

文章编号:1673-1689(2008)03-0094-05

背最长肌肌红蛋白 mRNA 表达与 肉色表观性状之间的相关

佟辉¹, 陈杰², 杨晓静², 邵根宝²,
贾超², 陈伟华², 赵茹茜^{*2}

(1. 南京医科大学基础医学院, 江苏南京 210029; 2. 南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏南京 210095)

摘要: 选用肥育期苏太猪 100 头, 屠宰后取背最长肌。采用相对定量 RT-PCR 法测定肌红蛋白(Myoglobin, Mb)mRNA 表达水平; 分光光度分析法测定肌红蛋白浓度; 用色度仪分别测定肌肉色度参数, 包括 L 值、a* 值、b* 值、C 值和 Hue 值; 此外用畜牧学常规方法对肉色进行评分, 并分析上述指标之间的相关。结果显示: 肉色评分与色度参数 L 值($r = -0.235, P = 0.018$)和 a* 值($r = 0.459, P = 0.002$)间存在显著相关; Mb 浓度与肉色评分($r = 0.407, P = 0.0002$), 与 a* 值($r = 0.406, P = 0.0002$), 与 Mb mRNA 水平($r = 0.364, P = 0.008$)均存在显著相关; Mb mRNA 与肉色评分($r = 0.426, P = 0.002$), 与 a* 值($r = 0.379, P = 0.006$)显著相关。

关键词: 肉色; 肌红蛋白; 背最长肌

中图分类号: TS 251.7

文献标识码: A

Relationship between Level of Myoglobin mRNA and Phenotypic Parameters of Meat Colour in Longissimus Dorsi

TONG Hui¹, CHENG Jie², YANG Xiao-jing², SHAO Gen-bao²,
JIA Chao², CHEN Wei-hua², ZHAO Ru-qian^{*2}

(1. School of Basic Medical Science, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University Nanjing, Nanjing 210095, China)

Abstract: 100 Suta pigs of marketing body weight were slaughtered and longissimus dorsi muscle was sampled for measuring various parameters related to meat color. Semi-quantitative RT-PCR was applied to determine the level of Mb mRNA; photometric method was used to measure Mb concentration. Meat color was evaluated both by colorimeter and subjective color scoring. Correlation analysis was performed to investigate relationships between parameters. It was found that subjective color scoring is correlated with a* -values ($r = 0.459, P = 0.002$) and Hunter L-values ($r = -0.235, P = 0.018$); Mb concentration was highly correlated with subjective color scoring ($r = 0.407, P = 0.0002$), a* values ($r = 0.406, P = 0.0002$), and Mb mRNA level ($r =$

收稿日期: 2007-04-20.

基金项目: 江苏省自然科学基金重点项目(BK2002204).

作者简介: 佟辉(1977-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 农学博士, 讲师, 主要从事生化与分子生物学研究.

* 通讯作者: 赵茹茜(1964-), 女, 江苏南京人, 教授, 博导, 主要从事神经内分泌与动物生长调控研究.

Email: lapb@njau.edu.cn

0.364, $P=0.008$). Mb mRNA level was correlated with subjective color scoring ($r=0.426$, $P=0.002$) and a^* values ($r=0.379$, $P=0.006$).

Key words: meat color; myoglobin; longissimus dorsi muscle

多年来,养猪生产的重要目标之一是提高猪肉的瘦肉率。长期的遗传选育,使猪的瘦肉率得到了较大的改善,但肉的品质,如肉色、嫩度、肌内脂肪含量等,均或多或少地受到负面的影响。随着国民经济的发展和人民生活水平的提高,人们对猪肉品质的要求越来越高,因此选育肉质优良的猪种已成为当前育种工作的重点^[1]。

将肉质性状纳入育种方案可以有效地提高猪肉品质^[2]。然而,肉质性状是很难活体测量的性状,受到许多宰前、宰后因素的影响,很难对最终的肉质进行预测,从而给遗传选育造成具体操作上的困难。活体取样并分析与肉质性状密切相关的主效基因的表达或与其连锁的遗传标记的多态性,是建立以优良肉质为目标的标记辅助育种(Marker-assisted selection, MAS)技术的关键。

肉色是猪肉的一项重要外观指标,消费者据此判断肉的新鲜程度,并最终决定是否购买。因此肉色对生产者和经营者来讲是最重要的品质之一^[3-4]。此外,肉色还与肉的嫩度^[4]和风味^[5]直接相关。肉色主要取决于肌肉中的色素肌红蛋白和血红蛋白,放血充分情况下,肌红蛋白在总色素中的比例为80%~90%。因此肌红蛋白的含量是决定新鲜猪肉颜色的重要因素^[6],而肌肉肌红蛋白含量在多大程度上与肉色表现性状相关,却少有报道。通过高度敏感的RT-PCR技术可以从极少量的组织样品中检测肌红蛋白 mRNA 表达的相对丰度,如果肌肉中肌红蛋白 mRNA 水平与肌肉的肉色表现指标密切相关,那么少量的活体样品中肌红蛋白 mRNA 的表达水平可能作为肉色相关的分子标记运用于育种实践。因此,研究中采取100头肥育期苏太猪背最长肌样本,通过测定肉色相关表现性状,包括色度仪(Mimulta Chroma Meter)测定的色度参数(Hunter L 值、 a^* 值、 b^* 值、 C 值和 Hue 值)和肉色目测评分,以及肌肉中 Myoglobin 基因在转录(Mb mRNA)和翻译(肌红蛋白)水平的表达,并分析所有测定指标之间的相关。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及采样

选取100头肥育期苏太猪,屠宰后平均胴体重

为(51.5±7.6) kg。放血后30 min内在右胴胸腰结合处垂直切取背最长肌,厚度为3 cm左右,在背最长肌横截面中央相同部位取样。用于表现性状测定的样品直接放入保鲜袋,冰上放置;用于蛋白质测定的样品,放入Eppendorf管中,-20℃冰箱冷冻保存;用于Mb mRNA测定的样品,放入Eppendorf管中,置液氮速冻,-80℃保存。

1.2 表现性状的测定

背最长肌的表现性状测定参照参考文献[7]。样品在0℃下放置24 h后,以色度仪(Mimulta Chroma Meter)测定色度参数,包括 L 值(Lightness亮度)、 a^* 值(红度)、 b^* 值(黄度)、 C 值(Saturation饱和度)、Hue值(Hunter氏色度色调)。色度仪用前经校正板标准化,然后将镜头垂直置于肉面上,镜口紧扣肉面,勿漏光,按下摄像按钮,色度参数即自动存入微机。由于肉面颜色随位置而异,故在肉面约10 cm²内重复3次改变位置度量,最后取平均数。其中, C 值和Hue值与 a^* 值和 b^* 值间的数学关系是: $C = (a^* + b^*)^{1/2}$, $Hue = \tan^{-1} b^* / a^*$ 。同时用标准肉色谱比色板与肉样对照,进行肉色评分。

1.3 氟烷基型检测

参照何玉英、刘红林2001年的方法^[8]。

1.4 Mb 浓度测定

详见文献[9]。

1.4.1 制作肌红蛋白标准曲线 标准马骨骼肌肌红蛋白(Horse skeletal muscle myoglobin)购自sigma公司。以匀浆缓冲液配制成为0、0.5、1、1.5、2、3 mg/mL的标准液,以1 mg/mL的标准液先在500~600 nm范围内扫描,从吸收光谱图中可见有两个吸收峰,然后在571~586 nm范围内逐波长测定,可见其特征吸收峰位于576 nm(见图1),与文献报道相符^[9]。之后,将标准液各质量浓度于此波长处测定OD值,绘制标准曲线(见图2)。

1.4.2 样品Mb含量测定 称取0.5 g背最长肌样品,加入10倍体积的缓冲液,彻底匀浆后高速离心(4℃,10 000 g)10 min,将离心上清液吸入另一离心管,再次高速离心(4℃,10 000 g)10 min,取离心上清液测定OD值,通过标准曲线换算成浓度值。

1.4.3 总蛋白浓度的测定 Bradford比色法^[10]测

定蛋白质浓度,测定时取 10 μL 上清液,加 90 μL ddH_2O 。标准曲线如图 3 所示。

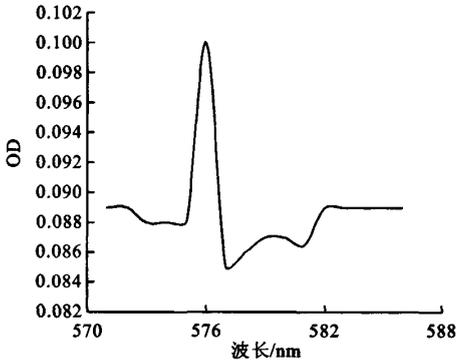


图 1 标准 Mb 吸光度扫描
Fig. 1 Scan of Mb absorbance

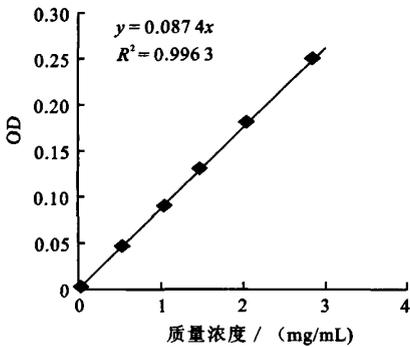


图 2 Mb 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of Mb concentration

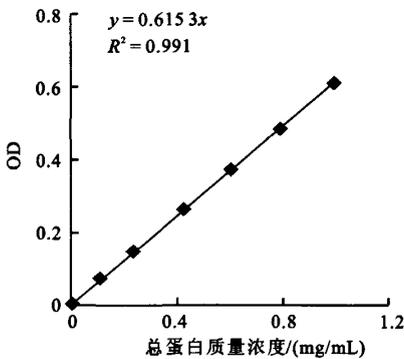


图 3 总蛋白质量浓度标准曲线

Fig. 3 Standard curve of total protein concentration

1.5 Mb 相对定量 RT-PCR

1.5.1 总 RNA 的提取 异硫氰酸胍-酚-氯仿一步抽提法^[10],提取组织样的总 RNA。紫外分光光度计(260 nm)测定总 RNA 浓度和纯度。

1.5.2 反转录(RT) 反转录反应总体积 20 μL ,包括 2 μg 总 RNA, 12 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物, 0.8 mmol/L dNTP, 10 U RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor), 10 U 反转录酶(AMV RTase), 4 μL 5 \times RT

Buffer (含 250 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L MgCl_2 , 250 mmol/L KCl, 50 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L spermidine)。先加 RNA 模板, dNTP 和随机引物(Random hexamer primer), 80 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min,立即放冰上冷却,再加其余试剂于 42 $^\circ\text{C}$ 反应 60 min, 95 $^\circ\text{C}$ 灭活 5 min。同时用不加反转录酶的反转录体系作为阴性对照(C_1),用于检测总 RNA 样品中是否有基因组 DNA 污染。

1.5.3 引物设计 Mb 引物根据 GenBank 上(编号: M14433)猪 Mb 基因组 DNA 序列中的编码区设计^[11],上游引物(forward primer)为: 5' ATGC-CACCAAGCACAAG 3',下游引物(reverse primer)为: 5' CAAACCCTACAGCTACAGGA 3'。以 Classic 18S internal standards (Ambion Inc. USA) 为内标校正加样和扩增效率的差异。

1.5.4 PCR 分别对 PCR 反应条件、循环圈数及 18S primer 和目的基因引物比例等进行优化选择,确定 Mb RT-PCR 条件如下:在 25 μL 的反应体系中含有 2 μL RT 产物, 0.5 U Taq DNA 聚合酶(Promega, Shanghai), 5 μL 10 \times PCR Buffer (含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 100 mmol/L NaCl, 1.0 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 50% glycerol, 1.0% Triton X-100), 0.2 mmol/L dNTP, 1.0~2.0 mmol/L MgCl_2 , 9.6 nmol/L 目的基因引物, 0.8~1.6 μL 18S rRNA 内标。PCR 反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 40 s, 28 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应同时有 C_1 和 C_2 (用 ddH_2O 和 RNA 样品分别取代 RT 产物作对照,以检验是否有外源性和基因组 DNA 污染),并以混合样校正电泳加样误差。PCR 反应在 Gene Amp PCP system 9600 型 PCR 仪(Perkin Elmer, U. S. A.)上进行。

1.5.5 电泳及图象分析 取 18 μL PCR 产物在 2.0% EtBr 染色的琼脂糖凝胶上电泳。图像处理及灰度分析应用 Kodak ID Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Photo Film Co., Ltd., U. S. A.),根据 Mb 和 18S PCR 产物的灰度比确定样品中 Mb mRNA 基因表达的相对含量(见图 4)。



图 4 部分样品 RT-PCR 结果

Fig. 4 Mb mRNA expression of some Longissimus Dorsi muscle of Sutai pigs

1.6 数据统计与分析

数据用平均值±SD 表示,用 SPSS10 软件分析相关性。

2 结果与讨论

苏太猪背最长肌基因组 DNA 提取后,以其为模板进行 PCR,扩增产物见图 5,所得产物均为 118 bp 的单一一条带。从图 6 Hha I 酶切结果看,所有 PCR 产物均被切为 85 bp 和 33 bp 大小的两个片段,证明苏太猪氟烷基因型均为阴性 NN 型。

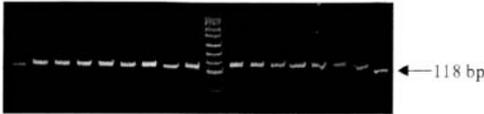


图 5 RYR1 基因 PCR 扩增产物电泳结果
Fig. 5 RYR1 gene PCR products



图 6 氟烷基因为 HhaI 酶切的限制性片段长度多态性
Fig. 6 RYR1 gene RFLP by Hha I

表 1 为各参数平均值表,表 2 为各肉色相关性状间的相关性分析。结果显示,肉色参数间普遍存在一定程度的相关。肉色评分与色度参数间有显著相关性:与 L 值($r = -0.235, P = 0.018$),与 a^* 值($r = 0.459, P = 0.002$);Mb 浓度与其他参数之间广泛存在显著相关性:与肉色评分($r = 0.407, P = 0.0002$),与 a^* 值($r = 0.406, P = 0.0002$),与 Mb mRNA 水平($r = 0.364, P = 0.008$); Mb mRNA 与肉色评分($r = 0.426, P = 0.002$),和 a^* 值($r = 0.379, P = 0.006$)也呈显著相关性。

表 1 各参数平均值

指标	平均值	标准差	样本数
L 值	51.575 71	4.304 898	100
a^* 值	6.687 822	2.283 641	100
b^* 值	5.918 119	1.708 413	100
C 值	8.993 663	2.643 379	100
Hue 值	41.932 48	7.658 629	100
肉色评分	3.615	0.695 785	100
Mb 浓度	0.259 913	0.136 45	100
Mb mRNA	1.191 012	0.659 585	60

表 2 各肉色相关性状间的相关性分析

Tab. 2 Correlation analysis among meat color related

指标	L* 值	a^* 值	b^* 值	C 值	Hue 值	肉色评分	Mb 浓度	MbmRNA
L* 值	1							
P	0.000							
a^* 值	0.124	1						
P	0.215	0.000						
b^* 值	0.520**	0.745**	1					
P	0.000	0.000	0.000					
C 值	0.308**	0.958**	0.904**	1				
P	0.002	0.000	0.000	0.000				
Hue 值	0.482**	-0.476**	-0.220	-0.220*	1			
P	0.000	0.000	0.027	0.027	0.000			
肉色评分	-0.235*	0.459**	0.385**	0.385**	-0.341**	1		
P	0.018	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000		
Mb 浓度	-0.017	0.406**	0.188	0.340**	-0.344**	0.407**	1	
P	0.482	0.000	0.059	0.001	0.000	0.000	0.000	
Mb mRNA	-0.216	0.379**	0.110	0.291*	-0.360**	0.426**	0.364**	1
P	0.125	0.006	0.438	0.036	0.009	0.002	0.008	0.000

3 结 语

本实验的结果表明, Mb mRNA 与 Mb 浓度间呈显著正相关, 表明 Mb 基因表达主要在转录水平调控, 与文献报道一致^[8]。 a^* 值与 Mb 浓度、Mb mRNA 间呈显著相关, 提示: a^* 值(红度)主要取决于肌红蛋白, 相关性处于中等强度, 说明还受其他因素影响。肉色评分与 Hunter L 值之间呈显著的负相关, 而与 a^* 值间呈显著的正相关, 表明: a^* 值和 L 值可作为预测肉色评分的两个重要指标。肉色评分与 Mb 浓度和 Mb mRNA 水平间相关性相近 ($r=0.407$, $r=0.426$), 提示: Mb 浓度或 Mb mRNA 水平均可作为预测肉色评分的指标, 特别是在活体采样情况下, Mb mRNA 水平作为预测肉色评分的指标更加具有实际意义。其他研究也显示, 具

有较高的肉色评分的肉品倾向于有较低的 Hunter L 值, 这主要是由较高的 UpH (Ultimate pH, 最终 pH 值) 导致^[12-13]。具有较高 UpH 的猪肉颜色较深, 而具有较低的 UpH 的猪肉颜色较浅^[14]。其中的原因, 一方面, 低 pH 导致肌红蛋白和其他一些肌肉蛋白的变性, 从而使得溶解性降低、蛋白质沉淀, 导致反射而非吸收光, 产生颜色较浅的肉品^[15]; 另一方面, 当处于较低的 pH 时, 肌肉内蛋白质与水结合松散, 自由水增多。当蛋白质结合较少的水时, 肌纤维呈萎缩状态, 纤维间空隙增大。因为有较多的水反光, 所以颜色更浅。

综上所述可以得知, 较高的肉色评分与高的 a^* 值、低的 L^* 值、高的 Mb 浓度、高的 Mb mRNA 水平, 另外还与高的 UpH 和低的失水率^[12]、较好的嫩度、多汁性和风味^[5] 紧密相关。

参考文献 (References):

- [1] 陆桂平, 陶勇, 任善茂. 猪肉肉质特性的研究现状[J]. 黑龙江畜牧兽医学, 2002 (11): 44-46.
LU Gui-ping, TAO Yong, REN Shan-mao. Research status of pig meat traits[J]. *Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2002(11): 44-46. (in Chinese)
- [2] 朱丽, 李学伟, 李芳琼, 等. 肉质性状与胴体性状间的相关分析[J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(1): 20-21.
ZHU Li, LI Xue-wei, LI Fang-qiong, et al. The correlation between meat quality traits and carcass traits[J]. *Journal of Sichuan Agriculture University*, 2002, 20(1): 20-21. (in Chinese)
- [3] Hedrick H B, Aberle E D. Principles of meat Science[M]. Dubuque, IA; Kendall/Hunt Publishing Company, 1994.
- [4] Page J K, Wulf D M, Schwotzer T R. A Survey of beef muscle color and pH[J]. *J Anim Sci*, 2001, 79: 678-687.
- [5] 陈伯祥. 肉与肉制品工艺学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1993.
- [6] 周光宏. 肉品学[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [7] 张伟力. 猪肉肉色与酸度测定方法[J]. 养猪, 2002(2): 33-34.
ZHANG Wei-li. Assay of color and pH of pig meat[J]. *Swine Production*, 2002(2): 33-34. (in Chinese)
- [8] 何玉英, 刘红林, 王林云. PCR-RFLPs 检测法在无氟烷隐性基因皮特兰猪建群中的应用[J]. 上海农业学报, 2001, 17(3): 34-37.
HE Yu-ying, LIU Hong-lin, WANG Lin-yun. Application of PCR-RFLPs testing method to construction of pietrain pig population with non-halothane allogen[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2001, 17(3): 34-37. (in Chinese)
- [9] 陈铭, 杨欣, 周兆年. 心肌肌红蛋白含量的生化测定方法[J]. 中国应用生理学杂志, 1998, 14(3): 283-284.
CHEN Ming, YANG Xin, ZHOU Zhao-nian. Biochemistry determination method for cardiac muscle myoglobin content [J]. *Chin J Appl Physiol*, 1998, 14(3): 283-284. (in Chinese)
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫 译, 侯云德 校. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995.
- [11] Akaboshi E. Cloning and sequence analysis of porcine myoglobin cDNA[J]. *Gene*, 1985, 40 (1): 137-140.
- [12] DeVoi D L, McKeith F K, Bechtel P J, et al. Variation in composition and palatability traits and relationships between muscle characteristics and palatability in a random sample of pork carcasses[J]. *J Anim Sci*, 1988(66): 385-395.
- [13] Hovenier R E, Kanis T, van Asseldonk. Genetic parameters of pig meat quality traits in a halothane negative population [J]. *Livest Prod Sci*, 1992(32): 309-321.
- [14] Monin G, Sellier P. Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate postmortem perio; The case of the Hamp-shire breed[J]. *Meat Sci*, 1985(13): 49-63.
- [15] Honikel K O. The influence of chilling on meat quality attributes of fast glycolysing pork muscle[M]. Tarrent P V, Eikelenboom G, Monin G. Evaluation and control of Meat Quality in Pigs. Hingham, MA; Martinus Nijhoff Publishers, Kluwer Academic Publishers, 1987: 273-284.

(责任编辑: 秦和平, 杨 萌)