

# 流水槽养殖与传统池塘养殖的罗非鱼 肌肉差异蛋白组学分析

高瑞昌<sup>1</sup>, 刘璐<sup>1</sup>, 马之瑞<sup>2,3</sup>, 袁丽<sup>1</sup>, 罗永巨<sup>2</sup>, 包玉龙<sup>1\*</sup>, 严欣<sup>2\*</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 南宁 530021; 3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** **目的** 利用蛋白组学技术对流水槽养殖与传统池塘养殖的罗非鱼肌肉的差异蛋白进行分析, 探讨两种养殖模式罗非鱼肉质差异的分子机制。**方法** 采用纳米液相色谱-串联质谱(Nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Nano LC-MS/MS)技术手段, 鉴定两种养殖模式罗非鱼鱼肉差异蛋白, 并进行代谢通路的分析。**结果** 在两种鱼肉中共鉴定到蛋白 3684 个, 其中共检测到差异表达的蛋白为 26 个。与传统池塘养殖的鱼肉相比, 流水槽养殖的鱼肉中磷酸化酶 b 激酶、硫氧还蛋白还原酶、腺苷酸琥珀酸酶、蛋白酶抑制剂等蛋白的表达量显著提高; 而胞质脂肪酸结合蛋白 1/2、XII 型胶原蛋白、线粒体导肽水解酶  $\beta$  等表达量则显著降低。这些差异蛋白与机体内蛋白质、脂肪的累积紧密相关, 这可能也是本研究中观察到流水槽养殖罗非鱼鱼肉具有高蛋白、低脂肪的原因之一。生物学功能显示差异蛋白主要分布在转运活性方面, 而差异蛋白功能通路的富集结果表明大多数差异蛋白与心肌的收缩、甲状腺激素合成、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、细胞内吞作用有关。**结论** 本研究得出的差异蛋白和关键代谢通路与鱼肉中蛋白质、脂肪含量密切相关, 为阐明流水槽养殖模式下罗非鱼肉质形成的机制奠定了基础, 为后续贮藏、加工方法选择提供依据。**关键词:** 流水槽养殖; 罗非鱼; 蛋白组学; 蛋白酶体; 脂肪酸结合蛋白

## Differential proteomic analysis of muscle of *Oreochromis mossambicus* between raceway system aquaculture and traditional aquaculture in ponds

GAO Rui-Chang<sup>1</sup>, LIU Lu<sup>1</sup>, MA Zhi-Rui<sup>2,3</sup>, YUAN Li<sup>1</sup>, LUO Yong-Ju<sup>2</sup>, BAO Yu-Long<sup>1\*</sup>, YAN Xin<sup>2\*</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Key Laboratory of Aquaculture Genetic and Breeding and Healthy Aquaculture of Guangxi, Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the differentially abundant muscle proteins from *Oreochromis mossambicus*

**基金项目:** 国家现代特色淡水鱼产业技术体系项目(CARS-46)、国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900601)、江苏大学高级人才科研启动基金项目(20JJDG062)

**Fund:** Supported by the National Modern Special Freshwater Fish Industry Technology System (CARS-46), the National Key Research and Development Program “Blue Granary Science and Technology Innovation” Key Special Project (2018YFD0900601), and the Senior Talent Program of Jiangsu University (20JJDG062)

\*通信作者: 包玉龙, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工。E-mail: yulong@ujs.edu.cn

严欣, 中级会计师, 主要研究方向为数据统计与分析。E-mail: 654418426@qq.com

\*Corresponding author: BAO Yu-Long, Ph.D, Professor, School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China. E-mail: yulong@ujs.edu.cn

YAN Xin, Semisenior Accountant, Guangxi Institute of Aquatic Sciences, Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Farming, Nanning 530021, China. E-mail: 654418426@qq.com

between raceway system aquaculture and traditional aquaculture in ponds by using proteomics, and explore the molecular mechanism of the difference of meat quality between 2 kinds of culture system. **Methods** Nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Nano LC-MS/MS) was used to identify the differentially abundant proteins in 2 kinds of culture system, and subsequently the differentially abundant proteins were subjected to pathway analysis. **Results** A total of 3684 proteins were identified in the two kinds of fish muscle, of which 26 proteins were differentially expressed. Compared with fish meat from traditional pond culture, the expression levels of phosphorylase b kinase, thioredoxin reductase, adenylosuccinase, proteasome inhibitor and other proteins in fish meat cultured in raceway were significantly increased. The expression levels of cytoplasmic fatty acid binding protein 1/2, XII collagen and mitochondrial peptide hydrolase  $\beta$  were significantly decreased. These differential proteins were closely related to the accumulation of protein and fat in the body. This may also be one of the reasons why *Oreochromis mossambicus* fish cultured in raceway system had high protein and low fat. Biological function annotation showed that the differentially abundant proteins were mainly distributed in transport activity. The enrichment results of differentially abundant protein functional pathways showed that most of the differential proteins were related to myocardial contraction, thyroid hormone synthesis, alanine/aspartic acid/glutamic acid metabolism, endocytosis. **Conclusion** The differentially abundant proteins and key metabolic pathways derived from this study are closely related to the protein and fat contents in fish, which lays the foundation for elucidating the mechanism of *Oreochromis mossambicus* fish muscle quality formation cultured in raceway system, and provides a basis for subsequent storage and processing method selection.

**KEY WORDS:** raceway system aquaculture; *Oreochromis mossambicus*; proteomic; proteasome; fatty acid binding protein

## 0 引言

罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)隶属鲈形目(Perciforms), 丽鱼科(Cichlidae), 原产于非洲, 具有生长快、食性广、肉质好、产量高等优点, 现已成为世界范围内重要的淡水养殖鱼类<sup>[1]</sup>。我国自 20 世纪 50 年代开始引进罗非鱼, 已经成功培育出一批深受消费者欢迎的品种<sup>[2]</sup>。由于近年来罗非鱼养殖规模日益增大, 水资源短缺、空间受限、病虫害增加等问题逐渐显现, 制约着罗非鱼产业的可持续发展<sup>[3-4]</sup>。改进罗非鱼养殖模式的任务迫在眉睫, 而流水槽养殖作为一种新兴的鱼类养殖模式, 与传统池塘养殖相比, 流水槽养殖具有水体水质好、资源利用率高、环境可控等优点<sup>[5-9]</sup>, 并且拥有更高的经济效益<sup>[10-11]</sup>。现有的研究表明通过流水养殖可有效提升鱼类肌肉食用价值和营养价值, 如李红艳等<sup>[12]</sup>通过对工厂化循环水养殖的珍珠龙胆石斑鱼进行研究, 发现其具有高蛋白、低脂肪的特点; 阮秋风等<sup>[13]</sup>利用室内微流水系统处理草鱼 0~7 d, 发现微流水处理鱼肉中呈鲜味和甜味的氨基酸和核苷酸含量累积, 呈苦味的氨基酸含量逐渐降低; 朱士臣等<sup>[14]</sup>得出结论, “跑道”养殖模式能显著改善三角鲂肌肉的基本成分组成, 且其具有较高的硬度、胶黏性和咀嚼性; FATIMA 等<sup>[15]</sup>分析了流水槽养殖对不同季节捕获的罗非鱼肌肉营养品质的影响, 结果表明流水槽养殖显著提高了鱼肉中脂肪的不饱和程

度。上述鱼肉理化特性的变化可能是因为持续的水流导致鱼类运动能力提高, 而运动可以促进肌肉的生长; 此外, 运动量增加导致代谢速率加快, 从而需要消耗更多的能量, 最终导致鱼肉脂肪含量降低<sup>[16]</sup>。流水槽养殖的罗非鱼的生长性能和肉质结构特点已经被广泛研究<sup>[17-18]</sup>, 然而运动导致鱼肉理化特性变化的分子机制尚不清晰。

基于高分辨质谱的蛋白组学可以用于研究机体在细胞代谢过程中蛋白质水平发生的变化。蛋白组学具有高通量、广覆盖等特点, 目前已有大量的研究利用蛋白组学分析对肌肉品质形成有关键作用的蛋白质<sup>[19-22]</sup>。物种鉴别方面, 张九凯等<sup>[23]</sup>利用鸟枪蛋白组学与质谱多反应监测技术对三文鱼物种进行鉴别研究, 最终共筛选出 7 条特征肽段, 包括大西洋鲑中的 4 条特征肽段, 大马哈鱼中的 1 条特征肽段, 虹鳟中的 2 条特征肽段, 成功建立了不同种类三文鱼的物种精准定性鉴别方法; 水产品方面, FENG 等<sup>[24]</sup>选取国内 5 个主要海参产地进行海参体壁蛋白组学分析, 结果表明在 5 个产地海参共发现 2266 个差异蛋白, 而这些差异蛋白与海水温度和饲料组成等有关; 鱼类养殖方面, 翁丽萍等<sup>[25]</sup>比较了普通网箱与深水网箱养殖大黄鱼的蛋白组, 发现两种模式下鱼肉中主要的差异表达蛋白为热休克蛋白、伴侣蛋白、球蛋白及胶原蛋白, 并推测与环境温度紧密相关。蛋白组学技术的发展让人们更加清晰地了解水产品中蛋白质组成及变化规律, 更好地解决人类实际生产问题<sup>[26]</sup>。

因此, 本研究基于蛋白组学技术, 对流水槽养殖与传统池塘养殖的罗非鱼肉质差异的分子机制进行探究, 以期揭示流水槽养殖模式导致鱼肉的理化性质发生变化的分子机制, 为后续贮藏、加工方法的选择提供依据, 对罗非鱼产业的可持续发展具有深远意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

实验用罗非鱼鱼苗投放规格为(123.5±4.3) g。实验场所位于国家级广西南宁罗非鱼良种场, 池塘内循环水养殖系统面积约为 20 亩, 养殖区由规格为 22 m×5 m×1.2 m 三条流水槽组成; 传统池塘养殖使用面积约为 10 亩。实验采用粗蛋白为 32%、粗脂肪为 6%的浮性颗粒饲料, 每天在上午 8 点以及下午 5 点各投喂一次。实验期间不换水, 仅适当添补损失的水体, 流水槽推水增氧系统保持 24 h 不断, 并根据养殖环境需求, 适时开启增氧机。每日定时进行巡塘, 确保养殖设备运行完好和鱼类活动摄食情况良好。实验养殖用时 71 d(期间流水槽的温度变化: 20~30℃), 于最后一天进行采样。采集传统池塘与流水槽养殖的罗非鱼背部肌肉各 1 g 左右置于塑料离心管(ependorf, EP)管中, 设置 3 个生物学重复, 液氮速冻之后-80℃保存。

丙酮、甲酸(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙腈(质谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司); 胰蛋白酶(10000 U/mg, 测序级, 美国 Promega 公司); RIPA (radio immunoprecipitation assay) Lysis Buffer 裂解液、Pierce BCA 蛋白测定试剂盒、50%羟胺溶液、碘乙酰胺、三(2-羧乙基)膦[Tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP]、四乙基溴化铵(tetraethyl ammonium bromide, TEAB)、Pierce™肽段分级试剂盒、串联质量标签(tandem mass tag, TMT)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

### 1.2 仪器与设备

Sartorius BP211d 分析千分之一天平(瑞士 Sartorius 公司); Concentrator plus 真空离心浓缩仪(德国 Eppendorf 公司); Microfuge 22R Centrifuge 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); MX-S 涡旋仪、D1008 掌上离心机(美国 Scilogex 公司); BPH-9042 恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); Easy-nLC1200 毛细管高效液相色谱仪、Orbitrap Eclipse 电喷雾-组合适型离子阱 Orbitrap 质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 色谱柱: Acclaim PepMap RPLC C<sub>18</sub> (150 μm×150 mm, 1.9 μm, 100 Å)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

### 1.3 粗蛋白和粗脂肪含量测定

各组取 10 尾罗非鱼背部肌肉组织混匀放入干冰中暂存, 后-80℃保存。取 250 g 罗非鱼背部肌肉均匀剪碎, 用

于测定粗蛋白和粗脂肪的含量。粗蛋白采用凯氏定氮法测定(GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》), 粗脂肪采用索氏提取法测定(GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》)。

### 1.4 蛋白质提取和定量

取 40 mg 背部肌肉组织, 加入 400~500 μL RIPA Lysis Buffer 裂解液于玻璃匀浆器研磨至糜状, 4℃超声裂解 40 min。裂解后的混合物在低温下离心(4℃, 10000×g) 10 min, 将中层清液转移至预冷的 1.5 mL EP 管中备用。按照蛋白质定量(bicinchoninic acid assay, BCA)试剂盒的说明测定清液中蛋白质的浓度。

### 1.5 蛋白质酶解

根据上述蛋白质的浓度, 将 25 μg 蛋白样品转移到新的 EP 管中, 并用 100 mmol/L TEAB 调整至最终体积为 25 μL; 加入 1.5 μL 200 mmol/L TCEP, 55℃孵育 1 h, 再向样品中加入 1.5 μL 375 mmol/L 碘乙酰胺, 并在室温下避光孵育 30 min; 加入约 150 μL 预冷的(-20℃)丙酮并在-20℃下过夜沉淀蛋白质, 之后在 4℃下以 8000×g 离心 10 min, 倒出丙酮, 保留白色沉淀, 干燥 2~3 min; 用 25 μL 50 mmol/L TEAB 重溶蛋白质沉淀。加入 0.5 μg 胰蛋白酶, 在 37℃下酶切样品过夜。将 20 μL TMT 标记试剂加入到酶切好的蛋白溶液中, 室温孵育 1 h。孵育结束后加入 1 μL 5%羟胺以淬灭反应。在新的微量离心管中等量混合上述处理好的样品, 并储存于-80℃备用。TMT 标记的肽段混合物经 Pierce™肽段分级试剂盒分级之后进行纳米液相色谱-串联质谱技术(Nano liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Nano LC-MS/MS)分析。

### 1.6 NanoLC-MS/MS 分析

主要参数设置为: 色谱柱: Acclaim PepMap RPLC C<sub>18</sub> (150 μm×150 mm, 1.9 μm, 100 Å); 流动相 A 为 0.1%甲酸, 流动相 B 为 0.1%甲酸, 80%乙腈, 流速 300 nL/min, 流动相混合条件为: 0~5 min, 4%~10% B; 5~85 min, 10%~22% B; 85~110 min, 22%~40% B; 110~111 min, 40%~95% B; 111~120 min, 95% B。肽段通过纳电喷雾电离源离子化后进入到串联质谱仪进行数据相关采集(data dependent acquisition, DDA)模式检测。离子源电压为 1.9 kV; 一级质谱扫描范围 350~1500 m/z; 分辨率为 60000; 二级质谱起始 m/z 固定为 100; 分辨率 30000。二级碎裂的母离子筛选条件为: 峰强度超过 20000 的前 20 的母离子, 电荷 2+到 6+, 碎片离子在 Orbitrap 中进行检测。自动发电控制(automatic generation control, AGC)设置为: 一级 4e<sup>5</sup>, 二级 25e<sup>4</sup>。

### 1.7 生物信息学分析

质谱原始文件经 Proteome Discoverer 2.5 软件检索, 检索参数如表 1 所示。流水槽组: 池塘组满足差异倍数(fold changes, FC) [FC>2 或 FC<0.5、P<0.05、特异性肽段数

(unique peptides)  $\geq 2$ ] 的定量蛋白质为差异蛋白。火山图利用 Graphpad Prism 绘制, 差异蛋白的生物学功能(gene ontology, GO)分析利用 <http://www.geneontology.org> 进行。

表 1 Proteome Discoverer 软件搜索鉴定蛋白质的参数  
Table 1 Parameters of Proteome Discoverer software used to search and identify proteins

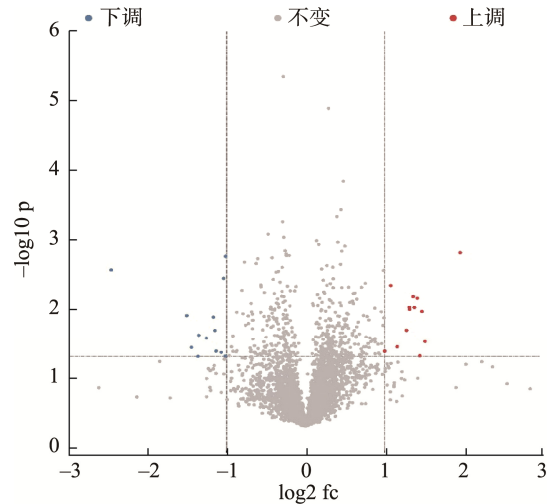
参数	名称
固定修饰	甲酰胺(C)
可变修饰	氧化(M)
酶	胰蛋白酶
遗漏酶切位点	2
一级质谱误差	百万分之 20
二级质谱误差	百万分之 20
肽段/碎片离子质量数	单同位素
显著性阈值	0.05

## 2 结果与分析

### 2.1 流水槽养殖与传统池塘养殖的罗非鱼肌肉中差异表达蛋白分析结果

与传统池塘养殖相比, 流水槽养殖模式下的鱼类肉质具有高蛋白低脂肪的特点。董立学等<sup>[16]</sup>比较了流水槽模式与传统池塘养殖模式下斑点叉尾鲷背部、腹部以及尾部的肉质特性, 发现流水槽组尾部鱼肉蛋白质含量显著高于传统池塘养殖组, 而尾部及背部的脂肪含量则显著低于池塘养殖组。冯德品等<sup>[27]</sup>在比较微流水与网箱养殖的齐口裂腹鱼肉质的研究中也发现微流水模式使得鱼肉蛋白含量更高而脂肪含量降低。与前人研究相一致, 本研究测得流水槽养殖模式下罗非鱼鱼肉蛋白约为 20.5%, 而脂肪含量仅为 2% 左右; 而传统池塘养殖组鱼肉蛋白含量为 19.1% 左右, 但脂肪含量却高达 3% 左右。动物性水产品化学组成与其养殖环境紧密相关, 环境的差异可能会导致机体内发生一系列代谢活动的变化从而会影响其化学组成和食用品质<sup>[28]</sup>, 而基因组学、蛋白组学、代谢组学等技术为全面解析机体内的变化提供了新的思路。

本研究利用 TMT 标记蛋白组学的手段共鉴定到 3684 个蛋白, 实验将筛选差异蛋白的条件设置为: 含有大于等于两个特异性片段, 并且在两种养殖模式的罗非鱼肌肉中检出量相差 2 倍以上, 可能性(probability,  $P$ ) $<0.05$ 。基于以上筛选条件, 共鉴定出 26 个差异蛋白(图 1), 其中 13 个蛋白在流水槽养殖的罗非鱼肌肉中表达量高于传统池塘养殖组, 主要包括磷酸化酶 b 激酶、硫氧还蛋白还原酶、腺苷酸琥珀酸酶、输入蛋白、还原型辅酶(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)脱氢酶(辅酶 Q)黄素蛋白 1、蛋白酶体抑制剂等; 而另外 13 个表达量则低于传统池塘组, 主要包括胞质脂肪酸结合蛋白 1/2、XII 型胶原蛋白、转铁蛋白受体、线粒体导肽水解酶  $\beta$  等(表 2)。



注: 红色数据点表示流水槽组表达量高的蛋白, 蓝色数据点表示流水槽组表达量低的蛋白。

图 1 流水槽养殖与传统池塘养殖的罗非鱼肌肉蛋白组比较的火山图

Fig. 1 Volcano plot of muscle proteome extracted from *Oreochromis mossambicus* between raceway system aquaculture and traditional aquaculture in ponds

表 2 流水槽养殖与传统池塘养殖的罗非鱼肌肉中差异表达蛋白  
Table 2 Differentially expressed proteins in muscle of *Oreochromis mossambicus* between raceway system aquaculture and traditional aquaculture in ponds

数据库编号	蛋白名称	倍数*	P
A0A669DWU0	胞质脂肪酸结合蛋白 1	0.18	0.00
I3JRB7	胞质脂肪酸结合蛋白 2	0.35	0.01
A0A669BN04	未表征的蛋白质	0.37	0.04
A0A669F525	未表征的蛋白质	0.39	0.05
A0A669BGH9	XII 型胶原蛋白	0.39	0.02
A0A669BZK8	含基质蛋白型的蛋白质	0.42	0.03
A0A669E7B3	未表征的蛋白质	0.45	0.01
A0A669EL96	转铁蛋白受体	0.45	0.02
A0A669DNQ7	含 Ig 的蛋白质	0.46	0.04
A0A669D7T6	线粒体导肽水解酶 $\beta$	0.48	0.04
I3JLP0	醛缩酶_II 蛋白质	0.49	0.00
I3KSX8	FGF 信号调节器 2 蛋白质	0.49	0.05
A0A669EQG1	T-复合物蛋白 1	0.50	0.00
A0A669C046	未表征的蛋白质	2.00	0.04
A0A669CWS3	未表征的蛋白质	2.11	0.00
I3JCK5	蛋白酶体抑制剂	2.23	0.04
I3KAA4	羧甲基丁烯醇酶	2.42	0.02
A0A223SEE0	凝集素 3d 型蛋白质	2.49	0.01
A0A669DRE5	含 4F5 的蛋白质	2.49	0.01
A0A669EIR3	NADH 脱氢酶(辅酶 Q) 黄素蛋白 1	2.57	0.01
A0A669B125	未表征的蛋白质	2.59	0.01
A0A669D114	输入蛋白	2.66	0.01
I3JPG7	腺苷酸琥珀酸酶	2.72	0.05
A0A669DJL7	硫氧还蛋白还原酶	2.77	0.01
A0A669DU53	未表征的蛋白质	2.85	0.03
A0A669ES59	磷酸化酶 b 激酶	3.88	0.00

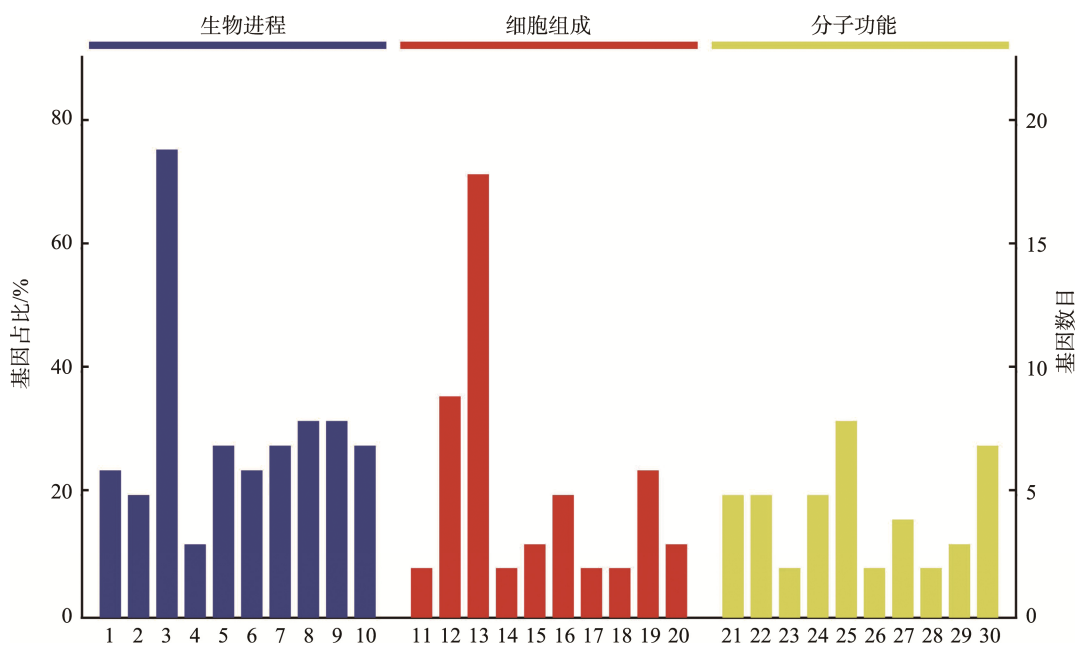
注: \*表示流水槽养殖组鱼肉中该蛋白表达量与传统池塘养殖的罗非鱼对应蛋白相比。

## 2.2 流水槽养殖与传统池塘养殖的罗非鱼肌肉的差异分子机制分析

前述差异表达的蛋白中, 蛋白酶体抑制剂(流水槽养殖: 池塘养殖=2.23:1)在流水槽养殖的罗非鱼肌肉中表达量高于传统池塘组。蛋白酶体广泛分布于骨骼肌中, 具有多重蛋白酶的活性, 可以在细胞质和细胞核中降解蛋白<sup>[29]</sup>。有研究表明, 蛋白酶体引起的蛋白降解可以导致肌肉含量的下降<sup>[30]</sup>。而蛋白酶体抑制剂表达量的增高, 可以导致蛋白质降解减弱, 体内蛋白质合成代谢与分解代谢的平衡打破, 造成更多的蛋白质积累, 这与本研究中蛋白质含量测定的结果相符合。在胶原蛋白方面, 鉴定到 XII 型胶原蛋白(流水槽养殖: 池塘养殖=0.39:1)在流水槽组肌肉中含量较低。胶原蛋白是构成细胞外基质的重要组成部分, XII 型胶原蛋白结构较为特殊, 具有较短的三螺旋结构而非螺旋的区域较长, 可以参与细胞外基质结缔组织的调控<sup>[31]</sup>。由于肌肉增长往往有赖于肌肉外围结缔组织的降解和再生, 因此推测流水槽组较少的 XII 型胶原蛋白, 弱化了肌肉外的结缔组织, 为肌肉快速生长创造了有利条件。脂肪酸结合蛋白主要结合细胞内游离的脂肪酸, 并将其输送到线粒体、细胞核等细胞器, 进而调控甘油三酯及磷脂合成。鱼体中脂肪酸结合蛋白参与脂代谢反应, 与脂肪性态密切相关, 对鱼肉中脂肪的沉积具有重要的调控作用<sup>[32]</sup>。流水槽养殖的罗非鱼肌肉中脂肪酸结合

蛋白(胞质脂肪酸结合蛋白 1, 流水槽养殖: 池塘养殖=0.18:1; 胞质脂肪酸结合蛋白 2, 流水槽养殖: 池塘养殖=0.35:1)的含量低于传统池塘组, 可能与传统池塘组鱼肉中脂肪含量较高有关。其他的一些差异蛋白主要是参与代谢过程调控的酶类(磷酸化酶 b 激酶、腺苷酸琥珀酸酶、线粒体导肽水解酶 $\beta$ )和机体内转运途径的蛋白(输入蛋白、转铁蛋白受体等)。两大类型的蛋白通过改变能量代谢和物质运输最终都可能影响鱼肉中蛋白和脂肪的含量<sup>[28,33-34]</sup>。

基因本体主要涵盖 3 个方面的功能: 生物进程、细胞组成、分子功能。为了进一步探索上述差异蛋白的来源及生物学功能, 对鉴定的差异蛋白进行了 GO 注释分析。差异蛋白的 GO 注释如图 2 所示, 在生物进程类目中, 差异蛋白主要集中在响应化学刺激、胞吞作用以及蛋白聚集体的组装; 在细胞组成类目中, 差异蛋白主要分布在细胞质以及膜蛋白; 在分子功能类目中, 差异蛋白主要分布在转运活性方面。基因组百科全书(kyoto encyclopaedia of genes and genomes, KEGG)通路分析(图 3)表明大多数差异蛋白与心肌的收缩、甲状腺激素合成、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、细胞内吞作用有关。其中心肌的收缩可以通过改变供血情况改变营养状况而影响肌肉生长, 甲状腺激素的分泌也可以通过生长因子促进肌肉生长<sup>[35]</sup>, 而丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢则直接与蛋白质降解及合成相关。



注: 1. 内吞作用的正调控; 2. 蛋白成熟调节; 3. 化学物质的响应; 4. 低密度脂蛋白受体颗粒代谢过程; 5. 蛋白质成熟; 6. 内吞调节; 7. 对氧气水平降低的反应; 8. 细胞蛋白质复合体组装; 9. 内吞作用; 10. 对氧水平降低的反应; 11. 免疫球蛋白复合物; 12. 膜蛋白复合物; 13. 胞质溶胶; 14. 内容酶体膜; 15. 质膜外侧; 16. 网格蛋白包衣; 17. 免疫球蛋白复合物; 18. 内容酶体; 19. 突触后; 20. 黑素小体; 21. 蛋白质转运体活性; 22. 肽转运体活性; 23. NAD(P)H 氧化酶活性; 24. 肽结合; 25. 转运体活性; 26. 氧化还原酶活性; 27. 钙调蛋白结合; 28. 寡肽结合; 29. 运载受体活性; 30. 基质特异性转运蛋白活性。

图 2 流水槽养殖与传统池塘养殖罗非鱼肌肉差异表达蛋白的 GO 注释图

Fig.2 GO annotation map of differentially expressed proteins in muscle of *Oreochromis mossambicus* between raceway system aquaculture and traditional aquaculture in ponds



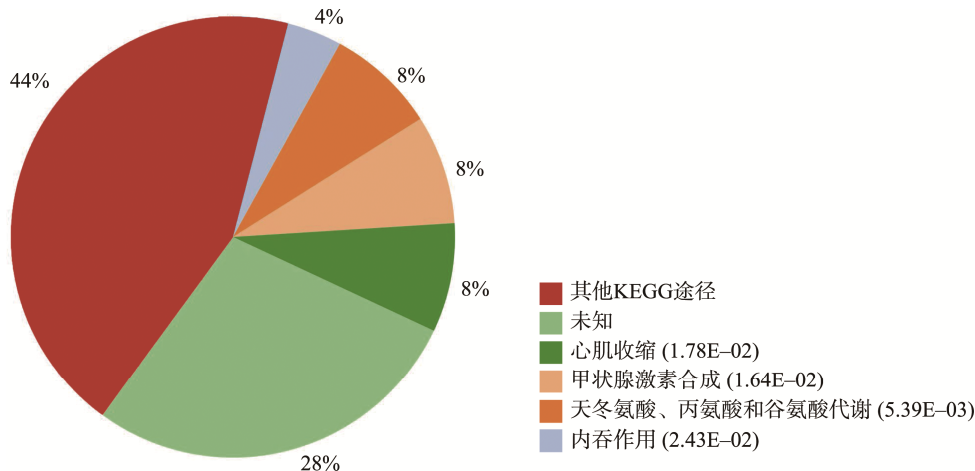


图 3 流水槽养殖与传统池塘养殖罗非鱼肌肉差异表达蛋白间的 KEGG 通路分析

Fig.3 KEGG pathway analysis of differentially expressed proteins in muscle of *Oreochromis mossambicus* between raceway system aquaculture and traditional aquaculture in ponds

### 3 结 论

采用 TMT 标记蛋白组学的技术对传统池塘养殖和流水槽养殖的罗非鱼背部肌肉差异蛋白进行了鉴定和比较,结果显示,与传统池塘养殖相比,流水槽养殖的罗非鱼背部肌肉中含量较高的蛋白包括磷酸化酶 b 激酶、硫氧还蛋白还原酶、腺苷酸琥珀酸酶、输入蛋白、NADH 脱氢酶(辅酶 Q)黄素蛋白 1、蛋白酶抑制剂等;而流水槽组含量较少的蛋白包括胞质脂肪酸结合蛋白 1/2、XII 型胶原蛋白、转铁蛋白受体、线粒体导肽水解酶  $\beta$  等。这些差异蛋白大多与心肌的收缩、甲状腺激素合成、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、细胞内吞作用有关。本研究得出的差异蛋白和关键代谢通路与鱼肉中蛋白和脂肪含量密切相关,为阐明流水槽养殖模式下罗非鱼鱼肉品质形成机制奠定了基础,对后续贮藏与加工模式选择提供依据。上述差异蛋白和代谢通路是通过生物信息学手段分析获得的,仍然有待进一步的实验验证。此外,蛋白质的翻译后修饰也可能调控鱼体内一系列的代谢活动,可以借助磷酸化蛋白组学、糖基化蛋白组学等手段进一步分析两种养殖模式下肌肉蛋白质的差异情况。

### 参考文献

- [1] 杨亚琨, 刘永杰, 董雨豪. 多重聚合酶链式反应技术检测罗非鱼 5 种常见食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 168–174.  
YANG YK, LIU YJ, DONG YH. Determination of 5 kinds of common foodborne pathogens in *Oreochromis niloticus* by multiplex polymerase chain reaction technology [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(2): 168–174.
- [2] 胡俊康. 罗非鱼养殖现状与健康管理——访中国水产科学研究院珠江水产研究所王广军研究员[J]. 广东饲料, 2021, 30(3): 8–10.  
HU JK. Current status and health management of tilapia farming——interview with researcher Wang Guangjun pearl river fisheries research institute, Chinese Academy of Fishery Sciences [J]. Guangdong Feed, 2021, 30(3): 8–10.
- [3] 王世表, 宋泽, 黄磊. 中国罗非鱼产业现状、存在问题和发展对策[J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(5): 27–31.  
WANG SB, SONG Y, HUANG L. The status, problems and development countermeasures of Chinese tilapia industry [J]. Chin Fish Qual Stand, 2016, 6(5): 27–31.
- [4] 苗卫卫, 江敏. 我国水产养殖对环境的影响及其可持续发展[J]. 农业环境科学学报, 2007, (S1): 319–323.  
MIAO WW, JIANG M. Environmental impacts and sustainable development of aquaculture in China [J]. J Agro-Environ Sci, 2007, (S1): 319–323.
- [5] 刘梅, 宓国强, 郭建林, 等. 池塘内循环流水养殖模式对黄颡鱼生长性能、形体指标、血清生化指标及肌肉营养成分的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(4): 1704–1717.  
LIU M, MI GQ, GUO JL, et al. Effects of internal-circulation pond aquaculture model on growth performance, morphological indices, serum biochemical indices and muscle nutritional components of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Chin J Anim Nutr, 2019, 31(4): 1704–1717.
- [6] 阴晴朗, 郭忠宝, 肖俊, 等. 池塘循环水槽养殖模式下吉富罗非鱼的生长及生理响应变化[J]. 水产学报, 2020, 44(7): 1065–1074.  
YIN QL, GUO ZB, XIAO J, et al. Changes of growth and physiological response of genetic improvement of farmed tilapia (GIFT) under pond circulation flume culture [J]. J Fish China, 2020, 44(7): 1065–1074.
- [7] 刘邦辉, 方彰胜, 王广军, 等. 罗非鱼精养池塘陆基微循环工厂化生态养殖技术研究[J]. 广东农业科学, 2016, 43(2): 144–149.  
LIU BH, FANG ZS, WANG GJ, et al. Study on terrestrial industrial microcirculatory technology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in

- intensive pond [J]. *Guangdong Agric*, 2016, 43(2): 144–149.
- [8] 阴晴朗, 罗永巨, 郭忠宝, 等. 罗非鱼池塘循环水槽养殖初探[J]. *渔业现代化*, 2018, 45(4): 15–20.
- YIN QL, LUO YJ, GUO ZB, *et al.* Preliminary study on culture of tilapia in circulating flow water tank of pond [J]. *Fish Mod*, 2018, 45(4): 15–20.
- [9] 马立鸣, 赵睿, 范毛毛, 等. 新型池塘循环流水养殖模式初探[J]. *中国水产*, 2016, (1): 78–83.
- MA LM, ZHAO R, FAN MM, *et al.* A preliminary study on a new model of recirculating aquaculture in ponds [J]. *China Fish*, 2016, (1): 78–83.
- [10] 郭忠宝, 吴铁军, 肖俊, 等. 罗非鱼标准化池塘高效生态养殖试验[J]. *科学养鱼*, 2014, (3): 18–19.
- GUO ZB, WU TJ, XIAO J, *et al.* Experiment on efficient ecological culture of tilapia in standardized ponds [J]. *Sci Fish Farm*, 2014, (3): 18–19.
- [11] 卢咏梅, 艾健, 杨军, 等. 池塘工程化循环水养殖加州鲈试验[J]. *水产养殖*, 2019, 40(7): 43–48.
- LU YM, AI J, YANG J, *et al.* Experimental study on California perch in ponds engineered recirculating aquaculture [J]. *J Aquac*, 2019, 40(7): 43–48.
- [12] 李红艳, 刘天红, 姜晓东, 等. 工厂化循环水养殖珍珠龙胆石斑鱼营养成分、食用安全性和质构特性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(12): 4083–4090.
- LI HY, LIU TH, JIANG XD, *et al.* Analysis of nutritional components, food safety and texture characteristics of pearl gentian grouper cultured in industrial circulating water [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(12): 4083–4090.
- [13] 阮秋凤, 安玥琦, 陈周, 等. 短时间微流水处理对草鱼鱼肉风味品质的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2021, 39(3): 30–42.
- RUAN QF, AN YQ, CHEN Z, *et al.* Effect of short-time micro-flow water treatment on flavor quality of grass carp fish meat [J]. *J Food Sci Technol*, 2021, 39(3): 30–42.
- [14] 朱士臣, 冯媛, 彭建, 等. 池塘内循环水“跑道”系统与传统池塘养殖的三角鲂营养品质对比研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(3): 1057–1065.
- ZHU SC, FENG Y, PENG J, *et al.* Comparison on nutrition quality of *Megalobrama terminalis* cultivated based on in-pond “raceway” aquaculture system and traditional pond system [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(3): 1057–1065.
- [15] FATIMA S, KOMAL W, MANZOOR F, *et al.* Analysis of the growth performance, stress, profile of fatty acids and amino acids and cortisol in tilapia (*Oreochromis niloticus*), cultured at high stocking density using in-pond raceway system [J]. *Saud J Biol Sci*, 2021, 28(12): 7422–7431.
- [16] 董立学, 喻亚丽, 毛涛, 等. 池塘内循环流水养殖斑点叉尾鲷肌肉品质的分析[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(7): 914–924.
- DONG LX, YU YL, MAO T, *et al.* Analysis of muscle quality of spotted forktail catfish cultured in pond circulation stream [J]. *J Fish Sci China*, 2021, 28(7): 914–924.
- [17] 李星星, 刘贤敏, 冷向军. 盐度对淡水鱼生长, 代谢和肉质的影响[J]. *养殖与饲料*, 2008, (10): 47–50.
- LI XX, LIU XM, LENG XJ. Effects of salinity on growth, metabolism and meat quality of freshwater fish [J]. *Anim Breed Feed*, 2008, (10): 47–50.
- [18] 程亚美, 赵金良, 唐首杰. 盐碱水和淡水养殖模式下尼罗罗非鱼肌肉品质比较[J]. *河南农业科学*, 2019, 48(4): 125.
- CHENG YM, ZHAO JL, TANG SJ. Comparison on meat quality of Nile tilapia cultured in saline-alkaline water and freshwater culture modes [J]. *J Henan Agric Sci*, 2019, 48(4): 125.
- [19] PURSLOW PP, GAGAOUA M, WARNER RD. Insights on meat quality from combining traditional studies and proteomics [J]. *Meat Sci*, 2021, 174: 108423.
- [20] 梁荣蓉, 许宝琛, 张一敏, 等. 蛋白质组学在生鲜肉肉色变化机制研究中的应用[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(16): 283–292.
- LIANG RR, XU BC, ZHANG YM, *et al.* Application of proteomics in mechanism research of fresh meat color changes [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2020, 36(16): 283–292.
- [21] 杨波若, 李华健, 苏娅宁, 等. 基于微观结构和蛋白质组学分析影响猪肉持水性的差异蛋白[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(7): 136–144.
- YANG BR, LI HJ, SU YN, *et al.* Analysis of different proteins affecting water holding capacity of pork based on microstructure and proteomics [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2021, 42(7): 136–144.
- [22] LÓPEZ-PEDROUSO M, LORENZO JM, STASIO L, *et al.* Quantitative proteomic analysis of beef tenderness of *Piemontese* young bulls by SWATH-MS [J]. *Food Chem*, 2021, 356(2): 129711.
- [23] 张九凯, 马聪聪, 邢冉冉, 等. 基于鸟枪蛋白组学与质谱多反应监测技术的三文鱼物种鉴别研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(16): 5271–5278.
- ZHANG JK, MA CC, XING RR, *et al.* Authentication of salmon species based on shotgun proteomics and mass spectrometry multiple reaction monitoring techniques [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(16): 5271–5278.
- [24] FENG J, ZHANG L, XIA X, *et al.* Effect of geographic variation on the proteome of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. *Food Res Int*, 2020, 136: 109498.
- [25] 翁丽萍, 张乐, 刘军波, 等. 不同养殖模式大黄鱼非标记定量差异蛋白组学分析[J]. *食品科学*, 2023, 44(8): 137–142.
- WENG LP, ZHANG L, LIU JB, *et al.* Label-free quantitative differential proteomic analysis of large yellow croaker culture under different aquaculture modes [J]. *Food Sci*, 2023, 44(8): 137–142.
- [26] 杨明畅, 马俪珍, 李来好, 等. 蛋白质免疫印迹技术在水产品中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(20): 7914–7919.
- YANG MC, MA LZ, LI LH, *et al.* Application of western blotting in aquatic products [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(20): 7914–7919.
- [27] 冯德品, 董舰峰, 张金平, 等. 网箱与微流水养殖的齐口裂腹鱼肌肉营养成分的比较与分析[J]. *水产学杂志*, 2017, 30(4): 17–22.

- FENG DP, DONG JF, ZHANG JP, *et al.* Comparison and quality evaluation of nutritive composition in muscle of *Schizothorax prenanti* reared in cages and flowing water [J]. *Chin J Fish*, 2017, 30(4): 17–22.
- [28] FLORINI JR, EWTON DZ, COOLICAN SA. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis [J]. *Endocr Rev*, 1996, 17(5): 481–517.
- [29] KEMP CM, SENSKY PL, BARDSLEY RG, *et al.* Tenderness-An enzymatic view [J]. *Meat Sci*, 2010, 84(2): 248–256.
- [30] KRAWIEC BJ, FROST RA, VARY TC, *et al.* Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis [J]. *Am J Physiol-Endoc*, 2005, 289(6): E969.
- [31] ZOU Y, ZWOLANEK D, HU Y, *et al.* Collagen type XII: A new congenital matrix and muscle disease [J]. *Neuromuscul Disord*, 2013, 23(9–10): 739–740.
- [32] 隋修磊, 张玉茹. 鱼类脂肪酸结合蛋白研究进展[J]. *水产科学*, 2019, 38(4): 563–574.
- SUI XL, ZHANG YR. Research progress on fish fatty acid binding proteins [J]. *Fish Sci*, 2019, 38(4): 563–574.
- [33] FAUCONNEAU B, ALAMI-DURANTE H, LAROCHE M, *et al.* Growth and meat quality relations in carp [J]. *Aquaculture*, 1995, 129(1–4): 265–297
- [34] MATARNEH SK, SILVA SL, GERRARD DE. New insights in muscle biology that alter meat quality [J]. *Annu Rev Anim Biol*, 2021, 9(1): 355–377.
- [35] KIEDDING A, RUOHONEN K, BJØRNEVIK M. Muscle fibre growth and quality in fish [J]. *Arch Tierz Dummerstorf*, 2006, 49: 137–146.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

## 作者简介



高瑞昌, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工。

E-mail: Xiyuan2008@ujs.edu.cn



包玉龙, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工

E-mail: yulong@ujs.edu.cn

严欣, 中级会计师, 主要研究方向为数据统计与分析。

E-mail: 654418426@qq.com