

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.07.040

牛肉肌纤维类型差异及成熟过程中组织蛋白酶活性研究

丰永红 李海鹏 张松山 谢鹏 徐晨晨 孙宝忠
(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要:为考察不同部位牛肉肌纤维类型的差异、比较两种肌纤维分型方法、研究肌纤维类型对宰后成熟过程中组织蛋白酶活性的影响,选取新疆褐牛冈下肌、菱形肌、背最长肌、背阔肌、腰大肌、股二头肌、半腱肌、腓肠肌共8个部位的牛肉,分别用ATPase染色法和RT-PCR法检测肌纤维类型组成和MyHC基因相对表达量,用Image-Pro Plus 6.0软件分析ATPase染色图像,计算各类型肌纤维的面积和直径,并检测各部位牛肉宰后成熟0、3、7、9、11、14 d时组织蛋白酶B、L、H活性。结果表明:新疆褐牛不同部位肉的肌纤维类型组成不同,两种肌纤维类型的分型方法在确定I型肌纤维数量时呈极显著相关,在8个部位牛肉中,均没有发现MyHC II b型基因的表达,ATPase染色法确定的II B型肌纤维数量百分比与RT-PCR法确定的MyHC II x型基因表达百分比呈显著正相关,与MyHC II a型基因表达百分比呈极显著负相关。两种确定肌纤维类型的方法存在一定的相关性,ATPase染色法确定的II B型肌纤维可能与RT-PCR法确定的MyHC II x基因相对应。在宰后成熟过程中,各部位牛肉组织蛋白酶活性基本表现为先升高、后降低的趋势,不同部位的牛肉达到活性最大值的时间不同;组织蛋白酶H活性非常低,相比于组织蛋白酶B和L,其在宰后成熟中的作用可以忽略不计,组织蛋白酶L活性是B活性的2.5~4倍,在宰后成熟中起更重要的作用。I型肌纤维数量与宰后9、11 d组织蛋白酶B和L活性呈显著甚至极显著正相关关系,在新疆褐牛各部位肉中含有的I型肌纤维越多,组织蛋白酶活性越高,越有利于牛肉宰后成熟嫩化。

关键词: 新疆褐牛; 肌纤维类型; 宰后成熟; 组织蛋白酶; ATPase染色法; RT-PCR法

中图分类号: TS251.5⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)07-0355-10 OSID: 

Difference of Muscle Fiber Types in Various Beef Cuts and Change of Cathepsins Activity during Postmortem Ageing

FENG Yonghong LI Haipeng ZHANG Songshan XIE Peng XU Chenchen SUN Baozhong
(Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Lysosomal cathepsins are enclosed in the lysosomes, which could be released into the cytosol as a consequence of lysosomal disruption occurring after cell death. It was approved that cathepsins played an important role in the degradation of myofibrillar protein in beef during postmortem aging. Despite its significance, there was little information about the correlation between cathepsins and muscle fiber types in beef during postmortem aging. The objectives were to compare the results of ATPase staining and RT-PCR in typing muscle fibers, find out the relationship between muscle fiber type and the activity of cathepsins, and reveal the possibility that muscle fiber types affect meat quality through cathepsin activity. Eight different parts of the muscles (*Semitendinosus*, *Latissimus dorsi*, *Longissimus thoracis*, *Infraspinatus*, *Biceps femoris*, *Gastrocnemius*, *Romboideu* and *Psoas major*) in Xinjiang brown cattle were removed from the left side of each carcass. The muscle fiber type composition, fiber diameter and fiber cross-sectional area were detected by ATPase staining, and MyHC gene expression of each muscle was determined by RT-PCR. The changes of cathepsin B, L, H activity were investigated at 0 d, 3 d, 7 d, 9 d, 11 d and 14 d during postmortem aging, respectively. The results showed that the composition of muscle fiber types in different parts of Xinjiang brown cattle was quite different. There was

收稿日期: 2019-09-30 修回日期: 2019-10-31
基金项目: 国家自然科学基金项目(31571910)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2016ywf-yb-13)、国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-37)和河北省现代农业产业技术体系肉牛产业创新团队建设项目(HBCT2018130204)
作者简介: 丰永红(1977—),女,博士生,主要从事牛肉质量及安全研究,E-mail: yike556@163.com
通信作者: 孙宝忠(1964—),男,研究员,博士生导师,主要从事优质畜产品质量与安全研究,E-mail: baozhongsun@163.com

a significant correlation ($p < 0.01$) between the two methods when they were used to quantify the muscle fiber type I and MyHC I gene expression. However, muscle fiber type II and the expression of MyHC II gene could not match very well. The proportion of muscle fiber II B was negatively correlated ($p < 0.05$) with the expression of MyHC II a and positively correlated ($p < 0.05$) with the expression of MyHC II x. MyHC II b was not found in eight muscles of Xinjiang brown cattle. It could be inferred that there was a correlation between the expression pattern of MyHC gene and the location of muscle. The activity of cathepsin was increased gradually during senescence after death and reached its highest value after 9 days. The content of cathepsin H in bovine muscle was extremely rare. Cathepsin L's activity was about 2.5 ~ 4 times of cathepsin B's activity, and more than ten times of cathepsin H's activity. There was a significant positive correlation ($p < 0.05$) between the proportion of muscle fiber I and the activities of cathepsin B and L after 9 days and 11 days. Further investigation was necessary to identify the function of cathepsins in the relationship between muscle fiber type and tenderness of beef.

Key words: Xinjiang brown cattle; muscle fiber type; postmortem ageing; cathepsins; ATPase dyeing; RT-PCR

0 引言

肌纤维是组成肌肉的基本单位,其类型、直径、密度及完整性与肉的嫩度密切相关,肌束中肌纤维数越多,肌纤维越细,肉就越嫩^[1]。通常按照形态或生理功能将肌纤维分为不同的类型。早期,肉类科学家依据肌肉颜色将骨骼肌分为红肌和白肌两种类型^[2],肌肉色泽与肉品质及动物生长性能有关,高比例的红肌纤维在一定程度上代表较好的肉品质,而高比例的白肌纤维则更多地代表较强的生长性能^[3]。随着对肌纤维研究的深入,依据其收缩和代谢特点进一步将肌纤维分为慢收缩氧化型(Slow oxidative,SO)、快收缩氧化型(Fast oxidative,FO)、快收缩氧化酵解型(Fast oxido-glycolytic,FOG)及快收缩酵解型(Fastglycolytic,FG)^[4]。目前较为广泛应用的ATP酶染色法将肌纤维分为I、II A、II B,也是基于肌纤维收缩特点的分型。利用现代分子生物学方法,根据肌纤维所含肌球蛋白重链(Myosin heavy chain,MyHC)的不同亚型,将肌纤维分为I、II a、II x 和 II b,代谢类型从氧化到酵解过渡,收缩速度依次增加^[5]。因此,可以将MyHC基因作为分子标记,利用RT-PCR分析方法研究肌纤维类型及组成,相比于其他组化染色法该方法既省时又省力^[6]。

依据不同肌纤维类型的代谢特性以及MyHC基因亚型的不同,肌纤维的分型方法主要有:组织化学法(ATPase法)、免疫印迹法、免疫组化法、RT-PCR法、单向凝胶电泳后LC-MS/MS(液相色谱-串联质谱)法^[7-8]。尽管LC-MS/MS法所得总肽数与免疫组化法所得结果呈极高度正相关,但由于受个别蛋白质和肽的限制,该法仍不能用于MyHC的定量研究^[7-8]。尽管肌纤维因分类方法多样而命名各异,但不同分类方法确定的肌纤维之间存在一定的

相关性,如SO型肌纤维即为I型,FO型肌纤维为II a型,FG型肌纤维为II b型,FOG型肌纤维为II x型^[9]。然而,不同分类方法所确定的肌纤维类型之间是否存在完全对应关系尚有待进一步研究^[10]。

近年来研究表明,肌肉中不同肌纤维类型的比例可影响宰后肉的嫩度^[11],较高的I型肌纤维和较低的II B型肌纤维比例有利于降低肉的剪切力、提高肉的嫩度^[12]。一般认为,宰后成熟过程是肌肉内源蛋白质水解酶的作用所致,肉的嫩化是一个复杂的物理化学(包括pH值和离子强度)和生物化学(细胞内蛋白水解酶)过程,在这个过程中,肌原纤维结构被破坏,细胞骨架逐渐消失^[13]。组织蛋白酶存在于溶酶体中,溶酶体膜在成熟过程中会遭到破坏,使组织蛋白酶从中释放出来,与肌原纤维蛋白接触^[14-16]。因此,很多学者认为,在宰后成熟过程中,钙激活酶对肌肉骨架蛋白进行初步降解,组织蛋白酶在成熟后期对骨架蛋白进行进一步降解^[17-19]。更深入的研究表明,在宰后成熟过程中溶酶体膜稳定性降低,组织蛋白酶从中释放出来后被活化,进而诱导凋亡反应的发生^[20]。位于细胞溶酶体中的组织蛋白酶大约有16种,依据活性位置可分为4类:天冬氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、金属蛋白酶,与肌肉成熟有关的主要是组织蛋白酶B(EC 3.4.22.1)、L(EC 3.4.22.15)、H(EC 3.4.22.16)和D(EC 3.4.23.5)。B、H、L属半胱氨酸类组织蛋白酶,在活体内由半胱氨酸蛋白酶抑制剂调节^[21]。关于组织蛋白酶的提取和活性检测已有大量研究,但肌纤维类型组成与组织蛋白酶之间的关系尚未见报道,本文通过考察不同肌纤维类型组成的各部位牛肉在宰后成熟过程中组织蛋白酶B、H、L活性的变化,研究肌纤维类型与组织蛋白酶之间的关系,进而探讨不同类型的肌纤维通过其组织蛋白酶活性差异影响牛肉宰后成熟过程中嫩度变化的可能性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牛肉样品取自新疆伊宁县伊新牛羊养殖专业合作社。选取 6 头 30 月龄新疆褐牛公牛,按照 GB/T 19477—2004《牛屠宰操作规程》^[22]屠宰后热剔骨分割取左半胴体的冈下肌、菱形肌、腰大肌、背最长肌、背阔肌、腓肠肌、半腱肌和股二头肌共 8 个部位肉,按以下操作取样:切 2 cm × 1.5 cm × 1.5 cm 大小的肉样各 3 条迅速置于液氮中冷冻以固定形状,然后用铝箔包装投入液氮中冷冻,再转入 -80℃ 冰箱(用于 ATPase 染色);取约 100 mg 肉样 3 块,置于液氮冷冻后转入 -80℃ 冰箱(用于 RT-PCR 分型);取约 10 g 肉样铝箔包好后液氮冷冻,转入 -80℃ 冰箱保存,用于组织蛋白酶活性检测。另取约 100 g 肉样真空包装后置于 4℃ 冰箱中成熟,分别在宰后的 3、7、9、11、14 d 取样,取样时切取 10 g 左右样品铝箔包好后先用液氮迅速冷冻,然后转移到 -80℃ 超低温冰箱内,用于检测组织蛋白酶活性。所有样品按照保存要求置于干冰或冰块中运回实验室。

主要试剂:7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)、Z-精氨酸-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐、Z-苯丙氨酰-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐、L-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐,均购自 Sigma 公司。RNAPrep Pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒 D431、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(去基因组)KR106、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 FP205,均购自天根生化科技(北京)有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 试验设备

FJ200-S 型高速均质机(北京维欣仪奥科技有限公司);LG10-24A 型高速离心机(北京京立离心机有限公司);XS105 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);leica CM1860 型冰冻切片机(德国莱卡公司);leica DM6000 B 型正置荧光显微镜(德国莱卡公司);HH-4 型可调恒温数显水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);Tecan Infinite 200 Pro 型多功能酶标仪(Tecan 集团有限公司);LineGene 9600 型荧光定量 PCR 仪(杭州博日科技有限公司);OSE-Y30 型高速组织研磨器、OSE-DB-01 加热型金属浴、OSE-MC8 微型离心机(天根生化科技(北京)有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 肌纤维类型、直径、面积测定

肌纤维类型分型采用 ATP 酶组织化学染色法

中的碱性染色法^[23-24]:采用莱卡冰冻切片机连续切片,制备 8 μm 厚的新鲜切片,室温(20℃)晾干后,加入碱性 ATP 孵育液(ATP 酶工作液(0.01 mol/L 甘氨酸-氯化钠溶液 50 mL,1 mol/L 氯化钙溶液 10 mL,0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 35 mL,pH 值为 9.5~9.6)10 mL 加入三磷酸腺苷二钠 0.3 g 溶解,pH 值 9.45),37℃ 培育 2 h。除去 ATP 酶工作液,置于 1% 氯化钙溶液 6 min;除去氯化钙溶液,置于 2% 氯化钴溶液,蒸馏水洗 3 次,每次 5 min;硫化铵溶液(10 mL 蒸馏水加入 8 滴硫化铵)显色约 1 min;自来水洗 3 次,乙醇脱水二甲苯透明后用树胶封片,生物显微镜 100、400 倍下镜检并拍照。本试验中,II B 型纤维被染成深褐色,II A 型纤维被染成浅褐色,I 型纤维颜色最浅。

1.3.2 MyHC 基因相对表达量测定

引物设计:在 NCBI(美国国立生物技术信息中心)官网上查询基因序列,并采用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物,具体见表 1。

提取样本总 RNA:使用天根生化科技(北京)有限公司的动物组织总 RNA 提取试剂盒(DP431)提取样本的 RNA,试验操作按照产品说明书进行,略有改动。提取的 RNA 浓度用酶标仪检测,后冻存于 -80℃。

逆转录合成 cDNA:使用天根生化科技(北京)有限公司的 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(KR106)进行 cDNA 逆转录,试验操作按照产品说明书进行,略有改动。逆转录 cDNA 保存于 -20℃ 备用。

RT-PCR:使用天根生化科技(北京)有限公司的 SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 FP205 进行扩增,试验操作按照产品说明书进行,略有改动。扩增程序:95℃、15 min,(95℃、10 s,60℃、32 s)×40 个循环。逆转录体系:10 μL 2×SuperReal 荧光定量预混试剂增强版;0.5 μL 上游引物(10 μmol/L);0.5 μL 下游引物(10 μmol/L);2 μL cDNA 模板;加入去 RNA 酶的双蒸水至 20 μL。

引物筛选:将各样本 cDNA 混合后进行 5 倍梯度稀释。稀释后样品各取 2 μL 作模板,分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增,同时在 60~95℃ 进行熔解曲线分析。

样品 RT-PCR 检测:将各样品 cDNA 稀释 10 倍后取 2 μL 作模板,分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增,每个样品重复检测 3 次。同时在 60~95℃ 进行熔解曲线分析。

根据 RT-PCR 原始检测结果,基因相对表达量

表 1 RT-PCR 分析用 MyHC 引物序列

Tab.1 Primers used for real-time PCR analysis of MyHC gene expression

类别	引物	产物大小/bp	基因序列
MyHC-I	上游:5'-GACCGGAAAGTTGGCGTCTG-3'	465	AB059400
	下游:5'-TCGTGCCCCACCTTCACCC-3'		
MyHC-II a	上游:5'-AGGTGTAATGGCGTGCTA-3'	385	AB059398.1
	下游:5'-TGAAGGCTCGGATGTTGT-3'		
MyHC-II b	上游:5'-AGAATCCTGTATGCGGACTTCA-3'	126	AY227972
	下游:5'-GTGGTCAATGTCAATAGACCCATA-3'		
MyHC-II x	上游:5'-GCCCACTTCTCCCTCATTCACT-3'	201	AB059399.2
	下游:5'-ACCCTTCTTCTTGCCACCTTTC-3'		
GAPDH	上游:5'-CAAGTTC AACGGCACAGTCA-3'	367	NM_001034034.2
	下游:5'-GGTCATAAGTCCCTCCACGAT-3'		

计算公式为

$$F = 2^{-[A - B - (C - D)]}$$

式中 A——待测组目的基因平均 Ct 值
B——待测组管家基因平均 Ct 值
C——对照组目的基因平均 Ct 值
D——对照组管家基因平均 Ct 值

1.3.3 组织蛋白酶活性测定

组织蛋白酶活性测定参考文献[25]的方法并加以改动。首先提取肌浆蛋白,提取方法:称取 2 g 绞碎的肉样,加入 10 mL 缓冲液 A (50 mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl, pH 值 7.5)、10 mmol/L 的 β-巯基乙醇、1 mmol/L EDTA),用高速分散机均质两次,每次 30 s。置于冷冻离心机在 4℃、10 000 g 下离心 20 min,收集上清液,用玻璃棉过滤,滤液作为组织蛋白酶的粗提取物。

组织蛋白酶 L、B、H 活力的测定:反应在 218 μL 的混合液中进行,反应混合液包括 98 μL 0.1% Brij35 (月桂醇聚氧乙烯醚)、40 μL 0.4 mol/L 含 5 mmol/L EDTA 的缓冲液 (L+B、B 及 H 缓冲体系的 pH 值分别为 5.5、6.0、6.8)、20 μL 10 mmol/L L-Cys (L-半胱氨酸)和 20 μL 酶的粗提取液。将反应混合液置于 40℃ 水浴中 2 min 后分别加入底物 (Z-苯丙氨酰-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐 (B+L)、Z-精氨酸-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐 (B)和 L-精氨酸-7-氨基-4-甲基香豆素盐酸盐 (H))40 μL,继续在 40℃ 水浴中反应 30 min 后加入 300 μL 终止液 (0.1 mol/L 乙酸钠和 0.1 mol/L 氯乙酸钠, pH 值 4.3)终止反应。在激发波长为 380 nm,发射波长 460 nm 条件下测定荧光强度。酶活力单位 (U) 定义为每分钟内催化 1 μmol AMC 转化为产物所需的酶量。

1.4 数据处理与统计分析

以 Image J 图像分析软件分析 I 型、II A 型和 II B 型肌纤维数量百分比。计数时每个切片至少取

5 个区域,每个样品需 500 个以上肌纤维。用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件分析 I 型、II A 型和 II B 型肌纤维的面积和直径,每个切片至少取 5 个区域。

采用 SPSS 20.0 及 Microsoft Excel 2010 软件对试验数据进行统计分析,结果以平均值 ± 标准差表示;对各项指标进行 Duncan's 分析,采用 SPSS 皮尔逊 (Pearson)法进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 各部位牛肉肌纤维类型组成

2.1.1 ATP 酶法分析各部位牛肉肌纤维类型组成

典型的 ATP 酶组织化学法碱染色 (pH 值 9.45) 照片见图 1,除腰大肌放大倍数为 10 × 40 倍外,其他均为 10 × 10 倍,图中标尺为 25 μm。图中 II B 型肌纤维、II A 型肌纤维、I 型肌纤维的颜色由深到浅。从图中可以看出,各部位肉的肌纤维类型组成差别较大,大部分部位牛肌肉由 3 种肌纤维类型组成,但组成比例及面积和直径有差异;而冈下肌没有 II A 型肌纤维,菱形肌几乎没有 II B 型肌纤维,腰大肌的肌纤维面积和直径明显小于其他部位肉的肌纤维面积和直径,且从照片看腰大肌的肌纤维之间间隙较大,说明其结构较松散。通常认为肌纤维总数在动物出生后基本保持不变,但肌纤维类型在生长过程中持续相互转化,且其转化是环境等外界因素和机体内部因子协同调控的结果。动物出生时主要以氧化型肌纤维为主,一些肌纤维在生长过程中具有由氧化型向酵解型转化的能力,一些后天因素会导致肌纤维类型整体由氧化型向酵解型转化,且早期生长阶段是肌纤维类型转变的重要阶段^[26]。总体来说,在动物的成长过程中,肌纤维遵循以下路径发生类型的转化:I ↔ II A ↔ II X ↔ II B^[27-28]。而低甲状腺激素水平和长期耐力训练可能会导致肌纤维类型由快肌向慢肌转化,即按照 II B ↔ II X ↔ II A ↔ I 的方向

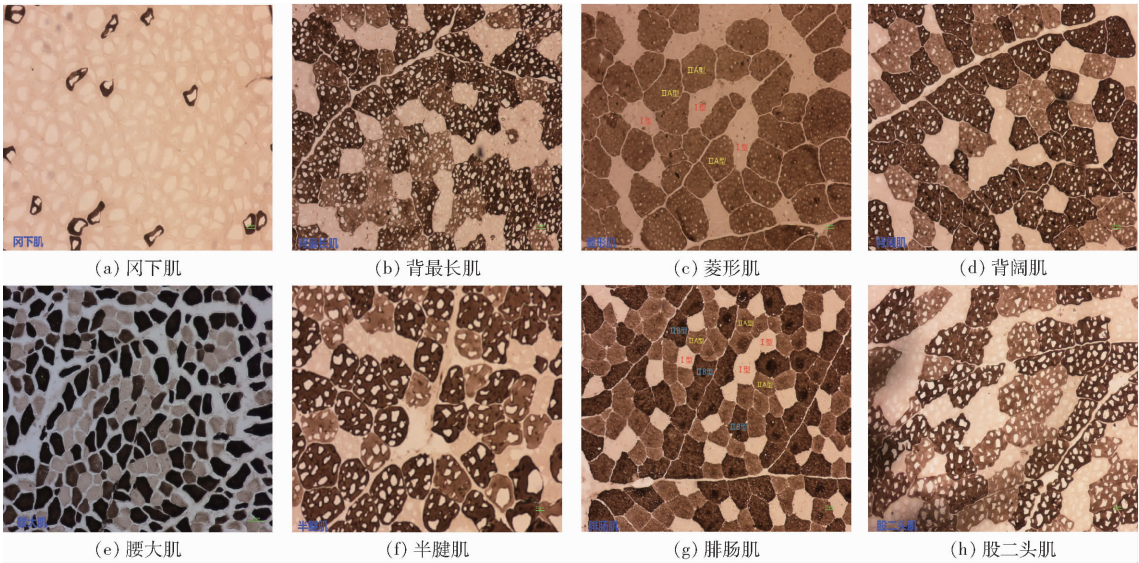


图 1 各部位肉 ATP 酶染色照片

Fig. 1 Pictures of various beef cuts stained for ATPase reactivity

转化^[29-30]。本研究的结果也表明,新疆褐牛的不同部位肉肌纤维类型组成存在较大的差异,这与学者对其他动物的研究结果相一致^[23,31-32]。

对新疆褐牛不同部位肉的各肌纤维类型数量进行分析,结果见图 2。可以看出不同部位肌肉间肌纤维类型的组成显著不同($p < 0.05$),最为典型的是冈下肌和菱形肌,冈下肌由 I 型肌纤维和 II B 型肌纤维组成,且数量比与其他部位肉差异显著($p < 0.05$);菱形肌基本上由 II A 型肌纤维和 I 型肌纤维组成,II B 型肌纤维仅占到 2.12%,II B 和 II A 型肌纤维的数量比均与其他部位肉差异显著($p < 0.05$)。从各部位肉的主要肌纤维类型来分析,半腱肌和背最长肌均以 II B 型肌纤维为主要类型,分别占 47.87% 和 40.85%,而冈下肌、腰大肌、背阔肌和股二头肌以 I 型肌纤维为主,分别占到 79.69%、43.06%、42.63% 和 39.75%,菱形肌和腓肠肌则以 II A 型肌纤维为主,分别占到 61.43% 和 42.10%。其中半腱肌、背最长肌和腰大肌的肌纤维类型组成与郎玉苗^[33]对西门塔尔牛这 3 个部位肌肉的研究基本一致。

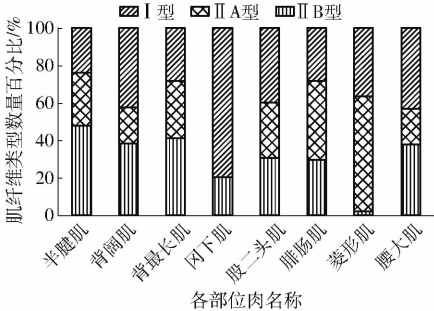


图 2 各部位牛肉肌纤维类型数量比

Fig. 2 Proportion of different muscle fiber types in various beef cuts

2.1.2 各部位牛肉肌纤维面积和直径

由图 3(图中不同字母表示同一肌纤维类型不同部位间差异显著, $p < 0.05$,下同)可以看出,在各部位肉中,大部分以 II B 型肌纤维面积最大, I 型肌纤维面积最小, II A 型肌纤维面积居中。8 个部位相比较,菱形肌的 II A 型肌纤维面积显著大于其他部位;菱形肌的 I 型肌纤维面积最大,但与背最长肌和股二头肌没有显著差异;II B 型肌纤维面积最大的是背最长肌,但与半腱肌、背阔肌和股二头肌的 II B 型肌纤维面积差异不显著;冈下肌的 II B 型肌纤维面积显著小于其他部位;腰大肌的 II A 型肌纤维显著小于其他部位;腰大肌的 I 型肌纤维面积最小,但与腓肠肌和冈下肌的 I 型肌纤维面积差异不显著。其中,股二头肌、菱形肌的肌纤维面积标准差较小,说明不同个体间的股二头肌肌纤维面积差异和不同个体间的菱形肌肌纤维面积差异均较小,而腰大肌、背最长肌的肌纤维面积标准差较大,说明不同个体间的腰大肌肌纤维面积差异和不同个体间的背最长肌肌纤维面积差异均较大。

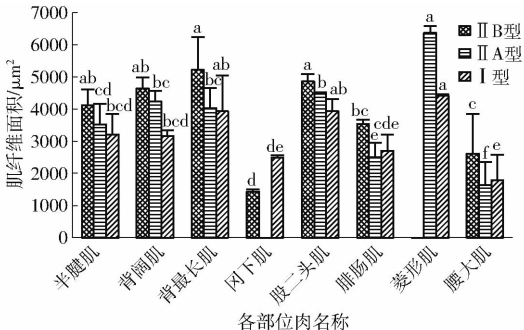


图 3 各部位牛肉肌纤维面积

Fig. 3 Cross-sectional area of different muscle fiber types in various beef cuts

结合各肌纤维类型单个肌纤维的面积和数量比,计算各部位肉不同肌纤维类型占整个部位肉横截面的面积百分比,结果见图 4。冈下肌的 I 型肌纤维占有绝对优势,菱形肌依然是 II A 型肌纤维占据优势。半腱肌、腰大肌、背最长肌、背阔肌的 II B 型肌纤维占到一半左右。而股二头肌的 3 种肌纤维类型面积百分比基本均分。腓肠肌的 II A 型和 II B 型面积百分比相当(约 36%),略大于 I 型面积比。

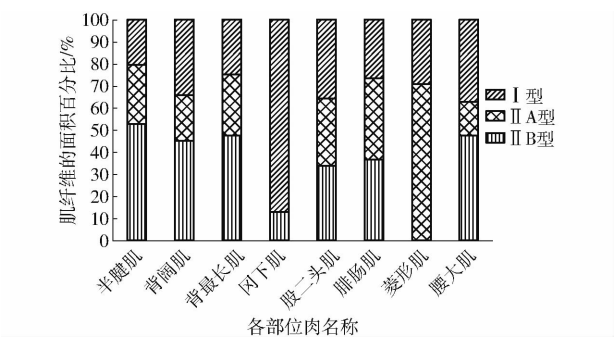


图 4 各部位牛肉不同肌纤维类型的面积百分比
Fig. 4 Area proportion of different muscle fiber types in various beef cuts

各部位肉肌纤维直径见图 5,与肌纤维面积的规律相类似。肌纤维直径最大的为菱形肌,其次为股二头肌、背最长肌、背阔肌、半腱肌,然后为腓肠肌、冈下肌、腰大肌。腰大肌的标准差较大,说明不同个体牛之间的腰大肌直径差异较大。

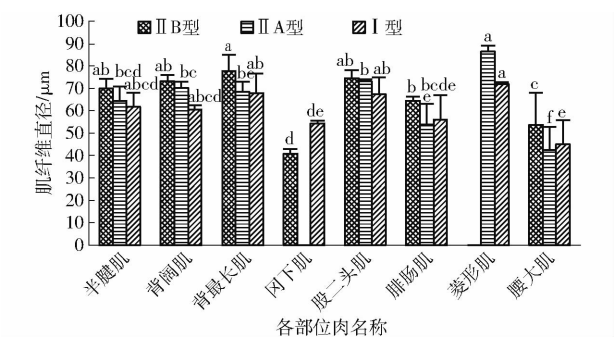


图 5 各部位牛肉肌纤维直径
Fig. 5 Diameter of different muscle fiber types in various beef cuts

2.1.3 MyHC 基因表达量

图 6 表明,冈下肌的 I 型 MyHC 基因表达量显著高于其他部位,而菱形肌的 II a 型 MyHC 基因表达量显著高于其他部位,II x 型 MyHC 基因在半腱肌、腓肠肌和腰大肌中有比较突出的表达。II b 型 MyHC 基因在 8 个部位肉中均没有表达,这与早期对牛骨骼肌的研究结果相一致^[34-35]。

文献[36]对 18~24 月龄公牛的背最长肌、咬肌、膈、眼外肌等 10 个部位进行研究,仅在眼外肌中发现了 MyHC II b 型基因的表达,而 PICARD 等^[7]对 22 头公牛的半腱肌和背最长肌进行研究,仅在 5 头

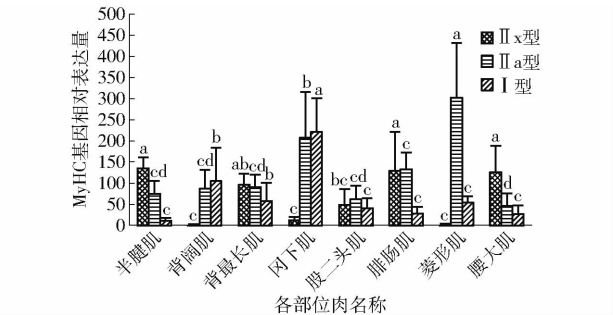


图 6 各部位牛肉 MyHC 基因相对表达量
Fig. 6 MyHC expression in various beef cuts

中发现 MyHC II b 型基因的表达。国内研究者对西杂牛背最长肌、半腱肌和比目鱼肌的研究^[37]以及文献[8]利用 LC-MS/MS 和免疫组化两种方法对牛背最长肌的研究均没有发现 MyHC II b 型基因的表达。文献[38]在马的臀中肌中也未发现 MyHC II b 亚型的表达。因此研究者曾假设 II b 型作为 MyHC 的最快同型仅在小型哺乳动物中表达的原因是其相对于大型哺乳动物具有较快的肌肉收缩^[30],而牛和马科动物更适于慢氧化条件^[39]。对比本研究与其他文献的结果进一步说明,不同品种不同年龄不同部位牛肉的肌球蛋白重链亚型表达存在差异。

图 7 为各部位肉中不同类型 MyHC 基因表达所占的百分比,其中菱形肌、冈下肌和背阔肌 3 个部位的 II x 型只有少量表达,而菱形肌的 II a 型占到 84.20%,冈下肌和背阔肌的 I 型和 II a 型基本呈均分模式。腰大肌和半腱肌的 MyHC 基因表达以 II x 为主,分别占到 60.95% 和 63.07%;腓肠肌的整体表达模式与腰大肌和半腱肌类似,II 型 MyHC 基因占到 90%。背最长肌和股二头肌的 3 种基因表达百分比分配类似,II x 和 II a 占到 30%~40%,I 型所占百分比低于 30%。所取 8 个部位肉在牛胴体的位置从前躯到后躯分别按照以下顺序排列:前躯的菱形肌和冈下肌;中躯的背阔肌、背最长肌和腰大肌;后躯的股二头肌、半腱肌和腓肠肌。可以推测在新疆褐牛中,MyHC 基因表达模式可能与部位肉所处的躯体位置存在极大相关性,如作为前躯的菱形肌和冈下肌,以 I 型和 II a 型为主,II x 型的

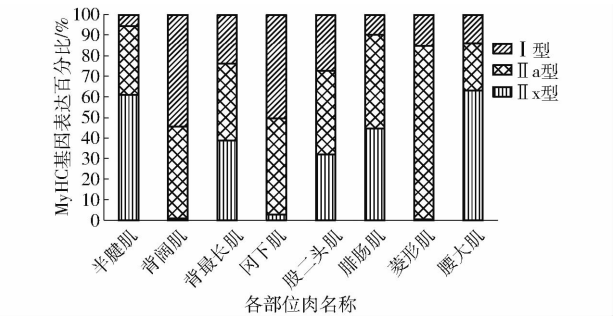


图 7 各部位牛肉 MyHC 基因相对表达百分比
Fig. 7 Percentage of MyHC expression in various beef cuts

表达比例极少;后躯的股二头肌、半腱肌和腓肠肌,Ⅰ型的表达比很少,以Ⅱ型为主。这可能与前中后躯不同部位肌肉的生理功能不同相关,MyHC 基因表达模式与部位肉所处躯体位置的具体关系有待更深入的研究。

2.2 两种方法肌纤维类型的相关性

对新疆褐牛各部位肉肌纤维类型组成和 MyHC

基因型的相对表达量做相关性分析,结果列于表 2。MyHC Ⅰ型基因的表达式与Ⅰ型肌纤维的数量百分比和面积百分比均呈极显著正相关关系。MyHC Ⅱa 型基因的表达式与ⅡB 型肌纤维的数量百分比和面积百分比均呈极显著负相关关系;与ⅡA 型肌纤维的数量百分比和面积百分比均呈正相关关系,但相关性不显著。

表 2 两种分型方法肌纤维类型的相关性
Tab.2 Relativity between muscle fiber types and MyHC expression

参数		MyHC 基因表达量			MyHC 基因表达百分比		
		I	Ⅱ a	Ⅱ x	I	Ⅱ a	Ⅱ x
肌纤维数量百分比	I	0. 802 **	0. 272	- 0. 536	0. 709 *	0. 122	- 0. 569
	Ⅱ A	- 0. 568	0. 418	0. 095	- 0. 612	0. 553	0. 038
	Ⅱ B	- 0. 335	- 0. 805 **	0. 545	- 0. 172	- 0. 775 **	0. 650 *
肌纤维面积百分比	I	0. 837 **	0. 285	- 0. 458	0. 665 *	0. 072	- 0. 504
	Ⅱ A	- 0. 428	0. 544	- 0. 070	- 0. 466	0. 662 *	- 0. 137
	Ⅱ B	- 0. 476	- 0. 836 **	0. 558	- 0. 255	- 0. 725 *	0. 673 *

注: * 表示相关性显著($p < 0. 05$), ** 表示相关性极显著($p < 0. 01$),下同。

Ⅰ型 MyHC 基因的表达式与Ⅰ型肌纤维的数量百分比和面积百分比均呈显著正相关关系。Ⅱa 型 MyHC 基因的表达式与ⅡB 型肌纤维的数量百分比和面积百分比呈极显著和显著负相关关系;与ⅡA 型肌纤维的面积百分比均呈显著正相关关系。Ⅱx 型 MyHC 基因的表达式与ⅡB 型肌纤维的数量百分比和面积百分比均呈显著正相关关系。这说明Ⅰ型 MyHC 基因与Ⅰ型肌纤维存在对应关系,而 RT-PCR 法确定的Ⅱx 型 MyHC 基因极有可能与 ATPase 法确定的ⅡB 型肌纤维相对应。

综上结果表明,在新疆褐牛中 MyHC 基因型表达与 ATPase 法确定的肌纤维类型之间存在一定的相关性,在确定 MyHC Ⅰ型基因与Ⅰ型肌纤维时两种方法所得结果一致,而在确定Ⅱ型肌纤维和 MyHC Ⅱ型基因时两种方法所得结果并不完全一致。

2.3 组织蛋白酶 B、L、H 活性的变化

图 8~10 分别为新疆褐牛各部位肉宰后成熟过程中组织蛋白酶 B、H、L 活性的变化。从图中可以看出,3 种组织蛋白酶活性基本遵循随着宰后成熟时间的延长先增大,然后又降低的规律。这是因为组织蛋白酶存在于溶酶体中,在活体组织中并不呈现活性,机体死亡后,溶酶体遭到破坏,组织蛋白酶逐渐释放到细胞溶质中,表现为活性的逐渐升高,而在接触到底物进而发挥作用后活性又呈现出逐渐降低的趋势。文献[40]对青海牦牛宰后成熟 8 d 内的组织蛋白酶活性变化研究结果表明,组织蛋白酶 B、H、L 活性在 8 d 内呈现持续上升趋势,与本文对新疆褐牛的研究结果基本一致。

不同部位肉的组织蛋白酶活性存在差异,宰后不同成熟时间的变化也有所不同,但变化规律基本一致。冈下肌的组织蛋白酶 B 活性最高,且与其他部位肉的活性存在显著差异,其活性在第 9 天时达到最大值,然后逐渐降低;绝大部分部位肉的组织蛋白酶 B 活性在宰后成熟第 9 天或第 11 天时达到最大值,除背最长肌外,其他部位肉在第 9 天和第 11 天时无显著差异。而背阔肌的组织蛋白酶 B 活性在第 3 天时即达到最大值,从第 7 天到第 11 天无显著性变化,第 14 天时又上升到第 3 天的活性水平。腰大肌的组织蛋白酶 B 活性处于持续上升趋势,在第 14 天时达到最大值。这说明不同部位肉溶酶体膜破裂、组织蛋白酶释放出来的速度不同,而 14 d 后组织蛋白酶的变化情况还有待进一步研究。

新疆褐牛各部位肉的组织蛋白酶 H 活性较低,说明组织蛋白酶 H 在牛肉宰后成熟过程中所起的作用可能很小,可以忽略不计^[21]。

宰后成熟过程中组织蛋白酶 L 活性变化规律与 B 相似,除腰大肌外其他各部位肉在第 9 天或第 11 天时达到最大值,而腰大肌的组织蛋白酶 L 活性则呈持续上升趋势,在第 14 天时达到最大。冈下肌的组织蛋白酶 L 活性也显著高于其他部位肉。新疆褐牛肉中,组织蛋白酶 L 活性明显高于 B 和 H,以各部位的活性最大值计算,组织蛋白酶 L 活性是 B 的 2.5~4 倍,是 H 的 10 倍多甚至 20 倍,文献[25]对牦牛肉的研究表明组织蛋白酶 L 降解肌球蛋白的能力是组织蛋白酶 B 的 10 倍,在牛肉的宰后成熟过程中发挥着重要作用。这可能是由于组织

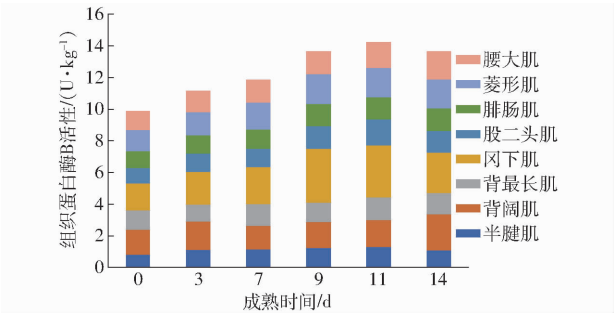


图8 牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶B活性的变化
Fig.8 Change of cathepsin B's activity during postmortem

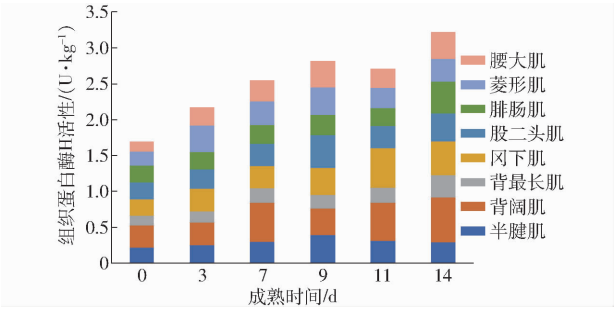


图9 牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶H活性的变化
Fig.9 Change of cathepsin H's activity during postmortem
aging of beefaging of beef

蛋白酶B和H会因水洗处理受到损失,而L相对稳定,不易损失,所以组织蛋白酶L在降解肌球蛋白

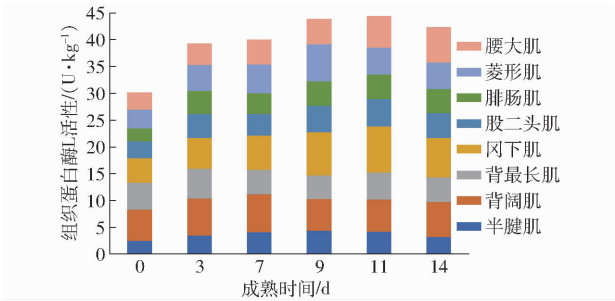


图10 牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶L活性的变化
Fig.10 Change of cathepsin L's activity during postmortem
aging of beef

重链方面起更大的作用^[41],它能快速降解肌钙蛋白T和I,也能缓慢分解肌联蛋白、伴肌动蛋白、 α -辅肌动蛋白、原肌球蛋白、肌动蛋白、重酶解肌球蛋白和轻酶解肌球蛋白^[42]。同时牛肉成熟3d以后肌肉的pH值基本保持在5.5~5.7,与组织蛋白酶L的最适pH值接近,从而使其能够达到最大活力^[43]。

2.4 肌纤维类型数量比和面积比与组织蛋白酶活性的相关性分析

肌纤维类型的数量比和面积比分别与组织蛋白酶活性及活性变化率做相关性分析,结果如表3~5所示。组织蛋白酶活性变化率以活性最大值与初始值相比较来计算。

表3 各类型肌纤维与组织蛋白酶B活性相关性

Tab.3 Relativity between different muscle fiber types and cathepsin B's activity		0 d 活性	3 d 活性	7 d 活性	9 d 活性	11 d 活性	14 d 活性	活性变化率
ⅡB型	肌纤维类型数量比	-0.421	-0.427	-0.499	-0.532	-0.469	-0.442	-0.274
	肌纤维面积比	-0.454	-0.675	-0.729	-0.896 **	-0.856 *	-0.630	-0.785 *
ⅡA型	肌纤维类型数量比	-0.167	-0.392	-0.417	-0.509	-0.540	-0.345	-0.717 *
	肌纤维面积比	0.315	0.362	0.510	0.804 *	0.497	0.270	-0.155
I型	肌纤维类型数量比	0.495	0.721 *	0.803 *	0.918 **	0.900 **	0.686	0.920 **
	肌纤维面积比	0.454	0.697	0.787 *	0.921 **	0.893 **	0.648	0.915 **

表4 各类型肌纤维与组织蛋白酶L活性相关性

Tab.4 Relativity between different muscle fiber types and cathepsin L's activity		0 d 活性	3 d 活性	7 d 活性	9 d 活性	11 d 活性	14 d 活性	活性变化率
ⅡB型	肌纤维类型数量比	-0.060	0.034	-0.290	-0.734 *	-0.298	-0.271	-0.472
	肌纤维面积比	-0.308	-0.120	-0.364	-0.856 *	-0.799 *	-0.557	-0.279
ⅡA型	肌纤维类型数量比	-0.071	-0.183	-0.158	-0.184	-0.688	-0.486	0.024
	肌纤维面积比	0.202	-0.002	0.297	0.881 **	-0.114	-0.098	0.247
I型	肌纤维类型数量比	0.200	0.153	0.384	0.758 *	0.910 **	0.691	0.348
	肌纤维面积比	0.188	0.135	0.350	0.734 *	0.902 **	0.641	0.323

由表3可以看出,ⅡB型肌纤维与组织蛋白酶B活性呈负相关关系,而ⅡB型肌纤维面积比与宰后9、11d组织蛋白酶B活性以及组织蛋白酶B活性的变化率极显著或显著负相关。ⅡA型肌纤维数量比与组织蛋白酶B活性变化率呈显著负相关。ⅡA型肌纤维的面积比与宰后9d时组织蛋白酶B

活性呈显著正相关关系。I型肌纤维数量比与组织蛋白酶B活性呈显著甚至极显著正相关关系,I型肌纤维面积比也与宰后7~11d组织蛋白酶B活性呈显著甚至极显著正相关关系。这说明,在新疆褐牛各部位肉中含有的I型肌纤维越多、ⅡB型肌纤维越少,组织蛋白酶B活性就越高,越有助于宰后

成熟过程中肉的嫩化。

肌纤维类型和组织蛋白酶 L 活性的相关性与肌纤维类型和组织蛋白酶 B 活性的相关性相类似,即 II B 型肌纤维面积比与组织蛋白酶 L 活性呈负相关,而 I 型肌纤维与宰后 9、11 d 组织蛋白酶 L 活性呈显著甚至极显著正相关。由于组织蛋白

酶 L 活性是 B 活性的 2.5~4 倍,更有助于解释肌纤维类型与宰后成熟的关系。由此可推断在 I 型肌纤维含量较高的牛肉中,由组织蛋白酶 L 参与降解的骨架蛋白在宰后成熟 9 d 以后的降解速度比 II B 型肌纤维含量高的牛肉快。这一推断需要进一步试验验证。

表 5 各类型肌纤维与组织蛋白酶 H 活性相关性
Tab.5 Relativity between different muscle fiber types and cathepsin H's activity

参数		0 d 活性	3 d 活性	7 d 活性	9 d 活性	11 d 活性	14 d 活性	活性变化率
II B 型	肌纤维类型数量比	-0.042	-0.072	-0.728 *	-0.202	-0.122	-0.009	0.039
	肌纤维面积比	-0.264	0.017	-0.503	-0.202	-0.549	-0.359	-0.184
II A 型	肌纤维类型数量比	0.086	0.159	0.247	-0.086	-0.439	-0.183	-0.297
	肌纤维面积比	0.210	0.205	0.723	0.096	0.057	-0.060	-0.445
I 型	肌纤维类型数量比	-0.052	-0.100	0.331	0.243	0.527	0.186	0.261
	肌纤维面积比	-0.022	-0.144	0.268	0.186	0.527	0.179	0.233

由于组织蛋白酶 H 活性非常低,在进行与肌纤维类型的相关性分析时,除了与 II B 型肌纤维数量比在宰后 7 d 时呈显著负相关关系外,与其他指标没有显著相关性,不具有参考价值。

3 结论

(1)新疆褐牛不同部位肉的肌纤维类型组成存在较大差异,最为典型的是冈下肌和菱形肌,冈下肌没有 II A 型肌纤维,菱形肌则几乎没有 II B 型肌纤维。对大部分部位的牛肉来说,II B 型肌纤维的横截面积和直径最大,I 型肌纤维的横截面积和直径最小。不同个体的腰大肌肌纤维横截面积和直径相差较大,说明相对于其他部位牛肉而言,在牛的生长过程中,腰大肌的肌纤维更易于受各种因素的影响。

(2)在新疆褐牛 8 个部位肉中,均未发现 MyHC

II b 型基因的表达。MyHC 基因的表达与各部位肉所处躯体的位置关系密切。两种分型方法在确定 I 型肌纤维时所得结果一致,而 ATPase 法确定的 II B 型肌纤维可能与 RT-PCR 法确定的 MyHC II x 型相对应。

(3)组织蛋白酶 L 活性高,在宰后成熟中起重要作用。组织蛋白酶 H 活性非常低,在牛肉宰后成熟中的作用可以忽略。在宰后成熟过程中,3 种组织蛋白酶活性基本呈现先增大、后减小的趋势,在宰后 9~11 d 时达到最大值。腰大肌的组织蛋白酶活性呈持续上升趋势,在宰后 14 d 后的变化仍需进一步研究。

(4)肌纤维类型与组织蛋白酶活性的相关性表明,各部位牛肉中 I 型肌纤维比例越高,II B 型肌纤维比例越低,组织蛋白酶活性就越高,越有益于牛肉宰后成熟嫩化。

参 考 文 献

[1] 尹靖东. 动物肌肉生物学与肉品科学[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2011: 3.
[2] BROOKE M H, KAISER K K. Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence[J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1970, 18(9): 670-672.
[3] BERRI C, WACRENIER N, MILLET N, et al. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines[J]. Poultry Science, 2001, 80(7): 833-838.
[4] PETER J B, SAWAKI S, BARNARD R J, et al. Lactate dehydrogenase isoenzymes: distribution in fast-twitch red, fast-twitch white, and slow-twitch intermediate fibers of guinea pig skeletal muscle[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 144(1): 304-307.
[5] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Fiber types in mammalian skeletal muscles[J]. Physiological Reviews, 2011, 91(4): 1447-1531.
[6] 程晓芳. 白藜芦醇通过脂联素信号通路调控肌纤维类型转化的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2017: 8-9.
CHENG Xiaofang. Research on regulation of muscle fiber transformation through adiponectin pathway by reseratrrol [D]. Nanning: Guangxi University, 2017: 8-9. (in Chinese)
[7] PICARD B, CASSAR-MALEK I. Evidence for expression of II b myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls[J]. Meat Science, 2009, 82(1):30-36.
[8] KIM G D, JEONG T C, CHO K M, et al. Identification and quantification of myosin heavy chain isoforms in bovine and porcine longissimus muscles by LC-MS/MS analysis[J]. Meat Science, 2017, 125:143-151.
[9] 刘培峰, 冯佳炜, 段晓雪, 等. 肌纤维类型及其转化对畜禽肉品质的影响[J]. 中国饲料, 2015(16): 16-19.
[10] 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):55-61.
LIANG Tingyu, WU Jianping, LIU Ting, et al. Recent progress in classification and transformation mechanism of muscle fiber types[J]. Meat Research, 2018, 32(9): 55-61. (in Chinese)
[11] LISTRAT A, LEBRET B, LOUVEAU I, et al. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality[J].

- Scientific World Journal, 2016; 3182746.
- [12] CHOI Y M, KIM B C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality[J]. *Livestock Science*, 2009, 122(2): 105–118.
- [13] 陈琳, 徐幸莲, 周光宏. 应用于肉品嫩化的组织蛋白酶的研究进展[J]. *食品科学*, 2009, 30(1): 271–274.
CHEN Lin, XU Xinglian, ZHOU Guanghong. Research progress on lysosomal cathepsins applied in meat tenderization[J]. *Food Science*, 2009, 30(1): 271–274. (in Chinese)
- [14] KOOHARAIE M, BABIKER A S, MERKEL R A, et al. Role of Ca^{2+} -dependent proteases and lysosomal enzymes in postmortem changes in bovine skeletal muscle [J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53(5): 1253–1257.
- [15] O'HALLORAN G R, TROY D J, BUCKLEY D J, et al. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle[J]. *Meat Science*, 1997, 47(3): 187–210.
- [16] KUBO T, GERELT B, HAN G D, et al. Changes in immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in muscle induced by conditioning or high-pressure treatment[J]. *Meat Science*, 2002, 61(4): 415–418.
- [17] CALKINS C R, SEIDEMAN S C. Relationships among calcium-dependent protease, cathepsins B and H, meat tenderness and the response of muscle to aging[J]. *Journal of Animal Science*, 1988, 66(5): 1186–1193.
- [18] QUALI A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development[J]. *Biochimie*, 1992, 74(3): 251–265.
- [19] BARON C P, JACOBSEN S, PURSLOW P P. Cleavage of desmin by cysteine proteases: calpains and cathepsin B[J]. *Meat Science*, 2004, 68(3): 447–456.
- [20] 张佳莹, 余群力, 韩玲, 等. 溶酶体组织蛋白酶参与宰后牛肉 AIF 介导细胞凋亡研究[J/OL]. *农业机械学报*, 2018, 49(3): 354–360.
ZHANG Jiaying, YU Qunli, HAN Ling, et al. Lysosomal cathepsins in apoptosis-inducing-factor-mediate apoptosis of bovine muscle during postmortem aging[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(3): 354–360. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20180344&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2018.03.044. (in Chinese)
- [21] CHÉRET R, DELBARRE-LADRAT C, DE LAMBALLERIE-ANTON M, et al. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles[J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(4): 1474–1479.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 牛屠宰操作规程: GB/T 19477—2004[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [23] HWANG Y H, KIM G D, JEONG J Y, et al. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers[J]. *Meat Science*, 2010, 86(2): 456–461.
- [24] BROOKE M H, KAISER K K. Muscle fiber types: how many and what kind? [J]. *Archives of Neurology*, 1970, 23(4): 369–379.
- [25] 田甲春. 牦牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶 L、B、H 对肉品质及微观结构的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
TIAN Jiachun. The effect of cathepsins L, B, H on yak meat quality and microstructure during postmortem aging[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [26] 张丽, 孙宝忠. 肌纤维类型与生理代谢、生长性能及肉质的关系[J]. *肉类研究*, 2013, 27(8): 25–30.
ZHANG Li, SUN Baozhong. Relationship of muscle fiber types with physiological metabolism, growth performance and meat quality[J]. *Meat Research*, 2013, 27(8): 25–30. (in Chinese)
- [27] PETTE D, STARON R S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2001, 115(5): 359–372.
- [28] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle[J]. *Journal of Applied Physiology*, 1994, 77(2): 493–501.
- [29] JOO S T, KIM G D, HWANG Y H, et al. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics [J]. *Meat Science*, 2013, 95(4): 828–836.
- [30] LEFAUCHEUR L. A second look into fibre typing-relation to meat quality[J]. *Meat Science*, 2010, 84(2): 257–270.
- [31] KIM G D, KIM B W, JEONG J Y, et al. Relationship of carcass weight to muscle fiber characteristics and pork quality of crossbred (Korean Native Black Pig × Landrace) F2 pigs[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(2): 522–529.
- [32] KIRCHOFER K S, CALKINS C R, GWARTNEY B L. Fiber-type composition of muscles of the beef chuck and round[J]. *Journal of Animal Science*, 2002, 80(11): 2872–2878.
- [33] 郎玉苗. 肌纤维类型对牛肉嫩度的影响机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
LANG Yumiao. Mechanism and effects of muscle fiber types on beef tenderness [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016. (in Chinese)
- [34] MACCATROZZO L, PATRUNO M, TONIOLO L, et al. Myosin heavy chain 2B isoform is expressed in specialized eye muscles but not in trunk and limb muscles of cattle[J]. *European Journal of Histochemistry*, 2009, 48(4): 357–366.
- [35] TANABE R I, MUROYA S, CHIKUNI K. Sequencing of the 2a, 2x, and slow isoforms of the bovine myosin heavy chain and the different expression among muscles[J]. *Mammalian Genome*, 1998, 9(12): 1056–1058.
- [36] TONIOLO L, MACCATROZZO L, PATRUNO M, et al. Expression of eight distinct MHC isoforms in bovine striated muscles: evidence for MHC–2B presence only in extraocular muscles[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(22): 4243–4253.
- [37] 傅冲云. 西杂牛 MyHC 基因的表达模式及其与部分肉质性状的相关分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
FU Chongyun. The expression pattern of MyHC gene and its correlation with meat quality in simmental hybridization[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [38] ENRÍQUEZ V, GRANADOS S, ARIAS M P, et al. Muscle fiber types of gluteus medius in the Colombian creole horse[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2015, 35(6): 524–530.
- [39] CHIKUNI K, MUROYA S, NAKAJIMA I. Absence of the functional myosin heavy chain 2b isoform in equine skeletal muscles [J]. *Zoological Science*, 2004, 21(5): 589–596.
- [40] TIAN J C, HAN L, YU Q L, et al. Changes in tenderness and cathepsins activity during post mortem ageing of yak meat[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2013, 93(3): 321–328.
- [41] HU Y, MORIOKA K, ITOH Y. Non-binding property of cathepsin L to myosin[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(2): 741–744.
- [42] TAYLOR M A J, ALMOND R E, ETHERINGTON D J. The immunohistochemical location of cathepsin L in rabbit skeletal muscle: evidence for a fiber type dependence distribution [J]. *Histochemistry*, 1987, 86: 379–383.
- [43] 田甲春, 韩玲, 刘昕, 等. 牦牛肉宰后成熟机理与肉用品质研究[J/OL]. *农业机械学报*, 2012, 43(12): 146–150.
TIAN Jiachun, HAN Ling, LIU Xin, et al. Ageing mechanism and meat quality during postmortem ageing of yak meat[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2012, 43(12): 146–150. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20121227&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2012.12.027. (in Chinese)