

牦牛 *CAPN4* 基因启动子区突变对胴体及肉质性状的影响

牛晓亮¹, 李彦清¹, 胡江¹, 罗玉柱¹, 郭淑珍², 闫伟¹, 杨树猛²

(1. 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃省草食动物生物技术重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘南州畜牧科学研究所, 甘肃 合作 747000)

摘要:为检测 *CAPN4* 基因在牦牛群体中的多态性, 分析 *CAPN4* 基因启动子区突变对甘南牦牛胴体及肉质性状的影响, 寻找与牦牛此类性状相关的分子遗传标记。采用 PCR-SSCP 技术检测 830 头甘南牦牛、大通牦牛和天祝白牦牛 *CAPN4* 基因启动子区突变并分析其多态性, 运用 SPSS 19.0 软件中的 GLM 模型分析基因突变对甘南牦牛胴体及肉质性状的影响。牦牛 *CAPN4* 基因启动子区存在 a. -1222G > A 的单碱基突变, 检测到 AA、AB 和 BB 3 种基因型。相关性分析结果表明, a. -1222G > A 的突变对不同年龄甘南牦牛胴体和肉质性状有一定影响, 其中 4、6 岁牦牛 BB 型个体熟肉率显著高于 AA 型或 AB 型 ($P < 0.05$); 3、6 岁牦牛 AB 型个体失水率显著高于 BB 型或 AA 型 ($P < 0.05$), 而 5 岁牦牛 BB 型个体肌肉失水率显著高于 AA 型 ($P < 0.05$); 3、5 岁牦牛 BB 型个体的眼肌面积显著高于 AA 和 AB 型 ($P < 0.05$)。等位基因 A 对 4、6 岁牦牛熟肉率、各龄牦牛肌肉保水性和眼肌面积均存在不利影响; 除 5 岁牦牛携带等位基因 A 个体的胴体重显著低于未携带者外, 该突变对其他年龄段牦牛胴体重及全部牦牛个体的肌肉嫩度无显著影响。*CAPN4* 基因启动子区 a. -1222G > A 突变影响不同年龄段甘南牦牛部分胴体及肉质性状, 可作为甘南牦牛此类性状的遗传标记。

关键词:牦牛; *CAPN4* 基因; 多态性; 胴体及肉质性状

中图分类号: Q78; S823.8⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)02-0028-07

doi: 10.7668/hbxb.2015.02.006

The Mutations in the Promoter Region of *CAPN4* and Its Effects on Carcass and Meat Quality Traits in Yak

NIU Xiao-liang¹, LI Yan-qing¹, HU Jiang¹, LUO Yu-zhu¹,
GUO Shu-zhen², YAN Wei¹, YANG Shu-meng²

(1. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Gansu Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Animal Husbandry Science of Gannan Prefecture, Hezuo 747000, China)

Abstract: To search for the molecular markers associated with meat traits in yaks, *CAPN4* mutations in the promoter region were investigated in different populations and their effects on carcass and meat quality were also analyzed. A total of eight hundred and thirty yaks which sourced from Gannan yak, Tianzhu white yak and Datong yak were used in this study. PCR-SSCP method was used to detect the *CAPN4* mutations in the promoter region. Associations between mutations and the carcass and meat quality traits of Gannan yak were analyzed using the general linear model (GLM) in SPSS 19.0 program. The mutation (a. -1222G > A) in the promoter region was identified, which led to three PCR-SSCP patterns (AA, AB and BB). The results of the statistical analysis indicated that the genotypes and allele effected carcass and meat quality in Gannan yak with different ages. At the ages of four and six, yaks possessing the genotype BB had higher cooking rate than those with possessing the genotype AA and AB ($P < 0.05$). At the ages of three and six, individuals with possessing the genotype AB had higher water loss rate

收稿日期: 2015-01-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160451); 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2010-02); 甘肃省国际科技合作专项(1304WCGA178)

作者简介: 牛晓亮(1989-), 男, 山西陵川人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与生产研究。

通讯作者: 胡江(1975-), 男, 甘肃秦安人, 副教授, 博士, 主要从事牛遗传育种与生产研究。

than those with possessing the genotype BB and AA ($P < 0.05$). However, yaks at the age of five, individuals with possessing the genotype BB had higher water loss rate than those with the genotype AA ($P < 0.05$). At age of three and five, individuals with the genotype BB had bigger eye muscle area than those with possessing the genotype AA and BB ($P < 0.05$). Yaks with possessing allele A had negative effect on cooking rate at the ages of four and six, as well as water-holding capacity and eye muscle area in all yaks. Excepting these yaks at the age of five, individuals with the presence of allele A had lower carcass weight ($P < 0.05$), the mutation had no effects on carcass weight and tenderness. The mutation (a. -1222G > A) in the promoter of *CAPN4* had an effect on carcass and meat quality partly, it might be used as a genetic marker to improve those traits in Gannan yak.

Key words: Yak; *CAPN4* gene; Polymorphism; Carcass and meat quality traits

钙蛋白酶 (Calpain, CAPN) 是一类广泛分布于哺乳动物细胞内且特异性依靠钙激活的中性半胱氨酸蛋白酶。Calpain 可以启动动物宰后胴体排酸嫩化过程中肌原纤维蛋白的降解, 是参与牛肉嫩化的重要蛋白酶^[1]。CAPN4 (Calpain small subunit1) 是组成 μ -calpain 和 m-calpain 的小亚基并调节其生化活性^[2]。在 Ca^{2+} 存在时, CAPN4 经历一个逐渐自崩解过程, 从而导致相应大亚基 (Calpain1 和 Calpain2) 产生酶活性^[3]。 μ -calpain 的活性与肌肉嫩度相关^[4], 因此, *CAPN4* 基因可作为影响肌肉嫩度性状的候选基因。牦牛 (*Bos grunniens*) 是青藏高原及其周边高海拔地区的主要牛种。牦牛肉蛋白质含量高、矿物质丰富, 是重要的高原特色肉食品, 但因肌肉纤维较粗、肌内脂肪沉积少, 影响肌肉的嫩度和风味^[5]。随着人们生活水平不断提高, 畜禽肉质的遗传调控逐渐成为遗传育种研究的热点和难点。因此, 对牦牛肉嫩度等肉质性状候选基因分子遗传进行研究具有一定的理论和实践意义。自 1964 年首次从大鼠的脑组织中发现 CAPN 以来^[6], 人类已克隆鉴定了 14 个 80 kDa 钙蛋白酶基因和 30 kDa 小亚基基因^[7]。CAPN4 作为钙蛋白酶的调节小亚基, 在促进细胞迁移、增殖、凋亡和分化过程中起着重要作用^[8-9]。牛 *CAPN4* 基因定位于第 18 号染色体, 有 11 个外显子^[10]。McClelland 等^[11]研究牛的大动脉管平滑肌时, 测定了 *CAPN4* 基因的 cDNA 序列。Juszczuk-kubiak 等^[10]在夏洛来牛和海福特牛的 *CAPN4* 基因第 11 外显子区 (转录 3'-UTR) 发现 6 536 位存在 C-T 的转换。Wolf 等^[12]证实较高水平的大理石花纹可以提高牛肉的嫩度、多汁性和风味, 减少牛肉在烹调过程中嫩度变化, 并推断 *CAPN4* 基因可能与牛肉嫩度存在必然联系。Chung 等^[13]发现 *CAPN4* 基因突变对安格斯牛大理石花纹和肉品质等级有显著影响。但李君灵等^[14]研究表明, 中国杂种牛 *CAPN4* 基因 intron6 区 T-C 单碱基突变对肌肉嫩度没有影响。牦牛 *CAPN4* 基因研究未见报道。

以甘南牦牛为研究对象, 检测其 *CAPN4* 基因启动子区突变, 并分析该突变对甘南牦牛胴体及肉质性状的影响, 以确定牦牛 *CAPN4* 基因与其胴体及肉质性状紧密关联的变异位点, 丰富牦牛肉质性状候选基因分子遗传研究素材, 也为牦牛肉质性状分子选育提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 试验动物与肉质测定

甘南牦牛 703 头, 其中 311 头来自甘肃省甘南藏族自治州夏河县, 392 头来自甘肃省甘南藏族自治州玛曲县; 天祝白牦牛 77 头, 来自甘肃省天祝藏族自治县; 大通牦牛 50 头, 来自青海省大通牛场。甘南牦牛在屠宰时采集血样 10 mL, 天祝白牦牛及大通牦牛颈静脉采血 10 mL, 所有血样 ACD (酸性柠檬酸葡萄糖) 抗凝, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

甘南牦牛采集血样后, 记录耳号、性别及年龄, 测定胴体及肉质性状。胴体重为牦牛屠宰后热胴体重; 眼肌面积测定时用硫酸纸描下胴体 12~13 肋骨间眼肌横断面, 然后用求积仪测定眼肌面积。从宰后牦牛眼肌取鲜肉样品, 现场测定嫩度、失水率及熟肉率。其中嫩度测定参照《肉嫩度的测定 剪切力值测定法》(NY/T 1180-2006), 用 C-LM3 型数显式嫩度仪测定剪切力值; 失水率用钢环膨胀压缩仪施压 35 kg, 持续 5 min 的方法测定; 熟肉率为鲜肉样经 40 min 蒸煮并冷却后, 计算熟肉重占鲜肉重的百分比。

1.2 基因组 DNA 提取

采用苯酚-氯仿法^[15]从冻存血样中提取基因组 DNA。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 公布的普通牛 *CAPN4* 基因启动子序列 (登录号: AC000175), 应用 Primer3.0 软件设计特异性扩增引物, 扩增牦牛 *CAPN4* 基因启动子部分序列 (预期片段长度 209 bp)。上游引物 (F): 5'-TCCCAAGACAAGTATCAGGAGT-3', 下游引物

(R):5'-CTGCGTTTCCAGTGCCTTG-3'。引物由北京六合华大基因公司合成。

PCR 反应体系总体积 20 μ L;DNA 模板 0.8 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, TaKaRa Premix Taq 聚合酶 11 μ L, 灭菌超纯水 7.4 μ L。

PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,63 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 SSCP 检测及等位基因序列测定

取 2 μ L 的 PCR 产物,加入 8 μ L 变性上样缓冲液(98% 去离子甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10 mmol/L EDTA),105 $^{\circ}$ C 变性 10 min,迅速冰浴 5 min 后,上样到 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Scr=39:1),300 V 电压、电泳槽水循环温度 4.5 $^{\circ}$ C 电泳 18 h。电泳结束后用银染法^[16]染色并判定基因型。

检测群体中等位基因为纯合型个体时,PCR 产物直接测序;如等位基因仅存在于杂合个体中时,对特异性 SSCP 条带切胶、重新扩增后测序^[17]。等位基因序列测定在北京六合华大基因公司完成。

1.5 统计分析

应用 SPSS 19.0 统计软件中一般线性模型(GLM)分析 CAPN4 基因启动子区突变对甘南牦牛肉质性状的影响。随着年龄的增大,动物肌肉中结缔组织含量增多,致使肌肉嫩度下降^[18],因此,对甘南牦牛群体分年龄段分析基因突变对肉质的影响。

```
普通牛 Cattle  TCCCAAGACAAGTATCAGGAGTCTTTTCAGAGGAAACCGAAAGCCACATCTGTGAGACGATGGCAGCAGGCTTTCGGGC
牦牛A Yark A  -----
牦牛B Yark B  -----
普通牛 Cattle  GAAAATCGACACTAGGTGCGCTTGGGCACGATGACTGCCAAGTTCCTAGGGACTGCATAGAGTAGAGAAAGACCTCG
牦牛A Yark A  -----
牦牛B Yark B  -----
普通牛 Cattle  ATCTGTCAACTCAGGCGGTGTGCGGAATGCAAGGCACTGGAAACGCAG
牦牛A Yark A  -----
牦牛B Yark B  -----
```

图 2 牦牛和普通牛 CAPN4 基因启动子区等位基因序列比对

Fig.2 Alignment of the CAPN4 allelic sequences in promoter region in yak and cattle

2.3 牦牛 CAPN4 基因启动子区多态性分析

甘南牦牛、天祝白牦牛和大通牦牛 CAPN4 群体遗传多态性分析结果见表 1。由表 1 可知甘南牦牛

甘南牦牛来源于不同地区,饲养环境也存在一定差异,因此考虑场效应对性状的影响。其统计模型为:

$$Y_{ijk} = \mu + Genotype_i + Gender_j + Farm_k + e_{ijk}$$

$$Y_{ijk} = \mu + Allele_i + Gender_j + Farm_k + e_{ijk}$$

式中: Y_{ijk} 为性状表型值, μ 为群体均值; $Genotype_i$ 为基因型效应; $Gender_j$ 为性别效应; $Allele_i$ 为等位基因效应; $Farm_k$ 为场效应; e_{ijk} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 牦牛 CAPN4 基因 PCR-SSCP 检测结果

甘南牦牛、天祝白牦牛及大通牦牛 CAPN4 基因 PCR 产物 SSCP 电泳带型见图 1。在引物扩增区域发现 2 种 SSCP 带型,分别代表 2 种等位基因 A 和 B,形成 AA、AB 和 BB 共 3 种基因型。

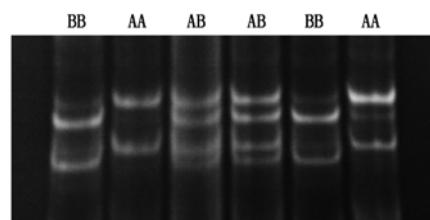


图 1 牦牛 CAPN4 基因启动子区 PCR-SSCP 电泳

Fig.1 PCR-SSCP pattern of CAPN4 promoter region in yak

2.2 牦牛 CAPN4 基因等位基因序列比对

甘南牦牛、天祝白牦牛及大通牦牛 CAPN4 基因引物扩增区域各等位基因序列比对见图 2。等位基因 A 序列与普通牛相同;相对于等位基因 A,等位基因 B 存在 a. -1222G>A 的突变。

表 1 牦牛 CAPN4 基因启动子区遗传多态性分析

Tab.1 Genetic diversity of the CAPN4 promoter in yak

群体 Population	个体数 Number	基因型频率 Genotypic frequency			基因频率 Allelic frequency		遗传多态性 Genetic polymorphism			
		AA	AB	BB	A	B	Ho	He	Ne	PIC
甘南牦牛 Gannan yak	703	0.253 2	0.506 4	0.240 4	0.506 4	0.493 6	0.493 6	0.506 4	1.999 7	0.375 0
天祝白牦牛 Tianzhu white yak	77	0.181 8	0.623 4	0.194 8	0.493 5	0.506 5	0.377 6	0.623 4	1.999 7	0.375 0
大通牦牛 Datong yak	50	0.140 0	0.480 0	0.380 0	0.380 0	0.620 0	0.520 0	0.480 0	1.891 1	0.360 2

一般通过多态性信息含量 (Polymorphism information content, PIC)、纯合度 (Homozygosity, Ho)、遗传杂合度 (Heterozygosity, He) 和有效等位基因数 (Effective number of alleles, Ne) 衡量群体遗传多态性,进而估测群体的选择潜力。甘南牦牛、天祝白牦牛和大通牦牛 *CAPN4* 基因检测区域多态信息含量均为 $0.25 < \text{PIC} < 0.5$, 属中度多态。结果表明,3 类群牦牛在该基因位点具有较丰富的多态性。

2.4 甘南牦牛 *CAPN4* 基因启动子区突变与肉质性状关联分析

不同年龄甘南牦牛 *CAPN4* 启动子区基因型与肉质性状关联分析结果见表 2。应用等位基因“缺失/存在”方法^[19]分析主要等位基因对肉质性状的影响,分析结果见表 3。方差分析结果表明,*CAPN4* 基因启动子区突变对不同年龄甘南牦牛肉质性状有一定影响。

CAPN4 启动子区突变与 4,6 岁牦牛肌肉熟肉率显著相关 ($P < 0.05$)。各基因型间多重比较结果表明,4,6 岁牦牛 BB 型个体的熟肉率显著高于 AA 型或 AB 型 ($P < 0.05$); 等位基因 A 对 4,6 岁牦牛熟肉率有负面影响,携带等位基因 A 个体的熟肉率

显著低于未携带者 ($P < 0.05$)。

CAPN4 启动子区突变与 3,5,6 岁牦牛的宰后肌肉失水率显著相关 ($P < 0.05$)。3,6 岁牦牛 AB 型个体失水率显著高于 BB 型或 AA 型 ($P < 0.05$),6 岁牦牛携带等位基因 A 个体的肌肉失水率显著高于未携带者;5 岁牦牛 BB 型个体肌肉失水率最高且显著高于 AA 型 ($P < 0.05$),而 5 岁牦牛携带等位基因 A 及 B 个体的肌肉失水率均显著高于未携带者;3,7 岁牦牛携带等位基因 A 的个体失水率均高于未携带者,即等位基因 A 对牦牛肌肉保水性存在不利影响。

CAPN4 启动子区突变显著影响 3,5 岁牦牛的眼肌面积 ($P < 0.05$)。3,5 岁牦牛 BB 型个体的眼肌面积显著高于 AA 和 AB 型个体 ($P < 0.05$),携带等位基因 A 个体的眼肌面积显著低于未携带者 ($P < 0.05$),其他年龄段牦牛均有相同的变化趋势,即等位基因 A 对牦牛眼肌面积有不利影响。

另外,除 5 岁牦牛携带等位基因 A 个体的胴体重显著低于未携带者外,*CAPN4* 基因启动子区突变对其他年龄段牦牛的胴体重及全部牦牛个体的肌肉嫩度无显著影响。

表 2 甘南牦牛 *CAPN4* 基因启动子区基因型与胴体及肉质性状的关联分析

Tab. 2 Association of genotype of *CAPN4* promoter with carcass and meat quality traits in Gannan yak

年龄 Age	性状 Traits	基因型 Genotypes			P 值 P value
		AA	AB	BB	
3 岁 3 years (n = 32)	熟肉率/%	66.28 ± 2.59 (12)	65.58 ± 3.15 (11)	65.63 ± 2.69 (9)	0.96
	失水率/%	23.00 ± 2.31a (12)	28.41 ± 2.81b (11)	20.94 ± 2.40a (9)	0.02
	眼肌面积/cm ²	27.84 ± 2.37a (12)	26.34 ± 2.88a (11)	37.71 ± 2.46b (9)	0.00
	嫩度/(kg·f)	5.47 ± 0.66 (12)	5.15 ± 0.81 (11)	5.47 ± 0.69 (9)	0.89
	胴体重/kg	86.76 ± 13.60 (4)	96.72 ± 14.17 (7)	109.19 ± 14.90 (3)	0.53
4 岁 4 years (n = 52)	熟肉率/%	65.48 ± 1.95a (12)	67.50 ± 1.31ab (28)	71.42 ± 1.99b (12)	0.03
	失水率/%	20.66 ± 1.48 (12)	21.28 ± 1.00 (28)	22.15 ± 1.51 (12)	0.68
	眼肌面积/cm ²	32.43 ± 2.71 (12)	31.74 ± 1.82 (28)	33.38 ± 2.77 (12)	0.83
	嫩度/(kg·f)	6.19 ± 0.49 (12)	5.92 ± 0.33 (28)	6.03 ± 0.50 (12)	0.86
	胴体重/kg	103.59 ± 13.15 (9)	113.83 ± 8.52 (16)	93.22 ± 16.32 (6)	0.46
5 岁 5 years (n = 101)	熟肉率/%	65.86 ± 1.21 (21)	65.23 ± 0.80 (53)	65.06 ± 1.06 (27)	0.86
	失水率/%	18.53 ± 1.45a (21)	21.34 ± 0.91ab (53)	23.71 ± 1.27b (27)	0.02
	眼肌面积/cm ²	31.11 ± 1.91a (21)	31.49 ± 1.67a (53)	34.87 ± 1.77b (27)	0.01
	嫩度/(kg·f)	5.44 ± 0.33 (21)	5.57 ± 0.21 (53)	5.47 ± 0.29 (27)	0.93
	胴体重/kg	106.61 ± 6.82 (12)	108.34 ± 4.49 (25)	123.54 ± 5.72 (16)	0.07
6 岁 6 years (n = 466)	熟肉率/%	65.34 ± 0.54a (115)	65.01 ± 0.39a (235)	66.84 ± 0.55b (116)	0.02
	失水率/%	21.65 ± 0.47ab (115)	22.32 ± 0.33a (235)	20.90 ± 0.48b (116)	0.04
	眼肌面积/cm ²	31.75 ± 0.79 (115)	32.22 ± 0.57 (235)	32.84 ± 0.81 (116)	0.62
	嫩度/(kg·f)	5.51 ± 0.13 (115)	5.35 ± 0.10 (235)	5.44 ± 0.14 (116)	0.60
	胴体重/kg	120.73 ± 4.39 (49)	117.49 ± 3.22 (91)	116.63 ± 4.79 (41)	0.78
7 岁 7 years (n = 52)	熟肉率/%	65.45 ± 1.45 (18)	65.73 ± 1.18 (29)	61.26 ± 2.64 (5)	0.31
	失水率/%	21.39 ± 1.33 (18)	19.96 ± 1.08 (29)	19.89 ± 2.43 (5)	0.65
	眼肌面积/cm ²	32.34 ± 1.83 (18)	30.56 ± 1.48 (29)	30.55 ± 3.32 (5)	0.71
	嫩度/(kg·f)	5.63 ± 0.31 (18)	5.73 ± 0.25 (29)	4.73 ± 0.57 (5)	0.28
	胴体重/kg	103.59 ± 7.34 (12)	110.84 ± 6.28 (16)	97.90 ± 12.06 (4)	0.56

注:同行相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$),不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$);括弧内数字为各基因型的牦牛头数。表 3 同。

Note: The same letters within the same row show no significant difference ($P > 0.05$), the different letters show significant difference ($P < 0.05$); Figures in brackets are the number of yak with corresponding genotype. The same as Fig. 3.

表 3 甘南牦牛 *CAPN4* 基因启动子区等位基因与胴体及肉质性状的关联分析Tab. 3 Association of alleles of *CAPN4* promoter with carcass and meat traits in Gannan yak

年龄 Age	性状 Traits	等位基因 A Allele A			等位基因 B Allele B		
		存在 Present	缺失 Absent	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	存在 Present	缺失 Absent	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
3 岁	熟肉率/%	66.09 ± 2.44 (23)	65.72 ± 2.63 (9)	0.88	65.61 ± 2.45 (20)	66.29 ± 2.51 (12)	0.76
3 years	失水率/%	24.52 ± 2.36 (23)	20.70 ± 2.55 (9)	0.08	23.50 ± 2.50 (20)	21.90 ± 2.56 (12)	0.49
(n = 32)	眼肌面积/cm ²	27.42 ± 2.24a (23)	37.89 ± 2.41b (9)	0.00	33.81 ± 2.90 (20)	29.52 ± 2.96 (12)	0.11
	嫩度/(kg·f)	5.38 ± 0.62 (23)	5.51 ± 0.67 (9)	0.84	5.36 ± 0.63 (19)	5.51 ± 0.64 (12)	0.79
	胴体重/kg	91.45 ± 10.81 (11)	108.52 ± 14.42 (3)	0.32	102.58 ± 10.85 (10)	88.09 ± 13.11 (4)	0.35
4 岁	熟肉率/%	67.07 ± 1.25a (40)	71.61 ± 1.98b (12)	0.02	68.27 ± 1.30 (40)	65.04 ± 2.00 (12)	0.09
4 years	失水率/%	21.15 ± 0.94 (40)	22.21 ± 1.49 (12)	0.45	21.45 ± 0.95 (40)	20.57 ± 1.46 (12)	0.52
(n = 52)	眼肌面积/cm ²	31.89 ± 1.72 (40)	33.31 ± 2.73 (12)	0.56	32.06 ± 1.74 (40)	32.24 ± 2.68 (12)	0.94
	嫩度/(kg·f)	5.98 ± 0.31 (40)	6.00 ± 0.50 (12)	0.97	5.94 ± 0.31 (40)	6.18 ± 0.49 (12)	0.61
	胴体重/kg	110.76 ± 8.41 (25)	94.24 ± 16.11 (6)	0.30	109.92 ± 9.05 (22)	105.69 ± 13.16 (9)	0.76
5 岁	熟肉率/%	65.83 ± 0.66 (74)	64.60 ± 1.06 (27)	0.77	65.17 ± 0.64 (80)	65.86 ± 1.20 (21)	0.59
5 years	失水率/%	22.59 ± 0.81a (74)	21.82 ± 1.29b (27)	0.03	22.11 ± 0.77a (80)	18.48 ± 1.46b (21)	0.02
(n = 101)	眼肌面积/cm ²	31.39 ± 1.05a (74)	37.11 ± 1.66b (27)	0.003	33.31 ± 1.05 (80)	30.97 ± 1.98 (21)	0.27
	嫩度/(kg·f)	5.63 ± 0.18 (74)	5.38 ± 0.29 (27)	0.85	5.53 ± 0.17 (80)	5.44 ± 0.33 (21)	0.79
	胴体重/kg	107.83 ± 3.76a (37)	123.60 ± 5.66b (16)	0.02	114.09 ± 3.68 (41)	106.06 ± 7.05 (12)	0.30
6 岁	熟肉率/%	65.12 ± 0.32a (350)	66.84 ± 0.55b (116)	0.006	65.60 ± 0.33 (351)	65.33 ± 0.54 (115)	0.67
6 years	失水率/%	22.10 ± 0.28a (350)	20.90 ± 0.48b (116)	0.03	21.87 ± 0.28 (351)	21.66 ± 0.47 (115)	0.70
(n = 466)	眼肌面积/cm ²	32.06 ± 0.47 (350)	32.83 ± 0.81 (116)	0.40	32.42 ± 0.48 (351)	31.75 ± 0.79 (115)	0.46
	嫩度/(kg·f)	5.40 ± 0.08 (350)	5.44 ± 0.14 (116)	0.81	5.38 ± 0.08 (351)	5.51 ± 0.13 (115)	0.40
	胴体重/kg	118.62 ± 2.59 (140)	116.63 ± 4.78 (41)	0.72	117.22 ± 2.66 (132)	120.73 ± 4.38 (49)	0.50
7 岁	熟肉率/%	65.62 ± 0.96 (47)	61.27 ± 2.61 (5)	0.12	64.97 ± 1.08 (34)	65.37 ± 1.47 (18)	0.82
7 years	失水率/%	20.51 ± 0.89 (47)	19.84 ± 2.42 (5)	0.80	19.95 ± 0.97 (34)	21.39 ± 1.32 (18)	0.35
(n = 52)	眼肌面积/cm ²	31.24 ± 1.22 (47)	30.49 ± 3.31 (5)	0.83	30.56 ± 1.33 (34)	32.34 ± 1.81 (18)	0.40
	嫩度/(kg·f)	5.69 ± 0.21 (47)	4.73 ± 0.57 (5)	0.12	5.56 ± 0.24 (34)	5.61 ± 0.32 (18)	0.89
	胴体重/kg	107.83 ± 4.94 (28)	97.90 ± 11.98 (4)	0.45	108.08 ± 5.51 (20)	103.30 ± 7.32 (12)	0.59

注:括弧内数字为各等位基因的牦牛头数。

Note: Figures in brackets are the number of yak with corresponding allele.

3 讨论

甘南牦牛、天祝白牦牛和大通牦牛 *CAPN4* 基因启动子区发现 a. -1222G > A 的 SNP, 多态信息含量为中度多态。基因调控区域的 SNPs 能调节基因转录水平和转录时间^[20]。研究表明, 包含一个 NRF-1 结合位点、一个 AP-1 结合位点和一个 SP1 结合位点的核心启动子区调控人类 *CAPN4* 基因的表达^[21]。推测牦牛 *CAPN4* 基因启动子区突变可能对该基因的功能及转录有一定的作用。

CAPN4 基因启动子区突变与牦牛肉质性状关联, 等位基因 A 对部分年龄段甘南牦牛的熟肉率、肌肉保水性、眼肌面积及胴体重均有不利影响。钙蛋白酶 (Calpain, CAPN) 是一类在生物细胞中普遍表达并依赖于钙激活的中性半胱氨酸氨基内肽酶, 主要存在于细胞质中, 通过调节其基质生物活性以调节细胞迁移、黏附、凋亡、分泌和自我吞噬等生物学活性^[22-24]。根据激活钙蛋白酶活性所需要的钙

离子浓度, 一般分为 μ -Calpain (激活的 Ca^{2+} 浓度以微摩尔计量, CAPN1) 和 m-Calpain (激活的 Ca^{2+} 以毫摩尔计量, CAPN2), 主要分布于肌原纤维 Z 盘附近。钙蛋白酶水解系统除参与机体生长及代谢过程外, 在肌原纤维更新和动物宰后肌肉成熟嫩化过程中发挥决定性作用^[25]。CAPN1 和 CAPN2 都能水解肌原纤维, 其活性下降是其发挥水解作用的体现, 但研究发现, 动物宰后肌肉成熟嫩化过程中 CAPN2 的活性几乎不变, 而 CAPN1 的活性则显著下降, 因此, 人们普遍认为 CAPN1 是参与肌肉嫩化的主要酶。Page 等^[26]在西门塔尔牛和安格斯牛杂交群体的研究中发现, *CAPN1* 基因是肉质嫩度的一个重要候选基因。Melody 等^[27]研究发现, CAPN1 的活性影响猪肉的嫩度和失水率。Jiang 等^[28]在对草原红牛、延边黄牛 *CAPN1* 基因第 14 内含子区 4 685 位点进行基因多态性与肉质嫩度的相关性研究中发现, 该位点与肉质嫩度的相关检测指标 (蒸煮损失、肌纤维直径、剪切力、滴水损失等) 密切相关, 与眼肌面

积也存在一定的相关性,但与屠宰性状(净肉重、胴体重、净肉率等)无关。Gill 等^[29]发现,*CAPN1* 的 316 位点的碱基突变与安格斯公牛的肌肉嫩度和后腿重显著相关。当肌原纤维组织被 *CAPN1* 破坏后,*CAPN2* 就会参与肌原纤维组织降解,影响肌肉的生长和嫩度^[30-31]。Chung 等^[13]发现,*CAPN2* 基因与安格斯牛肉嫩度、脂肪厚度、热胴体重、大理石花纹评分和肉品质等级有关联。

CAPN4 作为 *CAPN1* 和 *CAPN2* 的异源调控小亚基,在 Ca^{2+} 存在时,调控小亚基经历一个逐渐自溶解的过程,从而导致相应大亚基(*CAPN1* 和 *CAPN2*)产生酶活性^[32]。Rosenberger 等^[33]报道,*CAPN4* 与 αPIX 的结合在细胞迁移过程中起整合和调节的作用,一些报道也表明 *CAPN4* 对鼠科动物胚胎发育^[34-35]及成骨细胞的功能及再生^[36]也是必需的。*CAPN4* 基因也被确定为影响动物宰后胴体重及肉质性状的候选基因。普通牛 *CAPN4* 基因 *Hha*I-RFLP 的酶切位点^[37]及第 11 外显子区(转录 3'-UTR)多态性^[10]已有报道。另外,Chung 等^[13]报道 *CAPN4* 基因突变与牛肉大理石花纹评分和质量等级相关。Gandolfi 等^[38]研究发现 *CAPN4* 基因突变也影响猪肉肉质性状。但李君灵等^[14]研究了中国杂种牛 *CAPN4* 基因多态性,发现第 6 内含子 448 位的 T-C 单碱基突变对嫩度性状没有显著影响。本研究中,牦牛 *CAPN4* 基因启动子区突变对肌肉熟肉率、保水性、眼肌面积及胴体重有一定的影响,这一结果与上述报道相符;但目前对牦牛 *CAPN4* 基因研究报道较少,*CAPN4* 基因其他区域突变对胴体及肉质性状的影响仍需进一步测定和分析。

甘南牦牛、天祝白牦牛及大通牦牛 *CAPN4* 基因启动子区多态性较丰富。甘南牦牛 *CAPN4* 基因启动子区 a. -1222G>A 突变与不同年龄段牦牛胴体及肉质性状关联,其中等位基因 A 对部分年龄段甘南牦牛宰后肌肉熟肉率、保水性、眼肌面积及胴体重有不利影响,可作为甘南牦牛此类性状的遗传标记。

参考文献:

- [1] Uytterhaegen L, Claeys E, Demeyer D. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility [J]. *Animal Science*, 1994, 72: 1209 - 1223.
- [2] J Simon C, Arthur P, Greer A, John S, Elce. Structure of the mouse calpain small subunit gene [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988, 1388: 247 - 252.
- [3] Smith T P, Casas E, Rexroad C E, et al. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness [J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(10): 2589 - 2594.
- [4] Pringle T D, Harrelson J M, West R L, et al. Calcium-activated tenderization of strip loin, top sirloin, and top round steaks in diverse genotypes of cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(12): 3230 - 3237.
- [5] 洛桑,旦增,布多,等.藏北牦牛肉成分和营养品质的分析研究 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(29): 14198 - 14199.
- [6] Gordon Guroff. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain [J]. *Biological Chemistry*, 1964, 239: 149 - 155.
- [7] Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, et al. Structure, activation, and biology of calpain [J]. *Diabetes*, 2004, 53(Suppl 1): S12 - S18.
- [8] Dourdin N, Bhatt A K, Dutt P, et al. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(51): 48382 - 48388.
- [9] Ronald L Mellgren, Wenli Zhang, Katsuya Miyake, et al. Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane [J]. *Biological Chemistry*, 2007, 282: 2567 - 2575.
- [10] Juszczuk-Kubiak E, Flisikowski K, Wicinska K. A new SNP in the 3' UTR region of the bovine calpain small subunit (*CAPNS1*) gene [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(1): 473 - 476.
- [11] McClelland P, Lash J A, Hathaway D R. Identification of major autolytic cleavage sites in the regulatory subunit of vascular calpain II. A comparison of partial amino-terminal sequences to deduced sequence from complementary DNA [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(29): 17428 - 17431.
- [12] Wolf B W, Berger L L, Fahey G C. Effects of feeding a return chewing gum packaging material mixture on performance and carcass characteristics of feedlot cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 1996, 74(11): 2559 - 2565.
- [13] Chung H Y, Davis M E. Effects of calpain genotypes on meat tenderness and carcass traits of Angus bulls [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(7): 4575 - 4581.
- [14] 李君灵, 许尚忠, 李武峰. 杂种牛 *CAPN4* 基因第六内含子的遗传变异与牛肉嫩度的关联分析 [J]. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(3): 247 - 249.
- [15] Kanai N, Fujii T, Saito K, et al. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood [J]. *Clinical Pathology*, 1994, 47: 1043 - 1044.
- [16] Byun S O, Fang Q, Zhou H, et al. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide

- gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 385(1): 174 – 175.
- [17] Hu J, Zhou H T, Smyth A, *et al.* Polymorphism of the bovine ADRB3 gene[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(7): 3389 – 3392.
- [18] 赵改名, 王艳玲, 田 玮. 影响牛肉嫩度的因素及其机制[J]. *国外畜牧科技*, 2000, 27(2): 35 – 40.
- [19] Byun S O, Zhou H, Forrest R H J, *et al.* Association of the ovine calpastatin gene with birth weight and growth rate to weaning[J]. *Animal Genetics*, 2008, 39: 572 – 576.
- [20] Wang X T, Daniel J, Tomso, *et al.* Identification of polymorphic antioxidant response elements in the human genome[J]. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(10): 1188 – 1200.
- [21] Asangani I A, Rasheed S A, Leupold J H, *et al.* NRF-1, and AP-1 regulate the promoter of the human calpain small subunit 1 (CAPNS1) gene[J]. *Gene*, 2008, 410(1): 197 – 206.
- [22] Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals[J]. *Experimental Animals*, 2010, 59(5): 549 – 566.
- [23] Croall D E, Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity[J]. *Genome Biology*, 2007, 8(6): 218.
- [24] Storr S J, Carragher N O, Frame M C, *et al.* The calpain system and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(5): 364 – 374.
- [25] Croall D E, Demartino G N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation[J]. *Physiological Reviews*, 1991, 71(3): 813 – 847.
- [26] Page B T, Casas E, Quaas R L, *et al.* Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(12): 3474 – 3481.
- [27] Melody J L, Lonergan S M, Rowe L J, *et al.* Early post-mortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(4): 1195 – 1205.
- [28] Jiang C G, Quan S Y, Yang C, *et al.* Close association between 4685 loci on CAPN1 gene and meat tenderness[J]. *Agricultural Science and Technology*, 2012, 13(12): 2480 – 2483.
- [29] Gill J L, Bishop S C, Mccorquodale C, *et al.* Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle[J]. *Genetics, Selection, Evolution*, 2009, 41: 36.
- [30] 杨雪梅, 李学伟, 丁 义. 钙蛋白酶抑制蛋白对猪肉肉质的影响[J]. *畜禽业*, 2007, 213(1): 59 – 61.
- [31] 王学敏, 李碧侠, 任守文. 猪 CAPN2 基因的生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2008(1): 157 – 160.
- [32] Goll D E, Thompson V F, Li H, *et al.* The Calpain System[J]. *Physiological Reviews*, 2003, 83: 731 – 801.
- [33] Rosenberger G, Gal A, Kutsche K. αPIX association with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading[J]. *Biological Chemistry*, 2005, 280(8): 6879 – 6889.
- [34] Zimmerman U J, Boring L, Pak J H, *et al.* The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality[J]. *IUBMB Life*, 2000, 50(1): 63 – 68.
- [35] J Simon C Arthur, John S, *et al.* Disruption of the murine calpain small subunit gene, CAPN4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20: 4474 – 4481.
- [36] Shimada M, Greer P A, McMahon A P, *et al.* In vivo targeted deletion of calpain small subunit, Capn4, in cells of the osteoblast lineage impairs cell proliferation, differentiation, and bone formation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(30): 21002 – 21010.
- [37] Zhang H M, Denise S K, Ax R L. Rapid communication: a novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis[J]. *Journal of Animal Science*, 1996, 74(6): 1441.
- [38] Gandolfi G, Cinar M U, Ponsuksili S, *et al.* Association of PPARGC1A and CAPNS1 gene polymorphisms and expression with meat quality traits in pigs[J]. *Meat Science*, 2011, 89(4): 478 – 485.