

# 钙离子对钙激活蛋白酶 mRNA 表达、活性及其对肌肉蛋白降解的影响

朱燕<sup>1,2</sup>, 徐幸莲<sup>1</sup>, 罗欣<sup>1,2</sup>, 周光宏<sup>1,\*</sup>

(1. 南京农业大学 农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏 南京 210095

2. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 本实验分别以牛肉肌束和分化为肌细胞的 L6 成肌细胞为研究对象, 研究钙离子对离体肌束中钙激活蛋白酶活性、蛋白分解以及活体肌肉(肌细胞)中钙激活蛋白酶 mRNA 水平表达的影响。结果表明 500  $\mu\text{mol/L}$  以内的钙离子处理肌束, 可以提高肌束中  $\mu$ -钙激活蛋白酶的活性, 当高于此浓度时,  $\mu$ -钙激活蛋白酶因发生自动降解而失活。但是钙离子对  $m$ -钙激活蛋白酶活性影响不大, 只有钙离子浓度达到 10  $\text{mmol/L}$  时才会导致自动降解而失活。钙离子可以加速肌肉中蛋白质的降解, 且浓度越高, 降解越明显; 钙离子处理活体肌细胞, 在没有产生明显细胞死亡的情况下, 可导致  $\mu$ -钙激活蛋白酶和  $m$ -钙激活蛋白酶 mRNA 水平表达的增加。由本研究的结果初步推断钙离子不仅可以激活钙激活蛋白酶的酶活性, 提高分解肌肉蛋白的能力, 在刚刚屠宰的肉(肌肉未死亡)中进行钙离子嫩化也可以导致钙激活蛋白酶表达量的增加。

**关键词:** 钙离子; 钙激活蛋白酶; 酶活; mRNA; 实时定量 PCR; 酪蛋白底物酶原分析

Effects of Calcium Ion on Calpains mRNA Expression, Activity and Degradation of Muscle Protein

ZHU Yan<sup>1,2</sup>, XU Xing-lian<sup>1</sup>, LUO Xin<sup>1,2</sup>, ZHOU Guang-hong<sup>1,\*</sup>

(1. Key Laboratory of Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China 2. College of Food Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**Abstract:** In order to evaluate the effects of calcium ion on calpains mRNA expression and proteolysis activity, and muscle protein degradation, L6 myoblast and beef fascicle were used *in vivo* and *in vitro* samples respectively in this study. The results indicated that  $\mu$ -calpains activity increases when the calcium ions concentration is less than 500  $\mu\text{mol/L}$ , otherwise, the  $\mu$ -calpains activity disappears due to autolysis. The effects of calcium ion on  $m$ -calpain are less effective than on  $\mu$ -calpain. Furthermore, calcium ion also accelerates the degradation of beef muscle proteins *in vitro* experiments. mRNA expressions of  $\mu$ - and  $m$ -calpain both increases in L6 myoblast during the L6 had low death rate *in vivo* experiment. Therefore, it could be deduced that the calcium ion can not only activate calpains proteolysis activity and accelerate the degradation of muscle proteins, but also lead to mRNA expression of  $\mu$ - and  $m$ -calpain when the muscle cell is still alive.

**Key words:** calcium ions; calpains; proteolysis activity; mRNA real-time quantitative PCR; casein zymography  
中图分类号: TS251.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2007)05-0025-04

嫩度是决定牛肉食用品质最重要的指标<sup>[1-2]</sup>。动物屠宰后进入尸僵期, 肉的嫩度变差, 必须经过低温存放过程, 嫩度才可以逐步得到改善<sup>[3]</sup>, 这一过程俗称“排酸”。排酸过程是肉类嫩化的过程, 肉中蛋白质发生明显水解, 且肌纤维结构发生很大变化, 嫩度也得到显著提高。虽然前人的研究一致认为成熟过程中嫩度的改善源于骨架蛋白的降解, 但在骨架蛋白的降解机理上

存在较大分歧, 并行成了两个主要的理论。

钙理论以日本学者 Takahashi<sup>[4-5]</sup>为代表, 他认为, 在没有钙激活蛋白酶存在的肉类成熟过程中, 单独的钙离子可以与 Z 线中的磷脂分子结合后, 磷脂分子从 Z 线中释放出来, 从而导致 Z 线结构破坏, 引起 Z 盘的弱化; 同时, 伴肌球蛋白(titin)、伴肌动蛋白(nebulin)、肌间线蛋白(desmin)等骨架蛋白也发生了降解。而以

收稿日期: 2005-10-31

\*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371016)

作者简介: 朱燕(1974-), 女, 讲师, 博士研究生, 研究方向为肉品质量控制。

Koohmarie 等学者为代表的酶学说却对钙理论提出了质疑, 酶学说认为, 肉类成熟过程中骨架蛋白的降解主要与钙激活蛋白酶有关, 体内和体外实验都证明肌联蛋白伴肌球蛋白、伴肌动蛋白, 肌间线蛋白, 肌钙蛋白 T(troponin-T)和肌膜连接蛋白 Dystrophin、Vinculin、Ankyrin、Talin 等骨架蛋白是钙激活蛋白酶的良好底物, 且钙激活蛋白酶对这些蛋白的降解方式与肉类排酸过程中这类蛋白的降解方式相似<sup>[6-7]</sup>。钙激活蛋白酶是异二聚体, 无钙离子结合时以酶原的方式存在, 无蛋白分解能力, 当与钙离子结合时酶原形式被激活, 开始分解蛋白。单独钙离子无分解蛋白能力。

从肉类成熟机制的两种理论的论点可以看出, 两者争论的焦点问题是钙离子在嫩化中所起的作用。本实验以牛肉肌束和大鼠成肌细胞为研究对象, 研究离体和活体条件下, 钙离子在肉类嫩化过程中对钙激活蛋白酶酶原活性、蛋白分解和活体细胞钙激活蛋白酶 mRNA 表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 牛肉肌束的钙处理

在刚刚屠宰后的牛的背最长肌上, 顺其肌纤维方向用镊子取肌纤维一束, 一端用大头针固定在灌有石蜡的 60mm 培养板中, 另一端游离。每个培养板中固定 20 个肌纤维束, 共 5 个培养板。第一个培养板中加入含 500  $\mu\text{mol/L}$  的氯化钠蒸馏水为对照组, 其它四个培养板中分别加入含氯化钙为 500、1000、5000 和 10000  $\mu\text{mol/L}$  的溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$  处理 12h, 然后进行 SDS-PAGE 和酪蛋白底物酶原分析。

### 1.2 成肌细胞培养、分化和钙离子处理

大鼠 L6 成肌细胞系(购于中国科学院上海细胞库, 源自 ATCC)按照  $1.5 \times 10^5$  的密度接种于含有 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素的 DMEM(Gibico) 培养液的 60mm 一次性细胞培养板中。细胞每 2d 传代一次, 三代后将培养液中的 10% FBS 更换为 2% 马血清, 诱导成肌细胞分化为肌纤维。分化的肌细胞, 倒掉培养液, 用 PBS 冲洗两遍, 然后用含 0、100、500、1000 和 5000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  的分化培养液处理肌细胞, 继续培养 2d, 收获细胞, 用于荧光实时定量 PCR 分析。

### 1.3 $\mu$ -和 m-calpain 荧光实时定量 RT-PCR 分析

#### 1.3.1 RNA 提取

钙离子处理的肌管(6孔板一个孔)细胞约  $10^8$  个, 倒掉培养液, 直接加入 Trizol (Invitrogen) 1ml 抽提 RNA, 参照 Invitrogen 的推荐方法提取。抽提的 RNA 溶于适量 0.1% DEPC 水中。用 Beckman 分光光度计在 260nm 处测定 RNA 浓度,  $A_{260}/A_{280}$  测定其纯度。取 5  $\mu\text{l}$  进行 1.5% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性。

#### 1.3.2 cDNA 第一链的合成

2  $\mu\text{l}$  oligo(dt)<sub>18</sub>, 和 2  $\mu\text{l}$  提取的总 RNA 加入 5  $\mu\text{l}$  0.1% DEPC 水后混匀, 70 $^{\circ}\text{C}$  温浴 10min 转入冰浴 5min, 经短暂离心后加入 4  $\mu\text{l}$  15  $\times$  buffer, 2  $\mu\text{l}$  0.1mol/L DTT 及 4  $\mu\text{l}$  2.5mmol/L dNTPs, 轻混, 42 $^{\circ}\text{C}$  预热 2min; 加入 MMLV 反转录酶(200U/ $\mu\text{l}$ ) 并混匀, 然后于 42 $^{\circ}\text{C}$  下 50min 反转录, 反转录完成后, 75 $^{\circ}\text{C}$  5min 灭酶。

#### 1.3.3 荧光实时定量 PCR 扩增

m-钙激活蛋白酶引物

P1: 5' GATGAAACTGGCCAAAGA 3'

P2: 5' AGCTCCTCTGGGACCTCATAGATG 3'

$\mu$ -钙激活蛋白酶引物

P1: 5' CAG GAG GAG ATG GAA GGG AT3'

P2: 5' TCT GCT GAG GCA ACC ACT AC 3'

大鼠 GAPDH 基因(持家基因)

P1: 5' GAA TTC CAT TGA CCT CAA CTA CAT GG-3'

P2: 5' TTG CTG CAG TCT TAC TCC TTG GAG GCC AT-3'

反应体系: 每管 50  $\mu\text{l}$ , 其中 25  $\mu\text{l}$  SYBR Green Taqx 热启动混合物(20mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 100mmol/L KCl, 7mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.4mmol/L dNTP, 0.05U/ $\mu\text{l}$  Taq DNA 聚合酶, 热启动 Taq 抗体和 SYBR Green 染料), 0.5  $\mu\text{l}$  指示染料、1  $\mu\text{l}$  P1、1  $\mu\text{l}$  P2、1  $\mu\text{l}$  反转录产物和 21.5  $\mu\text{l}$  去离子水。

反应程序: 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ , 2min, 然后变性 94 $^{\circ}\text{C}$ , 15s; 退火分别为 60 $^{\circ}\text{C}$  ( $\mu$ -钙激活蛋白酶)、55 $^{\circ}\text{C}$  (m-钙激活蛋白酶) 和 58 $^{\circ}\text{C}$  (GAPDH), 1min; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ , 1min 共 40 个循环, 然后 60 $^{\circ}\text{C}$  熔解。绘制曲线。利用 ABI7000 定量 PCR 仪进行测定, 利用 PCR 所带软件进行结果分析。

#### 1.4 SDS-PAGE 电泳

取钙离子处理后的肌束 200mg, 在 5ml 经预冷的抽提液 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 5mmol/L EDTA, 5mmol/L EGTA, 1mmol/L DTT, 0.5mmol/L PMSF 中匀浆, 制备成全肌肉蛋白液。全肌肉蛋白抽提液 5000  $\times$  g 离心, 分为沉淀和上清两部分, 调整蛋白浓度为 1.5mg/ml, 然后与 5 倍样品缓冲液(60mmol/L Tris-HCl, 25% 甘油, 2% SDS, 14.4mmol/L 2-巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝, pH6.8) 以 4:1 混匀, 在沸水中煮 5min, 上样 30  $\mu\text{g}$  蛋白于 SDS-PAGE, 分离胶为 12%, 浓缩胶为 5%, 80V 恒压电泳, 待蛋白进入分离胶后调至 120V, 恒压电泳 4h。电泳结束后, SDS-PAGE 胶在考马斯亮蓝(R-250)染色液中染色 1h, 脱色液中脱色过夜。

#### 1.5 酪蛋白酶原分析

酪蛋白酶原分析参照文献[8]方法, 稍作修改。取钙离子处理的肌束 200mg 加入 5ml 经预冷的抽提液 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 5mmol/L EDTA, 5mmol/L EGTA, 1mmol/L DTT, 0.5mmol/L PMSF, 匀浆, 经 2000  $\times$  g, 5min 离心弃去沉淀, 用 Bradford 法测定蛋

表1  $\mu$ -和m-钙激活蛋白酶 mRNA 实时定量 PCR 结果  
Table 1 Results of real-time quantitative PCR of  $\mu$ - and m-calpain mRNA

组别	mRNA									
	基因 CANP1					基因 CANP2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
实时定量值	3	6.74	4.9	4.54	3.13	6.03	4.22	5.87	5.79	3.9
GAPDH	2.34	3.17	2.29	2.92	3.83	2.93	1.52	2.2	2.92	2.67
相对值	1.28	2.13	2.14	1.55	0.82	2.06	2.8	2.63	2	1.46

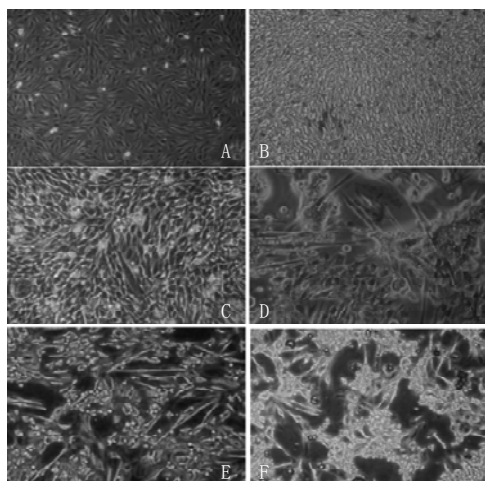
注: 1~5 分别为对照、100、500、1000 和 5000  $\text{Ca}^{2+}$  处理组。

白浓度。每个样品取 100  $\mu\text{g}$  蛋白与适量的  $5 \times$  上样缓冲液 (150mmol/L Tris-HCl、pH6.8、20% 甘油、2mmol/L 2-巯基乙醇和 0.004% 溴酚蓝) 混匀, 然后进行 PAGE 电泳。分离胶为 12% 丙烯酰胺, 0.32% 双丙烯酰胺, 375mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 0.2% 酪蛋白 (W/V), 0.04% 过硫酸氨和 0.28% TEMED。浓缩胶包括 4% 丙烯酰胺, 0.11% (W/V) 双丙烯酰胺, 380mmol/L Tris-HCl (pH6.8), 0.04% 过硫酸氨, 0.28% TEMED。电泳缓冲液为 25mmol/L Tris、192mmol/L 甘油、1mmol/L EDTA 和 1mmol/L DTT (pH8.3)。电泳条件: 4℃, 电流 4mA, 电泳时间 12h。

电泳后, 胶置于反应液中 (20mmol/L Tris-HCl、10mmol/L DTT、3mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , pH7.5), 室温条件下孵育, 同时轻轻摇动, 前 3h 每 1h 换液一次, 然后继续孵育 20h。反应结束后, 在考马斯亮蓝 (R-250) 染色液中染色 1h, 脱色过夜。

## 2 结果与分析

### 2.1 钙离子处理对细胞死亡的影响



A. 正常 L6 细胞; B. 对照组; C. 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  处理组; D. 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  处理组。

图1 钙离子处理肌细胞形态图

Fig.1 L6 myoblasts morphology image treated with different levels of calcium ion

$\text{Ca}^{2+}$  处理细胞 2d 后观察到细胞出现大量死亡, 且  $\text{Ca}^{2+}$  浓度越高细胞死亡越大。由图 1 可以看出正常 L6 细

胞呈短梭状 (A), 细胞不更换培养液生长 6d 后, 细胞大量生长铺满培养板的底层, 且出现衰亡的迹象 (B)。用 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  处理后细胞出现死亡率增加, 当  $\text{Ca}^{2+}$  升至 500  $\mu\text{mol/L}$  后细胞大量死亡 (C), 存活的细胞也是以长的肌管的形式存在 (D),  $\text{Ca}^{2+}$  浓度上升到 1000  $\mu\text{mol/L}$  以上时 (E, F) 细胞出现聚集状态且绝大多数细胞死亡, 死亡的细胞浮在培养液的表面。

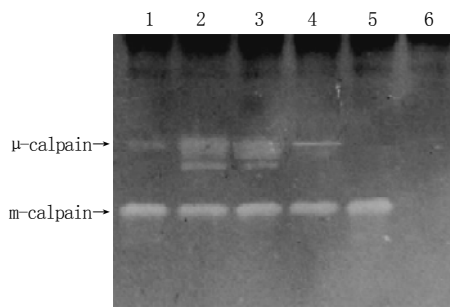
### 2.2 钙离子处理对活体肌细胞中钙激活蛋白酶 mRNA 表达的影响

实时定量 PCR 研究表明 (表 1),  $\text{Ca}^{2+}$  影响 L6 肌细胞中钙激活内源蛋白酶  $\mu$ - 和 m- 钙激活蛋白酶的表达。随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,  $\mu$ - 钙激活蛋白酶的表达量也出现上升趋势, 当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$  时, mRNA 含量达到最高, 随后有所下降。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 5000  $\mu\text{mol/L}$  时  $\mu$ - 钙激活蛋白酶 mRNA 表达量明显低于对照组, 其原因可能与 L6 细胞死亡有关。m- 钙激活蛋白酶 mRNA 表达情况与  $\mu$ -calpain 相似,  $\text{Ca}^{2+}$  处理也可以促进其表达, 但是由于细胞死亡增加, 当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度高于 1000  $\mu\text{mol/L}$ , 处理组中 m- 钙激活蛋白酶 mRNA 表达量低于对照组。从本研究的结果看出在不导致肌纤维死亡的前提下,  $\text{Ca}^{2+}$  处理除了可以激活蛋白形式的钙激活蛋白酶外, 还可以促进 mRNA 水平的表达。

### 2.3 钙离子处理对钙激活蛋白酶活性的影响

由于酪蛋白是钙激活蛋白酶的良好底物, 酪蛋白酶原分析的原理是将酪蛋白铺在含有半胱氨酸蛋白酶抑制剂和还原剂的 PAGE 胶上, 肌肉中的蛋白抽提物在 4℃ 条件下, 于 PAGE 胶上进行活性电泳, 活性形式和酶原形式的钙激活蛋白酶都在胶上排列。然后, 在含有足以激活  $\mu$ - 和 m- 钙激活蛋白酶的钙离子的反应条件下, 激活的  $\mu$ -calpain 降解 PAGE 胶上的酪蛋白。在含有钙激活蛋白酶的位置, 胶上的酪蛋白被分解, 考马斯亮蓝染色时不着色, 从而在酪蛋白着色的 PAGE 胶上形成亮的分解条带。

从图 2 可以看出, 当用低浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  处理时 (小于 1000  $\mu\text{mol/L}$ ), 由于  $\text{Ca}^{2+}$  的激活作用,  $\mu$ - 钙激活蛋白酶降解酪蛋白底物的能力明显增强, 而当钙离子浓度高于 1000  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\mu$ - 钙激活蛋白酶发生部分降解, 钙离子为 5000  $\mu\text{mol/L}$  和 10000  $\mu\text{mol/L}$  时,  $\mu$ - 钙激活蛋白酶则发生完全降解。钙离子对 m- 钙激活蛋白酶的影响不大,

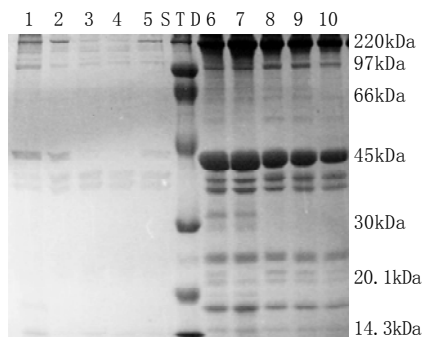


1~6 泳道分别是 500  $\mu\text{mol/L}$  NaCl, 500、500、1000、5000 和 10000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CaCl}_2$  处理的牛肉肌束。

图2 不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  处理肌束钙激活蛋白酶酪蛋白底物酶原分析  
Fig.2 Casein zymography of beef muscle treated with different levels of calcium ion

只有  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 10000  $\mu\text{mol/L}$  组发生了完全降解。本研究结果表明, 当用一定浓度  $\text{Ca}^{2+}$  处理肌束时, 由于  $\mu$ -钙激活蛋白酶可以被  $\mu\text{mol/L}$  级  $\text{Ca}^{2+}$  激活, 因而促进了对酪蛋白底物的降解, 但是在高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  作用下,  $\mu$ -钙激活蛋白酶因迅速降解而失去活性。 $m$ -钙激活蛋白酶只有在  $\text{mmol/L}$  级  $\text{Ca}^{2+}$  作用下才可以激活, 所以  $\text{Ca}^{2+}$  对其的影响较小。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 10  $\text{mmol/L}$  时,  $m$ -钙激活蛋白酶也会因降解而失去蛋白分解能力。

#### 2.4 $\text{Ca}^{2+}$ 处理对肌束中蛋白分解的影响



PAGE 胶的中间为标准分子量蛋白 (STD), 5~1 泳道分别为 500  $\mu\text{mol/L}$  NaCl 对照组、500、1000、5000 和 10000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  处理组上清液中的蛋白含量; 10~6 泳道分别是 500  $\mu\text{mol/L}$  NaCl 对照组、500、1000、5000 和 10000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  处理组沉淀中的蛋白含量。

图3 不同  $\text{Ca}^{2+}$  处理对肌肉蛋白质 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE electropherogram of beef muscle treated with different levels of calcium ion

从图 3 可以看出, 随  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高, 肌束蛋白沉淀中蛋白出现不同程度的降解。当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度高于 5  $\text{mmol/L}$  时, 肌束沉淀物中出现明显 30 kDa 和 20 kDa 降解产物。与此同时, 上清液中 45 kDa 分子量的片段明显增多, 表明降解后的较大的片段进入上清中, 且在 10  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  处理的肌束的上清液中也发现低于 14.3 kDa 的片段。

宰后肌肉在成熟过程中维持肌原纤维内部结构的骨架蛋白受到内源酶的水解, 致使超微结构发生变化<sup>[9-10]</sup>。

成熟过程中肌钙蛋白 T 降解成 27~32 kDa 的降解产物, 这些降解片段的生成速度和数量可作为牛肉嫩度改善的标志<sup>[11-12]</sup>。由图 3 可以看出, 随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高, 30 kDa 片段的量显著升高, 与  $\text{Ca}^{2+}$  激活  $\mu$ -calpain 和  $m$ -calpain 提高酶活性的结果一致。

### 3 结 论

3.1 500  $\mu\text{mol/L}$  以内的钙离子处理肌束可以提高肌束中  $\mu$ -钙激活蛋白酶的活性, 当高于此浓度时,  $\mu$ -钙激活蛋白酶因发生自动降解而失活。

3.2 钙离子对  $m$ -钙激活蛋白酶活性影响不大, 只有钙离子浓度达到 10  $\text{mmol/L}$  时才会导致自动降解而失活。

3.3 钙离子可以加速肌肉中蛋白质的降解, 且浓度越高, 降解越明显。

3.4 钙离子处理活体肌细胞, 在没有产生明显细胞死亡的情况下, 可导致  $\mu$ -钙激活蛋白酶和  $m$ -钙激活蛋白酶 mRNA 水平表达的增加。

### 参考文献:

- [1] SHACKELFORD S D, WHEELER T L, MEADE M K. Consumer impressions of tender select beef[J]. J Anim Sci, 2001, 79: 2605-2615.
- [2] LONERGAN S M, HUFF LONERGAN E. Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from brangus cattle[J]. J Muscle Food, 2001(12): 121-136.
- [3] KOOHMARAIE M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat[J]. Meat Sci, 1996, S193-S201.
- [4] TAKAHASHI K. Structure weakening of skeletal muscle tissue during postmortem aging of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization[J]. Meat Sci, 1996, 43: s67-s80.
- [5] TAKAHASHI K. Mechanism of meat tenderization during postmortem aging: calcium theory[R]. Meat Sci, 1999, 45th ICoMST: 230-235.
- [6] TAYLOR R G, GEENSINK G H, THOMPSON V F, et al. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?[J]. J Anim Sci, 1995, 73: 1351-1367.
- [7] HUFF-LONERGAN E, TOMIKO M, DIRK D B. Proteolysis of specific muscle structural proteins by  $\mu$ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem muscle[J]. J Anim Sci, 1996, 74: 993-1008.
- [8] VEISETH E, SHACKELFORD S D, WHEELER T L, et al. Effect of postmortem storage on  $\mu$ -calpain and  $m$ -calpain in ovine skeletal muscle[J]. J Anim Sci, 2001, 79: 1502-1508.
- [9] TAYLOR R G, KOOHMARAIE M. Effect of postmortem storage on the ultrastructure of endomysium and myofibrils in normal and callipyge longissimus[J]. J Anim Sci, 1998, 76: 2811-2817.
- [10] TAYLOR R G, LABAS R, SMULDERS F J M, et al. Ultrastructural changes during aging in M. longissimus thoracis from moose and reindeer[J]. Meat Science, 2002, 60: 321-326.
- [11] GEENSINK G H, MAREKO M H D, MORTON J D, et al. Effects of stress and high voltage electrical stimulation on tenderness of lamb M. longissimus[J]. Meat Sci, 2000, 57: 265-271.
- [12] LONERGAN S M, HUFF LONERGAN E. Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from brangus cattle[J]. J Muscle Foods, 2001(12): 121-136.