

曾建红,郑玉才,李丛艳,等. 蜀兴1号肉兔与伊拉兔肉质差异的分子机制[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(9):1689-1700.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.09.013

蜀兴1号肉兔与伊拉兔肉质差异的分子机制

曾建红^{1,2}, 郑玉才², 李丛艳^{1,3}, 郭志强^{1,3}, 杨锐^{1,3}, 郑洁^{1,3}, 李钰莹^{1,3},
任永军^{1,3}, 雷岷^{1,3}, 谢晓红^{1,3}, 邝良德^{1,3}

(1.四川省畜牧科学研究院,四川 成都 610066; 2.西南民族大学畜牧兽医学院,四川 成都 610041; 3.动物遗传育种四川省重点实验室,四川 成都 610066)

摘要: 为明确蜀兴1号肉兔(SX)与伊拉兔(IRA)肉质差异及差异形成分子机制,本研究通过采集2个品种兔背最长肌样品,进行肉质性状测定及转录组测序和代谢组分析,筛选差异表达基因和差异代谢物并进行功能富集分析。结果表明,蜀兴1号肉兔的肌纤维直径和滴水损失率显著低于伊拉兔,而肌纤维密度、熟肉率和肌肉脂肪含量显著高于伊拉兔。蜀兴1号肉兔与伊拉兔转录组中共筛选出81个差异表达基因,其中蜀兴1号肉兔中51个基因上调,30个基因下调。*SMTNL1*、*PM20D2*和*EDN1*等可能是导致两种兔肉品质差异的基因。差异表达基因显著富集于cAMP信号传导途径。挥发性代谢组学比较共得到12种差异显著代谢物,均在蜀兴1号肉兔中上调,其中,2-十一烯醛、4-乙基辛酸、(E)-2-壬烯醛、鸟氨酸和十一醛等代谢物与肉质风味正相关,挥发性代谢物显著富集于2-氧代羧酸代谢、ABC转运蛋白和精氨酸生物合成等KEGG代谢通路。广泛靶向代谢组学比较分析共得到15种差异显著代谢物,其中蜀兴1号肉兔中7种代谢物上调,8种下调,2个品种兔肉中 γ -L-谷氨酸-L-谷氨酰胺、L-谷氨酸-L-谷氨酰胺和溶血磷脂酰胆碱(LPC)等肉质风味相关物质的含量差异较大,广泛靶向代谢物显著富集于咖啡因代谢和昼夜节律夹带等KEGG代谢通路。本研究得到的差异表达基因和差异代谢物可为进一步的优质兔养殖和优质兔选育提供参考依据。

关键词: 转录组学; 代谢组学; 蜀兴1号肉兔; 伊拉兔; 肉质

中图分类号: S829.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)09-1689-12

Molecular mechanism of transcriptomic and metabolomic differences between the longissimus dorsi muscle of Shuxing No.1 rabbit and Ira rabbit

ZENG Jianhong^{1,2}, ZHENG Yucai², LI Congyan^{1,3}, GUO Zhiqiang^{1,3}, YANG Rui^{1,3}, ZHENG Jie^{1,3},
LI Yuying^{1,3}, REN Yongjun^{1,3}, LEI Min^{1,3}, XIE Xiaohong^{1,3}, KUANG Liangde^{1,3}

(1.Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China; 2.College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China; 3.Animal Genetics and Breeding Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610066, China)

Abstract: In order to clarify the difference of meat quality between Shuxing No.1 rabbit (SX) and Ira rabbit (IRA)

收稿日期:2023-09-18

基金项目:国家兔产业技术体系项目(CARS-43-D-1);四川省财政厅运行专项(SASA2024CZYX004);四川省“十四五”育种攻关项目(2021YFYZ0033);四川省科研院所科技成果转化项目(2023N22J0001)

作者简介:曾建红(1998-),女,四川绵阳人,硕士,主要从事家兔繁殖与饲养管理。(E-mail)1762725547@qq.com

通讯作者:邝良德,(E-mail)215640832@qq.com

and the molecular mechanism of the difference formation, the longissimus dorsi muscle samples of two varieties of rabbits were collected for meat quality trait determination, transcriptome sequencing and metabolomics analysis, and differentially expressed genes and differentially expressed metabolites were screened and their functional enrichment analysis was performed. The results showed that the muscle fiber diameter and drip loss rate of SX were significantly

lower than those of IRA, while the muscle fiber density, cooked meat rate and intramuscular fat content were significantly higher than those of IRA. A total of 81 differentially expressed genes were screened in the transcriptome of SX and IRA. Among them, 51 genes were up-regulated and 30 genes were down-regulated in SX. *SMTNLI*, *PM20D2* and *EDN1* might be the genes that lead to the difference in meat quality between SX and IRA. The differentially expressed genes were significantly enriched in the cAMP signaling pathway. A total of 12 significantly different metabolites were obtained by volatile metabolomics comparison, all of which were up-regulated in SX. Among them, metabolites such as 2-undecenal, 4-ethyl-octanoic acid, (*E*)-2-nonenal, ornithine and undecanal were positively correlated with meat flavor. The volatile metabolites were significantly enriched in KEGG metabolic pathways such as 2-oxocarboxylic acid metabolism, ABC transporter and arginine biosynthesis. A total of 15 significantly different metabolites were obtained by extensive targeted metabolomics comparative analysis. Among them, seven metabolites were up-regulated and eight metabolites were down-regulated in SX. The contents of meat flavor-related substances such as γ -*L*-glutamic acid-*L*-glutamine, *L*-glutamic acid-*L*-glutamine and lysophosphatidylcholine (LPC) in SX and IRA were significantly different. Widely targeted metabolites were significantly enriched in KEGG metabolic pathways such as caffeine metabolism and circadian rhythm entrainment. The differentially expressed genes and differential metabolites obtained in this study can provide a reference for further high-quality rabbit breeding.

Key words: transcriptomics; metabolomics; Shuxing No.1 rabbit; Ira rabbit; meat quality

中国是世界上第一肉兔养殖大国,2022 年兔肉产量 5.18×10^5 t,兔业产值超过 3.00×10^{10} 元。优质畜禽资源的培育与养殖是畜禽产业健康发展的基础,同时符合消费者的需要。目前中国兔产业总体呈上升趋势,但由于对种兔重要性认知不够,导致中国优良种兔的繁育体系不健全、优质兔资源缺乏及品种退化,因此长期以来只能通过从国外引进优良品种以维持兔产业的发展,这不但增加了兔养殖成本,还制约着兔产业的发展^[1]。伊拉兔是由法国欧洲兔业公司在 20 世纪 70 年代末培育成的肉兔配套系,具有早期生长速度快、抗病力强、出肉率高等特点,因其适应中国大部分地区的气候和饲养条件,被广泛饲养和销售^[2]。近年来,中国的优质兔育种取得了一定的成绩,培育出了一些优质兔品种。蜀兴 1 号肉兔是四川省畜牧科学研究院针对中国西南地区特殊的兔肉消费需求和粗放的饲养管理条件,利用齐兴肉兔、欧洲大白兔和齐卡新西兰白兔 3 个品种(系)肉兔培育而成的优质肉兔配套系,具有繁殖性能好、适应性强、上市期早、屠宰率高、耗料少等特点,于 2020 年 12 月通过国家畜禽遗传资源委员会审定^[3]。

基于转录组测序技术和代谢组学技术分析畜禽产品品质差异的研究已得到广泛应用。牛、羊、鸭、鸡等畜禽产品中品质相关基因的挖掘、功能注释及代谢通路已有大量研究^[4-7],鸡肉、鸭肉、猪肉等畜禽产品中与肉质风味相关的代谢物及前体物质筛选亦

有初步研究^[8-11]。截止目前,基于转录组测序和代谢组学技术进行兔肉品质的比较及品质差异形成的分子机制研究还不多见。本研究以蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔为研究对象,利用转录组测序和代谢组学技术,分析蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔差异表达基因及其代谢通路,为优质兔的养殖和分子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及肉质性能测定

试验动物为 28 日龄商品代伊拉兔(IRA)(购买于重庆阿兴记原种兔养殖基地)和 28 日龄蜀兴 1 号肉兔(SX)(四川省畜牧科学研究院繁育),于四川省畜牧科学研究院肉兔科研基地相同条件饲养 42 d,选取蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔各 30 只(公兔、母兔各 15 只)进行屠宰,将兔背最长肌组织按照检测要求进行分割,冷藏保存。屠宰后 45 min 和 24 h,利用 Testo 205 pH 测量仪(德国 Testo 公司产品)测定肌肉的 pH 值,利用美能达色差仪 CR-10(日本美能达公司产品)测定兔肉的亮度值(L^*)、红绿度(a^*)、黄蓝度(b^*)。参照刘浪等^[12]的方法测定兔背最长肌的肌纤维直径和密度、熟肉率、滴水损失率、脂肪含量、蛋白质含量、水分含量和灰分含量。使用 IBM SPSS 统计软件进行分析差异显著性。试验兔屠宰 30 min 内,将兔背最长肌组织按照测序要求分割放置于冻存管中,液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱保存。随机选取蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔各

8只(公、母各4只)由武汉迈特维尔生物科技有限公司完成转录组学和代谢组学测序。

1.2 主要仪器与试剂

试验用仪器主要有美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产的 Qubit 2.0 荧光分光光度计、Thermo Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机和核酸蛋白检测仪,美国 Bio-Rad 公司生产的 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System、POWER/PAC 3000 电泳仪及 VersaDoc™ 凝胶成像系统,美国 Sciex 公司生产的 ExionLC AD 超高效液相色谱系统,美国 Agilent 公司生产的 Agilent 2100 生物分析仪、7890B-7000D 气相色谱-质谱联用仪、毛细管色谱柱 DB-5MS(规格 30 m×0.25 mm×0.25 μm),美国 Waters 公司生产的广泛靶向色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18(规格 1.8 μm,2.1 mm×100.0 mm);德国 Implen 公司生产的 Nano Photometer 超微量分光光度计;德国 Retsch 公司生产的 MM400 球磨机,瑞士 CTC Analytics AG 公司生产的 SPME Arrow 固相微萃取装置、Fiber Conditioning Station 老化装置、Agitator 样品加热箱。

主要试剂有美国 Illumina 公司生产的 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit 试剂盒,美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产的 Thermo K1622 逆转录试剂盒、TRIzol® Reagent,日本 TaKaRa 公司生产的 TB Green Premix Ex Taq II、DL2000 DNA Marker,北京金沙生物技术有限公司生产的 GS-GelRed 核酸凝胶染料,美国 Merck 公司生产的正己烷、甲醇、乙腈,上海 Aladdin 公司生产的甲酸、甲酸铵、氨水,广州赛国生物科技公司生产的氯仿、异丙醇、无水乙醇、氯化钠(分析纯)。

1.3 兔肉总 RNA 提取及转录组测序

利用 TRIzol 法提取背最长肌组织中的总 RNA,用核酸蛋白检测仪检测 RNA 的纯度,用 Qubit 2.0 荧光分光光度计、Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 浓度和完整性,使用 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit 试剂盒,通过磁珠富集 mRNA,并合成 cDNA,再使用 Qubit 2.0 荧光分光光度计和 Agilent 2100 生物分析仪对 cDNA 的浓度和完整性进行检测,最后用 AMPure XP 磁珠筛选出 200 bp 左右的 cDNA,进行 PCR 富集得到最终的 cDNA 文库。文库构建完成后,通过 qPCR 方法对文库有效浓度进行准确定量,对文库质量进行检验,库检合格后,通

过 Illumina 测序平台进行高通量测序。使用 Fastq 软件对原始数据进行质量检验,去除 A、T 碱基以及 G、C 碱基分离的低质量数据,得到高质量数据,并对高质量数据中的 G、C 碱基含量进行检测。使用 String Tie 软件进行新基因预测,使用 Feature Count 软件对每个样本的基因数据进行统计并合并所有样品的基因计数结果^[13-14]。采用 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)值衡量基因表达水平,反映转录本表达水平。对于无生物学重复的样品使用 edgeR 差异分析软件获得组间差异表达基因集^[15]。利用 HISAT2 软件将高质量数据与参考基因组 *Oryctolagus_cuniculus*.OryCun2.0.dna.toplevel.fa.gz (http://ftp.ensembl.org/pub/release-105/gff3/oryctolagus_cuniculus/)进行序列比对后根据基因的表达量进行差异表达分析,当 $|\log_2 FC| \geq 1$ (FC 为差异倍数),且 FDR (False discovery rate,错误发现率) <0.05 时,认为该基因在 2 个兔品种间呈差异表达^[16]。

1.4 差异表达基因的 qPCR 验证分析

为验证 RNA-seq 所得到的差异表达基因的可靠性,选取表达差异较大的 4 个基因 (*MCAM*、*SLC7A6*、*LCMT2* 和 *CALB2*),以家兔 *GAPDH* 和 *18SrRNA* 作为内参基因,利用 qPCR 技术对 4 个基因的表达模式进行验证。基因引物如表 1 所示。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time fluorescent quantitative PCR amplification

基因	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物大小(bp)
<i>MCAM</i>	F: CTCCTGGAGCTGGTCACTTTA R: TGTATTTCTCTCCATCTCCTGC	60	270
<i>SLC7A6</i>	F: ACCTCCCGGACCTTCTATCC R: CAGGCTCAGCTTGAGAGGAC	60	227
<i>LCMT2</i>	F: TGACGAGTTTGAGGAGTGCC R: CAGGTGAACTTGCTCACGC	60	295
<i>CALB2</i>	F: TGGAAGCACTTTGACGCAGA R: TCTGCCATCTCGATCTTGCC	60	188
<i>GAPDH</i>	F: GGAGCGAGATCCCGCCAACA R: TGACCCCTTTTGGCTCCGCC	65	125
<i>18SrRNA</i>	F: TTGGTGGAGCGATTGTTC R: TGAGCCAGTCAGTGTAGCC	54	199

1.5 代谢组学测序

1.5.1 GC-MS 挥发性代谢组学测序 在顶空瓶中添加 0.2 g 兔背最长肌样品、0.2 g NaCl 粉末和 10

μL 内标溶液,先在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 5 min ,然后插入萃取头并在 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下解析 5 min ,使用 SPME Arrow 全自动顶空固相微萃取装置进行样本萃取。色谱条件:采用 DB-5MS 毛细管柱 ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}\times 0.25\text{ }\mu\text{m}$),载气为高纯氦气,流速为 1.2 mL/min ,进样口温度设定为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,溶剂延迟 3.5 min 。升温程序设置为开始时保持 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3.5 min ,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升至 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$,再以 $7\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升至 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$,最后以 $25\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ 的速率升至 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保持 5 min 。质谱条件为:采用电子轰击离子源,温度为 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$,四级杆温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$,质谱接口温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,电子能量设定为 70 eV ,扫描方式为离子检测模式 (SIM),定性定量离子精准扫描。每种化合物分别选择 2~3 个定性离子和 1 个定量离子。然后按照质谱出峰顺序分时段检测所有离子,并选取其中的定量离子进行积分和校正工作,得到各种化合物的含量。

1.5.2 广泛靶向代谢组学 将 20 mg 样品放到离心管中,并加入 5 mm 钢珠,先用 MM400 球磨仪以 30 Hz 的频率均匀搅拌 20 s ,然后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $3\text{ }000\text{ r/min}$ 的速度离心 30 s ,离心后加入 70% 甲醇 $400\text{ }\mu\text{L}$,振荡 5 min 后放于冰上静置 15 min ,再在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,将 $200\text{ }\mu\text{L}$ 上清液移到进样瓶中,用于上机分析。色谱条件为:流动相 A 为超纯水,流动相 B 为乙腈;洗脱梯度: $0\sim 11.9\text{ min}$ 水与乙腈体积比为 $95:5$, $12.0\sim 12.1\text{ min}$ 水与乙腈体积比为 $10:90$, $12.2\sim 14.0\text{ min}$ 水与乙腈体积比为 $95:5$;流速 0.4 mL/min ;柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量为 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。质谱条件为:电喷雾离子源温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$,正电压 $5\text{ }500\text{ V}$ 、负电压 $-4\text{ }500\text{ V}$;离子源气体设定为气体 I 379.3 kPa 、气体 II 413.8 kPa 、气帘气 172.4 kPa 。基于自建靶向标准品数据库 MWDB,通过检测物质的子、母离子和保留时间对二级谱数据进行准确判断。利用 MultiQuant 软件对不同样本中相同代谢物的质谱峰值进行积分校正,并利用多反应监测模式进行代谢物的定量分析。

1.6 转录组学和代谢组学的数据分析

将所有比较组的差异基因合并后取并集作为差异基因集进行层次聚类分析,使用 Z 分数对数据进行标准化处理并绘制聚类热图。采用基因功能国际标准分类体系 GO 和综合性数据库 KEGG 对差异基因进行分析,进一步解读基因的功能。

利用 Mass Hunter 软件处理 GC-MS 挥发性代谢

组学获得的代谢物数据,利用 Analyst 1.6.3 软件处理广泛靶向代谢组学获得的质谱数据。利用主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 评估 2 个兔品种间的代谢物差异。基于变量重要性投影值 (VIP) ≥ 1.0 和 $|\log_2 FC| \geq 1$,筛选出蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔背最长肌的差异代谢物,利用综合性数据库 KEGG 进行差异代谢物的代谢途径富集分析。

2 结果与分析

2.1 肉质性状

蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔屠宰后背最长肌组织的肉质性状如表 2 所示。从表中可知,2 个品种兔屠宰后 45 min 和 24 h 的 pH 值和肉色指标 (亮度值 L^* 、红度值 a^* 和黄度值 b^*) 无显著差异;随着贮藏时间的增加,兔肉的 pH 值下降,酸性增强,而 L^* 、 a^* 和 b^* 均呈增加趋势。蜀兴 1 号肉兔的肌纤维直径和滴水损失率显著低于伊拉兔,而肌纤维密度和熟肉率显著高于伊拉兔。兔肉常规组分中,蜀兴 1 号肉兔的肌肉脂肪含量显著高于伊拉兔,而 2 个品种兔肉的含水率、蛋白质含量、灰分含量差异不显著。

表 2 蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔的肉质性状

Table 2 Meat quality properties of Shuxing No.1 rabbit and Ira rabbit

品质指标	测定时间 (h)	蜀兴 1 号肉兔	伊拉兔
pH	0.75	6.62 ± 0.14	6.69 ± 0.17
	24.00	5.78 ± 0.10	5.77 ± 0.10
亮度值 (L^*)	0.75	46.39 ± 1.98	46.63 ± 2.07
	24.00	53.56 ± 2.60	54.07 ± 2.32
红度值 (a^*)	0.75	1.07 ± 0.45	1.14 ± 0.42
	24.00	3.11 ± 0.81	3.05 ± 0.70
黄度值 (b^*)	0.75	6.44 ± 0.61	6.51 ± 0.69
	24.00	7.52 ± 0.92	7.66 ± 0.87
肌纤维直径 (μm)	24.00	$45.73\pm 3.15^*$	53.26 ± 3.47
肌纤维密度 (根, 1.0 mm^2)	24.00	$461.76\pm 47.78^*$	345.14 ± 37.28
熟肉率 (%)	24.00	$61.97\pm 2.98^*$	60.07 ± 2.66
滴水损失率 (%)	24.00	$2.27\pm 0.32^*$	2.69 ± 0.38
水分含量 (%)	24.00	75.59 ± 2.35	75.92 ± 2.84
蛋白质含量 (%)	24.00	22.42 ± 0.81	22.36 ± 0.99
肌肉脂肪含量 (%)	24.00	$1.05\pm 0.08^*$	0.82 ± 0.07
灰分含量 (%)	24.00	1.19 ± 0.11	1.20 ± 0.13

* 表示蜀兴 1 号肉兔与伊拉兔相比差异显著 ($P<0.05$)。

2.2 转录组学测序统计及质量评估

本研究建立的16个测序文库共获得约 8.5×10^8 bp的原始数据,质量控制后,约97%的原始数据达到高质量数据标准。 $Q20$ (质量值 ≥ 20 的碱基所占百分比)均在96%以上, $Q30$ (质量值 ≥ 30 的碱基所占

百分比)均在90%以上,说明转录组学测序结果质量较好。G+C碱基含量在50.02%~56.59%,符合理论分布比例,说明本研究测序结果是可靠的。16个测序文库质量控制后的数据与参考基因组的比率为79.95%~87.49%(表3)。

表3 测序数据质量评估

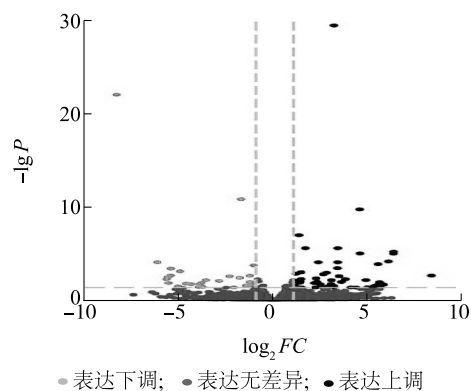
Table 3 Quality assessment of sequencing data

样品	原始数据(bp)	高质量数据(bp)	$Q20$ (%)	$Q30$ (%)	G+C含量(%)	匹配序列(bp)	比对率(%)
SX-1	51 107 188	49 519 594	96.20	90.57	54.74	39 784 042	80.34
SX-2	58 193 126	56 242 020	96.63	91.49	56.59	44 965 495	79.95
SX-3	50 082 102	48 811 138	96.70	91.52	55.08	41 030 643	84.06
SX-4	53 451 906	51 941 862	96.79	91.66	53.52	44 171 359	85.04
SX-5	47 202 760	45 402 640	96.89	91.81	50.02	39 722 770	87.49
SX-6	49 334 328	48 072 440	96.84	91.74	50.54	41 823 023	87.00
SX-7	44 616 958	43 544 238	96.94	91.94	54.00	37 073 564	85.14
SX-8	56 768 762	54 950 092	96.92	91.94	50.93	46 910 894	85.37
IRA-1	58 832 744	56 687 952	96.77	91.63	53.00	47 929 663	84.55
IRA-2	53 368 494	51 965 272	96.86	91.79	52.41	44 357 556	85.36
IRA-3	57 179 568	54 971 262	97.00	92.04	52.38	46 945 458	85.40
IRA-4	48 239 538	46 826 130	96.55	91.24	55.45	38 748 623	82.75
IRA-5	51 697 818	50 334 708	96.73	91.57	54.33	42 009 347	83.46
IRA-6	62 855 868	60 821 434	96.58	91.32	52.81	51 436 687	84.57
IRA-7	46 260 548	45 089 688	96.85	91.71	54.47	37 487 567	83.14
IRA-8	56 587 574	54 902 360	96.81	91.68	53.42	46 848 184	85.33

SX-1~SX-8,IRA-1~IRA-8分别为蜀兴1号肉兔和伊拉兔的背最长肌样本。 $Q20$:质量值 ≥ 20 的碱基所占百分比; $Q30$:质量值 ≥ 30 的碱基所占百分比。

2.3 蜀兴1号肉兔和伊拉兔差异表达基因的筛选

蜀兴1号肉兔和伊拉兔背最长肌共有81个差异表达基因。其中,蜀兴1号肉兔中表达上调的差异基因51个,表达下调的差异基因30个(图1)。蜀兴1号肉兔中差异倍数较大的表达上调基因包括*SLC7A6*、*MCAM*、*LARS2*和*EDN1*等,表达下调基因包括*CALB2*、*LCMT2*、*SMTNL1*和*PM20D2*等。



FC:差异倍数;P:基因一致性概率值。

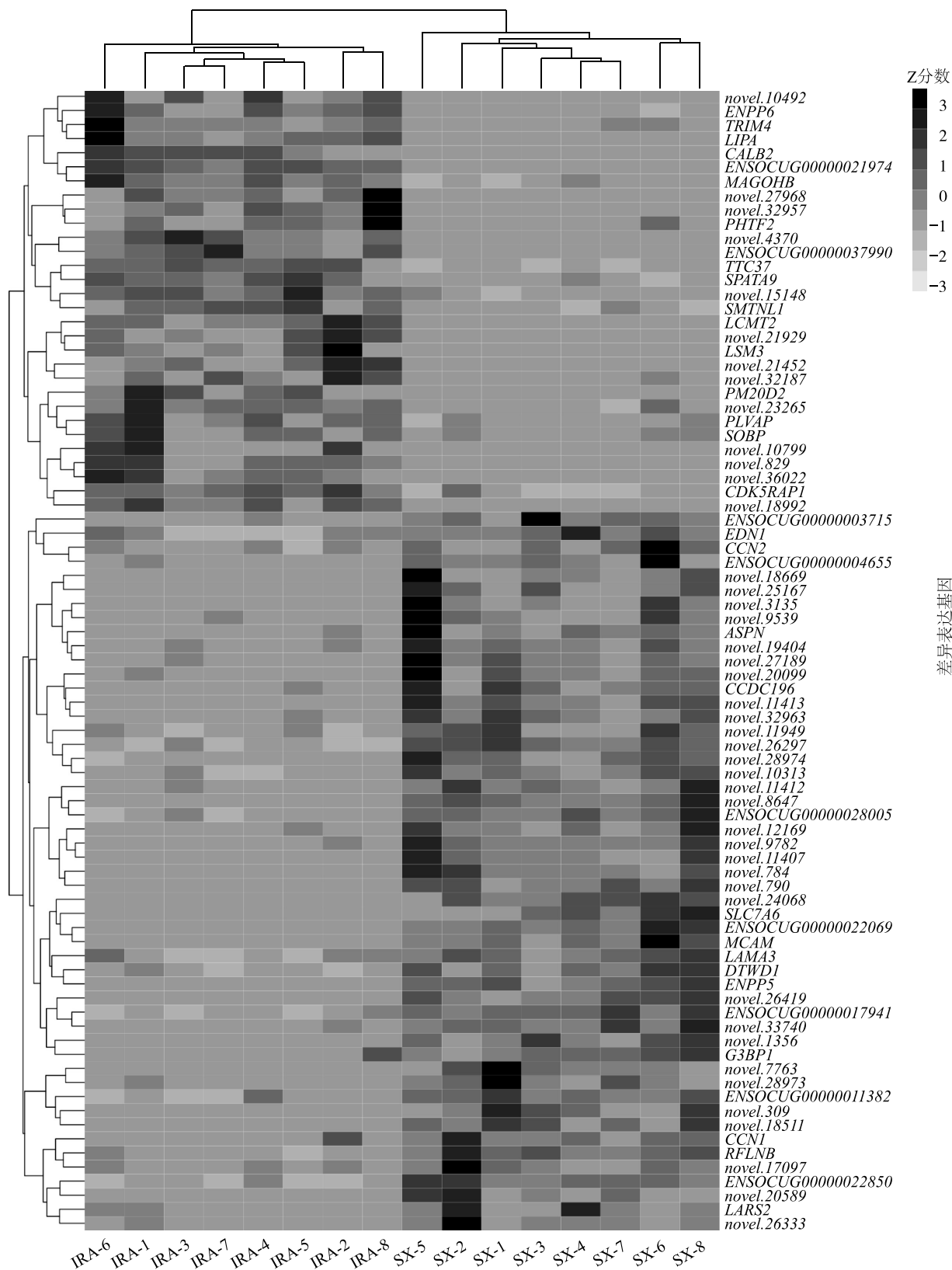
图1 蜀兴1号肉兔和伊拉兔差异表达基因火山图

Fig.1 Volcano map of differentially expressed genes between Shuxing No.1 meat rabbit and Ira rabbit

蜀兴1号肉兔和伊拉兔背最长肌差异表达基因层次聚类结果如图2所示。从图中可以看出,16个转录本按兔品种聚为2类,说明这些聚类基因可能具有相似的功能或者处于同一代谢通路。

2.4 蜀兴1号肉兔和伊拉兔差异表达基因的功能富集分析

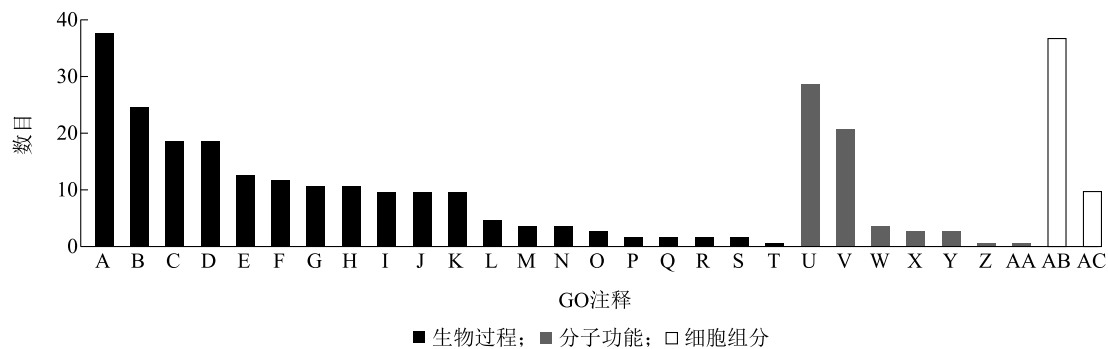
蜀兴1号肉兔和伊拉兔81个差异表达基因共富集到758条GO条目中,包括79个细胞组分条目、578个生物进程条目、101个分子功能条目。主要功能条目中富集到的基因数如图3所示。细胞过程中聚集的基因数较多;分子功能中以结合和催化活性等功能富集的基因数量较多;细胞组分中以细胞解剖实体、蛋白质复合体等功能富集的基因数较多。81个差异表达基因KEGG富集分析后共得到61条KEGG通路,其中富集最显著的20个通路如图4所示。从图4可以看出,富集到cAMP信号传导途径的差异表达基因数量最丰富、显著度亦高,富集到类固醇激素生物合成和RNA降解途径的差异表达基因数量和富集显著度略低。



SX-1~SX-8 为蜀兴 1 号肉兔样本 1~样本 8;IRA-1~IRA-8 为伊拉兔样本 1~样本 8。

图 2 蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔差异表达基因聚类热图

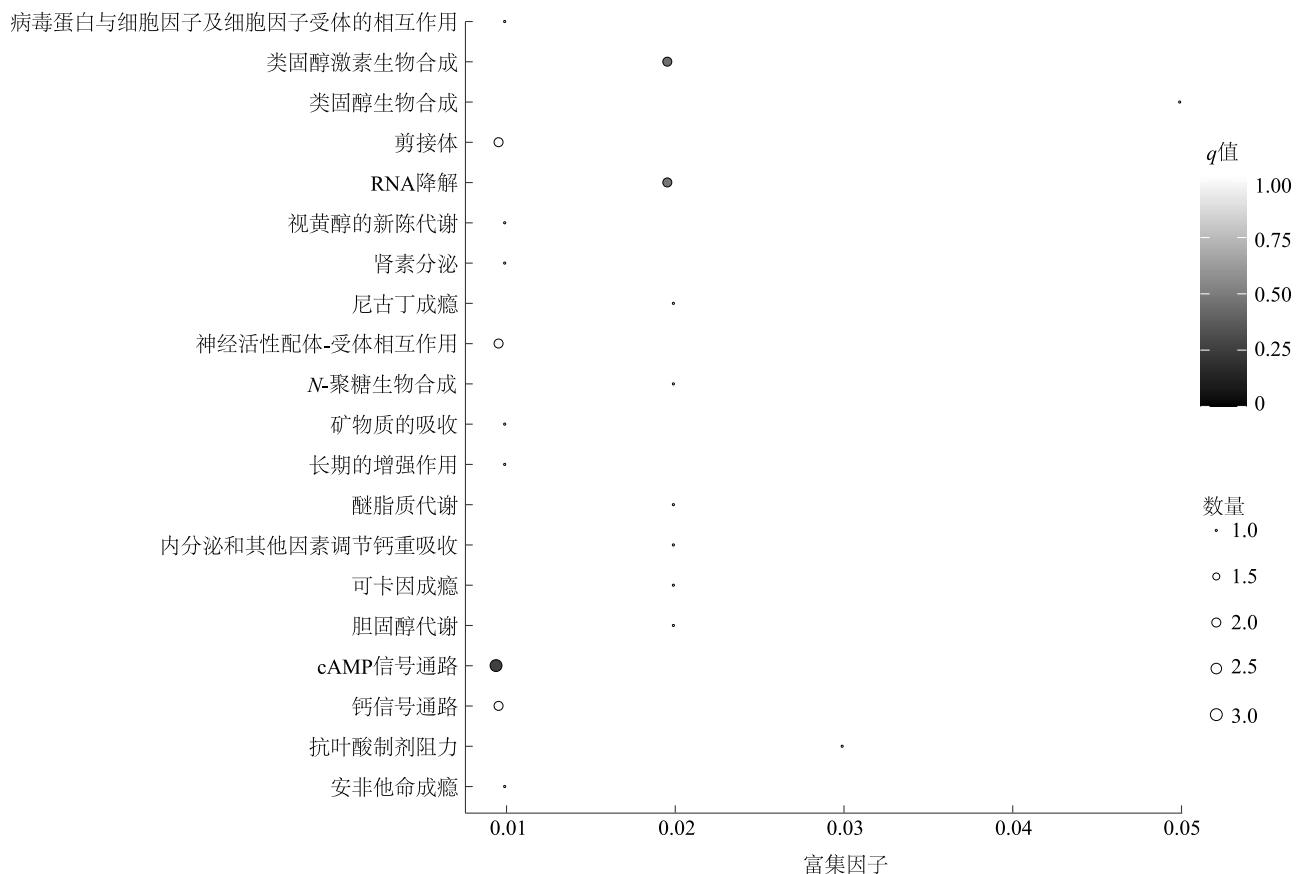
Fig.2 Cluster heat map of differentially expressed genes between Shuxing No.1 meat rabbit and Ira rabbit



A:细胞过程;B:代谢过程;C:生物过程调控;D:生物调控;E:生物过程的负调控;F:对刺激的反应;G:多细胞有机体过程;H:发育过程;I:信号;J:生物过程的正调控;K:本地化;L:运动;M:免疫系统过程;N:生物黏附性;O:参与生物间种间相互作用的生物学过程;P:繁殖;Q:生殖过程;R:多组织过程;S:生物矿化;T:增长;U:结合;V:催化活性;W:结构分子活性;X:分子转导活性;Y:分子功能调节因子;Z:转运蛋白活性;AA:货物受体活性;AB:细胞解剖实体;AC:蛋白复合体。

图3 蜀兴1号肉兔和伊拉兔差异表达基因的GO注释结果

Fig.3 GO annotation of differentially expressed genes between Shuxing No.1 meat rabbit and Ira rabbit



q值: P值产生假阳性的概率。

图4 蜀兴1号肉兔和伊拉兔差异表达基因KEGG富集最显著的20条通路

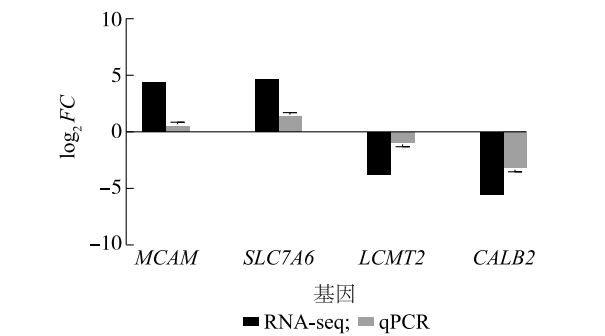
Fig.4 The 20 pathways with the most significant KEGG enrichment of differentially expressed genes between Shuxing No.1 meat rabbit and Ira rabbit

2.5 蜀兴1号肉兔和伊拉兔差异表达基因的qPCR验证

基于qPCR和RNA-seq得到的MCAM、SLC7A6、

LCMT2和CALB2等4个差异表达基因表达特征如图5所示。从图中可以看出,qPCR和RNA-seq得到的MCAM、SLC7A6、LCMT2和CALB2等4个基因

的表达趋势基本一致,说明 RNA-seq 测序结果准确可靠,能够体现蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔背最长肌中差异表达基因的表达特征。



FC:差异倍数。
图 5 差异表达基因的 qPCR 验证

Fig.5 Validation of differentially expressed genes by quantitative real-time PCR

2.6 代谢产物分析与鉴定

基于 GC-MS 挥发性代谢组学分析方法,蜀兴 1

号肉兔和伊拉兔中共检测到 368 种代谢物,其中 12 种代谢物存在显著差异,主要包括 2-十一烯醛、5-氨基-2,2,4-三甲基环戊烷甲胺和 4-乙基辛酸等,且都在蜀兴 1 号肉兔中显著上调(表 4)。基于广泛靶向代谢组学分析方法,在蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔中共检测到 734 种代谢物,15 种代谢物存在显著差异。其中,γ-L-谷氨酸-L-谷氨酰胺、L-谷氨酸-L-谷氨酰胺、褪黑激素等 7 种代谢物在蜀兴 1 号肉兔中显著上调,溶血磷脂酰胆碱、DL-泛酰醇、4-羟基苯甲酸丙酯等 8 种代谢物在蜀兴 1 号肉兔中显著下调。蜀兴 1 号肉兔中 γ-L-谷氨酸-L-谷氨酰胺含量和 L-谷氨酸-L-谷氨酰胺含量约为伊拉兔的 14.90 倍、褪黑激素含量约为伊拉兔的 9.34 倍。伊拉兔中溶血磷脂酰胆碱含量约为蜀兴 1 号肉兔的 14.98 倍(表 5)。γ-L-谷氨酸-L-谷氨酰胺、L-谷氨酸-L-谷氨酰胺、褪黑激素和溶血磷脂酰胆碱可能是造成蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔品质差异的关键代谢物。

表 4 基于 GC-MS 挥发性代谢组学的蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔差异代谢物

Table 4 Differential metabolites of Shuxing No.1 meat rabbit and Ira rabbit based on GC-MS volatile metabolomics

序号	中文名	分子式	FC	log ₂ FC	VIP	类型
1	2-十一烯醛	C ₁₁ H ₂₀ O	2.52	1.34	1.83	上调
2	5-氨基-2,2,4-三甲基环戊烷甲胺	C ₉ H ₂₀ N ₂	2.46	1.30	1.90	上调
3	4-乙基辛酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	2.38	1.25	1.81	上调
4	(E)-2-壬烯醛	C ₉ H ₁₆ O	2.32	1.21	1.68	上调
5	2-甲基-十一烷	C ₁₂ H ₂₆	2.31	1.21	1.67	上调
6	鸟氨酸	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	2.30	1.20	1.89	上调
7	5-甲基-5-丙基-壬烷	C ₁₃ H ₂₈	2.28	1.19	1.82	上调
8	δ-正内酯	C ₉ H ₁₆ O ₂	2.26	1.18	1.96	上调
9	十一醛	C ₁₁ H ₂₂ O	2.19	1.13	1.85	上调
10	3-甲基-2-(2-戊烯基)-P 环戊酮	C ₁₁ H ₁₈ O	2.11	1.08	1.95	上调
11	3-甲基十四烷	C ₁₅ H ₃₂	2.03	1.02	1.96	上调
12	3-乙基-3-甲基-癸烷	C ₁₃ H ₂₈	2.00	1.00	1.77	上调

FC 为蜀兴 1 号肉兔与伊拉兔代谢物的比值。VIP 为变量重要性投影值。

2.7 差异代谢物 KEGG 富集分析

根据 KEGG 数据库,基于 GC-MS 挥发性代谢组学技术得到的蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔 368 种代谢物共富集到 8 种代谢通路,包括 2-氧代羧酸代谢、ABC 转运蛋白、精氨酸生物合成、氨基酸的生物合成、D-氨基酸代谢、谷胱甘肽代谢、精氨酸和脯氨酸代谢

等(图 6A)。基于广泛靶向代谢组学技术得到的 734 种代谢物共富集到咖啡因代谢、昼夜节律夹带、色氨酸代谢、泛酸和辅酶 A 生物合成、神经活性配体-受体相互作用等代谢通路,其中,最可能影响蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔背最长肌代谢物变化的代谢途径为咖啡因代谢(图 6B)。

表5 基于广泛靶向代谢组学的蜀兴1号肉兔和伊拉兔差异代谢物

Table 5 Differential metabolites of Shuxing No.1 meat rabbit and Ira rabbit based on widely targeted metabolomics

序号	中文名	分子式	FC	log ₂ FC	VIP	类型
1	γ-L-谷氨酸-L-谷氨酰胺	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆	30 511.97	14.90	2.16	上调
2	L-谷氨酸-L-谷氨酰胺	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆	30 511.97	14.90	2.16	上调
3	褪黑激素	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂	648.99	9.34	3.29	上调
4	咖啡因	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	5.10	2.35	2.13	上调
5	肉碱(C22:2)	C ₂₉ H ₅₃ NO ₄	2.39	1.25	1.10	上调
6	溶血磷脂酰乙醇胺	C ₂₁ H ₄₂ NO ₇ P	2.11	1.08	1.09	上调
7	1,7-二甲基黄嘌呤	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	2.02	1.01	1.35	上调
8	D-泛酸钙(维生素B5)	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₁₀	0.49	-1.02	1.51	下调
9	环(L-亮氨酸-L-脯氨酸)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	0.40	-1.34	1.56	下调
10	2',4'-二羟基苯乙酮	C ₈ H ₈ O ₃	0.31	-1.69	1.60	下调
11	4-羟基苯甲酸甲酯	C ₈ H ₈ O ₃	0.31	-1.69	1.60	下调
12	对苯二甲酸	C ₈ H ₆ O ₄	0.31	-1.70	1.81	下调
13	4-羟基苯甲酸丙酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	0.23	-2.12	1.85	下调
14	DL-泛酰醇	C ₉ H ₁₉ NO ₄	0.05	-4.47	1.20	下调
15	溶血磷脂酰胆碱	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	0	-14.98	3.28	下调

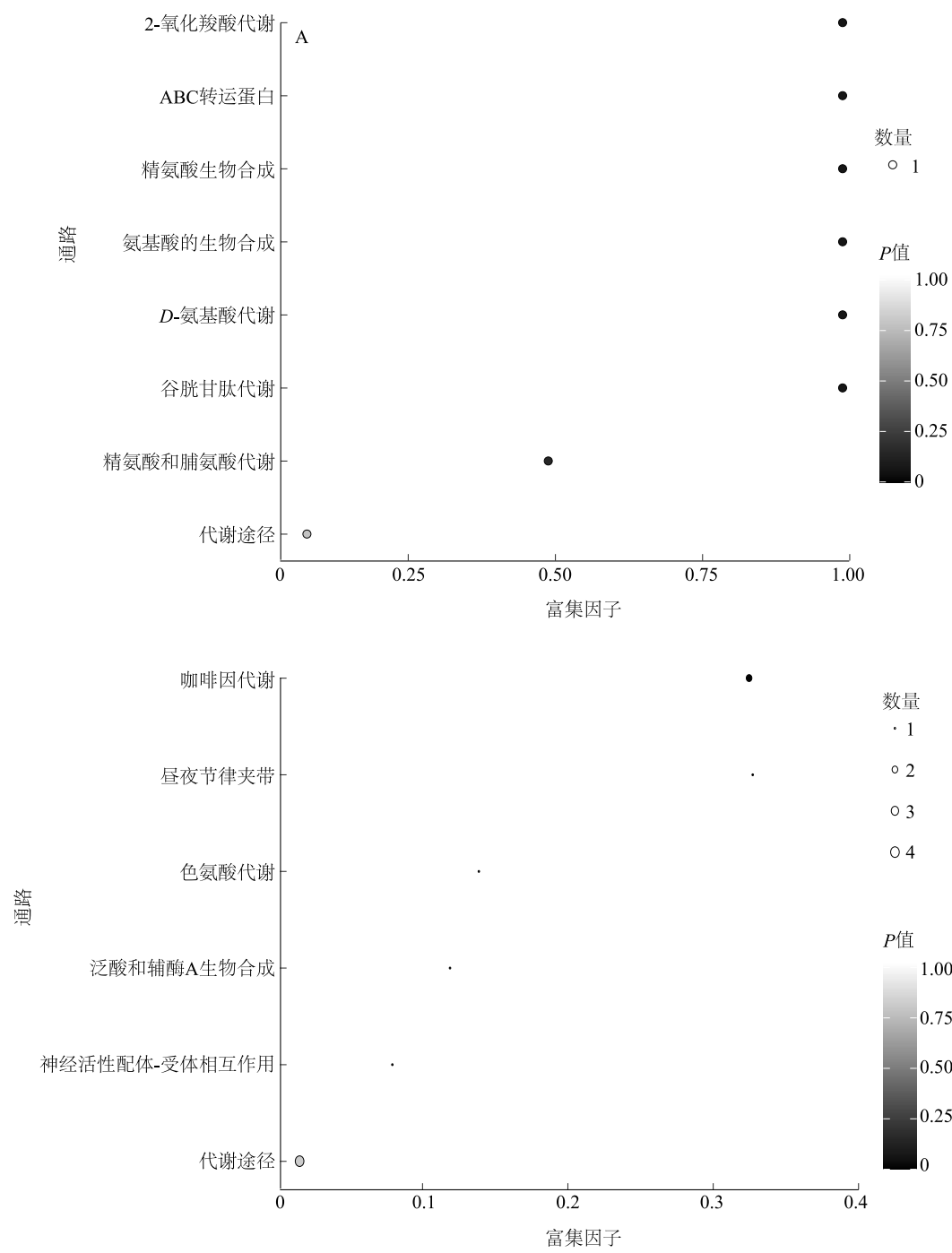
FC为蜀兴1号肉兔与伊拉兔代谢物的比值。VIP为变量重要性投影值。

3 讨论与结论

肉品质和风味是评价畜禽肉质优劣的重要指标,同时也是畜禽品种改良的关键指标之一^[17]。肌肉内脂肪、氨基酸、核苷酸和有机酸等物质与肉的风味密切相关,含量的不同会引起肉品质和风味产生差异^[18]。品种、年龄和营养状况等多种因素都会导致畜禽产品肌纤维特性的差异。通常情况下,肌肉中肌纤维密度越高、肌纤维直径越小,其细嫩度越好^[19]。本研究结果表明,蜀兴1号肉兔和伊拉兔的肉品质指标存在一定程度的差异。蜀兴1号肉兔的肌纤维密度显著高于伊拉兔,肌纤维直径显著低于伊拉兔。这说明,蜀兴1号肉兔的肉质比伊拉兔更加细嫩。

转录组学研究可揭示畜禽生长和品质差异的关键基因^[20-26],对优质畜禽资源的培育具有较好的指导意义。本研究通过转录组测序技术,共筛选出蜀兴1号肉兔和伊拉兔背最长肌中81个差异表达基因,其中,51个基因在蜀兴1号肉兔中表达上调,30个下调。*SMTNL1*、*PM20D2*和*EDN1*等基因在2个品种兔之间表达差异显著,而这些基因已被证实能调控畜禽产品品质。*SMTNL1*能调节兔平滑肌收缩力,加强平滑肌和骨骼肌对高血压、妊娠和运动训练

的适应,还可能参与调控细胞骨架的重组和细胞收缩^[27]。*SMTNL1*和孕酮受体之间的相互作用能改变收缩蛋白和代谢蛋白的表达,促进小鼠怀孕期间骨骼肌纤维转换,*SMTNL1*的缺失会降低小鼠的代谢效率和葡萄糖耐受量^[28]。*SMTNL1*蛋白还能够与肌球蛋白磷酸酶等收缩调节因子相互作用,在肌肉组织和类固醇激素敏感组织中表达^[29-30]。这些研究结果都说明*SMTNL1*在肌肉生长和能量代谢中具有重要作用。*PM20D2*是1种含有M20酶结构域的蛋白质,而M20酶结构域蛋白质家族主要与脂质代谢相关,在能量代谢和脂质代谢中起重要作用^[31]。*PM20D2*还能阻止β-丙氨酰赖氨酸等异常二肽的积累,从而有利于肌肽和高肌肽的合成^[32]。本研究中差异表达基因的KEGG富集分析结果表明,富集到cAMP信号传导途径的差异表达基因数量最多,且显著度最高,而cAMP信号传导途径通路已被证实是与肉品质调控和风味物质代谢有关的通路,富集到cAMP信号传导途径通路的*EDN1*可通过自分泌和旁分泌作用促进血管平滑肌细胞的增殖或肥大,从而影响平滑肌细胞的收缩^[33]。因此,本研究筛选出的*SMTNL1*、*PM20D2*和*EDN1*差异表达基因可能是导致蜀兴1号肉兔和伊拉兔肉质性能差异的关键基因。



A:GC-MS挥发性代谢组学分析;B:广泛靶向代谢组学分析。P值:样本之间的差异性。

图 6 蜀兴 1 号肉兔和伊拉兔差异代谢物 KEGG 富集分析

Fig.6 KEGG enrichment analysis of differential metabolites between Shuxing No.1 meat rabbit and Ira rabbit

脂肪酸、氨基酸和醛类等代谢物是影响动物肉质和风味的重要因素^[34]。十一烯醛是牛脂酶解-轻度热氧化过程中产生的独特产物,是牛肉加热过程中产生的香气物质^[35], (E)-2-壬烯醛、2-十一烯醛等代谢物是滩羊肉的关键香气化合物^[36], 4-乙基辛

酸则是羊脂中的主要风味活性物质^[37]。本研究通过 GC-MS 挥发性代谢组学测序技术,共筛选出 12 个差异显著的代谢物,包括 2-十一烯醛、4-乙基辛酸、(E)-2-壬烯醛和十一醛等,这些物质均在蜀兴 1 号肉兔肉中显著上调。通过广泛靶向代谢组学测序

技术,共筛选出差异显著的代谢物15个,其中蜀兴1号肉兔肉中上调代谢物7个,下调代谢物8个。差异代谢物大多显著富集在咖啡因代谢通路。在筛选出的差异代谢物中,肉碱能将长链脂肪酸从细胞质输送到线粒体基质中,提高脂肪酸的转化效率^[38];咖啡因可以防止脂肪在细胞中过度堆积,抑制磷酸二酯酶的活性来刺激脂肪的分解,能有助于保护细胞免受紫外线辐射^[39];谷氨酸和谷氨酰胺等氨基酸是挥发性风味物质的前体物质,影响肉质风味^[40-41]。因此,这些差异代谢物可能是导致蜀兴1号肉兔和伊拉兔肉质差异的重要原因。

本研究通过对蜀兴1号肉兔和伊拉兔的肉质特性的比较分析,发现蜀兴1号肉兔肌纤维密度和脂肪含量更高,并通过转录组学和代谢组学分析,筛选到 *SMTNL1*、*PM20D2* 和 *EDN1* 等可能影响肉质的差异表达基因以及 2-十一烯醛、肉碱、谷氨酸等差异代谢物,为蜀兴1号肉兔的优质养殖以及优质肉兔新品种培育提供参考和依据。

参考文献:

- [1] 武拉平,王建勋,秦应和. 2022年兔产业生产概况、2023年发展趋势及政策建议[J]. 中国畜牧杂志,2023,59(3):348-352.
- [2] 谢跃杰. 伊拉兔肉腥味物质及其体内沉积变化的研究[D]. 重庆:西南大学,2016.
- [3] 李丛艳,梅秀丽,邝良德,等. 限饲对蜀兴1号商品兔生长性能、屠宰性能及肉品质的影响[J]. 中国畜牧杂志,2022,58(1):247-251.
- [4] MENG X, GAO Z, LIANG Y, et al. Longissimus dorsi muscle transcriptomic analysis of Simmental and Chinese native cattle differing in meat quality[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7:601064.
- [5] CHEN B, YUE Y, LI J, et al. Transcriptome-metabolome analysis reveals how sires affect meat quality in hybrid sheep populations[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9:967985.
- [6] HU Z, CAO J, GE L, et al. Characterization and comparative transcriptomic analysis of skeletal muscle in Pekin duck at different growth stages using RNA-Seq[J]. Animals, 2021, 11(3):834.
- [7] REN L, LIU A, WANG Q, et al. Transcriptome analysis of embryonic muscle development in Chengkou Mountain Chicken[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1):431.
- [8] OTT K H, ARANIBAR N, SINGH B, et al. Metabonomics classifies pathways affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts[J]. Phytochemistry, 2003, 62(6):971-985.
- [9] ZHOU H, YANG Y, WANG L, et al. Integrated multi-omic data reveal the potential molecular mechanisms of the nutrition and flavor in Liancheng white duck meat[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13:939585.
- [10] CARTONI MANCINELLI A, SILLETTI E, MATTIOLI S, et al. Fatty acid profile, oxidative status, and content of volatile organic compounds in raw and cooked meat of different chicken strains[J]. Poultry Science, 2021, 100(2):1273-1282.
- [11] CHEN C, ZHENG J, XIONG C, et al. Metabolomics characterize the differential metabolic markers between Bama Xiang pig and De-bao pig to identify pork[J]. Foods, 2022, 12(1):5.
- [12] 刘浪,熊国远,朱秀柏. 家兔的胴体性状和肉品质测定方法[J]. 中国养兔杂志,2009(3):11-14.
- [13] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3):290-295.
- [14] LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. Bioinformatics, 2014, 30(7):923-930.
- [15] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1):139-140.
- [16] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4):357-360.
- [17] 李金玲,白昊鑫,马晶晶,等. 肉鹅制品中松香酸和脱氢松香酸残留的高效液相色谱检测方法[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(11):174-178.
- [18] 梁鹏,张稳,冯登侦,等. 基于转录组学筛选绵羊肉质性状相关候选基因[J]. 华北农学报, 2022, 37(4):220-231.
- [19] 陈勇,朱友军,邹万瑞,等. 舍饲牦牛、犏牛与放牧牦牛的肌纤维特性研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(21):141-144, 149.
- [20] PAN P, QIN Z, XIE W, et al. Identification of differentially expressed genes in the longissimus dorsi muscle of Luchuan and Duroc Pigs by transcriptome sequencing[J]. Genes (Basel), 2023, 14(1):132.
- [21] ZHAO L, LI F, ZHANG X, et al. Integrative analysis of transcriptomics and proteomics of longissimus thoracis of the Hu sheep compared with the Dorper sheep[J]. Meat Science, 2022, 193:108930.
- [22] 赵旺生,李柯锐,张婷婷,等. 基于高通量转录组测序的牦牛和犏牛附睾尾部差异表达基因分析[J]. 南方农业学报, 2023, 54(5):1273-1282.
- [23] 丁玥竹,任宇,扈孟雪,等. 云南独龙鸡和红原鸡卵巢组织转录组水平的比较分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(5):38-44.
- [24] 袁建,敖政,曾素梅,等. 基于转录组测序的摘除卵巢藏姜母猪背最长肌脂代谢相关基因筛选与分析[J]. 南方农业学报, 2023, 54(3):669-680.
- [25] 王钱保,姜润深,黎寿丰,等. 光照调控优质肉鸡性成熟的转录组分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(3):16-21.
- [26] 熊讯,阮涌,许厚强. 基于转录组分析干扰 *FABP1* 基因对猪肌肉脂肪沉积的影响[J]. 南方农业学报, 2023, 54(3):724-

- 734.
- [27] BORMAN M A, FREED T A, HAYSTEAD T A, et al. The role of the calponin homology domain of smoothelin-like 1 (SMTNL1) in myosin phosphatase inhibition and smooth muscle contraction[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009, 327(1/2): 93-100.
- [28] LONTAY B, BODOOR K, SIPOS A, et al. Pregnancy and smoothelin-like protein 1 (smtnl1) deletion promote the switching of skeletal muscle to a glycolytic phenotype in human and mice [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(29): 17985-17998.
- [29] MURALI M, MACDONALD J A. Smoothelins and the control of muscle contractility[J]. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 81: 39-78.
- [30] MAJOR E, GYÖRY F, HORVÁTH D, et al. Smoothelin-like protein 1 regulates development and metabolic transformation of skeletal muscle in hyperthyroidism[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 751488.
- [31] HUANG X, HE P, WU L. Clinical significance of peptidase m20 domain containing 1 in patients with carotid atherosclerosis[J]. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2022, 119(3): 372-379.
- [32] VEIGA-DA-CUNHA M, CHEVALIER N, STROOBANT V, et al. Metabolite proofreading in carnosine and homocarnosine synthesis: molecular identification of PM20D2 as β -alanyl-lysine dipeptidase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(28): 19726-19736.
- [33] KOBAYASHI Y, YOSHIMOTO Y, YAMAMOTO Y, et al. Roles of EDNs in regulating oviductal NO synthesis and smooth muscle motility in cows[J]. *Reproduction*, 2016, 151(6): 615-622.
- [34] 张润, 杨曼, 王立贤, 等. 畜禽肉中代谢物质对肉品质的影响及相关基因研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(8): 2444-2452.
- [35] SHI X, ZHANG X, SONG S, et al. Identification of characteristic flavour precursors from enzymatic hydrolysis-mild thermal oxidation tallow by descriptive sensory analysis and gas chromatography-olfactometry and partial least squares regression[J]. *Journal of Chromatography B*, 2013, 913/914: 69-76.
- [36] WANG Y R, WANG S L, LUO R M. Evaluation of key aroma compounds and protein secondary structure in the roasted Tan mutton during the traditional charcoal process[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 1003126.
- [37] KAFFARNIK S, PREUSS S, VETTER W. Direct determination of flavor relevant and further branched-chain fatty acids from sheep subcutaneous adipose tissue by gas chromatography with mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1350: 92-101.
- [38] DURAZZO A, LUCARINI M, NAZHAND A, et al. The nutraceutical value of carnitine and its use in dietary supplements[J]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2127.
- [39] HERMAN A, HERMAN A P. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use[J]. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2013, 26(1): 8-14.
- [40] LI Y, WANG J, WANG T, et al. Differences between Kazak Cheeses fermented by single and mixed strains using untargeted metabolomics[J]. *Foods*, 2022, 11(7): 966.
- [41] WENG K, SONG L, BAO Q, et al. Comparative characterization of key volatile compounds in slow- and fast-growing duck raw meat based on widely targeted metabolomics[J]. *Foods*, 2022, 11(24): 3975.

(责任编辑:石春林)