

蛋白质修饰组学在肉品质研究中的应用

蒲强, 罗嘉, 沈林园, 李学伟, 张顺华, 朱砺

四川农业大学动物科技学院, 成都 611130

摘要: 蛋白质翻译后修饰(Post-translational modifications, PTMs)在生命体中具有十分重要的作用。生命有机体中常见的 PTMs 有磷酸化、酰化、糖基化、泛素化、乙酰化、氧化和甲基化等。文章主要介绍了蛋白质组学在肉制品科学方面的应用、PTMs 的主要内容以及分析蛋白修饰特性常见技术的发展,总结了 PTMs 对肌肉生理特性的影响和蛋白质组学方法在肉质蛋白质修饰研究中的重要性及前景,讨论了利用蛋白质修饰组学技术研究肌肉熟化过程中品质特性变化的特点。

关键词: 蛋白质组学; 肌肉; 翻译后修饰; 肉质

Application of modification-specific proteomics in the meat-quality study

Qiang Pu, Jia Luo, Linyuan Shen, Xuewei Li, Shunhua Zhang, Li Zhu

College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: Post-translational modifications (PTMs) play an important role in life science. The most widely studied protein modifications in biological science include protein phosphorylation, acylation, glycosylation, ubiquitination, acetylation, oxidation, methylation and so on. This review outlines current achievements in the study of protein modifications in muscle food using proteomic approaches. First we describe the general knowledge of protein modifications and then the development of proteomic approaches for the characterization of such modifications. Second, we describe the effects of protein modifications on muscle foods and devote our main attention to the application of proteomic approaches for the analysis of these modifications. We conclude that proteomics analysis is powerful for the study of protein modifications and analysis of meat quality characteristics in the process of food production.

Keywords: proteomics; muscle; post-translational modifications (PTMs); meat quality

在宰后(Postmortem, PM)肌肉熟化的过程中, 生物学机制的发生, 尤其是肌肉的新陈代谢发生了呼吸系统和血液循环功能的终止将导致一系列复杂显著改变^[1]。宰后代谢的速率和程度对大量重要的

收稿日期: 2014-11-30; 修回日期: 2015-02-11

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(编号: 2013NZ0041), 国家科技支撑计划项目(编号: 2013BAD20B07), 和教育部长江学者和创新团队发展计划(编号: IRT13083)资助

作者简介: 蒲强, 硕士研究生, 专业方向: 猪的遗传育种。E-mail: 461662559@qq.com;

罗嘉, 硕士研究生, 专业方向: 猪的遗传育种。E-mail: 1028400278@qq.com

蒲强和罗嘉并列第一作者。

通讯作者: 张顺华, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 猪的遗传育种。E-mail: 363445986@qq.com;

朱砺, 教授, 博士生导师, 研究方向: 猪的遗传育种。E-mail: zhuli7508@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.14-417

网络出版时间: 2015-2-14 13:55:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150214.1355.001.html>

肉质属性有显著影响,如嫩度、保水力、肉色等,蛋白质翻译后修饰(Post-translational modifications, PTMs)是造成上述性状改变的重要原因。PM 肌肉中的蛋白质经过了一系列的蛋白质修饰,如可逆磷酸化、氧化、降解和变性,这些修饰对各项肉质性状的变化是非常重要的。PTMs 可从根本上影响肌肉中蛋白质的生物化学性质,从而影响各项肉质指标。

近几年对 PTMs 进行了大量研究,发现了其在影响肉质方面的潜力,尤其是肌肉蛋白质 PTMs 极大地影响着肉质性状的发展。如蛋白氧化导致劣质肉的产生以及营养价值的流失^[2-4];PM 蛋白磷酸化调节酶的活动和宰后肌肉僵直过程,因此影响 pH 值下降和肉质的发展^[5,6];蛋白的降解和变性主要决定了肌肉的嫩度^[7]。氧化、磷酸化及降解是影响肉质的主要 PTMs 形式。蛋白质是基因功能的最终体现者,有其自身特有的活动规律,单纯在转录水平上所获取的基因表达信息并不足以揭示其在细胞内的确切功能。因此,需要对蛋白质的表达模式和修饰模式进行更深入分析。而蛋白质组学研究可以从组学角度更全面深入地揭示蛋白质特征,包括蛋白质表达水平、PTMs、蛋白与蛋白之间相互作用等。基于质谱技术的蛋白质组可以分析蛋白质组成、修饰以及动态表达水平^[8,9]。在肉质科学领域,蛋白质组学是研究不同肉品质性状形成机制的强大工具,可以对不同的修饰方式进行分析^[10],为进一步开展影响各项肉质性状遗传因素的研究提供有价值的信息,这些信息有助于人们进行优质猪肉的生产。质谱技术的发展使蛋白鉴定、位点识别以及蛋白修饰的研究发展迅速,关于肉制品的研究主要集中于肌肉蛋白质 PTMs,如磷酸化、氧化、降解等方面,因此蛋白质组学分析可以作为肉质研究中的重要手段。

1 蛋白质组学

功能基因的描述是后基因组时代的一个重大挑战,后基因组学工具和技术的使用极大地促进了对复杂生物系统的深入研究。蛋白质组(Proteome)即 PROTEins+genOME,是基因组学的延续和补充,代表基因组在不同时相表达的所有蛋白质^[11]。蛋白质组是动态的,作为基因组表达的产物随时间、地点、环境条件变化,具有时间性、动态性、空间性和特异性,能在细胞和生命的整体水平上阐明生命活动

的本质和活动规律。蛋白质的研究要比基因组和转录组更复杂,主要是由于存在 PTMs 或者基因变异体的表达。蛋白质组学研究的目的是获得细胞蛋白表达的信息,从而揭示基因的功能,解释遗传和环境相互作用^[12]。蛋白质组学技术可以对上千的蛋白质进行分离和定量,但蛋白质修饰在很大程度上增加了蛋白质研究的复杂性。Ghaemmaghami 等^[13]首次报道了酵母蛋白质的完整图谱,解释了这项工作的难度并指出其可以预测哺乳动物组织的复杂性。蛋白质组学的主要优势是可以对单一蛋白进行详细描述、识别断裂位点和蛋白质翻译后修饰类型,如蛋白质氧化和磷酸化。蛋白质组学的使用在肉质研究领域具有巨大的潜力,可以描述更多 PTMs 改变后的蛋白质。

2 蛋白质修饰组学

PTMs 是蛋白质修饰的一类重要形式,属于蛋白质行使功能的最高级形态,也是表观遗传现象的核心内容。PTMs 是蛋白质能够行使其功能的关键,蛋白质修饰组学特指蛋白质组学中的翻译后修饰部分。其研究通常以高端物质谱仪及高质量蛋白质修饰抗体为核心,综合运用蛋白质组学、生物化学、细胞生物学与生物信息学手段,应用高通量定量蛋白质修饰组学技术平台开展以蛋白质修饰-表观遗传为特征的新型生物标志物、靶点的高通量筛选与鉴定。

前体蛋白(TpP)是没有活性的,必须要经过一系列的加工才能成为具有活性的蛋白质,无论 PTMs 是否经历了从 mRNA 到成熟蛋白质的整个过程,它在蛋白质功能方面具有极其重要的作用。PTMs 增加了蛋白质的多样性,大多数蛋白质都经历了一定的修饰才能对不同环境因素的作用产生响应^[14]。不同氨基酸残基修饰的异质性使蛋白质更加复杂,根据其修饰类型可分为共价修饰和官能团修饰^[15]。在生物科学领域,广泛研究的修饰主要有磷酸化、酰化、糖基化、泛素化、乙酰化和氧化等。PTMs 是蛋白质结构多样性的重要贡献者,并且许多蛋白可同时结合多种类型的修饰,使蛋白质结构的多样性更加丰富。PTMs 通常出现在亚蛋白水平,因为其修饰往往只发生在蛋白质某个特殊的位点。PTMs 在大多数细胞过程中扮演着重要的地位,如维持蛋白的结构和

完整性、调控代谢和防御、细胞通路以及时空分布^[16]。另外,蛋白质上氨基酸残基的修饰往往和蛋白质功能的改变紧密相连,某些特定的修饰类型能作为调节特定蛋白激活或失活的动态开关^[5,6]。蛋白质修饰类型是人们理解蛋白质特定类型修饰功能多样性的基础。目前虽然已经对部分修饰类型进行了注释,但还有部分没有完成,如羧基化、巴豆酰化、琥珀酰化。最近,Khoury等^[17]报道了蛋白质修饰的多样性和发生频率,大约有431种蛋白质修饰得到了注解,并估计了它们的相对丰度,指出蛋白质糖基化比例不到1/5,而磷酸化比例可能较高。

PTMs也影响一些重要的食品特性,如保质期、营养价值、消化率、卫生以及对消费者的吸引力等^[18]。例如,热处理广泛用于许多食品和原料的加工,包括乳制品、肉类和谷物产品。然而,热处理可导致蛋白质氧化、蛋白质聚集和交联修饰最终导致肉品质变质、营养结构破坏进而影响健康^[19,20]。因此,对PTMs的研究显得尤为重要。

3 蛋白质组学方法检测蛋白修饰

PTMs通常发生在亚蛋白水平,因此对蛋白组分析其特定的修饰增加了极大的挑战。通常,蛋白质修饰特性的鉴别需要结合蛋白分离、亲和色谱、电泳分离、氨基酸序列分析等方法^[16,21]。

3.1 凝胶蛋白质组法

Western blotting是一种分析蛋白质修饰最普遍和传统的方法,可以进行特定和相对定量,其特定抗体可以用来研究蛋白质的修饰形式,如蛋白分裂和翻译后修饰。但是在很大程度上依赖于对一些基础信息、修饰位点的认识并且受到特定抗体的限制。

单向和双向凝胶电泳广泛用于蛋白质翻译及PTMs研究,因为无论何种修饰都会导致蛋白质等电点或者分子量的改变。如蛋白质磷酸化可导致蛋白质等电点发生改变,因为丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸上的中性羟基被带负电荷的磷酸盐取代,导致蛋白质酸度增加,二维凝胶电泳可以将其检出。另外,如果蛋白质被降解或者部分位点糖基化,产生的碎片的分子量会改变。因此,修饰后的蛋白质以及蛋白的不同亚型会在凝胶上表现出不同的流动模式。

荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization,

FISH)是在放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传技术,是以荧光标记取代同位素标记的一种新的原位杂交方法。荧光原位杂交技术在对蛋白特定的修饰鉴定中得到了显著发展。磷酸化蛋白质染色(分子探针)用于在一维、二维凝胶以及蛋白质芯片的基础上鉴定包含丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化后的蛋白质^[22]。目前,磷酸化蛋白染色可用于检测蛋白质磷酸化在宰后肌肉中的变化,这种方法可以在多个样本中半定量分析蛋白质磷酸化的变化^[5]。蛋白质氧化可以利用免疫印迹和DNP抗体检测巯基来进行分析,巯基是蛋白质残基中最具有反应性的基团,通过已经鉴定的一大批受氧化还原调控的蛋白质,发现其活性部位都含有巯基,因此蛋白质巯基完全可以作为研究蛋白氧化最直接的“探针”。目前,大量的蛋白质氧化分析试剂盒已经商业化,如OxyBlot蛋白氧化检测试剂。在对特定修饰进行染色成像后,还将对总蛋白进行染色,如SYPRO荧光染料。经过激光扫描凝胶可获得蛋白修饰染色以及总蛋白染色图像,然后用图像软件进行分析,通过比较修饰蛋白染色和总蛋白染色的强度得到蛋白修饰水平的变化。对凝胶进行分离后,蛋白质将从凝胶上切割下来进行质谱(Mass spectrometry, MS)分析。根据质谱数据可以很清晰地知道蛋白修饰位点极其类型^[23]。若蛋白质发生降解还可以用串联质谱预测其裂解位点^[24,25]。

3.2 非凝胶蛋白质组法

一些特定蛋白或多肽的修饰可通过为蛋白质或多肽引入不同的同位素标记进行定量研究,对于简单样本还可对蛋白修饰进行鸟枪法序列测定。与凝胶技术相比,非凝胶液相色谱和串联质谱(Tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术的结合可以更好地分析蛋白质修饰。另外,蛋白质样品经蛋白酶处理后会生成多种互补或重复的肽,使用LC-MS/MS进行测序这种方法适用于亚蛋白质组、简单的蛋白混合物以及蛋白复合物^[26]。对于大多数复杂的生物样品,利用蛋白质组学方法对特定的修饰进行检测是非常困难的。而特定修饰蛋白质组法可以用特定的抗体对其进行检测,其关键是要通过MS/MS对蛋白或肽进行富集和纯化。

泛抗体是指物种之间无特异性,可在物种间通

用的形式。目前已成功研发出许多种类的可对修饰蛋白进行富集的泛抗体(Pan antibody),包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等。另外,巴豆酰化、琥珀酰化、丙酰化、丁酰化等新型蛋白修饰的位点特异性抗体(Sequence-specific antibody)也相继研发成功,抗体种类涵盖了主要类型及新型蛋白质修饰通路。由于泛抗体没有物种特异性,因此为蛋白质修饰组学应用于肉质研究奠定了基础。

结合 LC/MS/MS 对特定修饰蛋白的富集是进行高通量修饰蛋白质组分析比较常用的方法,另外使用亲和色谱技术、免疫沉淀和特定修饰抗体对蛋白富集也非常有意义。商用的磷酸化修饰抗体已广泛应用于细胞信号通路研究^[27]。磷酸化多肽也可用固定化金属亲和层析(IMAC)或二氧化钛(TiO_2)柱进行富集^[28,29]。离子交换色谱可用于降低肽的复杂性^[30]。糖蛋白富集可以通过特定的糖凝集素抗体和二氧化钛(TiO_2)柱^[31,32],乙酰化肽的富集可通过树脂耦合抗体^[33]。

蛋白经过预分离以及浓缩后,利用 MS 或 MS/MS 对特定修饰位点进行测定,对所有候选的蛋白修饰位点进行测序。但是如何从 LC-MS/MS 产生的数据中得到有意义的信息成为极大的挑战。因此,蛋白质修饰计算机集成工具的发展对从大规模数据当中得到有意义的生物信息显得非常重要,关于 PTMs 的数据库的发展将是决定蛋白修饰分析关键的一步^[21]。

4 蛋白质修饰组学在肉质研究中的应用

骨骼肌是动物体内最丰富的组织,对于家养动物,大约占自身体重的 30%~40% 或者占胴体的 40%~60%^[34]。骨骼肌收缩纤维组成的细胞单元支持和协调机体的周期运动以及姿势的维持^[35]。从营养角度来说,肌肉是重要的氨基酸来源,在某种程度上还能提供其他重要营养物质比如矿物质、维生素和脂肪酸,所以肌肉可以提供大部分人体健康所需的营养素。从食品科学角度来看,由于肌肉营养价值丰富,骨骼肌是消费者最重要的食物资源之一。

肌肉品质性状的变化是显著影响肉类产业的一个关键因素。尽管对导致不同肉质性状改变的机制进行了大量深入的研究,目前还没有对肉质得到完全的理解,因此迫切需要应用新的工具和技术来开展相应的研究。其中,蛋白质组学是研究宰后肌肉

蛋白质变化较为优势的一项新技术。此外,还应用在肌肉的加工和包装过程,动物生长以及遗传变异。肌肉的质量在极大程度上受肌肉蛋白质改变的影响,一些外部因素,比如动物生长、年龄、糖酵解和后期蛋白质降解等都会导致蛋白质的改变^[36,37]。肉品科学家已经对其中大量因素进行了研究,然而,潜在的影响肉质的生物化学和物理化学机制还没有得到完全理解,最近应用蛋白质组学在肉质领域的研究得出了一些有价值的结果。同时对宰后早期肌肉蛋白质的变化已经进行了大量研究,证明屠宰以后大量的蛋白质发生了变化^[4,38-40]。肌纤维类型和肉质(比如多汁性、风味、嫩度等)的关系还存在争议,尤其是肌纤维类型对嫩度的影响尚不清楚^[41]。Bouley 等^[42]第一次利用蛋白质组学对牛肌纤维肥大进行了研究,发现肌肉生长抑制素基因与分子标记有关的 11 对碱基缺失有关,这种突变导致肌肉生长抑制素蛋白表达异常。肌肉生长抑制素主要是控制快收缩糖酵解肌纤维的增值,相对的增加了糖酵解肌纤维在成年动物中的比例^[43]。大量研究证实钙蛋白酶在肌肉嫩度调控中起着重要作用,其活动在屠宰以后主要受到钙蛋白酶抑制剂的作用^[44,45]。利用蛋白质组对肌原纤维蛋白特定钙蛋白酶调节模式进行研究,发现肌动蛋白、肌间线蛋白、肌钙蛋白和原肌球蛋白亚型存在特定的降解模式,但是其与嫩度之间的关系还需要进一步分析^[46]。在 *RN* (Rendement napole)基因的比较蛋白质组研究中发现糖原储存过程中的一些酶的表达受到不同模式的调控,并且基因突变体动物中血糖转运调节也受到了影响^[47]。进一步研究这种基因突变或许可以理解肌肉滴水损失的分子机制。

在肌肉向肉制品转化的过程中蛋白质修饰涉及到了肉质发展的整个过程。肉品的蛋白质修饰发生在动物屠宰之前以及屠宰以后。屠宰前,压力可能影响宰后肌肉 pH 值下降的速率和程度,改变蛋白质修饰模式,从而影响肉品质性状^[48]。屠宰以后,激烈的代谢变化可以激活不同的蛋白质修饰机制(主要是 PTMs),以调节在 ATP 短缺以及肌肉僵直过程中酶的活性和蛋白结构。例如,蛋白磷酸化主要发生在宰后 1~24 h,可逆磷酸化可以间接影响 pH 的下降速率和肌肉僵直过程^[6,49]。在肉类加工过程中蛋白质主要发生氧化,这种氧化对肉品质的控制有

许多负面的影响^[3]。

在肌肉中,利用蛋白质组学方法分析肌肉 PTMs 主要包括氧化、磷酸化、降解以及糖基化,这些修饰在代谢调控和肌肉收缩方面发挥着重要的作用。尽管目前 PTMs 过程在整个食品领域中还未被探索,但是已经开始注意 PTMs 过程在整个肌肉代谢和储存过程中所起到的作用,尤其是氧化和磷酸化。同时,蛋白质降解也在肉质科学领域取得了深入的研究,因为它在调节肉质发展中扮演着重要角色,比如嫩度。

4.1 蛋白质磷酸化

蛋白质的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸侧链是主要的蛋白质修饰位点,特定的氨基酸修饰位点受激酶和磷酸酶蛋白的严格控制,这些蛋白主要调节和删除磷酸基团。磷酸化为蛋白质的激活和失活的动态变化以及许多蛋白质的释放提供了可能,比如代谢酶或者真核生物细胞信号通路的相关酶^[50]。蛋白质的可逆磷酸化在自然界是一种最广泛的作用机制,磷酸化和脱磷酸作用的蛋白质调节至关重要的生物学过程,包括代谢、信号转导和增殖分化。磷酸化是肌肉代谢、生长发育以及肌肉多样性形成的关键调控因子,和肌肉生长高度相关,因此,蛋白质组学在肌肉蛋白研究中非常重要^[5,6,51]。近几年,随着磷酸化蛋白质组发展,蛋白质磷酸化在各种肌肉样本进行了大量研究^[52-54]。大量的肌质蛋白和肌纤维蛋白被鉴定出发生了磷酸化,在宰后肌肉中,酶催化糖酵解反应加快 pH 下降的速率和程度,而大部分的糖酵解酶是磷蛋白^[55]。研究表明,单个或几个糖酵解酶的蛋白质磷酸化在糖酵解的几个限速步骤发挥着重要作用。磷酸化激酶可以使丝氨酸磷酸化酶磷酸化,改变其结构,转换其活动形式^[56,57]。丙酮酸磷酸化酶磷酸化会导致更多的稳定亚型,使其在 PSE 肉中能够维持活动强度^[58]。蛋白激酶的磷酸化间接影响着糖酵解过程和 pH 下降^[20]。对宰后肌肉中蛋白质磷酸化动态变化的研究为研究蛋白质修饰,鉴定潜在的调节蛋白提供了一个新的角度。

磷酸化蛋白质染色(分子探针)结合一维、二维凝胶电泳表明磷酸化蛋白染色可用来检测蛋白质磷酸化在宰后肉中的变化^[49]。这种染色方法对于磷酸化蛋白和总蛋白在一维和二维凝胶中都表现出了高度

的特异性。结果发现,在快的 pH 下降组中,整体磷酸化水平在宰后 1 h 内最高,但是 24 h 后下降到最低,在慢的 pH 下降组中相反。蛋白质磷酸化水平受到 pH 下降速率和储存时间的协同影响($P<0.05$),大部分磷酸化蛋白被鉴定出为糖酵解酶。丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶的磷酸化和宰后肌肉 pH 下降的速率有关,表明磷酸化水平可能指导宰后肌肉中相关蛋白的活动。肌纤维蛋白、MyLC2、肌钙蛋白 T、原肌球蛋白和一些结构蛋白被鉴定出高磷酸化并且随储存时间而改变。与肌质蛋白不同,肌纤维蛋白的磷酸化模式主要随时间变化,仅有少量的受 pH 下降速率的影响。因此,肌纤维蛋白的磷酸化可能和肌肉僵直和熟化过程相关^[49]。

宰后肌肉磷酸化的变化和 RN⁺以及一些常规基因的关系也进行了研究,发现糖原磷酸化酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶受 RN⁺基因的影响,因此肌肉蛋白的蛋白磷酸化水平可能和肌肉宰后代谢中的一些酶的活性相关^[6]。用相同的方法分析了电刺激对肌质蛋白和肌肉嫩度的影响,结果发现,电刺激导致肌酸激酶、二磷酸醛缩酶和丙酮酸激酶在宰后 3 h 内低的磷酸化水平($P<0.05$)^[59]。

4.2 蛋白质氧化

蛋白质氧化会导致猪肉品质的急剧下降,减少肌肉的保水力(WHC)、嫩度以及多汁性^[60]。蛋白质氧化可影响蛋白水解酶的敏感性,消化率降低和营养价值的流失^[61]。氨基酸氧化导致羰基化合物和其他衍生品的形成,肌肉中必需氨基酸减少,直接从赖氨酸、苏氨酸、精氨酸和脯氨酸的侧链发生氧化是蛋白质羰基化的主要途径和机制^[62]。2,4-二硝基苯肼(2,4-DNPH)法和蛋白质组学方法的结合广泛用于评估肌肉蛋白质的羰基化反应。免疫学与一维二维凝胶的结合已经应用于分析鸡肉蛋白质的氧化^[63]。一些含有羟基或者硝基酪氨酸(3-NT)的特定蛋白已经用 DNPH 法和 3-NT 抗体得到了鉴定。烯醇酶是水溶性肌肉蛋白中主要的羟基化类蛋白,一些其他蛋白(肌动蛋白、热休克蛋白 70、肌酸激酶)也含有羟基或者 3-NT。饲养对蛋白氧化水平的影响也进行了研究,用 DNPH 法和 DNP 抗体研究宰后肌肉肌纤维的氧化并且鉴定出了 7 种氧化蛋白^[64]。另外,应用 2DE 结合 DNPH 法、荧光氨基硫脲染色(FTSC)

和质谱鉴定了在储存过程中蛋白的羟基化。烯醇酶、醛缩酶和 L-乳酸脱氢酶的氧化状态随储存时间而改变^[18]。羟基化水平和肌质蛋白质在 2DE 中表现出的丰度有显著的相关性($P<0.05$)^[4]。

随着质谱技术的发展, LC-MS/MS 被逐渐应用于分析肉品蛋白氧化。大量研究者们利用它来分析从 2DE 当中分离的蛋白位点, 鉴定出了几个特异的氧化蛋白位点, 肌酸激酶、肌动蛋白和磷酸丙糖异构酶^[64]。利用 LC-ESI-MS/MS 和其他蛋白质组学方法研究氧合肌红蛋白(OxyMb)在猪肉和牛肉中的氧化, 鉴定出一些残留在牛肉中的组氨酸结合物, 并且发现弹性蛋白酶诱导组氨酸结合物的内转方式具有物种特异性^[65]。

4.3 蛋白质降解

众所周知, 蛋白质的水解在肉制品储存和熟化过程中决定着风味、质地的发展, 释放具有生物活性的多肽类物质^[66~68]。嫩度已被视为最重要的肉质属性之一, 而大量研究证实嫩度主要受宰后肌肉蛋白降解的影响^[69]。蛋白质组学被广泛用来研究宰后肌肉蛋白质的降解并且为观察蛋白质降解过程提供了全新的视野。

经典的二维凝胶方法, 肌肉中蛋白质降解为许多碎片, 包括结构蛋白(肌动蛋白、肌球蛋白重链和肌钙蛋白 T)和肌质蛋白(肌酸激酶、碳酸脱水酶和丙酮酸激酶)^[24]。此外, 肌球蛋白重链降解可能导致肌球蛋白和肌动蛋白之间的交互作用受到破坏。肌动蛋白和肌球蛋白重链碎片被发现和肌肉嫩度相关, 结构蛋白质的降解可能导致肌肉的硬化^[40]。最近, 2DE 和 FTICR-MS 技术结合用于分析肌肉中蛋白质的降解, 发现一些肌酸激酶和肌钙蛋白 T 的碎片^[10]。蛋白质降解也在牛肉宰后 0~24 h 熟化过程中进行了研究, 发现酰谷胱甘肽裂解酶、线粒体 ATP-基质蛋白 SP-22、HSP27 和 HSP20 的完整性降低^[14]。肌动蛋白、肌酸激酶、HSP27 和晶状体蛋白碎片增加, 而分子的完整性在储存 14 d 后下降^[70]。

4.4 蛋白质糖基化

糖基化是常见的蛋白质修饰形式, 影响几乎所有的分泌蛋白和膜蛋白, 研究已经观察到细胞质和核蛋白质的糖基化, 但是丰度不高。内质网和高尔基体蛋白质的合成过程中复杂碳水化合物的组装和修

补需要糖基转移酶协调一致的活动。适当的糖基化对蛋白质稳定, 细胞间、细胞与蛋白质之间、蛋白质与蛋白质之间的联系非常重要并且在蛋白质溶解度和结构中扮演着极其重要的角色^[71,72]。因此, 糖基化和蛋白质食品的加工来说高度相关, 尤其是牛奶和肌肉蛋白质。Saeki 等^[73]发现水溶性肌纤维蛋白可以由糖基化美拉德反应获得。CHEN 等^[74]发现羧甲基纤维素钠是改善肌纤维蛋白质溶解性和热稳定性最好的糖, 可作为进一步研究肌纤维蛋白质糖基化修饰的糖基供体。

5 结语与展望

尽管描述蛋白质修饰在复杂的生物系统中仍然是一个非常具有挑战性的任务, 在过去的研究中, 荧光检测、亲和层析技术和质谱技术的快速发展大大加快了应用修饰蛋白质组学(主要是 PTMs)来揭示蛋白质的分子特性和在生命科学中的功能。系统的描述和解释 PTMs 过程可以通过高通量蛋白质组学研究方法得到实现, 将为生命提供大量有意义的信息。和生命科学相比, PTMs 很少的肉制品方面得到探讨, 蛋白质组学方法分析 PTMs 在食品科学、食品安全、产品鉴别等方面显得越来越重要。

宰后肌肉蛋白质主要受到 PTMs 和细胞外修饰, 这些修饰决定了肌肉蛋白质的生物化学和物理性质, 从而影响最终肉的质量。迄今为止, PTMs 应用在肉质研究方面主要包括磷酸化、氧化、降解, 这些方面的研究仍然处于初步发展水平。高通量蛋白质修饰组学将系统地分析这些蛋白质修饰和肉品加工、遗传背景、处理和存储之间的关系, 更多的修饰类型将逐渐被发现, 更多的修饰抗体将逐渐被开发, 这将有利于我们更好的理解肉质的作用机制。

参考文献

- [1] Paredi G, Raboni S, Bendixen E, de Almeida AM, Mozzarelli A. "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: The proteomics insight. *J Proteomics*, 2012, 75(14): 4275-4289. [DOI]
- [2] Lagerstedt Å, Lundström K, Lindahl G. Influence of vacuum or high-oxygen modified atmosphere packaging on quality of beef *M. longissimus* dorsi steaks after different ageing times. *Meat Sci*, 2011, 87(2): 101-106. [DOI]
- [3] Lund MN, Heinonen M, Baron CP, Estévez M. Protein

- oxidation in muscle foods: A review. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(1): 83–95. [\[DOI\]](#)
- [4] Promeprat A, Sayd T, Laville E, Chambon C, Lebre B, Gatellier P. Early post-mortem sarcoplasmic proteome of porcine muscle related to protein oxidation. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1097–1104. [\[DOI\]](#)
- [5] Huang H, Larsen MR, Karlsson AH, Pomponio L, Costa LN, Lametsch R. Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in postmortem porcine muscle with pH decline rate and time differences. *Proteomics*, 2011, 11(20): 4063–4076. [\[DOI\]](#)
- [6] Lametsch R, Larsen MR, Essén-Gustavsson B, Jensen-Waern M, Lundström K, Lindahl G. Postmortem changes in pork muscle protein phosphorylation in relation to the RN genotype. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(21): 11608–11615. [\[DOI\]](#)
- [7] Koohmaraie M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci*, 1996, 43(Suppl. 1): 193–201. [\[DOI\]](#)
- [8] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003, 422(6928): 198–207. [\[DOI\]](#)
- [9] Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*, 2009, 11: 49–79. [\[DOI\]](#)
- [10] Bendixen E, Danielsen M, Hollung K, Gianazza E, Miller I. Farm animal proteomics—a review. *J Proteomics*, 2011, 74(3): 282–293. [\[DOI\]](#)
- [11] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(1): 61–65. [\[DOI\]](#)
- [12] Bendixen E. The use of proteomics in meat science. *Meat Sci*, 2005, 71(1): 138–149. [\[DOI\]](#)
- [13] Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephore N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 2003, 425(6959): 737–741. [\[DOI\]](#)
- [14] Jia X, Hollung K, Therkildsen M, Hildrum KI, Bendixen E. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: *M. longissimus dorsi* and *M. semitendinosus*. *Proteomics*, 2006, 6(3): 936–944. [\[DOI\]](#)
- [15] Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Intl Ed*, 2005, 44(45): 7342–7372. [\[DOI\]](#)
- [16] Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(6): 391–403. [\[DOI\]](#)
- [17] Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep*, 2011, 1: Article number 90. [\[DOI\]](#)
- [18] Kerwin BA, Remmele RL. Protect from light: photodegradation and protein biologics. *J Pharm Sci*, 2007, 96(6): 1468–1479. [\[DOI\]](#)
- [19] Promeprat A, Gatellier P, Lebre B, Kajak-Siemaszko K, Aubry L, Santé-Lhoutellier V. Evaluation of protein aggregation in cooked meat. *Food Chem*, 2010, 121(2): 412–417. [\[DOI\]](#)
- [20] Shen QW, Du M. Role of AMP - activated protein kinase in the glycolysis of postmortem muscle. *J Sci Food Agric*, 2005, 85(14): 2401–2406. [\[DOI\]](#)
- [21] Witte ES, Old WM, Resing KA, Ahn NG. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods*, 2007, 4(10): 798–806. [\[DOI\]](#)
- [22] Steinberg TH, Agnew BJ, Gee KR, Leung WY, Goodman T, Schulenberg B, Hendrickson J, Beechem JM, Haugland RP, Patton WF. Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics*, 2003, 3(7): 1128–1144. [\[DOI\]](#)
- [23] Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(1): 33–41. [\[DOI\]](#)
- [24] Lametsch R, Roepstorff P, Bendixen E. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(20): 5508–5512. [\[DOI\]](#)
- [25] Larsen MR, Larsen PM, Fey SJ, Roepstorff P. Characterization of differently processed forms of enolase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by two - dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2001, 22(3): 566–575. [\[DOI\]](#)
- [26] Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Yates JR. A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 532–538. [\[DOI\]](#)
- [27] Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha X-M, Polakiewicz RD, Comb MJ. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol*, 2004, 23(1): 94–101. [\[DOI\]](#)
- [28] Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 2002,

- 20(3): 301–305. [\[DOI\]](#)
- [29] Thingholm TE, Jørgensen TJ, Jensen ON, Larsen MR. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1929–1935. [\[DOI\]](#)
- [30] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(33): 12130–12135. [\[DOI\]](#)
- [31] Gabius HJ, André S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1572(2–3): 165–177. [\[DOI\]](#)
- [32] Larsen MR, Jensen SS, Jakobsen LA, Heegaard NH. Exploring the sialome using titanium dioxide chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(10): 1778–1787. [\[DOI\]](#)
- [33] Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu YD, Ball H, Pei JM, Cheng T, Kho Y, Xiao H, Xiao L, Grishin NV, White M, Yang XJ, Zhao YM. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*, 2006, 23(4): 607–618. [\[DOI\]](#)
- [34] Lawrie RA. Lawrie's meat science. 6th ed. Cambridge, England: Woodhead Ltd, 1998. [\[DOI\]](#)
- [35] Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*, 2000, 80(2): 853–924. [\[DOI\]](#)
- [36] Hopkins DL, Thompson JM. Factors contributing to proteolysis and disruption of myofibrillar proteins and the impact on tenderisation in beef and sheep meat. *Crop Past Sci*, 2002, 53(2): 149–166. [\[DOI\]](#)
- [37] Rosenvold K, Andersen HJ. Factors of significance for pork quality—a review. *Meat Sci*, 2003, 64(3): 219–237. [\[DOI\]](#)
- [38] D'Alessandro A, Marrocco C, Zolla V, D'Andrea M, Zolla L. Meat quality of the *longissimus lumborum* muscle of Casertana and Large White pigs: Metabolomics and proteomics intertwined. *J Proteomics*, 2011, 75(2): 610–627. [\[DOI\]](#)
- [39] Jia XH, Ekman M, Grove H, Færgestad EM, Aass L, Hildrum KI, Hollung K. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *J Proteome Res*, 2007, 6(7): 2720–2731. [\[DOI\]](#)
- [40] Lametsch R, Karlsson A, Rosenvold K, Andersen HJ, Roepstorff P, Bendixen E. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(24): 6992–6997. [\[DOI\]](#)
- [41] Maltin C, Balcerzak D, Tilley R, Delday M. Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc*, 2003, 62(2): 337–347. [\[DOI\]](#)
- [42] Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF, Picard B. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*, 2005, 5(2): 490–500. [\[DOI\]](#)
- [43] Deveaux V, Picard B, Bouley J, Cassar-Malek I. Location of myostatin expression during bovine myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Reprod Nutr Dev*, 2003, 43(6): 527–542. [\[DOI\]](#)
- [44] Taylor RG, Geesink GH, Thompson VF, Koohmaraie M, Goll DE. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?. *J Anim Sci*, 1995, 73(5): 1351–1367. [\[DOI\]](#)
- [45] Koohmaraie M, Shackelford SD, Wheeler TL, Lonergan SM, Doumit ME. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. *J Anim Sci*, 1995, 73(12): 3596–3607. [\[DOI\]](#)
- [46] Lametsch R, Roepstorff P, Møller H, Bendixen E. Identification of myofibrillar substrates for μ -calpain. *Meat Sci*, 2004, 68(4): 515–521. [\[DOI\]](#)
- [47] Hedegaard J, Horn P, Lametsch R, Møller HS, Roepstorff P, Bendixen C, Bendixen E. UDP-Glucose pyrophosphorylase is upregulated in carriers of the porcine RN- mutation in the AMP-activated protein kinase. *Proteomics*, 2004, 4(8): 2448–2454. [\[DOI\]](#)
- [48] Ferguson DM, Warner RD. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Sci*, 2008, 80(1): 12–19. [\[DOI\]](#)
- [49] Huang HG, Larsen MR, Lametsch R. Changes in phosphorylation of myofibrillar proteins during *postmortem* development of porcine muscle. *Food Chem*, 2012, 134(4): 1999–2006. [\[DOI\]](#)
- [50] Larsen MR, Trelle MB, Thingholm TE, Jensen ON. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques*, 2006, 40(6): 790–798. [\[DOI\]](#)
- [51] Wang LJ, Xiong YZ, Zuo B, Lei MG, Ren ZQ, Xu DQ. Molecular and functional characterization of glycogen synthase in the porcine satellite cells under insulin treatment. *Mol Cell Biochem*, 2012, 360(1–2): 169–180. [\[DOI\]](#)
- [52] Gannon J, Staunton L, O'Connell K, Doran P, Ohlendieck K. Phosphoproteomic analysis of aged skeletal muscle. *Int J Mol Med*, 2008, 22(1): 33–42. [\[DOI\]](#)
- [53] Højlund K, Bowen BP, Hwang H, Flynn CR, Madireddy L, Geetha T, Langlais P, Meyer C, Mandarino LJ, Yi ZP. In

- vivo* phosphoproteome of human skeletal muscle revealed by phosphopeptide enrichment and HPLC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res*, 2009, 8(11): 4954–4965. [DOI]
- [54] Hou JJ, Cui ZY, Xie ZS, Xue P, Wu P, Chen XL, Li J, Cai TX, Yang FQ. Phosphoproteome analysis of rat L6 myotubes using reversed-phase C18 prefractionation and titanium dioxide enrichment. *J Proteome Res*, 2010, 9(2): 777–788. [DOI]
- [55] Scheffler TL, Gerrard DE. Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci*, 2007, 77(1): 7–16. [DOI]
- [56] Johnson LN. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J*, 1992, 6(6): 2274–2282. [DOI]
- [57] Sprang SR, Acharya KR, Goldsmith EJ, Stuart DI, Varvill K, Fletterick RJ, Madsen NB, Johnson LN. Al changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature*, 1988, 336(6196): 215–221. [DOI]
- [58] Schwägle F, Haschke C, Honikel KO, Krauss G. Enzymological investigations on the causes for the PSE-syndrome, . Comparative studies on pyruvate kinase from PSE-and normal pig muscles. *Meat Sci*, 1996, 44(1–2): 27–40. [DOI]
- [59] Li CB, Li J, Zhou GH, Lametsch R, Ertbjerg P, Brügge-mann DA, Huang HG, Karlsson AH, Hviid M, Lundström K. Electrical stimulation affects metabolic enzyme phosphorylation, protease activation, and meat tenderization in beef. *J Anim Sci*, 2012, 90(5): 1638–1649. [DOI]
- [60] Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. *J Anim Sci*, 2004, 82(3): 785–793. [DOI]
- [61] Morzel M, Gatellier P, Sayd T, Renerre M, Laville E. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci*, 2006, 73(3): 536–543. [DOI]
- [62] Estévez M. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci*, 2011, 89(3): 259–279. [DOI]
- [63] Stagsted J, Bendixen E, Andersen HJ. Identification of specific oxidatively modified proteins in chicken muscles using a combined immunologic and proteomic approach. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(12): 3967–3974. [DOI]
- [64] Bernevic B, Petre BA, Galetskiy D, Werner C, Wicke M, Schellander K, Przybylski M. Degradation and oxidation postmortem of myofibrillar proteins in porcine skeleton muscle revealed by high resolution mass spectrometric proteome analysis. *Int J Mass Spectrom*, 2011, 305(2–3): 217–227. [DOI]
- [65] Suman SP, Faustman C, Stamer SL, Liebler DC. Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. *Proteomics*, 2007, 7(4): 628–640. [DOI]
- [66] Sentandreu MA, Sentandreu E. Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Sci*, 2011, 89(3): 280–285. [DOI]
- [67] Jardin J, Mollé D, Piot M, Lortal S, Gagnaire V. Quantitative proteomic analysis of bacterial enzymes released in cheese during ripening. *Int J Food Microbiol*, 2012, 155(1–2): 19–28. [DOI]
- [68] Panchaud A, Affolter M, Kussmann M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: how to analyze food bioactives and their health effects. *J Proteomics*, 2012, 75(12): 3546–3559. [DOI]
- [69] Koohmaraie M, Geesink GH. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci*, 2006, 74(1): 34–43. [DOI]
- [70] Morzel M, Terlouw C, Chambon C, Micol D, Picard B. Muscle proteome and meat eating qualities of *Longissimus thoracis* of “Blonde d’Aquitaine” young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci*, 2008, 78(3): 297–304. [DOI]
- [71] Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 2002, 12(4): 43R–56R. [DOI]
- [72] D’Ambrosio C, Arena S, Salzano AM, Renzone G, Ledda L, Scaloni A. A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. *Proteomics*, 2008, 8(17): 3657–3666. [DOI]
- [73] Saeki H, Inoue K. Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(9): 3419–3422. [DOI]
- [74] 陈欣, 周春霞, 洪鹏志, 黄和. 糖基化改性对罗非鱼肉肌原纤维蛋白功能特性的影响. *现代食品科技*, 2010, 26(8): 793–796. [DOI]