋白B1和α-晶状体蛋白作为识别黑切肉的候选蛋白生物标记。此外，蛋白质互作图中的ATP-柠檬酸合酶与多种代谢酶和抗氧化酶有联系，因此可以对其进行深入研究，探究其与黑切肉形成的直接关系。

参考文献：

[1] FERGUSON D M, WARNER R D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants?[J]. Meat Science, 2008, 80(1): 12-19. DOI:10.1016/j.meatsci.2008.05.004.

[2] PONNAMPALAM E N, HOPKINS D L, BRUCE H, et al. Causes and contributing factors to “dark cutting” meat: current trends and future directions: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017, 16(3): 400-430. DOI:10.1111/1541-4337.12258.

[3] FRANCO D, MATO A, SALGADO F J, et al. Tackling proteome changes in the *longissimus thoracis* bovine muscle in response to pre-slaughter stress[J]. Journal of Proteomics, 2015, 122: 73-85. DOI:10.1016/j.jprot.2015.03.029.

[4] ENGLAND E M, MATARNEH S K, SCHEFFLER T L, et al. Perimortal muscle metabolism and its effects on meat quality[M]// PURSLOW P P. New aspects of meat quality. Amsterdam: Elsevier, 2017: 63-89. DOI:10.1016/b978-0-08-100593-4.00004-7.

[5] SUMAN S P, JOSEPH P. Myoglobin chemistry and meat color[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2013, 4(1): 79-99. DOI:10.1146/annurev-food-030212-182623.

[6] ABRIL M, CAMPO M M, ONENÇ A, et al. Beef colour evolution as a function of ultimate pH[J]. Meat Science, 2001. 58(1): 69-78. DOI:10.1016/S0309-1740(00)00133-9.

[7] ASHMORE C R, DOERR L, FOSTER G, et al. Respiration of mitochondria isolated from dark-cutting beef[J]. Journal of Animal Science, 1971, 33(3): 574-577. DOI:10.1121/1.1912606.

[8] HUGHES J, CLARKE F, PURSLOW P, et al. High pH in beef *longissimus thoracis* reduces muscle fibre transverse shrinkage and light scattering which contributes to the dark colour[J]. Food Research International, 2017, 101: 228-238. DOI:10.1016/j.foodres.2017.09.003.

[9] GILL C O, NEWTON K G. Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1979, 37(3): 362-364. DOI:10.1007/BF00403678.

[10] MCKENNA D R, ROEBERT D L, BATES P K, et al. National beef quality audit-2000: survey of targeted cattle and carcass characteristics related to quality, quantity, and value of fed steers and heifers[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(5): 1212-1222. DOI:10.2527/2002.8051212x.

[11] 卢骁, 朱立贤, 张一敏, 等. 山东省DFD牛肉发生率的调查研究[J]. 肉类工业, 2015(3): 39-42.

[12] 杜燕, 张佳, 胡铁军, 等. 宰前因素对黑切牛肉发生率及牛肉品质的影响[J]. 农业工程学报, 2009, 25(3): 277-281.

[13] PAREDI G, RABONI S, BENDIXEN E, et al. “Muscle to meat” molecular events and technological transformations: the proteomics insight[J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(14): 4275-4289. DOI:10.1016/j.jprot.2012.04.011.

[14] GRABEŽ V K M, PHUNG V, MOE K M, et al. Protein expression and oxygen consumption rate of early postmortem mitochondria relate to meat tenderness[J]. Journal of Animal Science, 2015, 93(4): 1967-1979. DOI:10.2527/jas2014-8575.

[15] 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.

[16] YANG X, WU S, HOPKINS D L, et al. Proteomic analysis to investigate color changes of chilled beef *longissimus* steaks held under carbon monoxide and high oxygen packaging[J]. Meat Science, 2018, 142: 23-31. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.04.001.

[17] CANTO A C V C S, SUMAN S P, NAIR M N, et al. Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef *Longissimus lumborum* color stability[J]. Meat Science, 2015, 102: 90-98. DOI:10.1016/j.meatsci.2014.11.011.

[18] 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. DOI:10.1021/jf204188v.

[19] NAIR M N, SUMAN S P, CHATLI M K, et al. Proteome basis for intramuscular variation in color stability of beef semimembranosus[J]. Meat Science, 2016, 113: 9-16. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.11.003.

[20] WU Wei, YU Qianqian, FU Yu, et al. Towards muscle-specific meat color stability of Chinese Luxi yellow cattle: a proteomic insight into post-mortem storage[J]. Journal of Proteomics, 2016, 147: 108-118. DOI:10.1016/j.jprot.2015.10.027.

[21] WU Wei, GAO Xiaoguang, DAI Yan, et al. Post-mortem changes in sarcoplasmic proteome and its relationship to meat color traits in *M. semitendinosus* of Chinese Luxi yellow cattle[J]. Food Research International, 2015, 72: 98-105. DOI:10.1016/j.foodres.2015.03.030.

[22] YU Qianqian, TIAN Xiaojing, SHAO Lele, et al. Label-free proteomic strategy to compare the proteome differences between *longissimus lumborum* and *psoas major* muscles during early postmortem periods[J]. Food Chemistry, 2018, 269: 427-435. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.07.040.

[23] GAGAOUA M, TERLOUW E M C, MICOL D, et al. Understanding early post-mortem biochemical processes underlying meat color and pH decline in the *Longissimus thoracis* muscle of young Blond d'Aquitaine bulls using protein biomarkers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(30): 6799-6809. DOI:10.1021/acs.jafc.5b02615.

[24] MAHMOOD S, TURCHINSKY N, PARADIS F, et al. Proteomics of dark cutting *longissimus thoracis* muscle from heifer and steer carcasses[J]. Meat Science, 2018, 137: 47-57. DOI:10.1016/j.meatsci.2017.11.014.

[25] POLETI M D, MONCAU C T, SILVA-VIGNATO B, et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals muscle contraction and metabolism proteins linked to ultimate pH in bovine skeletal muscle[J]. Meat Science, 2018, 145: 209-219. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.06.041.

[26] YU Q, WU W, TIAN X, et al. Unraveling proteome changes of holstein beef *M. semitendinosus* and its relationship to meat discoloration during post-mortem storage analyzed by label-free mass spectrometry[J]. Journal Proteomics, 2017, 154: 85-93. DOI:10.1016/j.jprot.2016.12.012.

[27] WOOD Z A, SCHRÖDER E, ROBIN HARRIS J, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2003, 28(1): 32-40. DOI:10.1016/S0968-0004(02)00003-8.

[28] GAO X, WU W, MA C, et al. Postmortem changes in sarcoplasmic proteins associated with color stability in lamb muscle analyzed by proteomics[J]. European Food Research and Technology, 2015, 242(4): 527-535. DOI:10.1007/s00217-015-2563-2.

[29] WYTTENBACH A, SAUVAGEOT O, CARMICHAEL J, et al. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin[J]. Human Molecular Genetics, 2002, 11(9): 1137-1151. DOI:10.1093/hmg/11.9.1137.

[30] LOMIWES D, HURST S M, DOBBIE P, et al. The protection of bovine skeletal myofibrils from proteolytic damage post mortem by small heat shock proteins[J]. Meat Science, 2014, 97(4): 548-557. DOI:10.1016/j.meatsci.2014.03.016.

[31] SAYD T, MORZEL M, CHAMBON C, et al. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(7): 2732-2737. DOI:10.1021/jf052569v.