

宰前短期高钙日粮对猪肌钙含量和 μ -calpain 活性及其 mRNA 表达量的影响

孙 会 秦贵信* 姜海龙 张庆华 高 磊

(吉林农业大学动物科技学院,动物生产及产品质量安全教育部重点实验室,长春 130118)

摘 要: 本试验以松辽黑猪为试验对象,研究宰前短期高钙日粮对猪肌钙含量和 μ -calpain 活性及其 mRNA 表达量的影响。选取健康、初重为 (90.2 ± 2.8) kg 的松辽黑猪 48 头,随机分成 8 组,每组 6 个重复,每个重复 1 头猪。试验期为 7 d。对照组饲喂基础日粮,试验组日粮分别在基础日粮中添加 Ca^{2+} 浓度为 0、0.5%、1.0% 和 1.5% 的 CaCl_2 或甲酸钙。结果表明:与对照组相比, CaCl_2 和甲酸钙均可显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 提高肌钙含量和 μ -calpain 活性,其中以 1.0% 甲酸钙组效果最明显;甲酸钙可以提高 μ -calpain 的 mRNA 相对表达量,1.0% 甲酸钙组与其他各组差异显著 ($P < 0.05$);甲酸钙处理下,肌钙与 μ -calpain 在宰后熟化第 3 天和第 9 天存在着显著的正相关 ($P < 0.05$)。由结果可知, CaCl_2 和甲酸钙做为宰前肥育猪日粮中短期超量添加的钙源,均可达到提高肌钙含量和 μ -calpain 活性的目的,在本试验条件下以 1.0% 的甲酸钙(以 Ca^{2+} 浓度计)效果最好。

关键词: 高钙日粮;肌钙含量; μ -calpain;mRNA

Calpain(钙蛋白酶,钙激活中性蛋白酶,钙依赖中性蛋白酶)对宰后肉的嫩化起着决定性的作用,但它只有在 Ca^{2+} 存在的条件下才具有活性,并且受 Ca^{2+} 浓度的调控,高 Ca^{2+} 浓度能加速 calpain 的活化。根据其表现最高活性所需 Ca^{2+} 浓度的不同,可分为 μ -calpain 和 m-calpain。 μ -calpain 在微摩尔(μmol)浓度下就可以发挥降解作用,而 m-calpain 在毫摩尔(mmol)浓度下才能发挥作用。正常情况下,肌肉细胞 Ca^{2+} 浓度的波动范围是在 μmol 浓度下,此时 μ -calpain 呈现活性。大量的研究证明,采用宰后肌肉注射 Ca^{2+} 溶液、用 Ca^{2+} 溶液浸泡肌肉块以及宰前灌服或宰后动脉灌注 Ca^{2+} 溶液,都可以提高 μ -calpain 活性^[1-7],但采用宰前日粮超量添加钙源以提高宰后肌肉中 μ -calpain 活性及其 mRNA 表达量的研究鲜有报道。本试验采用在基础日粮(含钙 0.5%)的基础上超量添加氯化钙(CaCl_2)和甲酸钙 $[\text{Ca}(\text{HCOO})_2]$,比较研究 2 种钙源对猪背最长肌 Ca^{2+} 浓度、 μ -calpain 活性及其 mRNA 表达量的影响,确定适宜添加钙源的种类和适宜剂量,为生产优质猪肉提供一种新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

CaCl_2 为分析纯,购至沈阳化工厂;甲酸钙含钙量 30.7%,购自广东天科科技有限公司。

1.2 基础日粮

采用玉米-豆粕型基础日粮,参照 NRC(1998)猪营养需要,同时结合松辽黑猪的饲养标准进行日粮配制(表 1)。饲料原料采用粉料形式配制。

1.3 试验设计

试验在公主岭农科院畜牧分院种猪场进行。选取健康、初重为 (90.2 ± 2.8) kg 的松辽黑猪 48 头(公母各占 1/2,公猪已被阉割),随机分为 8 组,每组 6 个重复,每个重复 1 头猪。

试验采用系统设计,A 因素为钙源,分别为 CaCl_2 和甲酸钙,B 因素为不同浓度梯度(0、0.5%、1.0% 和 1.5%),B 因素嵌套在 A 因素不同钙源水平下。分别设 CaCl_2 和甲酸钙 2 个对照组,均饲喂基础日粮(含钙 0.5%,未额外添加 CaCl_2 和甲酸钙),6 个试验组分别饲喂基础日粮 + 0.5% CaCl_2 、基础日粮 + 1.0% CaCl_2 、基础日粮 + 1.5% CaCl_2 、

收稿日期:2009-06-15

基金项目:吉林省科技厅科技引导计划项目(20080569)

作者简介:孙 会(1962-),男,山东诸城人,教授,博士,研究方向为单胃动物营养。E-mail: hui1688@163.com

* 通讯作者:秦贵信,教授,博士生导师,E-mail: guixin@public.cc.jl.cn

基础日粮 + 0.5% 甲酸钙、基础日粮 + 1.0% 甲酸钙和基础日粮 + 1.5% 甲酸钙的试验日粮。CaCl₂ 和甲酸钙的添加浓度均以 Ca²⁺ 水平计,在基础日粮组成外添加。预饲 7 d 后进入正式试验,试验期为 7 d。

表 1 础日粮及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets	
(air-dry basis, %)	
项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	60.00
玉米胚芽粕 Corn germ oil meal	10.00
豆粕 Soybean meal	6.00
棉子粕 Cottonseed meal	3.60
玉米酒精糟 DDGS	4.32
玉米皮 Corn husk	13.50
石粉 Limestone	0.95
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.50
食盐 NaCl	0.13
预混料 Premix ¹⁾	1.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ²⁾	
消化能 DE (MJ/kg)	12.97
粗蛋白质 CP	14.00
钙 Ca	0.50
总磷 TP	0.40
赖氨酸 Lys	0.63

¹⁾ 预混料为每千克日粮提供 The premix provided per kg of diet: Fe 80 mg; Cu 8 mg; Zn 100 mg; Mn 10 mg; Se 0.28 mg; I 0.14 mg; VA 5 000 IU; VD 2 500 IU; VE 50 IU; VB₁₂ 10 μg; VB₂ 5.5 mg; D - 泛酸钙 D-calcium pantothenate 20 mg; 烟酸 niacin 32 mg; 氯化胆碱 choline chloride 550 mg。

²⁾ 营养水平为计算值。Nutrient levels were calculated values.

表 2 基因引物序列

Table 2 Sequence of genetic primer				
基因名称	序列长度	引物	Tm 值	核酸序列
Gene name	Length of sequence (bp)	Primer	Tm value (°C)	Sequence of nucleotide (5'-3')
β -action	138	上游引物 Upstream primer	62.26	GGACTTCGAGCAGGAGATGG
		下游引物 Downstream primer	62.14	AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG
μ -calpain	89	上游引物 Upstream primer	61.15	CATCTTCGTGGGTTCTGTGG
		下游引物 Downstream primer	60.67	ATGTTGGGCTCTGGCTGTT

1.6.3.2 总 RNA 的提取、DNase-I 处理和检测
总 RNA 的提取采用宝生物工程(大连)有限公司的 TaKaRa RNAiso Reagent 进行,操作步骤按照说明书进行。
1.6.3.3 RNA 沉淀的清洗 弃去上清,缓慢地沿离心管壁加入 75% 的乙醇 1 mL,轻轻上下颠倒洗涤

1.4 饲养管理

试验猪全部在同一猪舍内,单槽单圈饲喂,每日饲喂 2 次(08:00 和 17:00),自由饮水,每天清扫圈舍,保证圈内清洁,自然通风。

1.5 样品的采集与处理

屠宰后取右半胴体的背最长肌中间部分(500 g)用密封袋封好,样品放置于隔热并放有冰块的泡沫箱中密封,用于测定肌钙浓度和 μ -calpain 活性;同时取背最长肌中间部分(10 g),立即置于液氮灌中冻存,随后置于 - 80 °C 冰箱保存,用与测定 μ -calpain 的 mRNA 表达量。

1.6 测定指标

1.6.1 肌肉钙离子含量

采用乙二胺四乙酸二钠络合滴定快速测钙法测定。

1.6.2 μ -calpain 活性测定

1.6.2.1 粗酶提取液的制备及纯化 参照 Koohmarize 等^[8] 和 马美湖等^[9] 介绍的方法。

1.6.2.2 μ -calpain 活性测定 分别于宰后第 3 天、第 9 天和第 15 天测定 μ -calpain 的活性,以观察其活性变化。 μ -calpain 的活性测定按 Koohmarie^[10] 介绍的方法进行。

1.6.3 μ -calpain mRNA 表达量的测定

1.6.3.1 目的基因和内参基因的引物设计 目的基因 μ -calpain 物序列来自 μ -calpain 基因序列(GenBank: NM_213972 序列);内参基因 β -action 引物序列来自 β -action 基因序列(GenBank: EF406272 序列)。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

离心管管壁,12 000×g 4 °C 离心 5 min 后弃去乙醇。
1.6.3.4 RNA 的溶解 室温干燥沉淀 2~5 min,加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀,待 RNA 沉淀完全溶解后于 - 80 °C 保存。
1.6.3.5 反转录反应 使用 SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code.

RR081)进行。按下列组份配制反转录反应液(反应液配制在冰上进行):2 μL 5 \times PrimeScript Buffer, 0.5 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I, 0.5 μL Oligo dT Primer (50 μmol), 0.5 μL Random 6 mers (100 μmol), 1 μL Total RNA, 5.5 μL RNase-Free dH₂O。

1.6.3.6 实时 PCR 反应 采用 SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (TaKaRa Code. RR081) 进行。溶液反应体系: 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq (2 \times), 0.5 μL Primer F/R (各 10 μmol), 2 μL RT 产物, 10 μL dH₂O (标准曲线制作时, 添加梯度稀释的 cDNA)。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 预变性, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 读板, 共 40 个循环。仪器使用 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Code. TP800)。

1.7 数据处理

肌钙和 μ -calpain 活性数值遵循下列模型:

$$Y_{ijl} = A_i + B_j(A) + E_{ijl};$$

公式中: Y_{ijl} 为肌钙和 μ -calpain 活性;

A_i 为不同钙源, $i = 1, 2$ (分别为 CaCl_2 和甲酸钙);

$B_j(A)$ 为不同钙源下的不同水平(嵌套在不同

钙源的不同水平下), $j = 1, 2, 3, 4$ (分别为 0、0.5%、1.0%、1.5%);

E_{ijl} 为随机误差。

数据处理采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 LSD 多重比较, 结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 结 果

2.1 CaCl_2 和甲酸钙对肌钙含量及 μ -calpain 活性的影响

由表 3 可知, 随着 CaCl_2 添加水平的提高, 肌钙含量显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 提高。与对照组相比, 0.5% CaCl_2 组显著提高了肌钙含量 ($P < 0.05$), 1.0% 和 1.5% CaCl_2 组则极显著地提高了肌钙含量 ($P < 0.01$)。 μ -calpain 的活性随 CaCl_2 添加量的增加逐渐提高, 随着熟化时间的增加而降低, 宰后熟化第 3 天, 1.0% 和 1.5% CaCl_2 组与对照组差异显著 ($P < 0.05$), 但各 CaCl_2 组间差异不显著 ($P > 0.05$); 宰后熟化第 9 天, 各 CaCl_2 组以及对照组间差异不显著 ($P > 0.05$); 宰后熟化第 15 天, 各 CaCl_2 组与对照组间差异均显著 ($P < 0.05$), 1.5% CaCl_2 组显著高于 0.5% CaCl_2 组 ($P < 0.05$)。

表 3 氯化钙对肌钙含量及 μ -calpain 活性的影响
Table 3 Effects of calcium chloride on muscular calcium content and activity of μ -calpain

添加水平 Supplemental levels (%)	肌钙含量 Muscular calcium content (mg/kg)	μ -calpain 活性 Activity of μ -calpain (U/g)		
		宰后熟化第 3 天 After 3 d of slaughtering	宰后熟化第 9 天 After 9 d of slaughtering	宰后熟化第 15 天 After 15 d of slaughtering
0	14.14 \pm 0.93 ^{Aa}	2.56 \pm 0.09 ^a	1.76 \pm 0.08	0.57 \pm 0.02 ^a
0.5	16.31 \pm 0.55 ^{Ab}	2.58 \pm 0.03 ^{ab}	1.76 \pm 0.03	0.61 \pm 0.01 ^b
1.0	20.32 \pm 0.67 ^B	2.62 \pm 0.02 ^b	1.82 \pm 0.06	0.65 \pm 0.02 ^{bc}
1.5	20.80 \pm 1.64 ^B	2.69 \pm 0.05 ^b	1.83 \pm 0.08	0.68 \pm 0.03 ^c

同列数据肩注相同字母或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下表同。

In the same column, values with the same letter or no superscripts mean no difference ($P > 0.05$), while with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference ($P < 0.01$). The same as below.

由表 4 可知, 随着甲酸钙添加水平的提高, 肌钙含量显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 提高。与对照组相比, 0.5% 甲酸钙组显著提高了肌钙含量 ($P < 0.05$), 1.0%、1.5% 甲酸钙组则极显著地提高了肌钙含量 ($P < 0.01$)。 μ -calpain 的活性随甲酸钙添加量的增加呈现先升高后降低的趋势, 随着熟

化时间的增加而降低, 宰后熟化第 3 天, 各甲酸钙组与对照组差异均显著或极显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 1% 甲酸钙组显著高于其他甲酸钙组 ($P < 0.05$); 宰后熟化第 9 天, 各甲酸钙组均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且 1.0% 和 1.5% 甲酸钙组显著显著高于 0.5% 甲酸钙组 ($P < 0.05$); 宰后熟化第 15

天,各甲酸钙组与对照组均差异显著($P<0.05$),且 1.0%甲酸钙组显著高于其他各甲酸钙组($P<0.05$)。

表 4 甲酸钙对肌钙及 μ -calpain 活性的影响
Table 4 Effects of calcium formate on muscular calcium content and activity of μ -calpain

添加水平 Supplemental levels (%)	肌钙含量 Muscular calcium content (mg/kg)	μ -calpain 活性 Activity of μ -calpain (U/g)		
		宰后熟化第 3 天 After 3 d of slaughtering	宰后熟化第 9 天 After 9 d of slaughtering	宰后熟化第 15 天 After 15 d of slaughtering
0	14.14 \pm 0.93 ^{Aa}	2.56 \pm 0.09 ^{Aa}	1.76 \pm 0.08 ^a	0.57 \pm 0.02 ^a
0.5	16.53 \pm 1.32 ^{Ab}	3.65 \pm 0.05 ^{Ab}	2.67 \pm 0.11 ^b	0.81 \pm 0.05 ^b
1.0	22.83 \pm 1.30 ^B	4.18 \pm 0.15 ^B	3.20 \pm 0.17 ^c	0.91 \pm 0.06 ^c
1.5	22.16 \pm 1.50 ^B	3.71 \pm 0.05 ^{Ab}	3.04 \pm 0.03 ^c	0.80 \pm 0.003 ^b

2.2 CaCl_2 与甲酸钙对肌肉 Ca^{2+} 含量及 μ -calpain 活性影响的总体比较

CaCl_2 和甲酸钙显著提高肌钙含量和宰后 μ -calpain 活性($P<0.05$),由表 5 可知,总体比较而言,甲

酸钙比 CaCl_2 能显著提高肌钙含量($P<0.05$);宰后熟化第 3 天、第 9 天和第 15 天,甲酸钙比 CaCl_2 更能显著提高 μ -calpain 的活性($P<0.05$)。

表 5 氯化钙和甲酸钙对肌钙及 μ -calpain 活性影响的总体比较
Table 5 Total result of calcium chloride and calcium formate on muscular calcium content and activity of μ -calpain

钙源 Calcium resource	肌钙含量 Muscular calcium content (mg/kg)	μ -calpain 活性 Activity of μ -calpain (U/g)		
		宰后熟化第 3 天 After 3 d of slaughtering	宰后熟化第 9 天 After 9 d of slaughtering	宰后熟化第 15 天 After 15 d of slaughtering
氯化钙 Calcium chloride	17.89 \pm 0.95 ^a	2.61 \pm 0.05 ^a	1.79 \pm 0.06 ^a	0.63 \pm 0.02 ^a
甲酸钙 Calcium formate	18.92 \pm 1.26 ^b	3.53 \pm 0.09 ^b	2.67 \pm 0.10 ^b	0.77 \pm 0.03 ^b

2.3 甲酸钙处理下肌钙与 μ -calpain 的相关关系

由表 6 可知,在甲酸钙处理下,宰后熟化第 3 天和第 9 天,肌钙与 μ -calpain 呈现正相关的关系,相关系数分别为 0.662 686 和 0.638 883。肌钙含量

越高, μ -calpain 的活性也就越高,差异显著($P<0.05$)。而宰后熟化第 15 天,肌钙与 μ -calpain 呈现的正相关不明显,相关系数为 0.198 976,差异不显著($P>0.05$)。

表 6 甲酸钙处理下肌钙与 μ -calpain 的相关关系
Table 6 Regression analysis of calcium content in muscle and μ -calpain under calcium formate condition

宰后熟化天数 Treatment days after slaughtered day (d)	回归方程 Equation of regression analysis	相关系数 Coefficient correlation	P 值 P -value
3	$y = 0.001\ 392x + 0.191\ 366$	0.662 686	0.018 851
9	$y = 0.001\ 093x + 0.078\ 641$	0.638 883	0.025 328
15	$y = -0.000\ 220x + 0.058\ 246$	0.198 976	0.535 278

字母 y 表示 μ -calpain, x 表示肌钙。The letter y means μ -calpain, and x means calcium content in muscle.

2.4 甲酸钙对 μ -calpain 的 mRNA 表达量的影响

由表 7 可知,随着甲酸钙添加水平的提高, μ -calpain mRNA 相对表达量呈现先升高再下降的趋势,各甲酸钙组间及与对照组间差异显著($P<0.05$),其中以 1.0%甲酸钙导致的 μ -calpain mR-

NA 相对表达量最高,比 0.5% 和 1.5% 甲酸钙相比分别高出 46.15% 和 40.74%。而过高的甲酸钙添加量,会导致 μ -calpain mRNA 相对表达量的下降。

表 7 甲酸钙处理下 μ -calpain mRNA 相对表达量
Table 7 Effects of calcium formate on relative expression of μ -calpain mRNA

添加水平 Supplemental levels (%)	μ -calpain mRNA 相对表达量 Relative expression of μ -calpain mRNA
0	1.00 ± 0.000 0 ^a
0.5	1.04 ± 0.000 2 ^b
1.0	1.52 ± 0.002 0 ^d
1.5	1.08 ± 0.004 0 ^c

3 讨 论

3.1 CaCl_2 和甲酸钙对肌肉 Ca^{2+} 浓度的影响

肌肉 Ca^{2+} 浓度对肌肉 μ -calpain 活性起着决定性的作用。肌肉中 Ca^{2+} 浓度越高, μ -calpain 活性也就越高, 对宰后肉的嫩化作用就越好。本试验主要通过 在日粮中短期超量添加不同钙源, 比较二者对肌钙含量的影响情况, 筛选出适于短期日粮中添加的最适钙源及其用量, 以期达到提高肌肉 Ca^{2+} 浓度的目的。结果表明, 随着日粮添加 Ca^{2+} 浓度的上升, 各组的肌钙含量都高于对照组。当钙添加量达到 1.5% 时, 肌钙含量增加幅度减小, 与 1.0% 水平差异不显著 ($P > 0.05$)。0.5%、1.0% 和 1.5% CaCl_2 组分别比对照组增加了 13.1%、30.41% 和 32.02%; 0.5%、1.0% 和 1.5% 甲酸钙组分别比对照组提高了 14.46%、38.06% 和 36.19%。总体比较而言, 甲酸钙能显著提高肌钙含量 ($P < 0.05$)。这主要是由于在日粮中添加的钙源不同, 在动物消化道中的吸收上存在着较大的差异, 有机钙的吸收量高于无机钙。甲酸钙属于有机钙, 氯化钙属于无机钙, 因此, 甲酸钙的吸收率高于氯化钙, 在肌肉中的沉积量就高。Duckett 等^[11] 的研究结果表明屠宰前给牛口服丙酸钙可以使牛肌肉中钙的含量极显著提高 ($P < 0.01$), 含量从 78.36 mg/kg 提高到了 102.37 mg/kg, 提高了 30.6%。李绍钦^[12] 的研究结果显示提高 Ca^{2+} 供给量能极显著提高肌肉中 Ca^{2+} 的含量 ($P < 0.01$), 日粮中添加 1.5% 和 3% 的 CaCl_2 在肌肉中的存留量分别比未添加 CaCl_2 组提高了 27.5% 和 40.5%。这些与本试验的研究结果相似。由此可见, 日粮短期超量添加钙源可以提高肌肉 Ca^{2+} 浓度, 而肌肉 Ca^{2+} 浓度又是激活钙蛋白酶的必要条件, 因此, 肌肉 Ca^{2+} 浓度的增加对研究肉的嫩化机制有重要意义。但日粮短期超量添加钙源提高肌肉 Ca^{2+} 浓度的吸收机制有待进一步研究。

3.2 CaCl_2 和甲酸钙对 μ -calpain 活性的影响

Ca^{2+} 是 μ -calpain 的激活剂, 对 μ -calpain 活性的提高有重要作用, μ -calpain 可被 μmol (5 ~ 65 μmol) 水平的 Ca^{2+} 激活, 因此 μ -calpain 是肉嫩化的体内关键酶, 可以加快宰后肉的嫩化进程。高 Ca^{2+} 浓度能加速 calpain 的活化, 但肌肉中过高的 Ca^{2+} 浓度反而对 μ -calpain 活性产生抑制作用。本试验采用 2 种钙源, CaCl_2 和甲酸钙, 比较研究对宰 后猪背最长肌中 μ -calpain 活性的影响。结果表明: 不同熟化时间不同浓度的 CaCl_2 和甲酸钙均能提高 μ -calpain 活性, 其中 1% 甲酸钙与对照组间差异极显著 ($P < 0.01$), 与其他各组组间差异显著 ($P < 0.05$)。甲酸钙与 CaCl_2 间差异显著 ($P < 0.05$)。当甲酸钙的浓度达到 1.5% 时, μ -calpain 的活性呈下降趋势。在宰后熟化第 15 天, 由于甲酸钙对肌钙含量提高显著, 使得过多的钙反而抑制了 μ -calpain 活性, 这也印证了上述观点。这一结果与谢婷^[13] 研究结果相似。谢婷研究结果表明: 向猪背最长肌注射 10 mmol/L 氯化钙溶液, 可以显著降低钙蛋白酶活性, 并随钙离子浓度的增加, 钙蛋白酶活性下降越明显。100 mmol/L 以上的氯化钙溶液可以极显著地降低钙蛋白酶活性 ($P < 0.01$)。

3.3 甲酸钙处理下肌钙与 μ -Calpain 的相关关系

本研究通过回归分析发现, 甲酸钙处理下, 宰后熟化第 3 天和第 9 天, 肌钙与 μ -calpain 存在着显著的正相关 ($P < 0.05$), 进一步证实了肌钙浓度越高, μ -calpain 活性就越强, 也即肌钙浓度与 μ -calpain 活性存在着一致性。

3.4 甲酸钙对 μ -calpain mRNA 表达量的影响

μ -calpain 是宰后肌肉嫩化的体内关键酶, 其活性以及 mRNA 表达量对肉的嫩化起着决定性的作用, 而肌肉中 Ca^{2+} 是 μ -calpain 的激活剂, 肌肉中 Ca^{2+} 浓度的高低决定 μ -calpain 高低以及 mRNA 表达量的多少。本试验采用在日粮基础上超量添加甲酸钙 (0.5%、1.0% 和 1.5%), 研究对猪背最长肌中 μ -calpain 的 mRNA 相对表达量的影响。结果表明, 不同水平的甲酸钙对 μ -calpain 的 mRNA 相对表达量都有显著影响 ($P < 0.05$), 以 1.0% 甲酸钙导致 μ -calpain 的 mRNA 相对表达量最高, 而当甲酸钙添加量达到 1.5% 时, 会导致 μ -calpain mRNA 相对表达量的下降。这一结果与朱燕等^[14] 报道的一致。朱燕等采用体外法, 研究不同浓度的 Ca^{2+} 对分化的大鼠 L6 成肌细胞中 μ -calpain 的 mRNA 蛋白水平表达的影响, 结果表明: 50 ~ 100 μmol 的 Ca^{2+} 可以使 μ -calpain 的 mRNA 表达量较对照组

提高 2 倍, 500~1 500 μmol 的 Ca^{2+} 可以使 μ -calpain 的 mRNA 表达量较对照组提高 5~7 倍, 当 Ca^{2+} 浓度达到 1 500 μmol 时, 则 μ -calpain 的 mRNA 表达量下降。原因可能是当 Ca^{2+} 浓度达到较高水平时, 被激活的钙蛋白酶抑制素抑制了 μ -calpain 的活性, 导致 μ -calpain 的 mRNA 表达量呈下降趋势。

4 结 论

CaCl_2 和甲酸钙作为宰前肥育猪日粮中短期超量添加的钙源, 均可达到提高肌钙含量和 μ -calpain 活性的目的, 甲酸钙比 CaCl_2 能显著提高肌钙含量和 μ -calpain 的活性 ($P < 0.05$), 甲酸钙处理下, 肌钙与 μ -calpain 在宰后熟化第 3 天和第 9 天存在着显著的正相关 ($P < 0.05$), 甲酸钙可以提高 μ -calpain 的 mRNA 相对表达量, 其中以 1.0% 的甲酸钙效果最好。因此, 甲酸钙作为宰前肥育猪日粮中短期添加的钙源, 有利于肌原纤维降解的钙蛋白酶活性的提高。

参考文献:

- [1] McFarlane B J, Unruh J A. Effects of blast chilling and postmortem calcium chloride injection on tenderness of pork longissimus muscle[J]. *Journal of Animal Science*, 1996, 74: 1 842-1 845.
- [2] Clare T L, Jackson S P, Miller M F, Elliott C T, Ramsey C B. Improving tenderness of normal and callipyge lambs with calcium chloride[J]. *Journal of Animal Science*, 1997, 75: 377-385.
- [3] 从玉艳, 边连全, 张建勋. 注射 CaCl_2 溶液对猪半膜肌嫩度的影响[J]. *河南农业科学*, 2006, (5): 105-107.
- [4] Koohmaraie M, Crouse J D, Mersmann H J. Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through infusion of calcium chloride: effect of concentration and ionic strength[J]. *Journal of Animal Science*, 1989, 67: 934-942.
- [5] Gerelta B, Ikeuchib Y, Nishiumic T, Suzuki A. Meat tenderization by calcium chloride after osmotic dehydration[J]. *Meat Science*, 2002, 60: 237-244.
- [6] Scang J A, Delmore Jr R J, Ames R P, Belk K E, Tatum J D, Smith G C. Palatability of beef steaks marinated with solutions of calcium chloride, phosphate, and (or) beef-flavoring[J]. *Meat Science*, 2000, 55: 397-401.
- [7] Dikeman M E, Hunt M C, Addis P B, Schoenbeck H J, Pullen M, Katsanidis E, Yancey E J. Effects of postexsanguination vascular infusion of cattle with a solution of saccharide, sodium chloride, and phosphates or with calcium chloride on quality and sensory traits of steaks and ground beef[J]. *Journal Animal Science*, 2003, 81: 156-166.
- [8] Koohmaraie M, Kennick W H, Elgasim E A. Effect of prerigon pressurization on the activity of calcium-activated facton[J]. *Journal of Food Science*, 1984, 49: 680.
- [9] 马美湖, 唐晓峰. 氯化钙和木瓜蛋白酶对牛肉嫩化效果的研究[J]. *湖南农业大学学报*, 2001, 27(1): 63-66.
- [10] Koohmaraie M. Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization and comparison its effects on myofibrils with μ -calpains[J]. *Animal Science*, 1992, 70 (12): 3 697-3 708.
- [11] Duckett S K, Andrae J G, Pritchard G T, Skow T A, Cuvala S L, Thorngate. Effect pre-slaughter administration of oral calcium gel to beef cattle on tenderness[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2000, 11: 33-38.
- [12] 李绍钦. 饲粮短期高剂量添加天冬氨酸镁、氯化钙对猪肉品质的影响[D]. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学, 2003: 17-23.
- [13] 谢 婷. 钙蛋白酶及钙离子在猪肉宰后成熟过程中的作用研究[D]. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学, 2008: 50-51.
- [14] 朱 燕, 罗 欣, 周光宏. 钙离子处理对成肌细胞 μ -calpain mRNA 和蛋白表达的影响[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2006, 37(4): 561-567.

Effects of High Dietary Calcium within Short Term Feeding on Muscular Calcium Content, Activity and mRNA Expression of μ -calpain of Swines

SUN Hui QIN Guixin* JIANG Hailong ZHANG Qinghua GAO Lei

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Key Lab of Animal Production and Safety of Ministry of Education, Changchun 130118, China)

Abstract: This trial was conducted to study the effects of high dietary calcium within short term feeding on muscular calcium content, activity and mRNA expression of μ -calpain of *Songliao* black swines. Forty-two *Songliao* black swines with an initial weight of (90.2 ± 2.8) kg were randomly allotted to 8 groups with 6 replicates each and 1 swine in each replicate. The trial lasted for 7 days. The control group was fed basal diets (contained Ca^{2+} of 0.5%, without CaCl_2 and calcium formate), the experimental groups were fed basal diets with 0, 0.5%, 1.0% and 1.5% CaCl_2 and calcium formate, respectively. The results showed as follows: compared with control group, CaCl_2 and calcium formate increased the content of muscular calcium and activity of μ -calpain ($P < 0.05$), and 1.0% calcium formate group had the best effect; calcium formate could increase the relative expression of μ -calpain mRNA, and the relative expression of μ -calpain mRNA of 1.0% calcium formate group was significantly higher than those of other groups ($P < 0.05$). There was a significant positive relation between muscular calcium and activity of μ -calpain under the treatment of calcium formate after 3 d and 9 d of slaughtering ($P < 0.05$). In conclusion, calcium chloride and calcium formate as the source of calcium in short term feeding of finishing pigs before slaughter could increase the content of muscular calcium and activity of μ -calpain, and the 1.0% calcium formate group had the best effect in this research. [Chinese Journal of Animal Nutrition, 2009, 21(6): 960-966]

Key words: High dietary calcium; Content of muscular calcium; μ -calpain; mRNA

* Corresponding author, professor, E-mail: guixin@public.cc.jl.cn