

野猪 *CAPN7* 基因的克隆、表达和变异分析

杨秀芹^{1,3}, 郭丽娟¹, 马建章², 刘 娣^{1,3,*}

(1. 东北农业大学 动物科技学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北林业大学 野生动物资源学院, 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江省农科院, 哈尔滨 150086)

摘要: 钙蛋白酶是细胞质中主要的蛋白水解酶, 在肌肉生长、蛋白转化及嫩化过程中发挥复杂的作用。该研究利用 RT-PCR、生物信息学方法克隆野猪 (*Sus scrofa ussuricus*) *CAPN7* cDNA 并进行序列分析, 利用相对定量 RT-PCR 方法研究其组织表达情况和利用 PCR-SSCP 方法对其进行变异分析。结果表明, 野猪 *CAPN7* 基因编码区全长 2442bp, 预期编码 813 个氨基酸残基, 多肽链中存在着 calpain 家族的催化结构域和催化活性中心; 野猪 *CAPN7* 不同程度地表达于所检测的 12 种组织中, 在 6、9 月龄野家杂交猪肌肉组织中的相对表达量高于同一时期的大白猪肌肉组织; 所检测到的 3 种基因型在野猪、民猪和杜洛克中的分布存在着极显著差异。该研究为进一步揭示 calpain7 的功能提供了分子生物学基础。

关键词: 野猪; *CAPN7*; 克隆; 序列分析; 组织表达; 钙蛋白酶

中图分类号: Q593.4; Q786; S828.89; Q556.4 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2009)05-0503-06

Cloning, Expression and Variation Analysis of the Wild Boar *CAPN7* Gene

YANG Xiu-qin^{1,3}, GUO Li-juan¹, MA Jian-zhang², LIU Di^{1,3,*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

3. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Calpains are the key proteases involved in muscle growth, protein transformation and meat tenderization. In this study, *CAPN7* cDNA of Wild boar was cloned by RT-PCR, its sequence analysis, expression characterization and polymorphism analysis were performed. The results showed that the full-length coding sequence of Wild boar *CAPN7* is 2442 bp long, and encodes a protein of 813 amino acids with the catalytic site of calpain family, whose catalytic triad residues is located at amino acids 290, 458 and 478, respectively. RT-PCR expression analysis indicated that *CAPN7* mRNA was ubiquitously expressed in the 12 tissues examined, but the relative abundance was unevenly distributed in tissues. The *CAPN7* mRNA levels in muscle of 6 and 9-month-old crossbred pigs were higher than those of Yorkshire pigs at the same ages. In addition, a missense mutation was identified by PCR-SSCP and its distribution in wild boar, Min pig and Duroc was significantly different. The results lay the foundation for further studying the function of *CAPN7* gene.

Key words: Wild boar; *CAPN7*; Cloning; Sequence analysis; Tissue expression; Calpains

钙蛋白酶 (calpain) 是一类依赖于 Ca^{2+} 的中性半胱氨酸巯基内肽酶, 是细胞质中主要的蛋白水解酶, 在肌肉生长、蛋白转化及嫩化过程中发挥复杂的作用。钙蛋白酶一方面能够参与活体中成肌细胞的融合和分化, 降解肌原纤维蛋白, 与肌肉的生长和发育密切相关 (Huang et al, 1998; Honda et al,

2008; Smith & Dodd, 2007); 另一方面在动物宰后肌肉成熟过程中, 能够降解肌肉蛋白质促进肉的嫩化, 是宰后肉嫩化的基本酶类 (Koohmaraie, 1992; Morgan et al, 1993; Smith et al, 2000; Ilian et al, 2004; Rowe et al, 2004)。

目前, 哺乳动物中已发现了 15 种不同的钙蛋

收稿日期: 2009-04-14; 接受日期: 2009-08-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2008BADB2B01); 中国博士后科学基金项目 (20080430950); 东北农业大学校基金项目

*通讯作者 (Corresponding author), Tel: 13803644211; E-mail: liudi1963@163.com

第一作者简介: 杨秀芹 (1971—), 女, 博士, 副教授, 主要从事动物分子遗传学研究。Tel: 13945694180; E-mail: xiuqin163@163.com

白酶,根据在机体内的表达情况,这些钙蛋白酶可分为普遍表达的(calpains1、2、5、7、10、12、14和15)和组织特异的(calpain3);根据结构特点又可分为典型的(calpains1、2、3、8、9、11和12)和非典型的(calpains5、6、7、10和15)。典型的钙蛋白酶都含有4个结构域,从氨基端到羧基端依次命名为I、II、III、IV,并且都能与calpain4组成异源二聚体;非典型的钙蛋白酶都不含有结构域IV,其他3个亚基也存在缺失和替换现象,不能与calpain4组成异源二聚体(Goll et al, 2002)。Calpain7是一个非典型的钙蛋白酶(Franz et al, 1999; Futai et al, 2001),人calpain7基因(CAPN7)全长46 kb,含有21个外显子,位于3p24,在机体内普遍表达。猪CAPN7基因的序列信息及表达情况尚未见报道。

野猪(*Sus scrofa ussuricus*)是我国重要的资源兽类之一,几乎分布于全国各地。作为家猪的祖先,开展野猪遗传学研究对中国地方猪种改良和种质资源库的构建具有重要意义。本研究在成功克隆了家猪CAPN7基因的基础上,利用RT-PCR和生物信息学方法克隆野猪CAPN7基因并进行序列分析;利用半定量RT-PCR方法研究该基因的组织表达谱,比较其在生长速度和嫩度性状上存在明显差异的大白猪和野家杂交猪肌肉组织中的表达情况;利用PCR-SSCP方法对其进行变异研究。研究结果将为进一步揭示calpain7的功能提供分子生物学基础,为野猪遗传资源保护、合理开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野猪来自牡丹江大海林林场,大白猪、杜洛克来自哈市幸福乡忠志原种猪场,野家杂交猪来自黑龙江省农科院育种基地,民猪来自黑龙江省兰西县种猪场。进行克隆和表达分析时,取各发育时期(3、6、9、12月龄)的大白猪和野家杂交猪各3头、成年野猪1头,宰后立即取胃、肾、脾、肺、心、肝、大肠、小肠、性腺、子宫、脂肪、肌肉等组织,放在液氮中速冻;进行变异分析时,采集野猪(14头)、民猪(23头)、杜洛克(20头)的耳组织样,浸泡于70%酒精中,常温下带回实验室。

各种组织样在液氮中充分研磨后,利用TRIZOL(invitrogen公司)提取总RNA, DNase I消化。基因组DNA的制备情况见Huo et al(2009)。

1.2 引物的设计与合成

根据本实验室克隆的家猪CAPN7基因序列(GenBank No: EF026106),设计5对引物(K1、K2、K3、K4、K5)用于野猪CAPN7 cDNA克隆;K1和C1用于基因表达分析,C1为内参 β -actin基因(GenBank No: U07786)的扩增引物;根据所克隆的野猪CAPN7序列,设计P1引物用于PCR-SSCP分析。所有引物均用primer5.0软件自行设计,由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。引物序列、扩增长度、在所克隆的CAPN7 cDNA序列中的位置见表1。

表1 本研究中用到的引物序列

Tab. 1 Primers used in the study

引物 Primers	序列 Sequence (5'-3')	位置 Location	扩增长度 Length (bp)
K1	S: TAAGCAAGGACCTGTGAAAGA	1670	404
	A: TTGATACGGTGTATGGTGAAG	2073	
K2	S: TACTCAGCGTGCAGCTTTACT	2019	516
	A: CATTGGAGGGATTGATGTTT	2534	
K3	S: GTTGGCTCGACAGGCACTA	419	1329
	A: CCCTGTGGACACTGCACCT	1747	
K4	S: GACCACGAAGGCCGCTA	66	410
	A: GGCTTTGTAAAGGCTCA	475	
K5	S: ATGGACGCGGCGCGCT	6	101
	A: TTGTAGTAAACACCGCCCTGA	106	
C1	S: CGGGACCTGACCGACTACCT	181	412
	A: GGGCCGTGATCTCCTTCTG	592	
P1	S: TAACTGTTTCTGTGGTGGGA	2236	219
	A: TGCTGGGAATGATGTTGTAG	2367	

1.3 cDNA 克隆、测序

cDNA 第一链文库通过反转录野猪肝脏组织总 RNA 获得。RT-PCR 反应按照大连宝生物工程有 限公司试剂盒 (BcaBEST™ RNA PCR Kit, Ver.1.1) 要求 进行, 反转录引物用 Oligo(dT)₁₈。扩增片断经胶 回收纯化后, 连接于 pMD-18T 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 挑选阳性菌液送上海 Invitrogen 公司进行测 序。

1.4 序列分析

利用 DNASTar 软件对测序结果进行整理、拼 接, 寻找开放读码框, 预测氨基酸序列和同源性鉴 定; 利用 ExPASy 提供的蛋白质组学工具 (<http://www.expasy.org/tools>) 中的 ProtParam 软件 进行氨基酸组成和等电点分析, SOPMA 软件进行 二级结构分析, ProtScale 软件进行疏水性分析; 利 用蛋白质功能位点数据库 Prosite (<http://www.expasy.org/prosite>) 进行蛋白的保守结 构域和功能预测。

1.5 组织表达特性分析

以 β -actin 作为对照, 用相对定量 RT-PCR 方法对 野猪 *CAPN7* 基因的组织表达进行定位, 比较大白猪 和野家杂交猪肌肉组织中 *CAPN7* 基因的表达情况。 RT-PCR 反应利用 BcaBEST™ RNA PCR Kit, Ver.1.1 试剂盒进行, 通过预试验确定扩增 *CAPN7*/ β -actin 基 因的循环数为 28/23, 保证在指数增长期进行数据 分析。图像拍摄及灰度分析采用 AlphaImager System, 根据目的基因与内参的净灰度之比, 确定 样品中目的基因 mRNA 表达的相对含量, 用 SAS 和 Microsoft excel 进行相对表达量的数据分析和图表 绘制。

1.6 变异分析

对 P1 引物的扩增结果利用 PCR-SSCP 方法进 行单核苷酸多态性检测和基因型分析, 具体方法见 Yang et al (2007, 2008)。

2 结果与分析

2.1 克隆与序列分析

5 对引物都得到了预期长度的特异性片段 (图 1)。测序、拼接后 mRNA 全长 2501 bp, 包含 2442 bp 的全长编码区, 预期编码 813 个氨基酸残基的多 肽链 (图 2), 相对分子质量为 92 k, 等电点为 7.54。 该序列已经提交到 GenBank 上 (GenBank Accession No: EU328309)。序列分析表明, *CAPN7* 高度保 守, 在编码区核苷酸水平上, 野猪与家猪的相似性 为 99.26%, 与人和小鼠的相似性分别为 91.3% 和 88.8%; 在氨基酸水平上, 野猪与家猪的相似性为 98.77%, 与人和小鼠的相似性分别为 95.4% 和 95.1%。

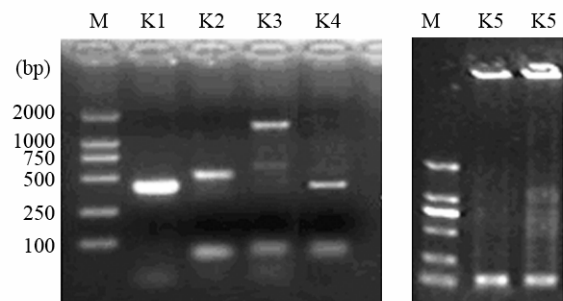


图 1 各引物扩增结果的凝胶电泳图片

Fig. 1 Electrophoresis pattern of amplification result by each primer pairs

M: 分子量标记 DL2000 (Marker DL2000)。

```

MDAAALERDAVQFARLAVQRDHEGRYSEAVFYKAAQALIYAEMAGSSLEHIQEKINEY    60
LERVQALHSVQSKSADPLKSKHQLDLERAHFLVTOAFDEDEKGNVEDAIELYTEAVDLC    120
LKTSYETADKTLQNKLKQLARQALDRAEALSEPLTKPLCKVKAATNIKPKPPPTTRTHFPLG  180
TNPFQERPQPFISQSCDAQGQRYTAEIEVLRTTSKINGIEYVPMNIDLRRERFAYPMP    240
FCDRCGKPLPLSPKQKAMFSKWVRPEDLTNNPTMIYTVSSFSIKQTIIVSDCSFVASLAISA  300
AYERRFNKKLITSIIYPQNKDGEPEYNPCGKYMVKLHLNGVPRKVIIDDQLPVDHKGELL    360
CSYSNNKSELWVSLIEKAYMKVMGGYDFPGSNSNIDLHALTGWIPERIATHSDSQSFSKD    420
NSFRMLYQRFHKGVDLITASTGVMTAEAGEKWLVPHTAYAVLDIREFKGLRFIQLKNPW    480
SHLRWKGRYSEDDVKNWTPPELQKYLNFDPRTAQKIDNGIFWISWDDLQYYDVIYLSWNP    540
GLFKESTCIHSTWDAKQGPVKDAYSLANNPQYKLEVCQPGGA&AVWVLLSRHITDKDDFA    600
MNREFITMVVYKTDGKKVYYPADPPYIDGIRINSPHYLTKIKLTTPGTHFTLVVVSQYE    660
KQNTIHYTVRVYSACSFTFKIPSPYTVSKQINGKWSGQSAGGCGNFQETHKNNPIYQFH    720
IEKSGPLLIELRGPRQYSVGFVVTVSVVGDPPGHGFORKSSGDYRCGFCYLELESIPAG    780
IYNIIPSTFLPKQEGPFFLDFNSVIPIKTTQLQ    813

```

图 2 预测的野猪 calpain7 氨基酸序列

Fig. 2 Predicted amino acid sequence of the wild boar calpain 7

表 2 PROSITE 预测的野猪 *CAPN7* 的结构功能域
Tab. 2 Domains in *CAPN7* of the wild boar predicted by PROSITE

结构域 Domain	数量 Number	位置 Location
TYR_PHOSPHO_SITE	3	20-26; 25-32; 320-326
CK2_PHOSPHO_SITE	13	48-51; 123-126; 205-208; 373-376; 393-396; 410-413; 445-448; 490-493; 523-526; 551-554; 594-597; 657-660; 761-764
PKC_PHOSPHO_SITE	7	215-217; 251-253; 281-283; 422-424; 594-596; 668-670; 710-712
CAMP_PHOSPHO_SITE	1	759-762
MYRISTYL	6	201-206; 390-395; 453-458; 630-635; 698-703; 702-707
ASN_GLYCOSYLATION	1	366-369
AMIDATION	1	614-617

2.2 结构功能域分析

利用蛋白质功能位点数据库 Prosite 对野猪 *CAPN7* 的氨基酸序列进行结构功能域分析,发现在多肽链的 260~540 氨基酸处,存在着 calpain 家族的催化结构域,催化活性中心分别位于 290 (半胱氨酸, Cys)、458 (组氨酸, His) 和 478 位 (天冬酰胺, Asn) 氨基酸处。此外,还存在有酪氨酸激酶磷酸化位点、CK-2 磷酸化位点、PKC 磷酸化位点、CAMP 磷酸化位点、豆蔻酰化位点、糖基化位点和酰胺化位点等。详细情况见表 1。

2.3 二级结构与疏水性分析

二级结构分析表明,野猪 *CAPN7* 含有较多的 α -螺旋和无规卷曲, α -螺旋、 β -转角、无规卷曲和延伸链的含量依次为 30.14%、3.94%、46.86% 和 19.07% (图 3)。疏水性分析表明,多肽链的第 23 位氨基酸 (Glu) 得分最低,亲水性最强;第 290 位氨基酸 (Ala) 得分最高 (图 4),疏水性最强。从图 4 可以看出,在整个多肽链中亲水性氨基酸明显多于疏水性氨基酸,并且均匀分布,没有明显的疏水区域,因此野猪 *CAPN7* 为亲水性蛋白。

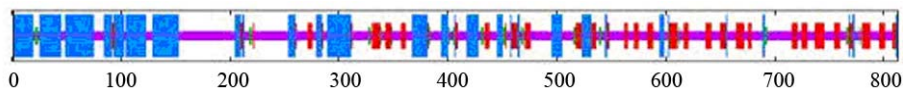


图 3 SOPMA 预测的野猪 *CAPN7* 二级结构

Fig. 3 Predicated secondary structure for calpain7 of the wild boar by SOPMA

蓝色: α -螺旋; 绿色: β -转角; 紫色: 无规卷曲; 红色: 延伸链
Blue: α helix; green: β turn; purple: random coil; red: extended strand.

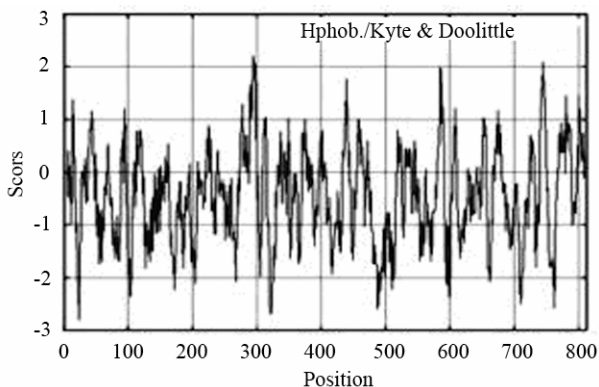


图 4 ProtScale 预测的野猪 *CAPN7* 疏水性分析结果
Fig. 4 Predicated hydrophobicity/hydrophilicity for the wild boar calpain7 by PortScale

2.4 组织表达特性分析

2.4.1 组织表达谱 RT-PCR 分析发现在所检测的 12 种组织中, *CAPN7* 基因都表达,但不同组

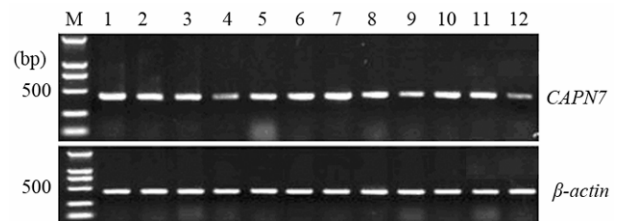


图 5 *CAPN7* 基因组织表达谱

Fig. 5 Expression pattern of *CAPN7* gene in tissues

M: 分子量标记 DL 2000; 1: 胃; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肺; 5: 心; 6: 肝; 7: 大肠; 8: 小肠; 9: 性腺; 10: 子宫; 11: 肌肉; 12: 脂肪。
M: Marker DL 2000; 1: stomach; 2: kidney; 3: spleen; 4: lung; 5: heart; 6: liver; 7: large intestine; 8: small intestine; 9: gonad; 10: uterus; 11: muscle; 12: fat.

织中的相对表达量存在着差异,肺脏和脂肪组织中低表达 (图5)。

2.4.2 大白猪和野家杂交猪肌肉组织中的表达情况比较 相对定量RT-PCR方法比较了 *CAPN7* 基因

在3、6、9、12月龄大白猪和野家杂交猪肌肉组织中的表达情况, 结果见图6。

2.5 变异分析

P1 引物的扩增产物经SSCP检测后, 得到3种基因型, 分别命名为AA、AB、BB(图7)。测序后发现两种纯合子在扩增产物的第192 bp处存在着A/G的替代, A等位基因在该位置处的碱基为G, B等位基因为A。该碱基替代为错义突变, 导致蛋白质多肽链第779位氨基酸由Ala变为Thr。检测了不同基因型在野猪、民猪和杜洛克3个猪种中的分布, 各基因型检出数、基因频率、多态信息含量(PIC)等统计参数值见表3。 χ^2 独立性检验表明, 3种基

因型在不同猪种中的分布存在着显著的差异($P<0.01$)。

3 讨论

钙蛋白酶是一类钙激活中性蛋白酶, 主要存在于肌纤维Z盘附近及肌质网膜上, 是导致联结蛋白、伴肌动蛋白、细丝蛋白、肌间蛋白、肌钙蛋白-T等多种肌原纤维蛋白降解的关键酶(Koohmarie, 1994; Huang et al, 1998)。大量的研究表明, 活体中降低肌原纤维蛋白的降解率可以促进肌肉生长, 提高营养物质转化效率; 而在宰后提高肌原纤维蛋白降解率或弱化肌原纤维结构, 可以促进肉的

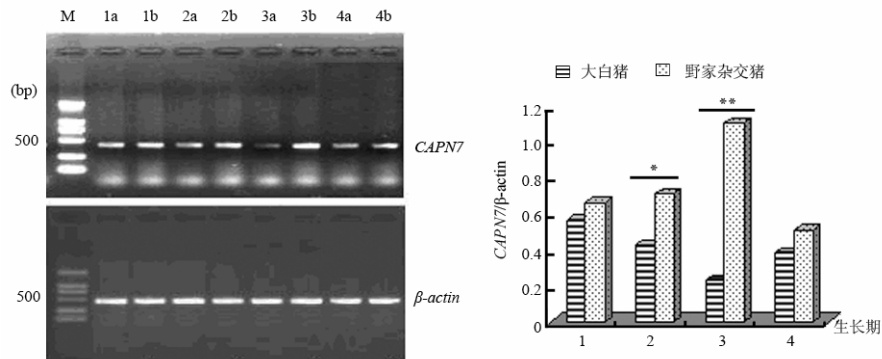


图6 *CAPN7* 基因在大白猪和野家杂交猪肌肉组织中的表达情况比较

Fig. 6 The comparison of *CAPN7* level between muscles from Yorkshire and Crossbred

M: 分子量标记 DL 2000; a: 大白猪; b: 野家杂交猪; 1: 3月龄; 2: 6月龄; 3: 9月龄; 4: 12月龄。*表示差异显著 ($0.01<P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)。

M: Marker DL 2000; a: Yorkshire; b: Crossbred; 1: 3-month-old; 2: 6-month-old; 3: 9-month-old; 4: 12-month-old. Asterisk indicates significant difference, $* 0.01<P<0.05$, $** P<0.01$.

表3 3品种猪 *CAPN7* 基因多态位点的统计参数值

Tab. 3 Statistic value of *CAPN7* gene among the wild boar, Min pig and Duroc

品种 Breeds	基因型检出数 Genotype number			基因频率 Gene frequency		多态信息含量 PIC
	AA	AB	BB	A	B	
野猪 Wild boar	4	9	1	0.6072	0.3928	0.3632
民猪 Min pig	19	4	0	0.913	0.0870	0.1461
杜洛克 Duroc	20	0	0	1	0	0

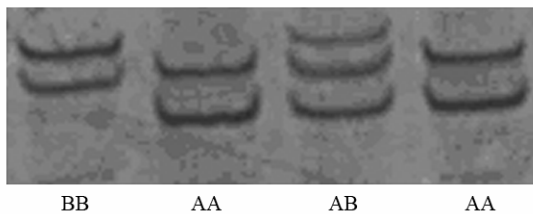


图7 *CAPN7* 基因的多态性检测结果

Fig. 7 Polymorphism analysis of *CAPN7* fragments

嫩化。因此, 揭示钙蛋白酶的功能, 实现对其活性

的调控具有重要的理论和实践意义。

分离基因序列、检测其组织表达特性是进行功能研究的基础, 本研究在成功克隆家猪 *CAPN7* 基因的基础上, 利用 RT-PCR 方法, 克隆了野猪 *CAPN7* 基因 cDNA。序列分析表明野猪 *CAPN7* 具有钙蛋白酶家族的特征性结构域——催化结构域和催化活性中心, 暗示着 *CAPN7* 与其他钙蛋白酶一样具有蛋白降解能力。

在本次实验所采集的野猪 12 个组织中, 都有

CAPN7 基因表达, 与人、鼠中的研究结果一致 (Franz et al, 1999; Futai et al, 2001), 进一步证实了 calpain7 是普遍表达的钙蛋白酶, 参与机体的生长与代谢过程; 但其相对表达量存在着组织差异, 肺脏和脂肪组织中低表达, 说明 *CAPN7* 基因的表达受到严格的调控, 也从一个侧面证明了 calpain7 在生长发育过程中的重要作用。

Calpains 通过对肌原纤维蛋白进行特异的局部降解而对其结构、功能进行调控, 其表达量与肌肉生长、嫩度存在一定的相关性 (Morgan et al, 1993; Doumit et al, 1999)。本研究以生长速度和嫩度性状

上存在明显差异的大白猪和野家杂交猪肌肉组织为实验材料, 比较了两者之间 *CAPN7* 基因转录量的差异, 结果发现在 6、9 月龄的野家杂交猪肌肉组织中的表达量显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 高于相同日龄的纯种大白猪。该结果预示着大白猪肌肉组织中 *CAPN7* 的含量较低, 降解蛋白质的能力较弱, 这与大白猪生长速度快、瘦肉率高的特点是相一致的。但是, 由于本研究只检测了 *CAPN7* 基因的转录量, 缺少蛋白水平的数据, 导致实验结果还不够完善, *CAPN7* 蛋白水平的研究将是下一步工作的重点。

参考文献:

- Doumit ME, Koohmaraie M. 1999. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in post-mortem muscle[J]. *J Anim Sci*, **77**: 1467-1473.
- Franz T, Vingron M, Boehm T, Dear TN. 1999. Capn7: A highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain[J]. *Mamm Genome*, **10**: 318-321.
- Futai E, Kubo T, Sorimachi H, Suzuki K, Maeda T. 2001. Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB[J]. *Biochim Biophys Acta*, **1517**: 316-319.
- Goll DE, Thompson VF, Li HQ, Wei W, Cong JY. 2002. The calpain system[J]. *Physiol Rev*, **83**: 731-801.
- Honda M, Masui F, Kanzawa N, Tsuchiya T, Toyooka T. 2008. Specific knockdown of m-calpain blocks myogenesis with cDNA deduced from the corresponding RNAi[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, **294**: C957-965.
- Huang J, Forsberg NE. 1998. Role of calpain in skeletal muscle protein degradation[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, **95**: 12100-12105.
- Huo JL, Huo HL, Miao YW, Li FQ, Liu LX, Wu GM, Ouyang YN, Qian K. 2009. Genetic diversity of 76 STR loci in the Dahe pig[J]. *Zool Res*, **30**(1): 105-108. [霍金龙, 霍海龙, 苗永旺, 李福泉, 刘丽仙, 伍革民, 欧阳依娜, 钱坤. 2009. 大河猪 76 个 STR 基因座的遗传多态性. *动物学研究*, **30**(1): 105-108.]
- Ilian MA, Bekhit AED, Bickerstaffe R. 2004. Does the newly discovered calpain 10 play a role in meat tenderization during postmortem storage[J]. *Meat Sci*, **66**: 317-327.
- Koohmaraie M. 1992. The role of Ca^{2+} -dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness[J]. *Biochimie*, **74**(3): 239-245.
- Koohmaraie M. 1994. Muscle proteinases and meat aging[J]. *Meat Sci*, **36**: 93-104.
- Morgan JB, Wheeler TL, Koohmaraie M, Savell JW, Crouse JD. 1993. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers[J]. *J Anim Sci*, **71**: 1471-1476.
- Rowe LJ, Maddick KR, Longergan SM, Huff-Lonergan E. 2004. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain[J]. *J Anim Sci*, **82**(11): 3254-3266.
- Smith PL, Casas E, Rexroad III CE, Kappes SM, Keele JW. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness[J]. *J Anim Sci*, **78**(10): 2589-2594.
- Smith IJ, Dodd SL. 2007. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle[J]. *Exp Physiol*, **92**: 561-573.
- Yang XQ, Liu D, Yu H, Guo LJ, Liu H. 2008. Cloning, expression, and polymorphism of the porcine calpain10 gene[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, **40**: 356-363.
- Yang XQ, Liu H, Guo LJ, Xu Y, Liu D. 2007. The mutation site analysis on *CAPN1* gene of Wild boar, Min pig and Yorkshire[J]. *Hereditas*, **29**(5): 581-586. [杨秀芹, 刘惠, 郭丽娟, 许尧, 刘娣. 2007. 野猪、民猪、大白猪 μ -钙激活酶基因的变异位点分析. *遗传*, **29**(5): 581-586.]