

牦牛肉品质相关的去饱和脂肪酶1基因表达差异分析

谢凤莲, 孙万成, 罗毅皓*

(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘要: 检测牦牛组织中去饱和脂肪酶1(stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)基因表达量, 分别选择1月份、4月份、9月份年龄相近, 取其肝脏、肾脏、结肠、背最长肌4个组织, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)技术和酶联免疫反应测定牦牛不同组织中SCD1的表达量和含量。结果表明: 以肝脏为对照组, SCD1基因在牦牛肝脏、肾脏、结肠、背最长肌4个组织中均有表达, 且SCD1基因表达量和蛋白含量均在牦牛背最长肌中最高, 差异显著($P < 0.05$)。不同月份间, 1月份牦牛SCD1基因表达量和蛋白含量都低于9月份和4月份。说明SCD1基因在牦牛不同组织均有表达, 且在寒冷季节表达量较低。

关键词: 牦牛肉; 去饱和脂肪酶1; 实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR); 酶联免疫吸附测定(ELISA); 表达量

Analysis of the Expression Differences of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene with Related Quality of Yak Meat

XIE Feng-lian, SUN Wan-cheng, LUO Yi-hao*

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China)

Abstract: To detect the expression of stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene in yak tissue, the samples were selected in January, April, September and taked the liver, kidney, colon, longissimus dorsi. There were real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) technology and enzyme-linked immunosorbent assay measuring yak SCD1 expression and protein content in different tissues. The results showed that SCD1 gene was expressed in all four tissues of yak liver, kidney, colon and dorsal longest muscle, and SCD1 gene expression and content were highest in the longissimus dorsi muscle of yak with significant difference ($P < 0.05$). The expression and protein content of SCD1 gene in yak were lower in January than that of sample in September and in April. The results indicated that SCD1 gene was expressed in different tissues of yak and had a low expression in cold season.

Key words: yak meat; stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1); real-time fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR); enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); expression

引文格式:

谢凤莲, 孙万成, 罗毅皓. 牦牛肉品质相关的去饱和脂肪酶1基因表达差异分析[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 1-5
XIE Fenglian, SUN Wancheng, LUO Yihao. Analysis of the Expression Differences of Stearoyl-CoA Desaturase 1 Gene with Related Quality of Yak Meat[J]. Food Research and Development, 2019, 40(5): 1-5

牦牛是生长在青藏高原地区的一种特有牛种, 这

里海拔高, 气候寒冷, 因此造就了牦牛不同于普通牛种的独特体质, 并含有大量的营养成分和丰富的微量元素, 特别是含有人体必需的脂肪酸, 对人体的健康非常重要, 但是牦牛肉比一般牛肉更粗糙且不好吃^[1-2]。许多学者认为牦牛肉蛋白质含量高(22.13%), 脂肪含量低(3.36%), 其营养成分高于黄牛肉、猪肉、羊肉, 属

基金项目: 国家自然科学基金(31460441)

作者简介: 谢凤莲(1994—), 女(汉), 硕士, 研究方向: 动物营养与饲料。

* 通信作者: 罗毅皓(1976—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向: 功能食品。

“高蛋白、低脂肪”的优质肉^[3-4]。去饱和脂肪酶 1 (stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1) 是合成单不饱和脂肪酸 (monounsaturated fatty acid, MUFA) 棕榈油酸和油酸的关键酶, 参与泌乳反刍动物肝脏中的脂肪酸生物合成, 且 SCD1 基因在肝脏中高表达^[5-6]。大量研究表明, SCD1 基因过表达可以增加细胞内 MUFA 含量和脂质积累, 而沉默 SCD1 基因导致油酸浓度和甘油三酯 (triglyceride, TAG) 积累的显著降低^[7]。牦牛 SCD1 基因全长序列为 1 300 bp, 编码 359 个氨基酸^[8], 且缺乏 SCD1 基因的小鼠不能使饱和脂肪酸去饱和, 并且避免饮食诱导的肥胖^[9]。研究表明, 牛乳中超过 70 % 的共轭亚油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 都是经 SCD1 催化产生的, SCD1 可能影响牛奶中 SFAs/MUFAs 比率、肌间脂肪沉积和成分, 是改善牛奶和牛肉质量的主要候选基因, 牛肉肌间脂肪中不饱和脂肪酸含量的提高对于改善牛肉品质和风味也有着重要影响^[10]。也有相关研究表明, 小鼠的 SCD1 基因敲除会导致小鼠体内的胆固醇丁酯和甘油三酯的缺乏, 棕榈酸、油酸的含量也存在着相应的下降趋势, 而棕榈酸酯和硬脂酸的含量却呈上升趋势^[11]。敲除小鼠 SCD1 基因, 发现小鼠的耗能会增加, 小鼠体内的脂肪沉积减少, 并能够加大脂肪酸氧化速度, 减少极低密度脂蛋白的分泌, 增加从而间接参与脂肪代谢和其生物合成^[12]。因此, 研究牦牛 SCD1 基因表达差异, 可以探究 SCD1 基因的调控脂肪酸含量比例的能力, 并对牦牛肉品质进行评估, 为进一步改善牦牛肉品质提供可借鉴的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1 月份、4 月份、9 月份在青海省西宁市城南马家肴屠宰场, 采集现杀的 3 头公牦牛的肝脏、肾脏、结肠、背最长肌组织 (采集样品所用的手术刀、镊子等严格灭菌), 迅速装于冷冻管中, 保存在液氮罐中, 带回实验室后, 将样品从液氮罐中取出, 保存于 -80 ℃ 冰箱中, 备用。

移液枪和微量吸头、核酸染料 (4s red plus nucleic acid stain): 上海生物工程技术股份有限公司; RNA 提取试剂盒、TaKaRa 反转录试剂盒、琼脂糖、荧光定量染料 (SYBR Green II): 兰州宝生物工程有限公司; 牛硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (SCD1) 酶联免疫分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒: 南京翼飞雪生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

电热鼓风干燥箱 (DHG-9070A): 上海一恒科学仪

器有限公司; 冷冻离心机 (2-16KL): 德国 Si GMA 公司; PCR 仪 (Gene AMP PCR System 9700): 美国 ABI 公司; NanoDrop One/OneC 超微量分光光度计 (AZY1603147): 基因有限公司; 电泳仪 (JY600): 北京君意东方电泳设备有限公司; 凝胶成像分析仪 (WD-9413A): 北京市六一仪器厂; 荧光定量仪 (CFX96): 美国 BIO-RAD 公司; 酶标仪 (352 型): 芬兰 Labsystems Multiskan MS; 洗板机 (AC8): 芬兰 Thermo Labsystems; 隔水式恒温培养箱 (GNP-9080 型): 上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计

在 NCBI 数据库中搜索 SCD1 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号为 AY241933), 通过核心序列设计 5' 和 3' 端特异性引物, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称	引物类型	序列信息 (5'-3')
SCD-1F	Forward	CCCTTTCCTTGAGCTGTCTG
SCD-1R	Reverse	ATGCTGACTCTCTCCCCTGA
β -actinF	Forward	GAGGCTCAGAGCAAGAGAGGC
β -actinR	Reverse	CGTGTAGAAAGTGTGCTGCC

1.3.2 样品总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

组织样品的 RNA 提取参照试剂盒说明书进行操作。使用 Nanodrop One/OneC 超微量分光光度计测定 RNA 样品的 OD 值 (260 nm 吸光度值与 280 nm 吸光度值之比, 反映核酸的纯度) 和浓度 (ng/ μ L), 并在电泳凝胶成像仪上拍照检测 RNA 的完整性。将提取到的牦牛组织样品的总 RNA 进行反转录, 主要参考 TaKaRa 反转录试剂盒进行, 采用 20 μ L 反转录体系, 进行 PCR 扩增得到 cDNA。反转录反应条件如下: 37 ℃, 15 min (反转录反应); 85 ℃, 5 s (反转录酶的失活反应)。

1.3.3 SCD1 基因实时荧光定量聚合酶链式反应

以合成的牦牛组织样品 cDNA 为模板, 按 TaKaRa 试剂盒推荐方法在冰盒上进行操作。加入引物 SCD1F1-SCD1R1 进行实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR), 同时选择内参 β -actin F1- β -actin R1 进行 RT-PCR 作为对照。两步法 PCR 扩增标准程序。

1.3.4 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 反应

ELISA 反应按照 ELISA 试剂盒, 应用双抗体夹心

法测定标本中牛硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (SCD1)水平。用纯化的牛硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1),再与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的 SCD1 抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine,TMB)显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的硬脂酰辅 A 去饱和酶 1 (SCD1)呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中牛硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)浓度。

1.3.5 数据处理与统计学分析

利用 SPSS 24.0 软件分析试验数据, 计量数据用“平均值±标准差”表示,采用 ANOVA 对试验结果进行差异显著性分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 提取的样品总 RNA 检测

提取出的牦牛肝脏、肾脏、结肠、背最长肌样品的总 RNA 在质量分数 1.2 %琼脂糖凝胶上的电泳结果见图 1。

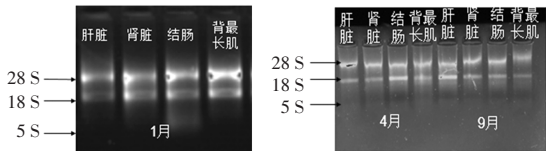


图 1 样品总 RNA
Fig.1 Sample RNA

由图 1 可以看到 28 S、18 S、5 S 三条亮带,且 28 S 条带亮度大概是 18 S 条带亮度的 2 倍。

2.2 SCD1 基因 cDNA 的合成

图 2 由提取的总 RNA 反转录后合成 cDNA,再通过 PCR 扩增成 DNA 得到的电泳图。

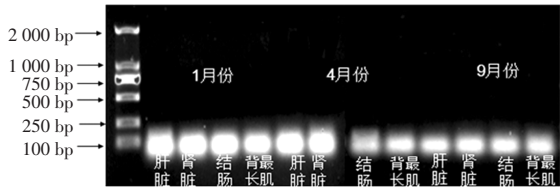


图 2 SCD1 基因 cDNA 的合成
Fig.2 SCD1 genes cDNA synthesis

本试验应用 DL2 000 的 Marker 可以看出目的基因在 100 bp~250 bp 之间。

2.3 牦牛 SCD1 基因荧光定量分析

不同月份牦牛不同组织间 SCD1 基因荧光定量见表 2。

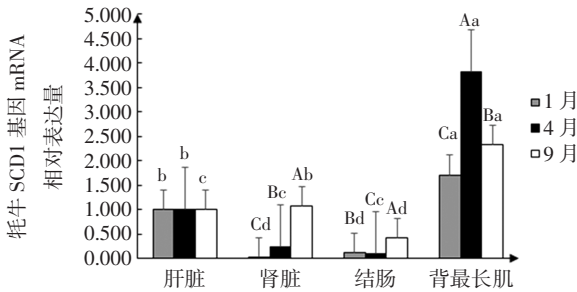
表 2 牦牛 SCD1 基因荧光定量
Table 2 Fluorescence quantification of SCD1 gene in yak

月份	组织	牦牛 SCD1 引物反应平均值	内参 β -actin 反应 Ct 值平均值	Δ ct	SCD1 基因 mRNA 相对表达量
1 月份	肝脏	21.47±0.20	21.39±0.28	0.09	1.000
	肾脏	26.69±0.53	21.46±0.05	5.23	0.028
	结肠	26.14±0.32	22.97±0.22	3.16	0.119
	背最长肌	21.19±0.01	21.88±0.06	-0.69	1.714
4 月份	肝脏	29.22±0.49	26.29±0.32	2.91	1.000
	肾脏	25.74±0.19	20.73±0.67	5.01	0.234
	结肠	28.09±0.07	21.68±0.16	6.41	0.088
	背最长肌	19.67±0.79	18.69±0.27	0.98	3.815
9 月份	肝脏	27.63±0.22	21.78±0.21	5.85	1.000
	肾脏	31.36±0.15	25.60±0.60	5.76	1.064
	结肠	28.49±0.13	21.42±0.35	7.08	0.428
	背最长肌	27.37±0.07	22.74±0.18	4.63	2.329

通过比较阈值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)进行相对定量。循环次数 (cycle times, Ct) 为样品中 PCR 扩增反应的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。以牦牛肝脏样品作为对照样,将其 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值设为 1 进行阈值比较,根据公式计算:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(\text{实验组 SCD1 Ct} - \text{实验组 } \beta\text{-actin Ct}) - (\text{对照组 SCD1 Ct} - \text{对照组 } \beta\text{-actin Ct})]}$$

由上述公式计算得到的结果可以得到不同月份 SCD1 基因相对定量的拷贝数(见图 3)。



同月份不同组织间差异性用 a 表示,不同月份同一组织差异性用 A 表示,字母不同表示差异显著($P<0.05$),字母相同表示差异不显著 ($P>0.05$)。

图 3 牦牛 SCD1 基因 mRNA 相对表达量
Fig.3 Relative mRNA expression of yak SCD1 gene

由表 2 和图 3 可得以每个月份的牦牛肝脏为对照组,1 月份、4 月份、9 月份牦牛 SCD1 基因表达量在牦牛肝脏、结肠、肾脏、背最长肌 4 个组织中均有表达,其中背最长肌组织中 mRNA 相对表达量最高,且 1 月份

牦牛 SCD1 基因在各个组织的表达量都低于 4 月份和 9 月份,且组织间 SCD1 基因表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

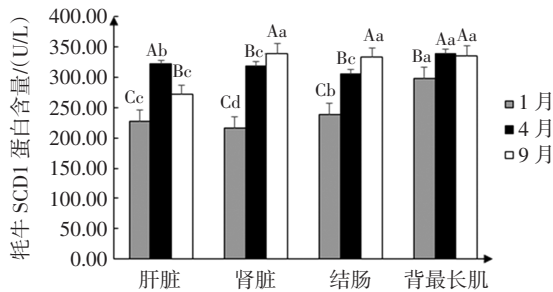
2.4 牦牛 SCD1 蛋白含量分析

不同月份牦牛不同组织间 SCD1 蛋白含量见表 3。

表 3 牦牛 SCD1 蛋白含量
Table 3 SCD1 protein content of yak

月份	组织	1 组	2 组	3 组	平均值±标准差 (U/L)
1 月份	肝脏	227.18	229.96	224.39	227.18±2.79
	肾脏	213.23	215.32	222.29	216.95±4.75
	结肠	239.72	242.51	234.15	238.79±4.26
	背最长肌	302.47	298.29	292.71	297.82±4.89
4 月份	肝脏	326.17	321.99	338.72	321.52±4.90
	肾脏	320.60	312.93	323.39	318.17±5.42
	结肠	303.17	321.99	316.41	305.03±9.21
	背最长肌	333.15	346.39	338.72	339.42±6.65
9 月份	肝脏	276.67	271.79	266.22	271.56±5.23
	肾脏	340.12	336.63	342.91	339.87±3.15
	结肠	337.33	327.57	333.84	332.91±4.95
	背最长肌	334.54	339.42	331.75	335.24±3.88

同组织不同月份的牦牛 SCD1 蛋白含量见图 4。



同月份不同组织间差异性用 a 表示,不同月份同一组织差异性用 A 表示,字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$),字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 4 牦牛 SCD1 蛋白含量

Fig.4 SCD1 protein content of yak

由表 3 和图 4 可得,以肝脏为对照组,1 月份、4 月份、9 月份牦牛 SCD1 蛋白含量在背最长肌中的普遍高于对照组,1 月份牦牛 SCD1 基因在各个组织的蛋白含量都低于 4 月份和 9 月份,且组织间 SCD1 蛋白含量差异显著 ($P < 0.05$)。

ELISA 试验结果与荧光定量 PCR 结果基本一致,相互印证。因此,牦牛 SCD1 基因在牦牛肝脏、肾脏、结肠和背最长肌 4 个组织中均有表达。以牦牛肝脏为对照组,不同月份间,牦牛 SCD1 基因在背最长肌组织中的表达量和蛋白含量普遍最高,1 月份牦牛 4 个组织中 SCD1 基因表达量和蛋白含量都较低,不同环境会

影响 SCD1 基因表达。

3 结论与讨论

本研究发现,以牦牛肝脏为对照组,SCD1 基因在牦牛肝脏、肾脏、结肠、背最长肌 4 个组织中均有表达,且 SCD1 基因表达量和含量在背最长肌组织中最高,差异显著 ($P < 0.05$)。说明牦牛 SCD1 基因不同月份不同组织存在差异性,SCD1 基因表达虽然影响肉品质,但是其不是唯一调控肌间脂肪含量的因素。1 月份牦牛 SCD1 基因表达量和 SCD1 蛋白含量都低于 9 月份和 4 月份。青藏高原 1 月份的气候较 4 月份和 9 月份冷,草地枯黄,牦牛饲料缺乏,这可能是导致 1 月份牦牛 SCD1 基因表达较低的缘由,说明牦牛 SCD1 基因的表达可能会受到气候、饲料的影响,且在寒冷季节 SCD1 基因表达量可能会降低,同时降低了 SCD1 蛋白含量。有相关研究发现,SCD1 的表达和酶活性受生长发育时期、牛品种、营养、激素、外部环境等诸多因素的影响^[13-15],高碳水化合物饮食、胰岛素、过氧化物酶和胆固醇直接影响 SCD1 基因转录^[16]。SCD1 基因表达水平高,会导致脂肪储存和肥胖,反之,敲除 SCD1 基因,减少脂肪堆积,并使脂肪酸氧化从而保护饱和脂肪引起的肥胖^[17]。也有研究表明,SCD1 基因表达量与背最长肌的 C16:1、C18:1 和 UFA 含量呈正相关,与 MUFA 含量呈正相关,与 PUFA 含量呈负相关,该基因是肉品质评定的候选指标之一^[18]。因此进一步研究 SCD1 基因在牦牛中的表达差异以及相关转录因子对肌间脂肪共同调控机理,可以试图去揭示牦牛高蛋白、低脂肪的机理,为改善牦牛肉营养品质提供理论依据。

参考文献:

- [1] 来得财,马黎明. 青海牦牛与其他肉牛产肉性能及肉的食用品质对比分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(4): 70-71
- [2] 侯丽,柴沙驼,刘书杰,等. 青海牦牛肉与秦川牛肉氨基酸和脂肪酸的比较研究[J]. 肉类研究, 2013, 27(3): 30-36
- [3] 孙鹏飞,刘书杰,崔占鸿. 牦牛肉产量及其品质特性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(17): 169-175
- [4] 谢荣清,罗光荣,杨平贵,等. 不同年龄牦牛肉肉质测试与分析[J]. 中国草食动物, 2006(2): 58-60
- [5] Henry B, David L, Ntambi J M. Cloning and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: transcriptional activation by sterol regulatory element binding protein and repression by polyunsaturated fatty acids and cholesterol[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284(5): 1194-1198
- [6] 王立中. 奶山羊 Sed1 基因克隆及其在乳腺上皮细胞中表达的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2015

- [7] Dawei Yao, Jun Luo, Qiuya He. et al. SCD1 Alters Long-Chain Fatty Acid (LCFA) Composition and Its Expression is Directly Regulated by SREBP-1 and PPAR γ 1 in Dairy Goat Mammary Cells[J]. Journal of Cellular Physiology, 2016, 232(3): 635-649
- [8] 罗毅皓, 孙万成. 牦牛去饱和脂肪酶 1(SCD1)基因的克隆及分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(17): 237-240
- [9] Bartoň L, Kott T, Bures D, et al. The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls[J]. Meat Science, 2010, 85(1): 15-20
- [10] 李云龙, 杨章平, 王小龙, 等. SCD1 基因不同基因型的差异表达及与牛奶中脂肪酸组成的相关性[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11): 2273-2279
- [11] Yao D W, Luo J, He Q Y, et al. Liver X receptor α promotes the synthesis of monounsaturated fatty acids in goat mammary epithelial cells via the control of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 in an SREBP-1-dependent manner[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(8): 6391-6402
- [12] Liu Li, Wang Shan, Yao Ling, et al. Long-term fructose consumption prolongs hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity independent of upstream regulation in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 479(4): 643-648
- [13] Mauvoisin D, Mounier C. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression[J]. Biochimie, 2011, 93(1): 78-86
- [14] 唐慧, 王巍, 方东辉, 等. 不同品种牛 SCD1 基因表达与肌肉脂肪酸组成的关系研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(1): 1-4, 9
- [15] 武秀香. 中国南方黄牛系统地位、抗热特性及 HSP70-1、SCD1 和 DGAT1 基因的遗传效应研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2011
- [16] Caputo Mariella, De Rosa Maria Caterina, Rescigno Tania, et al. Binding of polyunsaturated fatty acids to LXR α and modulation of SREBP-1 interaction with a specific SCD1 promoter element[J]. Cell Biochemistry & Function, 2014, 32(8): 637-646
- [17] Xiang-wen Gong, Li-Han, Qin-he Yang, et al. Effects of Soothing Liver and Invigorating Spleen Recipe on Lipid Metabolism Disorders in Kupffer Cells of NAFLD Rats by LXR α /SREBP-1c Signal Pathway[J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 6(4): 297-304
- [18] 金世杰, 李香子, 高青山, 等. 延边黄牛 SREBP1 和 SCD1 基因表达的发育性变化及与肌间脂肪含量的关联分析[J]. 饲料工业, 2015, 36(3): 37-42

收稿日期: 2018-09-19

