

TNNI 基因对家畜肉质性状的影响进展

肖 成, 曹 阳, 于永生, 张立春, 魏 天, 高 一, 金海国*

(吉林省农业科学院畜牧科学分院, 吉林 公主岭 136100)

摘 要:肌钙蛋白 I(Troponin I-TNNI)属于钙离子结合蛋白多基因家族成员,存在于不同类型的骨骼肌中。它受钙离子浓度的作用,控制肌肉的收缩与放松,影响肌肉的纤维直径、类型,进而影响家畜肌肉纤维的发育、肌间脂肪蓄积、肌肉含水率、剪切力、嫩度、熟肉率、风味等肉质性状。TNNI 基因在鉴定肉制品掺假,监控肉制品生产过程安全问题等实际生产也有所应用。因此,本文对 TNNI 基因结构、功能以及对家畜肉质性状的影响、应用进行综述,为深入研究其影响动物肉质性状作用机制,加强在实际生产中的应用提供参考。

关键词:TNNI; 结构; 功能; 肉质性状; 应用; 影响

中图分类号:S82

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2020)05-0069-04

Progress in the Effect of TNNI Gene on Meat Quality Traits of Livestock

XIAO Cheng, CAO Yang, YU Yongsheng, ZHANG Lichun, WEI Tian, GAO Yi, JIN Haiguo*

(Branch of Animal Husbandry, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Troponin I (TNNI) is a member of the multi-gene family of calcium-binding proteins and exists in different types of skeletal muscles. Under the action of calcium ion concentration, it controls contraction of muscle, affects diameter and type of muscle fiber, and then affects meat fiber development, muscle fat accumulation, muscle moisture content, shear force, tenderness, cooked meat rate, flavor and other meat quality traits. TNNI gene is also used to identify adulteration of meat products and to monitor the safety of meat production process. Therefore, this paper reviews the structure and function of TNNI gene and its effect and application on meat quality traits of livestock, so as to provide a reference for further study on its mechanism of affecting meat quality traits of animals and strengthen its application in practical production.

Key words: TNNI; Structure; Function; Meat quality traits; Application; Effect

寻找与肉质性状紧密相关的候选基因对于从分子育种水平上提高家畜肉质性状具有重要意义。研究表明,肌钙蛋白 I(Troponin I-TNNI)在肌肉收缩与放松时起关键作用,影响着肌纤维组织学形态、肌纤维直径、类型^[1]。肌纤维是肌肉组成的基本单位,占骨骼肌总体积的 75%~90%,是肉品质的决定因素^[2]。肌纤维类型、面积、密度、直径、肌节长度等与肉质性状密切相关,且相互联系,其中肌纤维直径和类型直接影响肉质嫩度。本文综述了 TNNI 结构与功能、表达规律,以全面了解基因本身特点,并阐述了近年来 TNNI 在肉质方面的研究进展,为 TNNI 基因可能作为提高

肉质性状的关键基因提供理论参考。

1 TNNI 结构、修饰与功能

1.1 TNNI 结构

TNNI 基因的第 4 到第 8 外显子是保守的,根据体外结构以及与其他细肌丝蛋白的相互作用,可分为 6 个功能区域^[3]:(1)心肌特异的 N 端延伸;(2)N 端保守区域;(3)TNNT 结合域;(4)抑制区域;(5)开关或触发区域;(5)C 末端移动域。TN-NI 蛋白大小为 21~24 kDa,带碱性等电点。脊椎动物中 TNNI 已经演化成 3 种同源基因,它们在特定的肌肉纤维类型和发育调节下表达^[4-5]。TNNI1 是慢骨骼肌肌钙蛋白(ssTnI),主要在 I 型肌肉纤维中表达;TNNI2 是快骨骼肌肌钙蛋白(fsTnI),主要在 II 型肌肉纤维中表达;TNNI3 是心肌骨骼肌肌钙蛋白(cTnI),主要调控心肌纤维。

1.2 TNNI 修饰

收稿日期:2018-12-05

基金项目:国家肉羊产业技术体系(cars38)

作者简介:肖 成(1990-),男,研究实习员,硕士,主要从事动物遗传育种研究。

通讯作者:金海国,男,博士,研究员,E-mail: khk1962@126.com

1.2.1 磷酸化修饰

磷酸化是指蛋白质上添加磷酸基团的过程。在高等脊椎动物中 *cTnI* 的 Ser23 和 Ser24 能够被蛋白激酶 A (PKA) 磷酸化影响基因功能^[6]。*cTnI* 与肌动蛋白结合区域的 Ser199 能够被蛋白激酶 C (PKC) 磷酸化, 增加 *TNNI* 的 Ca^{2+} 敏感度, 减少细肌丝中 *TNNI* 与肌动蛋白的亲合力^[7]。有研究表明, 在 *cTnI* 基因 N 端延伸中另有 4 个位点可能是潜在的磷酸化位点, 能够减少肌丝 Ca^{2+} 敏感度并且增加肌肉的放松度^[8]。

1.2.2 O 位糖基化修饰

O-糖基化是将糖链转移到多肽链的丝氨酸、苏氨酸或羟赖氨酸羟基的氧原子上, 是调控蛋白功能的方式之一。研究发现, *cTnI* 的 Ser150 是 O-糖基化的位点之一, 同时也能被 p21 活化激酶 3 (PAK3) 磷酸化, 增加 Ca^{2+} 敏感度。O-糖基化与磷酸化可能竞争性结合 *cTnI* 的 Ser150, 进而下调蛋白磷酸化^[9]。

1.2.3 谷胱甘肽化

谷胱甘肽化是指谷胱甘肽与蛋白质上的半胱氨酸残基形成混合型二硫键的过程。研究发现, 骨骼肌中 *fsTnI* 的 Cys134 能够被谷胱甘肽化, 增加了肌肉收缩中 Ca^{2+} 的活性^[10]。

1.2.4 蛋白水解修饰

蛋白水解是指蛋白质在蛋白酶的作用下, 降解为较小的多肽或氨基酸的过程。*cTnI* 是细胞内蛋白酶的底物, 对 μ -钙蛋白酶和 m-钙蛋白酶有显著的敏感性。*cTnI* 被 PKC 磷酸化能够增加 μ -钙蛋白酶蛋白水解的敏感性。PKC 磷酸化的 *cTnI* 的 Ser199 增加了肌丝中 Ca^{2+} 敏感度和钙蛋白酶介导的蛋白水解的敏感性^[7]。

1.2.5 C 端、N 端结构域变化

TNNI 的 C 端区域能够结合和稳定肌动蛋白丝中的原肌钙蛋白, 在缺少 Ca^{2+} 时会抑制肌肉的收缩。*cTnI* 的 N 端延伸是调控的结构域, 它包含了 PKA 的磷酸化位点以及调控整个分子结构、功能的作用^[11]。

1.3 *TNNI* 功能

TNNI 是肌钙蛋白复合物的抑制亚基, 存在于横纹肌的肌节细丝中, 受钙离子浓度的影响, 调控肌肉收缩与放松^[12]。*TNNI* 在钙控制的肌肉收缩中起中心作用, 肌肉收缩是由重叠的肌球蛋白厚丝与肌动蛋白细丝之间滑动产生的。当钙离子浓度上升时, 与 *TNNI* 结合, 其结构发生变化, 进而激活肌动蛋白、原肌球蛋白等发生肌肉收缩^[13]。

TNNI 引起的骨骼肌收缩与放松会影响肌纤维直径、密度、类型, 从而可能影响家畜肌肉纤维的发育、肌间脂肪蓄积、肌肉含水率、剪切力、嫩度、熟肉率、风味等肉质性状^[14]。

2 *TNNI* 在不同肌肉类型中的表达特点

ssTnI 基因在家畜胚胎时期的骨骼肌和心肌中均有表达。在胚胎出生后, 心肌中的 *ssTnI* 基因转变成了 *cTnI* 基因。在动物肌肉发生的早期, *fsTnI* 基因在快骨骼肌纤维中特异性表达直到成年。*cTnI* 在胚胎发育的心肌中以及成年动物骨骼肌再生中表达^[15]。研究发现, *TNNI* 的同源基因中慢骨骼肌能够转变成快骨骼肌, 同时也发生着 I 型纤维向 II 型纤维转变^[16]。这表明 *TNNI* 同源基因在维持肌肉收缩时具有功能的保守性及可交换性^[17]。在 I 型慢缩纤维中, Ca^{2+} 呈现出小幅度、持久性强的变化规律。而在 II 型快缩纤维中, Ca^{2+} 呈现出大幅度、迅速的变化规律。在不同肌肉纤维类型中 Ca^{2+} 与 *TNNI* 结合发挥不同程度的调控作用, 有可能导致肉品质形成差异^[14]。

3 *TNNI* 对肉质性状的潜在影响

TNNI 在猪肉品质性状上的研究较多, 已明确指出 *TNNI* 对肉质性状的关键影响。在家禽肉质性状的研究较少, 需要进一步试验验证。*TNNI* 在牛羊肉质性状方面均有研究, 但研究数量仍然不多, 初步确定了 *TNNI* 作为肉质调控的候选基因。

3.1 *TNNI* 对猪肉品质性状的影响

动物体内每个位置的骨骼肌都不相同, 由不同类型的肌纤维组成。I 型肌纤维富含线粒体, 具有高氧化代谢能力, 而 II 型肌纤维线粒体少, 糖酵解代谢能力高。在猪肌肉生长期间, 增加 I 型纤维数量可以使肉更红^[18]。研究表明, 提高骨骼肌组织颜色及氧化肌纤维量, *TNNI* 表达水平显著增加, 说明 *TNNI* 可能参与到猪红肉生产过程, 提高肉色^[19]。

利用 48 个杜洛克×长白×大白猪杂交后代仔猪, 60 kg 饲喂至 100 kg, 试验组补充 1% L-精氨酸。结果发现, 补充 1% L-精氨酸不会影响生长性能及胴体性状, 但它使 IMF 含量增加 32%, 降低了死后 48 小时的滴水损失。有趣的是, IMF 含量的增加与 *TNNI* 蛋白的丰度增加呈正相关^[20]。基于基因转录水平与肉质性状关联分析, 同样也证实了 *TNNI*, *TNNC1*, *TNNT1* 转录水平与滴水损

失、肉 pH 值相关^[21]。

约克夏和梅山猪在肉质性状上具有显著差异。股二头肌(BF)和咬肌(MM)是慢氧化纤维和快肌纤维的混合物^[22]。试验发现, *TNNI1* 和 *TNNI2* 在约克夏和梅山猪的 BF 和 MM 中的表达模式显著不同。*TNNI1* 和 *TNNI2* 基因在约克夏猪出生后 35 天以及梅山猪出生后 60 天表达出现峰值。因此, *TNNI1* 和 *TNNI2* 可能与约克夏和梅山猪在肉质性状上显著差异有关^[22]。

TNNI1 基因中两个 SNP(g.5174T>C 和 g.8350C>A)与股二头肌的肌肉脂肪含量和肉色值显著相关,并且对背最长肌的肉色值、大理石纹评分以及 pH 值也有显著影响^[22]。*TNNI2* 基因 g.1167C>T 多态性显著影响背最长肌的 pH 值、肉色值、大理石纹评分和肌肉脂肪^[23]。

3.2 *TNNI* 对牛肉肉质性状的影响

利用安格斯牛与其他肉质较差的牛种比较,发现与肉质性状相关的差异基因。结果显示存在 465 个差异基因。其中,影响牛肉品质性状的基因中就有 *TNNI1* 基因。这说明 *TNNI1* 在牛肉的肉质性状调控上可能存在重要作用,需要进一步验证^[24]。

在牛屠宰后的肌肉中,肽链的降解过程伴随着牛肉的嫩化。脊椎动物的 *TNNI* 是胴体熟化过程中容易降解的原纤维蛋白之一。*TNNI* 的降解过程同时伴随着牛肉的嫩化并且这两者之间表现出了高度的相关性^[25]。

3.3 *TNNI* 对绵羊肉肉质性状的影响

在杜泊绵羊和小尾寒羊的 8 个不同组织中, *TNNI1*、*TNNC1*、*TNNI1* 这三个基因具有相似的表达模式,但这两种绵羊的八个组织间存在明显差异^[26]。*TNNI1* 基因在天府肉羊的 12 个组织中,腹肌表达量最高,股二头肌其次,与其他组织差异极显著,在腹肌组织中 *TNNI1* 基因的表达量随年龄的增长而减少^[26]。*TNNI1* 基因在不同年龄段的腹肌中表达量与肌纤维直径及单根肌纤维横截面积间呈显著的正相关关系,与肌纤维密度间呈显著的负相关关系。*TNNI3* 基因在心肌的表达量最高,与其他组织差异极显著,在心肌组织中 *TNNI3* 基因的表达量随年龄的增长而减少。*TNNI3* 基因在不同年龄段心肌中表达量与肌纤维直径呈显著的负相关关系,与单根肌纤维横截面积呈不显著负相关关系,与肌纤维密度间呈极显著的正相关关系^[27]。

4 *TNNI* 基因在实际生产中的应用

针对 *TNNI* 基因存在于动物肌肉组织这一特性,开发了一种灵敏的酶联免疫吸附试验,利用特异于牛和绵羊 *TNNI* 的 MAbs 5G9 作为捕获抗体来检测反刍动物饲料中被禁止使用的动物性蛋白(牛或羊)^[28]。研究发现,肌肉提取物 *TNNI* 或 *TNNT* 基因的电泳模式变化与肉类韧性显著相关,可以对早期监测(屠宰后 24 小时内)的背最长肌进行准确预测^[29]。研究表明,在所有动物肌肉组织中存在 *TNNI*。每个物种均有 *TNNI* 特异性单克隆抗体,可以用每种物种特异性抗体来分析、识别欺诈性掺假^[30]。*TNNI* 已被视为哺乳动物肌肉组织中生肉和肉制品潜在热稳定和物种特异性的标志物。因此, *TNNI* 的定量研究能够快速评估各种肉制品中哺乳动物的肌肉含量^[31]。*TNNI* 抗体通过酶联免疫吸附测定也可以用来监测肉制品原料的采购和处理过程^[32]。可以利用 PCR 方法检测 *TNNI* 基因特异性片段来评估肉类是否掺假^[33]。通过比较 *TNNI* 的电泳迁移率,可以很容易地区分哺乳动物和家禽,并且可以通过 LC-MS/MS 分析鉴定每个物种^[34]。

5 展 望

肉质性状属于数量性状,多种基因、分子、信号通路参与其中,通过极其复杂的网络发挥作用,很难发现某些基因具有绝对的调控作用。因此,科学家们不断致力于寻找具有关键作用的新功能基因,并通过联系上下游相关基因,把目前已经发现的基因串联起来形成网络,弄清调控机制,应用于实践,促进整个行业发展。目前明确 *TNNI* 与肌纤维直径以及肌纤维密度显著相关,影响肉类品质。但仍需要进一步验证,并探索其如何更好地应用于生产实践。

参考文献:

- [1] Gordon A M, Homsher E, Regnier M. Regulation of Contraction in Striated Muscle[J]. *Physiological Reviews*, 2000, 80(2):853-924.
- [2] 梁婷玉,吴建平,刘 婷,等.肌纤维类型分类及转化机理研究进展[J]. *肉类研究*, 2018, 32(9): 65-71.
- [3] Li M X, Wang X, Sykes B D. Structural based insights into the role of troponin in cardiac muscle pathophysiology [J]. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 2004, 25(7):559-579.
- [4] Li M X, Hwang P M. Structure and Function of Cardiac Troponin C (TNNC1): Implications for Heart Failure, Cardiomyopathies, and Troponin Modulating Drugs[J]. *Gene*, 2015, 571(2): 153-166.
- [5] Perry S V. Troponin I: Inhibitor or facilitator[J]. *Molecular &*

- Cellular Biochemistry, 1999, 190(1-2):9-32.
- [6] Rao V S, Korte F S, Razumova M V, et al. N-terminal phosphorylation of cardiac troponin-I reduces length-dependent calcium sensitivity of contraction in cardiac muscle[J]. Journal of Physiology, 2013, 591(2):475-490.
- [7] Wijnker P J, Li Y, Zhang P, et al. A novel phosphorylation site, Serine 199, in the C-terminus of cardiac troponin I regulates calcium sensitivity and susceptibility to calpain-induced proteolysis [J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2015, 82:93-103.
- [8] Zhang P, Kirk J A, Ji W, et al. Multiple reaction monitoring to identify site-specific troponin I phosphorylated residues in the failing human heart[J]. Circulation, 2012, 126(15):1828.
- [9] Ramirezcorrea G A, Jin W, Wang Z, et al. O-linked GlcNAc Modification of Cardiac Myofilament Proteins: A Novel Regulator of Myocardial Contractile Function[J]. Circulation Research, 2008, 103(12):1354.
- [10] Mollica J P, Dutka T L, Merry T L, et al. S-glutathionylation of troponin I (fast) increases contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity in fast-twitch muscle fibres of rats and humans[J]. Journal of Physiology, 2012, 590(6): 1443-1463.
- [11] Wang H, Chalovich J M, Marriott G. Structural Dynamics of Troponin I during Ca^{2+} -Activation of Cardiac Thin Filaments: A Multi-Site Förster Resonance Energy Transfer Study[J]. Plos One, 2012, 7(12): e50420.
- [12] Gordon A M, Homsher E, Regnier M. Regulation of Contraction in Striated Muscle[J]. Physiological Reviews, 2000, 80(2):853-924.
- [13] Wei B, Jin J P. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2011, 505(2):144-154.
- [14] Hardie D G, Sakamoto K. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle[J]. Physiology, 2006, 21(21):48-60.
- [15] Rao V S, Korte F S, Razumova M V, et al. N-terminal phosphorylation of cardiac troponin-I reduces length-dependent calcium sensitivity of contraction in cardiac muscle[J]. Journal of Physiology, 2013, 591(2):475-490.
- [16] Stevens L, Bastide B, Kischel P, et al. Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2002, 282(5):1025-1030.
- [17] Sasse S, Brand N J, Kyprianou P, et al. Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure[J]. Circulation Research, 1993, 72(5):932.
- [18] 郭云雁,王立贤,程笃学,等.猪肌纤维组织学特性研究进展[J].中国畜牧兽医,2007,34(8):49-52.
- [19] Zhang L, Zhou Y, Wu W, et al. Skeletal Muscle-Specific Overexpression of PGC-1 α Induces Fiber-Type Conversion through Enhanced Mitochondrial Respiration and Fatty Acid Oxidation in Mice and Pigs[J]. International Journal of Biological Sciences, 2017, 13(9):1152-1162.
- [20] Ma X, Zheng C, Hu Y, et al. Dietary L-Arginine Supplementation Affects the Skeletal Longissimus Muscle Proteome in Finishing Pigs[J]. Plos One, 2015, 10(1):e0117294.
- [21] Pierzchala M, Hoekman A J, Urbanski P, et al. Validation of biomarkers for loin meat quality (*M. longissimus*) of pigs[J]. Journal of Animal Breeding & Genetics, 2014, 131(4): 258-270.
- [22] Xu Z Y, Yang H, Li Y, et al. Temporal expression of TnI fast and slow isoforms in, biceps femoris and, masseter muscle during pig growth[J]. Animal, 2010, 4(9):1541-1546.
- [23] Yang H, Xu Z Y, Lei M G, et al. Association of 3 polymorphisms in porcine troponin I genes (*TNNI1* and *TNNI2*) with meat quality traits[J]. Journal of Applied Genetics, 2010, 51(1): 51-57.
- [24] Taye M, Yoon J, Dessie T, et al. Deciphering signature of selection affecting beef quality traits in Angus cattle[J]. Genes & Genomics, 2018, 40(1):63-75.
- [25] Farah C S, Reinach F C. The troponin complex and regulation of muscle contraction[J]. Faseb Journal, 1995, 9(9):755-767.
- [26] Sun Y, Wang G, Ji Z, et al. Three slow skeletal muscle troponin genes in small-tailed Han sheep (*Ovis aries*): molecular cloning, characterization and expression analysis[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43(9):1-12.
- [27] 吴婷婷.天府肉羊 *TNNI1* 和 *TNNI3* 基因的克隆、表达及其与肌肉组织学性状相关性研究[D].成都:四川农业大学, 2013.
- [28] Chen F C, Hsieh Y H P, Bridgman R C. Monoclonal Antibody-Based Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Sensitive Detection of Prohibited Ruminant Proteins in Feedstuffs [J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(3):544-549.
- [29] Veronica S, Veronica F S, Pedro C, et al. Identification of biomarkers of meat tenderisation and its use for early classification of Asturian beef into fast and late tenderising meat[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(13):2727-2740.
- [30] Kim J M, Park B S, Shim K W, et al. Skeletal Muscle Troponin I (TnI) in Animal Fat Tissues to Be Used as Biomarker for the Identification of Fat Adulteration[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2014, 34(6):822-828.
- [31] Zvereva E A, Kovalev L I, Ivanov A V, et al. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products[J]. Meat Science, 2015,105:46-52.
- [32] Chen F C, Godwin S, Chambers E. An Immunoassay for Quantification of Contamination by Raw Meat Juice on Food Contact Surfaces[J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(11):1971-1976.
- [33] Cheng J H, Chou H T, Lee M S, et al. Development of qualitative and quantitative PCR analysis for meat adulteration from RNA samples[J]. Food Chemistry, 2016, 192:336-342.
- [34] Kim G D, Seo J K, Yum H W, et al. Protein markers for discrimination of meat species in raw beef, pork and poultry and their mixtures[J]. Food Chemistry, 2017, 217:163-170.

(责任编辑:王丝语)