

## 绵羊 CAST 基因 2 型和 4 型转录本的克隆及特性分析

张菊, 杜立新, 李宏滨, 魏彩虹

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 国家畜禽分子遗传育种中心, 北京 100193

**摘要:** 钙蛋白酶抑制蛋白 (Calpastatin, CAST) 是一种内源性的需要  $\text{Ca}^{2+}$  激活的钙蛋白酶抑制剂, 在肌肉组织的蛋白质降解过程中起重要的调节作用。文章利用牛 CAST 基因的 mRNA 序列, 通过逆转录 RT-PCR 首次克隆获得绵羊 CAST 基因 2 型转录本和 4 型转录本的部分 cDNA 序列, 并对序列进行生物信息学分析。CAST 基因 2 型转录本的扩增片段为 4385bp, 完整的开放阅读框为 2361bp, 编码 786 个氨基酸; CAST 基因 4 型转录本的扩增片段为 1467bp, 完整的开放阅读框为 1317bp, 编码 438 个氨基酸。CAST II 型蛋白序列存在 4 个保守结构域, CAST IV 型蛋白序列存在 3 个保守结构域; 两者的二级结构均以螺旋为主, 富含疏水区域, 其氨基酸序列存在多个磷酸化位点以及蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 的磷酸化位点。通过 RT-PCR 分析 CAST 基因 2 型转录本和 4 型转录本的组织表达谱, 结果表明 CAST 基因 2 型转录本在所检测的 10 个组织中均表达, CAST 基因 4 型转录本仅在睾丸组织中表达。

**关键词:** CAST; cDNA 克隆; 组织表达

## Cloning and characterization of CAST transcript 2 and 4 in sheep

ZHANG Ju, DU Li-Xin, LI Hong-Bin, WEI Cai-Hong

National Center for Molecular Genetics and Breeding of Animal, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences Beijing 100193, China

**Abstract:** As an endogenous inhibitor of the calpain system activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , calpastatin (CAST) plays a regulatory role in muscle proteolysis. The present study, Based on the bovine mRNA sequences, part of cDNA fragments of sheep CAST transcript 2 and 4 were obtained by RT-PCR. Bioinformatic analysis showed that sheep CAST transcript 2 was 4 358 bp in length with an open reading frame (ORF) 2 361 bp long and encoded 786 amino acids, while sheep CAST transcript 4 was 1 467 bp in length with 1 317 bp ORF encoding 438 amino acids. It was predicted that CAST type II contained four conserved domains and CAST type IV contained three conserved domains, and their secondary structures were rich in both hydrophobic regions and helical regions, with certain conserved phosphorylation sites and phosphorylation sites of protein kinase C (PKC). RT-PCR was conducted to analyze the expression patterns of CAST transcript 2 and transcript 4. CAST transcript 2 was expressed in ten tissues detected while CAST transcript 4 only in testis.

**Keywords:** CAST; cDNA cloning; tissue expression

钙蛋白酶抑制蛋白 (Calpastatin, CAST) 是钙蛋白酶 I (CAPN1, 又称  $\mu$ -calpain) 和钙蛋白酶 II (CAPN2, 又称 m-calpain) 的内源性抑制蛋白<sup>[1]</sup>。文献报道钙蛋白酶及其内源抑制蛋白 CAST 广泛存在于细胞中<sup>[2]</sup>。Kretchmar 等<sup>[3]</sup>检测 2.5 和 7 月龄瘦肉型猪及肥胖型猪中 CAST 的活性, 结果在两个不同的阶段中, 肥胖型猪 CAST 的活性明显高于瘦肉型猪, 且 CAST 的活性随年龄的增大而降低, 这可能与体内蛋白质的降解有关。钙蛋白酶系

**收稿日期:** 2009-04-19; **修回日期:** 2009-09-02

**项目基金:** 国家科技支撑计划项目-优质专用羊新品种选育项目 (编号: 2006BAD01A11) 资助

**作者简介:** 张菊 (1981-), 女, 在读硕士, 研究方向: 动物分子育种。Tel: 010-62816002 ; E-mail: zhangju2002@163.com

**通讯作者:** 杜立新 (1956-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 010-62819997;

E-mail: [lxdu@263.net](mailto:lxdu@263.net)

统在体内发挥非常重要的作用, 参与机体生长和代谢过程, 如成肌细胞融合<sup>[2,4]</sup>和脂肪细胞分化<sup>[5]</sup>、肌动蛋白重组<sup>[6]</sup>、细胞周期调节、信号转导<sup>[7]</sup>和凋亡过程的调节<sup>[8]</sup>等。由于骨骼肌蛋白质的含量对肉质的影响很大, *CAST*基因成为研究肌肉生长和肉质性状极有希望的候选基因<sup>[3]</sup>。

Emori 等<sup>[9]</sup>检测到兔心脏 *CAST*基因 mRNA 存在 3 种同工型: 3.8 kb、3.0 kb 和 2.5 kb, 其差异是由 3'非编码序列的长度不同引起。牛背最长肌 *CAST*基因 mRNA 也存在 3 种同工型: 3.8 kb、3.0 kb 和 1.5 kb, 分析发现 5'端序列存在差异; *CAST*表达量随 $\beta$ -肾上腺素诱导肌肉肥大过程而增加<sup>[10,11]</sup>。目前研究认为小鼠的*CAST*基因含有 34 个外显子, 跨越基因组 114kb 的长度, *CAST*基因的 4 个转录本被命名为 I 型、II 型、III 型和 IV 型转录本, 表明存在 4 个启动子位于外显子 1xa、1xb、1u 和 14t 的上游区域, 分别被认为是 I 型、II 型、III 型和 IV 型转录本的转录起始位点<sup>[12,13]</sup>。

牛和猪等物种的*CAST*基因已进行分子生物学及功能方面的研究, *CAST*基因被认为是影响肉质性状的重要候选基因<sup>[14,15]</sup>。*CAST*基因在绵羊上的研究较少, 而且 GenBank 所提供的序列没有指出其属于 *CAST*基因的哪种转录本。本研究以牛 *CAST*基因的转录本 2 和 4 为参考序列, 克隆绵羊 *CAST*基因转录本 2 和 4 的 cDNA 序列, 分析其不同组织中的表达情况, 为进一步研究该基因的结构和功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

本课题组在香河绿色东方农牧科技发展有限公司饲养场饲养的陶赛特羊 6 只, 3 公 3 母。预试期为 1 个月, 5 月龄后采用相同饲料配方育肥, 育肥 2 个月, 7 月龄屠宰。取其心、肝、脾、肺、大脑、肾、睾丸、卵巢、肌肉、胃组织。组织样置于液氮中冻存, 用于总 RNA 的提取。

#### 1.1.2 主要试剂

Trizol 试剂和逆转录酶 (M-MLV Reverse Transcriptase) 均购自 Invitrogen 公司。转化载体 pMD19-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RQ1 RNase-free DNase 酶、DNA 片段凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞和实验中用到的 DNA Marker 购自天根生化科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 提取及 RT-PCR

取液氮中保存的组织样品 50mg 左右, 在液氮中研碎后, 用 Trizol 法提取总 RNA。溶于无 RNA 酶的水中, -80℃ 保存。RT-PCR 体系为 20  $\mu$ L, 总 RNA 为 2  $\mu$ g, 用 RQ1 RNase-free DNase 处理以去除 RNA 中的 DNA 污染。RT-PCR 反应的具体过程参照 M-MLV 逆转录酶的说明书。逆转录合成 cDNA 第一条链, -20℃ 保存备用。

#### 1.2.2 PCR 反应

PCR 反应扩增体系为 25  $\mu$ L, 其中 10 $\times$ PCR Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs 2  $\mu$ L (2.5 mmol/L), 上游引物和下游引物各 0.4  $\mu$ L (20  $\mu$ mol/L), 0.3  $\mu$ L *Taq* 酶 (5 U/ $\mu$ L), cDNA 模板 2  $\mu$ L, 超纯水补齐至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 预变性 94℃ 3 min; 94℃ 变性 30 s, 复性 30 s (复性温度见表 1), 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

#### 1.2.3 *CAST* 基因转录本 2 和 4 的 cDNA 克隆

根据 GenBank 发表的牛 *CAST* mRNA 序列 (GenBank 登录号为 NM\_174003 和 AY834764), 利用 Primer5.0 和 DNAMAN6.0 软件设计特异性引物 P1、P2、P3、P4、P5、

P6、P7、P8 和 P9 扩增 *CAST* 基因转录本 2; P10 和 P11 扩增 *CAST* 基因转录本 4。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列及特征见表 1。

以逆转录合成的各组织cDNA混池后为模板进行PCR扩增。PCR反应结束进行琼脂糖凝胶电泳, 采用Promega的凝胶回收试剂盒回收目的片段, 回收步骤参照说明书。PCR产物纯化后, 分别克隆至pMD19-T载体中, 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 随机挑选阳性克隆送到北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

批注 [s1]: 是什么意思?

表 1 引物序列、复性温度及目的片段长度

基因名称	用途	引物名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)	复性温度 ( $^{\circ}$ C)
<i>CAST</i> 基因 转录本 2	克隆	P1	F: GAGTTAGTCCCAGTCAGGTCT R: GATGATTGCGGCTTCTTCTCAG	457	60.4
		P2	F: GGACCGCATTCTCCTAACAA R: TTCTTTGGCTTTTGCCTCAT	927	57.5
		P3	F: TCATCCGACTTCACCTGCAG R: GACTGTTTCCTCATCTTACCAC	302	60.4
		P4	F: GTGGTGAAGATGAGGAAACAGT R: GCAGATACCAAATAGTGTGAA	1 189	52.9
		P5	F: GACAAAGCACCCAGGAAT R: CTCCCAACTGAAGGCAAT	348	55.0
		P6	F: GGTGACGTCTGAAGAACAA R: GCCAAGTCCTAAGAAATAGTTT	1 200	51.9
		P7	F: GAACTAGGGAGGGTCTGA R: ATCCTGGCTTATCTTTCC	465	50.3
		P8	F: CATGCATATGCCTGAGAT R: CACATCTGTCAATGTCAA	255	52.7
		P9	F: GGATTTTAACTATGTGTCTGTA R: TTGCATCTTGATCTTGAGT	517	46.5
		PT2	F: GGCAGGTGGAGTGCGAAC R: GCTGACTGCTCCCAAGGCTT	230	58.0
<i>CAST</i> 基因 转录本 4	克隆	P10	F: ATGGGCCAGTTTCTATCGTCAACC R: GCATCAATGGGGTCCTGGGCA	1 133	61.4
		P11	F: GGAGAAAGAGATGACACCAT R: CAGACAATGTTTAGGAGGTCA	471	55.0
		PT4	F: GAGGACTCACTGGGTGCCGTATG R: GCCAAGGCTTCAACAGCATCGTCTG	452	63.9
<i>GAPDH</i> 基 因	组织表达 分析	PT	F: CTGCTGACGCTCCCATGTTTGT R: TAAGTCCCTCCACGATGCCAAA	150	60.0

#### 1.2.4 组织表达的 RT-PCR 检测

提取心、肝、脾、肺、大脑、肾、睾丸、卵巢、肌肉、胃组织的总RNA, 以反转录得到的cDNA第一条链为模板。组织表达RT-PCR的内参基因为*GAPDH* (GenBank 登陆号: AF030943), 引物名称为PT。组织表达所用的引物PT2 和PT4 分别用于检测*CAST*基因转录本 2 和 4。引物序列及复性温度见表 1<sup>[11]</sup>。PCR扩增产物用 1.5%的琼脂糖凝胶进行检测, 电

泳结束后用凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司的ChemiDoc XRS) 进行拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 绵羊 *CAST* 基因的 cDNA 序列

#### 2.1.1 *CAST* 基因转录本2的cDNA序列

P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7、P8和P9引物的PCR扩增产物, 经克隆和测序后用DNAstar对序列进行拼接, 获得绵羊*CAST*基因2型转录本4 538 bp的核苷酸序列 (GenBank登录号: FJ843091), 序列分析发现包括2 361 bp的完整开放阅读框, 共编码786个氨基酸以及119 bp的5'-UTR和2 058 bp的3'-UTR。3'-UTR区存在两个AATAAA终止信号, 分别位于序列的3432位和4003位。

#### 2.1.2 *CAST* 基因转录本4的cDNA序列

P10和P11为引物的PCR扩增产物, 经克隆和测序后用DNAstar对序列进行拼接, 获得绵羊*CAST*基因4型转录本1 467 bp的核苷酸序列, 序列分析发现包括1 317 bp的完整开放阅读框 (GenBank登录号: FJ843092), 共编码438个氨基酸以及150 bp的3'-UTR。

### 2.2 *CAST* 基因氨基酸序列的生物信息学分析

#### 2.2.1 *CAST* 基因2型转录本的氨基酸序列的生物信息学分析

绵羊*CAST*基因的转录本2编码786个氨基酸, 命名为CAST II型蛋白。利用ExPASy的ProtParam软件分析, 分子量为84.6177 kDa, 理论等电点为5.43。用NCBI的Conserved Domains程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测其蛋白的保守区, 结果表明该基因具有4个保守结构区(域1位于158~294位, 域2位于302~430位, 域3位于447~572位, 域4位于583~710位)。利用ExPASy的ProtScale软件, 对CAST II型蛋白进行疏水性分析发现, 其富含疏水区。利用garnier (<http://weblab.cbi.pku.edu.cn/program.inputForm.do?program=garnier>) 预测CAST II型蛋白的二级结构分析发现, 其富含螺旋结构, 占总氨基酸数目的50.6%。NetPhos 2.0 Server预测CAST II型蛋白的磷酸化位点结果如下: 56个丝氨酸磷酸化位点(位于氨基酸残基13、17、19、21、23、29、36、43、59、60、62、64、66、67、68、88、109、110、113、133、139、143、153、155、156、161、164、171、176、191、215、218、221、257、258、292、306、326、381、382、408、435、450、466、482、598、615、631、708、714、736、754、755、768、776和784位), 17个苏氨酸磷酸化位点(位于氨基酸残基10、16、101、233、240、270、321、356、371、463、547、596、617、685、701、744和755位), 1个酪氨酸磷酸化位点(位于氨基酸残基247位)。NetPhosK 1.0 Server预测特异蛋白激酶的磷酸化位点: PKC磷酸化16位(分数: 0.86)、165位(分数: 0.85)、321位(分数: 0.86)和371位(分数: 0.82)的苏氨酸; 同时PKC磷酸化60(分数: 0.81)和768位(分数: 0.87)的丝氨酸。

#### 2.2.2 *CAST* 基因4型转录本的氨基酸序列的生物信息学分析

绵羊*CAST*基因的转录本4编码438个氨基酸, 命名为CAST IV型蛋白, 同样利用ExPASy的ProtParam软件分析, 分子量为47.3381 kDa, 理论等电点为4.75。用NCBI的Conserved Domains程序预测其蛋白的保守区, 发现了3个保守区, 其中域1位于38~82位, 域2位于99~224位, 域3位于235~362位。同上述方法, 利用ExPASy的ProtScale软件, 对CAST IV型蛋白进行疏水性分析发现, CAST IV型蛋白富含疏水区。利用garnier预测CAST IV型蛋白的二级结构分析发现, 其富含螺旋结构, 占总氨基酸数目的53.3%。NetPhos 2.0 Server预测CAST IV型蛋白的磷酸化位点结果如下: 16个丝氨酸磷酸化位点(位于氨基酸残基60、87、102、118、134、250、267、283、360、366、388、406、407、420、428和436位), 8个苏氨酸磷酸化位点(位于氨基酸残基115、199、248、269、337、353、396和427位)。NetPhosK 1.0 Server预测特异蛋白激酶的磷酸化位点: PKC磷酸化420位的丝氨酸(0.87)。

### 2.3 组织表达RT-PCR分析

取等量不同组织的总 RNA, 经过 RT-PCR 扩增, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测都有清晰的 *CAST* 和 *GAPDH* 扩增带, 其片段大小与预期的一致。为了使实验结果更加准确, 每种组织经过 3 个不同个体的重复实验, 结果表明 (图 1): 内参基因 *GAPDH* 在陶赛特羊的 10 个组织中均有表达; *CAST* 基因 2 型转录本在陶赛特羊的 10 个组织中均有表达; *CAST* 基因 4 型转录本仅在睾丸组织中表达。

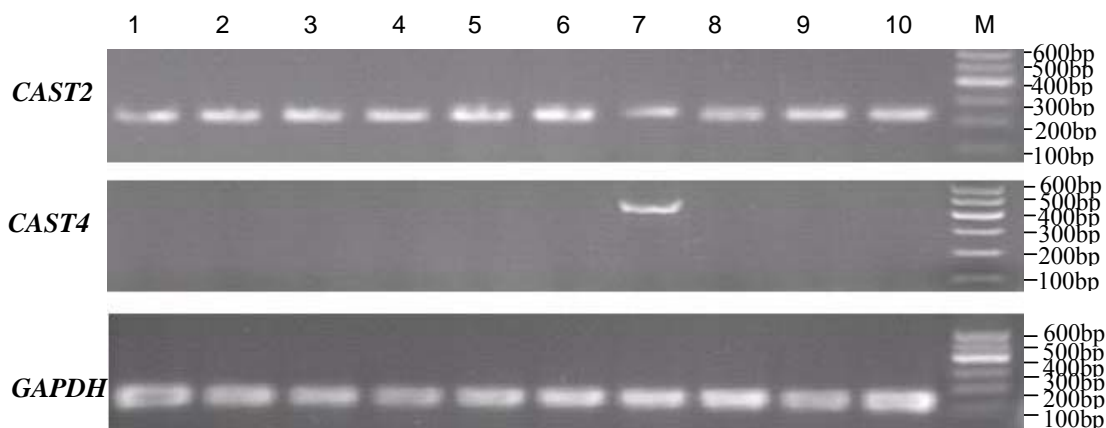


图 1 绵羊 *CAST* 基因 2 型和 4 型转录本及 *GAPDH* 在各组织中的表达

1: 心; 2: 肝; 3: 脾; 4: 肺; 5: 大脑; 6: 肾; 7: 睾丸; 8: 卵巢; 9: 肌肉; 10: 胃; M: DNA Marker I。

### 3 讨论

*CAST* 基因在小鼠、人、兔和牛等物种存在不同的转录本, 而且不同转录本在不同组织中的表达存在差异<sup>[3,8,9]</sup>。Zhu 等<sup>[16]</sup>发现 *CAST* 在睾丸组织中存在一新的亚型, 克隆了新的基因, 并推测可能与精子的发生与关。克隆绵羊 *CAST* 基因的不同转录本, 了解其不同组织中的表达情况对以后的研究具有重要意义。

本研究根据 GenBank 中牛 *CAST* 基因的 mRNA 序列 (GenBank 登录号分别为: NM\_174003 和 AY834764), 分别设计 9 对和 2 对引物, 克隆了绵羊 *CAST* 基因转录本 2 和转录本 4 的部分 mRNA 序列, 并提交至 GenBank (登录号分别为: FJ843091 和 FJ843092), 为深入研究该基因的功能奠定了基础。通过比对绵羊 *CAST* 基因转录本 2 和转录本 4 的序列, 发现其在 5' 端序列存在差异, 推测绵羊 *CAST* 基因不同转录本的形成原因与牛类似, 也是由于 5' 端不同的转录方式造成<sup>[11]</sup>。文献报道 *CAST* 共有 5 个结构域<sup>[1]</sup>。第一个结构域即 L 结构域的功能还不太清楚, 此结构域在某些细胞的 *CAST* 中不存在, 如红血球中的 *CAST*。第二到第五个结构域是 4 个结构相似的重复单位, 每个重复单位的氨基酸残基具有 20%~35% 的同源性。每个重复单位含有 3 个保守区, 分别为 A、B、C。其中由 Thr-Ile-Pro-Pro-X-Tyr-Arg 组成的七肽序列十分保守, 它可能是 *CAST* 起抑制作用的关键部位<sup>[9]</sup>。生物信息学预测发现: *CAST* II 型蛋白序列存在 4 个保守结构域, 4 个结构域之间存在 27.68% 的同源性, 推测即为 4 个重复的单元, 其中在氨基酸序列的 547 位和 685 位点处发现存在保守的七肽序列。*CAST* IV 型蛋白序列存在 3 个保守结构域, 分析发现第一个结构域为 L 结构域, 第二个与第三个结构域是 2 个重复单位, 同源性为 38.28%, 其中在氨基酸序列的 199 位和 337 位点处发现存在保守的七肽序列。以上保守的结构域及保守序列的存在进一步肯定了克隆序列的正确性, 它们是否也是 *CAST* 发挥



其抑制活性的关键部位, 需要进一步验证。

CAST蛋白的N-端结构域对其功能中起着重要的作用, 同时N-结构域含有的磷酸化位点对CAST 作用发挥可能起到重要作用; 研究表明CAST的磷酸化导致抑制活性降低, 如PKC磷酸化CAST蛋白N-端区域的一个丝氨酸残基, 这导致 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加, 有利于形成CAPN-CAST复合物, 结果CAST的抑制活性下降。PKC介导的信号转导通路与CAST磷酸化之间的关系仍然有很多机理需要研究<sup>[17]</sup>。在CAPN-CAST相互作用的过程中, CAST的磷酸化和去磷酸化过程发挥着非常重要的作用, 其中PKA和PKC在CAST不同位点处发生磷酸化, 最终影响CAST的活性<sup>[18]</sup>。通过生物信息学软件预测CAST II型蛋白存在56个丝氨酸磷酸化位点、17个苏氨酸磷酸化位点及1个酪氨酸磷酸化位点, 同时预测存在6个PKC特异蛋白激酶的磷酸化位点; CASTIV型蛋白存在16个丝氨酸磷酸化位点, 8个苏氨酸磷酸化位点, 同时预测一个特异蛋白激酶的磷酸化位点: PKC磷酸化420位的丝氨酸, 以上生物信息学的预测结果为以后CAST的功能研究以及与其他蛋白的相互作用等方面的研究提供参考。

绵羊CAST基因组织表达谱的研究发现: CAST基因的转录本2在所检测的各组织中均表达, 但是CAST基因的转录本4仅在睾丸组织中表达。CAST基因的2型转录本在绵羊各组织中均发挥作用, 推测其表达的蛋白在机体生长和代谢过程中发挥重要作用, 具体机制需要进一步研究。CAST基因的4型转录本与睾丸组织的功能存在关系, 推测其表达的蛋白可能与精子的生成有关。CAST基因的不同转录本在各组织中的表达情况存在差异, 不同转录本编码的蛋白在结构上存在差异, 功能也存在差异, 推测CAST基因功能的发挥存在多种可能的途径。

### 参考文献(References):

- [1] Croall DE, DeMartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 1991, 71(3): 813–847.
- [2] Kwak KB, Chung SS, Kim OM, Kang MS, Ha DB, Chung CH. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1175(3): 243–249.
- [3] Kretchmar DH, Koohmaraie M, Mersmann HJ. Comparison of proteolytic variables in a lean and obese strain of pig at the ages of 2.5 and 7 months. *Lab Anim Sci*, 1994, 44(1): 38–41.
- [4] Balcerzak D, Cottin P, Poussard S, Cucuron A, Brustis JJ, Ducastaing A. Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion. *Eur J Cell Biol*, 1998, 75(3): 247–253.
- [5] Patel YM, Lane MD. Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1279–1284.
- [6] Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall DE, Hughes CN, Fiacco KA, Mier JW, Maki M, Herman IM. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*, 1998, 141(3): 647–662.
- [7] Chen F, Lu Y, Kuhn DC, Maki M, Shi X, Sun SC, Demers LM. Calpain contributes to silica-induced I kappa B-alpha degradation and nuclear factor-kappa B activation. *Arch Biochem Biophys*, 1997, 342(2): 383–388.
- [8] Lee KS, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G. Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(16): 7233–7237.
- [9] Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Imahori K, Suzuki K. Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(11): 3590–3594.
- [10] Killefer J, Koohmaraie M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. *J Anim Sci*, 1994, 72(3): 606–614.
- [11] Raynaud P, Jayat-Vignoles C, Laforet MP, Leveziel H, Amarger V. Four promoters direct expression of the

- 
- calpastatin gene. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 437(1): 69–77.
- [12] Takano J, Watanabe M, Hitomi K, Maki M. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. *J Biochem*, 2000, 128(1): 83–92.
- [13] Takano J, Kawamura T, Murase M, Hitomi K, Maki M. Structure of mouse calpastatin isoforms: implications of species-common and species-specific alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260(2): 339–345.
- [14] Ciobanu DC, Bastiaansen JW, Lonergan SM, Thomsen H, Dekkers JC, Plastow GS, Rothschild MF. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Anim Sci*, 2004, 82(10): 2829–2839.
- [15] Bishop MD, Koohmaraie M, Killefer J, Kappes S. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *J Anim Sci*, 1993, 71(8): 2277.
- [16] Zhu H, Zhou ZM, Li JM, Zhu H, Cheng LJ, Shan YX, Yin LL, Sha JH. Cloning and characterization of a novel isoform of calpastatin in human adult testis. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(5): 450–454.
- [17] Salamino F, Averna M, Tedesco I, De Tullio R, Melloni E, Pontremoli S. Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. *FEBS Lett*, 1997, 412(3):433–438.
- [18] Averna M, De Tullio R, Salamino F, Melloni E, Pontremoli S. Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C. *FEBS Lett*, 1999, 450(1-2): 13–16.