

μ -calpain 激活因子 UK114 的克隆与序列分析

常 泓^{1*}, 南庆贤², 岳文斌³

(1. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801; 2. 中国农业大学食品学院, 北京 100083;

3. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘 要: 构建了山羊肝脏 cDNA 文库, 采用平板裂解法提取噬菌体 DNA, 以此为模板用所设计的引物以 PCR 法扩增出 μ -calpain 激活蛋白 UK114 基因, 并克隆到 pGEM-T easy 载体。序列分析表明, UK114 cDNA 包括起始密码子和终止密码子在内全长共计 1 017 bp, 5'非编码区长为 39 bp, 3'非编码区长为 567 bp, 编码区长 411 bp, 编码 137 个氨基酸序列。与 GenBank 中 Colombo 等所得 UK114 基因比较表明: 在 5'非编码区, UK114 为 102 bp, 克隆的 UK114 为 39 bp, 且二者仅有 9 个核苷酸序列是相同的; 紧接着是起始密码子 ATG, 然后是一个 411 bp 的阅读框 (40 nt~450 nt), 编码 137 个氨基酸, 理论分子量约为 15 ku, 二者在编码区仅有 1 个 bp 不同, 为无义突变; 在 3'非编码区为 552 bp, 所克隆的 UK114 为 567 bp, 二者在此区域有 57 个核苷酸序列是不同的; UK114 为 polyA, 所克隆的是不同的核苷酸。二者的同源率为 91%, 突变的 86 个核苷酸中都为无义突变, 开放阅读框中仅有一个核苷酸突变。

关键词: 钙激活酶; UK114; 克隆; 序列分析

中图分类号: S827.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)07-0629-06

Cloning and Sequence Analysis of UK114 of the Activator of μ -calpain

CHANG Hong^{1*}, NAN Qing-xian², YUE Wen-bin³

(1. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University,

Beijing 100083, China; 3. Animal Science and Technology College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China.)

Abstract: Goat liver cDNA library was constructed, and the DNAs of phage were isolated by plate lysate method. The UK114 gene was amplified by polymerase chain reaction, using two primers, and then were cloned into pGEM-T easy vector. Sequencing of the PCR-derived fragments showed that the UK114 cDNA consists of 1 017 bp. The 5' non-coding region consists of 39 bp, the 3' non-coding region consists of 567bp, and its coding region is about 411 bp (40 nt-450 nt), which can encode 137 amino acid (14.2ku). Compared this product with UK114 that Colombo reported, its 5' non-coding region consists of 102 bp, and there are 9bp identical. Their encoding region consists of 411 bp, and there is only one mutation nucleotide in coding region, and it is meaningless. The 3' non-coding consists of 522bp, the difference between them is that the UK114 of Colombo reported is the poly A tails and the UK114 is the different nucleotides. The homologous was 91%. There are 86 mutation nucleotides, and they are all meaningless. There is only one mutation nucleotide in coding region.

Key words: calpain; UK114; cloning; sequence analysis

收稿日期: 2005-08-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271003); 山西省科技攻关项目(011030); 山西省青年基金资助项目(20021038)

作者简介: 常 泓(1968-), 女, 博士后, 副教授, 主要从事食品科学、生物化学与分子生物学研究

* 通讯作者: 常 泓, Tel: 0354-6286908; E-mail: changhong523@yahoo.com.cn

Calpain(EC3. 4. 22. 17)是存在于果蝇属、寄生物细胞和所有脊椎动物细胞中的一种钙激活中性半胱氨酸内肽酶^[1~3];最新的研究表明,在植物、无脊椎动物和藻类中也存在 calpain^[4]。calpain 系统由三个因子组成:钙激活酶(calpain)、钙激活酶抑制蛋白(calpastatin)和钙激活酶激活蛋白(calpain activator)^[2,4],其中 calpain activator 是钙激活酶系统的新成员,是 calpain 的正调节因子。在医学方面,calpain 系统与各种生理和病理状态密切相关,如局部缺血、老年痴呆症、白内障、关节炎和癌症等疾病有关^[5,6];在畜牧业中,calpain 系统与肌肉的生长和发育密切相关,参与成肌细胞的融合和分化等作用^[7]。在食品研究中,calpain 的作用可导致横纹肌的肌原纤维 Z 盘裂解,使肌原纤维蛋白 titin、nebulin、desmin 和 Troponin-T 发生降解,从而使肌节部位断裂。因此,calpain 在动物宰后肌肉蛋白质的水解引起肉的嫩化中起重要作用^[8,9]。

据报道,哺乳动物中已有 13 个 calpains 通过鉴定^[4,10],目前研究比较清楚的是 μ -calpain 和 m-calpain。动物宰后, μ -calpain 的活性大大降低(宰后 24 h 为其起始活性的 40%,24 h 后到 14 d 逐渐减低到 0),但 m-calpain 和 calpastatin 的活性则几乎保持不变^[11]。与此作用相关联,宰后第 1 天肌肉嫩化速度最大,随后嫩度虽然继续增加,但嫩化速度降低。由此推测,在肌肉嫩化过程中 calpains 系统起主要作用的是 μ -calpain。另外,除动物本身的一些因素外,猪肉、羊肉和牛肉嫩度不同的一个原因是由于其宰后蛋白酶水解速度不同,猪肉中蛋白酶水解速度最快,羊肉次之,牛肉中蛋白酶水解速度最慢,且牛、羊、猪肉中 μ -calpain : calpastatin 的比值分别为:1 : 4,1 : 2.5,1 : 1.5^[8],由此可得:肌肉嫩度不同的原因是由于 μ -calpain 含量不同或是 μ -calpain 活性不同所导致的对肌肉产生的水解作用的不同。 μ -calpain 是导致肉嫩化最直接的酶,如何使 μ -calpain 继续保持高的活性是促进肉嫩化的最直接途径。

钙激活酶激活因子(calpain activator)是钙激活酶系统的新成员,是 calpain 活性的主要调节者^[12~14]。当 calpain activator 存在时,即使在正常生理状态的 $[Ca^{2+}]$ 条件下,calpain 也可以发挥其蛋白酶水解活性。calpain activator 的研究工作只有近 20 年的时间,且只有美国、意大利、日本等少数几个国家的少数几个科学家在进行这项研究工作,国

内还没有科学家对 calpain activator 进行研究。目前发现的 calpain activator 只有 2 种:UK114 就是 μ -calpain 的激活因子,ACBP-酰基辅酶 A 结合蛋白是 m-calpain 的激活蛋白^[14,15]。

本研究的目的是对 μ -calpain 的激活因子 UK114 cDNA 进行克隆和序列分析。以对 calpain activator cDNA(UK114 cDNA)进行克隆和表达,为 calpain activator 的结构及在细胞中所处的位置和 calpain activator 对 calpain 的作用机理的研究奠定基础。该研究还可为 calpain 作用机理作出科学的、准确的解释,如能达到高效表达,就可以制备钙激活酶激活蛋白的基因工程菌,为该酶在肉类嫩化中的实际应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 山羊肝脏 采样于河北省大厂县苇子庄村。屠宰剖腹取山羊肝脏,用剪刀剪数小块迅速置于液氮中。

1.1.2 宿主菌与载体 BL-21(DE3)、LE392 宿主菌购自鼎国生物技术中心;pMD18-T 质粒购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 试剂:mRNA 快速提取试剂盒(Quick Prep™ Micro Purification Kit)、cDNA 合成试剂盒购自安发玛西亚公司;噬菌体包装蛋白、噬菌体 λ gt10 载体、PCR 反应试剂盒、T₄DNA 连接酶购自 Promega 公司;Trizol 购自 TBD 公司;电泳试剂为 Sigma 公司进口分装产品;Nco I 和 BamH I 等内切酶购自华美生物公司;质粒纯化试剂盒、DNA 快速纯化/回收试剂盒、RNA 酶 A、DNA 酶 I、胰化蛋白胨、酵母提取物等购自鼎国生物技术中心;其他试剂为国产分析纯,购自鼎国生物技术中心。

1.1.4 UK114 基因的参考序列来自 GenBank。

1.1.5 引物的设计和合成 根据 GenBank 中 UK114 基因的序列(AF000167)设计引物,5'端从 ATG 开始,在其上游引入一个 Nco I 酶切位点及相应的保护碱基共 27 个核苷酸,3'引物选择在终止密码子后的一段序列共 32 个核苷酸,其中引入了一个 BamH I 酶切位点。由北京鼎国生物技术发展中心完成引物合成。

引物 1(5'): 5'-GACCA TGGCA TGTCG TCTTT GGTCA GA-3';

引物 2(3'): 5'-GAGGA TCCAA TCTGC AT-

GCT ATTTC ATTTC CA-3'。

1.2 方法

1.2.1 山羊肝脏 cDNA 文库的构建与分析 总 RNA 的提取采用 Trizol 提供的方法, mRNA 的提取、cDNA 的合成采用安发玛西亚公司 mRNA 快速提取试剂盒所提供的方法, 将 cDNA 克隆入 λ gt10 载体进行库容量的测定和文库的扩增, 提取 λ 噬菌体 DNA 用 *Eco*RI 限制性内切酶消化进行 cDNA 插入片段的分析。

1.2.2 山羊肝脏 DNA 的提取 采用平板裂解法, 宿主菌为 LE392。

1.2.3 PCR 法扩增 calpain activator cDNA 反应体系 50 μ L, 其中 λ 噬菌体 DNA 2 μ L, 10 \times buffer (Mg^{2+} Free) 5 μ L, 4 \times dNTP Mixture (10 mmol/L) 1 μ L, $MgCl_2$ 2 μ L, 引物 1、引物 2 (50 pmol/L) 各 2 μ L, *Taq* 酶 (2 U/ μ L) 1 μ L, 加灭菌水至 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}C$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 50 s, 55 $^{\circ}C$ 复性 50 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 50 s 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸加时 10 min, 4 $^{\circ}C$ 保存。在 MJ Research PTC-200 型 PCR 仪上进行。

1.2.4 PCR 产物的电泳和回收 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 并用 DNA 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。

1.2.5 PCR 产物与 pGEM-T easy 载体的连接转化 连接体系为: T_4 DNA Ligase 10 \times Buffer 1 μ L, pGEM-T 载体 (50 ng) 5 μ L, PCR 产物 (200 ng) 3 μ L, T_4 DNA Ligase (3 U/ μ L) 1 μ L, 连接条件为 4 $^{\circ}C$ 过夜。感受态细胞为 BL21 (DE3)。转化划线接种含有 Amp 的 LB 琼脂平板上培养, 挑取阳性克隆并接种 LB 液体培养基。

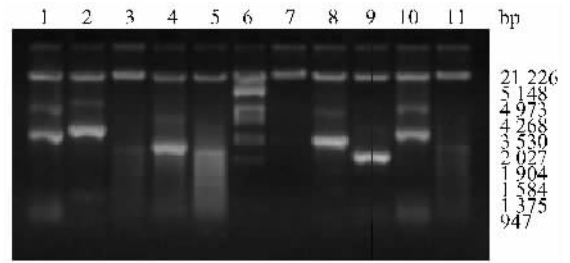
1.2.6 重组质粒的测序和序列分析 利用 PE 公司的 Big Dye Primer Ready Reaction Kit 进行反应, PE 公司 ABI-377 型全自动测序仪进行测序。为了保证序列测定的正确性, 每一种阳性质粒均使用 T_7 , SP_6 引物及 PCR 引物进行双向重复测定。测序结果用 DNAsis 进行分析。

2 结果与分析

2.1 山羊肝脏 cDNA 文库的构建及 cDNA 插入片段的分析

所构建的文库的噬菌体滴度为 2.6×10^6 pfu/mL。将噬菌体 DNA 进行 *Eco*R I 限制性内切酶消化, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 插入片段平均大小大于

1 kb, 结果如图 1。



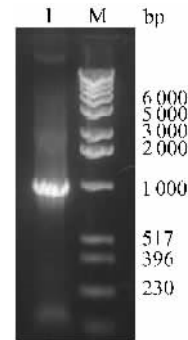
1~5, 7~11. λ DNA; 6. λ -*Hind* III digest marker

图 1 酶切检测 cDNA 文库平均插入大小

Fig. 1 Identification of the average insert fragment size of cDNA library

2.2 UK114 基因的 PCR 扩增

UK114 基因的 PCR 扩增产物如下 (见图 2)。



1. Product of PCR; M. Wind range DNA marker

图 2 PCR 扩增 UK114 cDNA

Fig. 2 The PCR fragment of UK114 cDNA

2.3 UK114 cDNA 与 GenBank 中 UK114 核苷酸序列和氨基酸序列的比较

对所得阳性克隆进行双向重复序列测定, 从而获得全长的 UK114 核苷酸序列 (图 3) 测序结果为: UK114 cDNA 包括起始密码子和终止密码子在内全长共计 1 017 bp, 5' 非编码区长为 39 bp, 3' 非编码区长为 567 bp, 编码区长 411 bp, 编码 137 个氨基酸序列。黑框锁定的核苷酸分别为起始密码子、终止密码子及酶切位点。

将得到的 UK114 cDNA 及由此推导出的相应氨基酸序列与 GenBank 中 Colombo 等^[16] 所得 UK114 基因进行比较, 如图 3。比较结果表明: 在 5' 非编码区, UK114 为 102 bp, 我们克隆的 UK114 为 39 bp, 且二者仅有 9 个核苷酸序列是相同的; 紧接着是起始密码子 ATG, 然后是一个 411 bp 的阅

读框(40 nt~450 nt),编码 137 个氨基酸,理论分子量约为 15 ku,二者在编码区仅有 1 个 bp 不同,为无义突变;在 3'非编码区,UK114 为 552 bp,本试验克隆的 UK114 为 567 bp,二者在此区域有 57 个核苷酸序列是不同的:UK114 为 polyA,本研究克隆的 UK114 则是不同的核苷酸。二者的同源性为 91%,突变的 86 个核苷酸中都为无义突变,开放阅读框中仅有一个核苷酸突变。

2.4 与 Melloni 等 1998 年报道的从牛脑中提取纯化的钙激活酶激活因子等蛋白质的比较

将克隆的 UK114 的氨基酸序列与 Melloni 等^[15]报道的从牛脑中提取纯化的钙激活酶激活蛋白的氨基酸序列相比发现,二者仅有 5 个位点不同,同源性为 98%。据报道,UK114 与小鼠 HR12 蛋白、大鼠肝脏 23 ku 都是肝脏中的蛋白质;与流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的热激蛋白 YjgF 和 YabJ 是同一家族中的成员。UK114 与小鼠 HR12 蛋白和大鼠肝脏 23 ku 相比发现同源性很高;与流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和枯草芽孢杆

菌(*Bacillus subtilis*)中的热激蛋白 YjgF 和 YabJ 比较发现同源性较低^[15]。

3 讨论

3.1 山羊肝脏 cDNA 文库的构建

本研究成功地构建了山羊肝脏 cDNA 文库,文库的噬菌体滴度为 2.6×10^6 pfu/mL,可插入的片段大于 1.0kb。数量多、质量高的 cDNA 是构建理想 cDNA 文库的关键,而得到足够数量、高质量的 cDNA 必须从总 RNA 和 mRNA 着手。在试验过程中,所需材料必须统筹准备好,尽量避免中间过程的停顿,以减少可能造成的 mRNA 的降解,以保证后续反应的正常进行。理论上认为,哺乳动物 cDNA 基因的平均长度为 1.5 kb,本研究最终得到的双链 cDNA 的长度集中于 1.0 kb 左右。考虑到最终所要克隆的目的基因所编码蛋白的 cDNA 大约为 1.0 kb 左右,因此认为这样的 cDNA 符合要求。经过计算该文库的克隆数为 1.3×10^6 ,理论上可以从该文库中筛选得到所要的目的基因。

```

2
2 TTGAAGCAGCGATTCTGGCTTCGGCTGGTCAGGCGAACGCGAGCGAGAACCGTGTGCTGCG
1
1 M S S L V R R
1 CATGCTCCCGGCCCCATGGCCGCGGGATTGACCATGGCATGTCGTCCTTTGGTCAGAAGG
2 T*CTTGTTTCCGAAGGGCA**AAA**A*AA*GGTTA*C*****
+ + + + + + +
1 I I S T A K A P A A I G P Y S Q A V L V
1 ATAATCAGCAGCGCGAAAGCCCCCGCGGCCATTGGTCCCTACAGTCAGGCTGTGTTAGTC
2 *****
2 + + + + + + + + + + + + + + + + +
1 D R T I Y I S G Q L G M D P A S G Q L V
1 GACAGGACCATTTACATTTACAGGACGCTAGGTATGGACCCTGCAAGTGGACAGCTTGTG
2 *****
2 + + + + + + + + + + + + + + + + +
1 P G G V V E E A K Q A L T N I G E I L K
1 CCAGGAGGGGTGGTAGAAGAGGCTAACAGGCTCTTACAAACATAGGTGAAATTCTGAAA
2 *****
2 + + + + + + + + + + + + + + + + +
1 A A G C D F T N V V K A T V L L A D I N
1 GCAGCAGGCTGTGACTTCACGAATGTGGTAAAAGCAACGGTTTTTGTGGCTGACATAAAT
2 *****C*****
2 + + + + + + + + + + + + + + + + +
1 D F S A V N D V Y K Q Y F Q S S F P A R
1 GACTTCAGTGTGTCATGATGTCTACAAACAATATTTCCAGAGTAGTTTTCCGGCGAGA
2 *****
2 + + + + + + + + + + + + + + + + +

```

```

1  A A Y Q V A A L P K G G R V E I E A I A
1  GCTGCTTACCAGTTGCTGCTTTGCCAAAGGAGGCCGTGTTGAGATCGAAGCAATAGCT
2  *****
2  + + + + + + + + + + + + + + + + + +
1  V Q G P L T T A S L
1  GTGCAAGGACCTCTCAGCACAGCATCACTCTAAGTGGGCCAAGTGTATTTAGTCTGGAA
2  *****
2  + + + + + + + + + +
1  ATTTAATAGTATTTTTAAACTAATGGCTTAATCCTTGTGGAAAGTATTAAGGTTGAAAT
2  *****
1  ATCTGAAAATATTATGGAAATACCATATAATAAGGGAAACGATATGAATTGAAGATTAAT
2  *****
1  GATGAATCTAGTTACTAATATTACAAATTATACTTCTGTAACACTTGTATTGCTGGATGT
2  *****
1  GGGAAAACAGACATGCCTTACTGAGTTAACTCAGAAGAATAAAAGTAGAAGGAAATAACA
2  *****
1  TGTAGGAAAGATGAGCTACTATGCCTGAAAAGTAAGAAAAAGCACACCTAATTCAACTAA
2  *****
1  ACACTATTAATTTAATGATGGGAAGTATTTTATTATGTCAGATATGTGATTTTACTTGA
2  *****
1  ATAAAATAAGCATTTAAATTTGCATGGCAGAGATAAAGGAGAAGAACTGGACCAAT
2  *****A*****
1  TTTATA[TAG]ATAATATTTTC[TAG]TGAAATAAAATAGCATGCAGATT[GGATCC]TCAATC
2  *****TTCAAAAAAAAAA
1  AC[TAG]TGGCGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGGTGGATGC
2  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

* 表示相同的碱基; + 表示相同的氨基酸

1. UK114(PCR); 2. UK114(Colombo);

* indicate the same bases; + indicate the same amino acids

图 3 UK114 与报道 UK114 的氨基酸及核苷酸序列的比较

Fig. 3 The comparison of amino acid and nucleotide sequences between UK114(PCR)and UK114(Colombo)

3.2 UK114 基因的克隆与序列分析

本研究采用平板裂解物法提取噬菌体 DNA, 根据 UK114 的 cDNA 序列设计了一对引物, 经 PCR 扩增获得了一个长度约为 1 kb 的 cDNA 片段。序列测定结果表明该片段为一长 1 017 bp 的 cDNA 片段, 与报道 UK114(1 065 bp) 的序列相比同源性为 91%, 有 86 个核苷酸发生突变, 其中在编码区有一个突变, 且此突变为无义突变。将克隆的 UK114 cDNA 推导的氨基酸序列与 Melloni 等^[14]报道的从牛脑中提取纯化的钙激活酶激活蛋白的氨基酸序列相比发现, 二者仅有 5 个位点不同, 同源性为 98%。

分析 Colombo 等克隆的 UK114 的序列发现,

UK114 的 5'非编码区长 102 bp, 而本试验所克隆的长 39 bp。在 3'非编码区, UK114 为 552 bp, 本研究克隆的为 565 bp, 其中有 54 个核苷酸序列不同, 且这些不同主要表现在: 前者为 polyA 尾, 本研究克隆产物为各种核苷酸。这些非编码区的不同对 calpain activator cDNA 在大肠杆菌中的表达调控有无影响有待于今后继续探讨。

参考文献:

[1] Croall D E, DeMartino G N. Comparison of two calcium-dependent proteinases from bovine heart[J]. Biochemical and Biophysical Acta, 1984, 788: 348~355.
 [2] Croall D E, DeMartino G N. Calcium-activated neutral

```

1      M-----SSLVRRII STA
CA     M-----SSLVRKII STA
HR12  MYGASVQSERTEKRVKDSGCSYLSFLLLEGLQEGRI SMSSI I RKVI STT
YJGF  M-----MTQI I HTE
23ku  M---VVNNQKSKDQHF-----
YABJ  M-----KTAV-HTK

1      KAPAA I GPYSQAVLVDR T I Y I SGQLGMDPAAGQLVPGGVVEEAKQAL T N I
CA     KAPAA I GPYSQAVLVDR T I Y I SGQLGMDPAAGQLVPGGVVEEAKQAL T N I
HR12  KAPAA I GPYSQAVGVDR T I Y I SGQVGLDPSSGQLVPGGVVEEAKQAL K N L
YJGF  KAPAA I GPYVQAVDLGNL V L T S G Q I P V N P A - T G E V P A D I V A Q A R Q S L E N V
23ku  KSPGA I G A Y S Q A V L V D R T I Y V S G Q I G M D P S S G Q L V P G G V A E E A K Q A L T N I
YABJ  H A P A A I G P Y S Q G I I V N N M F Y S S G Q I P L T P S - G E M V N G D I K E Q T H Q V F S N L

1      G E I L K A A G C D F T N V V K A T V L L A D I N D F S A V N D V Y K Q Y F --- Q S S F P A R A
CA     G E I L K A A G C D F T N V V K A T V L L A D I N D F S T V N D V Y K Q Y F --- Q S S F P A R A
HR12  G E I L K A A G C D F N N V V K T T V L L A D M N D F G T V N E I Y K T Y F --- Q G S L P A R A
YJGF  K A I I E K A G L T A A D I V K T T V F V K D L N D F A A V N A E Y E R F F K E N N H P N F P A R S
23ku  G E I L K A A G C D F T N V V K T T V L L A D I N D F G T V N E I Y K T Y F --- Q G N L P A R A
YABJ  K A V L E E A G A S F E T V V K A T V F I A D M E Q F A E V N E V F G Q Y F D T H K --- P A R S

1      A Y Q V A A L P K G G R V E I E A I A V Q G P L T T A S L
CA     A Y Q V A A L P K G G R V E I E A I A V Q G P L T T A --
HR12  A Y Q V A A L P R G S R V E I E A I A V Q G P F I T A --
YJGF  C V E V A R L P K D V G L E I E A I A V R K -----
23ku  A Y Q V A A L P K G S R I E I E A I A V Q G P F T T A G V
YABJ  C V E V A R L P K D A L V E I E V I A L V K -----

```

1. 本试验推导的氨基酸序列; CA. 牛脑中提纯的钙激活酶激活蛋白; HR12. 鼠 HR 蛋白; 23 ku. 鼠肝脏蛋白; YJGF 和 YABJ. *Haemophilus influenzae* 和 *Bacillus subtilis* 中提纯的热激蛋白

1. Deduced amino acid sequence of this paper; CA. Calpain activator purified from bovine brain; HR12. Mouse HR protein; 23 ku. Protein from rat liver; YJGF and YABJ. Heat-shock protein from *Haemophilus influenzae* and *Bacillus subtilis*

图4 UK114 基因编码区氨基酸序列的同源性比较

Fig. 4 Homologous comparison of amino acid of UK114 gene coding region

protease (calpain) system; structure, function, and regulation[J]. *Physiological Review*, 1991, 71(3): 813~847.

- [3] Saido T C, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: New perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement[J]. *FASEB Journal*, 1994, 8: 814~822.
- [4] Goll D, Thompson V, Li H Q, *et al.* The calpain system[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83: 731~801.
- [5] Saito K I, Elce J S, Hamos J E, *et al.* Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain)

in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration[J]. *Proc Natl Sci*, 1993, 90: 2 628~2 632.

- [6] Azarian S M, Schlamp C L, Williams D S. Characterization of calpain II in the retina and photoreceptor outer segments[J]. *Journal of Cell Science*, 1993, 183: 339~347.
- [7] Fox J E B, Goll D E, Reynolds C C, *et al.* Identification of two proteins (actin-binding protein and P235) that are hydrolyzed by endogenous Ca^{2+} -dependent protease during platelet aggregation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260 (2): 1 060~1 066.
- [8] Koohmaraie M. Muscle proteinases and meat aging[J]. *Meat Science*, 1994, 36: 93~104.
- [9] Quali A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development[J]. *Biochimie*, 1992, 74: 251~265.
- [10] Dear T N, Moeller A, Boehm T. CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6 [J]. *Genomics*, 1999, 59(2): 243~247.
- [11] Zamora F, Debiton E, Lepetit J, *et al.* Predicting variability of ageing and toughness in beef *M. Longissimus lumborum et thoracis* [J]. *Meat Science*, 1996, 43(3): 321~333.
- [12] DeMartino G N, Blumenthal D K. Identification and partial purification of a factor that stimulates calcium-dependent proteases[J]. *Biochemistry*, 1982, 21: 4 297~4 303.
- [13] Pontremoli S, Melloni E, Michetti M, *et al.* An endogenous activator of the Ca^{2+} -dependent proteinase of human neutrophils that increases its affinity for Ca^{2+} [J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 1 740~1 743.
- [14] Melloni E, Michetti M, Salamino F, *et al.* Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for μ -isoforms[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(21): 12 827~12 831.
- [15] Melloni E, Averna M, Salamino F, *et al.* Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(1): 82~86.
- [16] Colombo I, Cebrizio F, Ronchi S, *et al.* cDNA cloning and *Escherichia coli* expression of UK114 tumor antigen [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1 442: 49~59.