

网络出版日期:2017-10-18
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20171018.1733.002.html

绵羊 *EDAR* 基因的克隆、序列分析及其在毛囊发育过程中的表达

陈磊,贺三刚,刘书东,玛依拉,李文蓉

(新疆畜牧科学院 生物技术研究所,农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室,自治区重点实验室,乌鲁木齐 830000)

摘 要 旨在获得中国美利奴羊 *EDAR*(ectodysplasin A receptor)基因的 CDS 区全序列并进行生物信息学分析,同时分析 *EDAR* 在绵羊毛囊发育过程中的表达特性,为深入研究该基因在绵羊毛囊生长发育过程中的作用及其表达调控提供基础资料。采用 PCR 扩增获得绵羊 *EDAR* 基因全长编码区,并克隆到 PCRTM-Blunt II-TOPO[®] vector 进行测序;利用生物信息学方法预测蛋白结构;应用 qRT-PCR 技术检测 *EDAR* 基因在绵羊毛囊发育过程中的表达特征。结果表明,绵羊 *EDAR* 基因的 CDS 序列长度为 1 350 bp(GenBank 登录号: KX900497),编码 449 个氨基酸,该氨基酸序列与其他物种相比一致性较高;进化树分析表明,绵羊 *EDAR* 氨基酸序列与牛的进化关系较近,与斑马鱼较远;预测结果显示绵羊 *EDAR* 蛋白存在一个信号肽和一个跨膜结构域;qRT-PCR 分析表明,*EDAR* 基因在绵羊胎儿毛囊发育过程中均有表达,在毛囊发育第 55 天和第 135 天表达较高,第 75 天表达最低。获得绵羊 *EDAR* 基因完整的编码区序列和毛囊发育过程中的表达特性,生物信息学分析发现 *EDAR* 基因的编码区序列具有物种间的保守性,同时该基因在绵羊毛囊不同发育阶段的皮肤组织中表达,由此表明 *EDAR* 基因可能在绵羊毛囊的生长发育过程中发挥重要作用。

关键词 绵羊;*EDAR*;基因克隆;荧光定量 PCR;毛囊

中图分类号 S826;Q81 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)10-1415-07

中国美利奴羊是中国 1985 年培育成的第一个毛用细毛羊品种,具有适应性强、遗传稳定、毛丛结构好、羊毛长而明显弯曲和净毛量高的特点。绵羊的毛囊是一个形态和结构较为复杂的皮肤附属器官。绵羊毛囊的发育始于胚胎发育时期,通过表皮和真皮两个细胞群体之间相互作用并进行有序地增殖和分化,最终形成完整的毛囊^[1-5]。*EDAR* 基因在毛囊发育和生长周期中发挥重要作用,因此明确其在妊娠期绵羊毛囊不同发育阶段的表达差异,对于进一步研究其在绵羊毛囊发育过程中的作用具有重要意义。外异蛋白 A 受体(EDAR)是 1999 年由 Headon 和 Overbeek 采用定位克隆的方法发现的,主要由与胞外配体结合的 N 末端结构域、单跨膜结构域和胞内的死亡结构域 3 部分组成^[6]。EDAR 是肿瘤坏死因子受体(TNF)超家族中新发现的一个配体,它可以通过与 EDA 结合,募集辅助蛋白 EDARADD 激活

NF-KB 转录因子,最终影响细胞内下游靶基因的转录与翻译^[7-8],从而调节机体的生物学作用。研究表明,EDAR 在牙齿、皮肤、毛发和汗腺等外胚层组织的发育过程中具有重要的调控作用^[9-11]。此外 EDAR 还参与动物毛囊生长发育的调控,有研究表明,小鼠 *EDAR* 基因突变导致 guard 和 zig-zag 毛发类型缺失,导致髓质中色素颗粒的分布出现异常^[12]。Laurikkala 等^[10]利用原位杂交技术将 *EDAR* 基因 mRNA 定位于胚胎期小鼠皮肤毛囊的基板和毛球部,其在小鼠毛囊生长发育中发挥重要作用。同时研究也发现 *EDAR* 基因存在一个 1 072 C>T 错义突变,该突变引起的氨基酸改变影响毛发的厚度^[13-14]。另有研究发现 EDA/EDAR/NF-KB 信号通过结合 LHX2 促进毛囊基板的向下生长^[15];此外,研究发现 EDAR 参与 WNT、TGFβ、SHH 等多种细胞信号通路从而调控毛囊的发育^[16-17]。由此可见,EDAR 是一

收稿日期:2016-10-24 修回日期:2016-12-19
基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2014211B042)。
第一作者:陈磊,男,助理研究员,研究方向为绵羊毛囊发育。Email:chenlei0991@126.com
通信作者:李文蓉,女,研究员,研究方向为绵羊繁殖育种。Email:xjlwr@126.com

个具有重要生物学功能的蛋白,它在动物毛囊发育和毛发生长中发挥重要作用,但是绵羊上还未见 *EDAR* 基因的研究报道。本研究以中国美利奴羊为试验材料,对绵羊 *EDAR* CDS 区序列进行克隆,随后用生物信息学软件对 *EDAR* 蛋白进行结构和功能预测,检测其在绵羊毛囊不同发育时期的表达差异,初探 *EDAR* 在绵羊毛囊生长发育过程中的作用,为深入研究 *EDAR* 在绵羊毛囊生长发育过程中的作用及其表达调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选用 2~3 岁的中国美利奴羊,均来自新疆畜牧科学院绵羊中心羊场,采用相同的饲养条件进行饲喂。通过同期发情和人工授精技术分别采集中国美利奴羊妊娠期毛囊发育起始阶段第 55 天(D55)、初级毛囊形成阶段第 75 天(D75)、次级毛囊形成阶段第 85 天(D85)、次级获得性毛囊形成阶段第 105 天(D105)和毛发生长成熟阶段第 135 天(D135)各 3 只胎羊的体侧皮肤组织样本,迅速装入 RNAlater 冻存管中,−80 ℃ 保存,备用。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶、高保真 DNA 聚合酶、反转录酶购自 TaKaRa(大连)公司;感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;TRIzol、zero Blunt[®] TOPO[®] PCR cloning kit 购自 Life Technology 公司;RNAlater 购自 QIAGEN 公司;其他试剂为分析纯产品。

1.3 总 RNA 提取及反转录产物合成

参照 TRIzol Reagent(Invitrogen)说明书,分别提取中国美利奴羊妊娠期第 55、75、85、105 和 135 天体侧皮肤组织总 RNA,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并利用核酸蛋白分析仪测定 RNA 的质量浓度和纯度。取 2 μ g 总 RNA,按照反转录酶 M-MLV 说明书进行细羊毛囊发育不同时期皮肤组织总 RNA 的 cDNA 合成。

1.4 克隆引物设计

根据 GenBank 预测的羊 *EDAR* 基因序列信息(XM_015094371)设计引物。上游引物:5'-GTCCGGATCCGCCACCATGGCCACAGGG-GAAGCTGC-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点);

下游引物:5'-CCTGAAGCTTTCAagcgtagtctgg-gacgtcgtatgggtaGGATGCGGGGGGTGGCGGG-GC-3'(下划线为 *Hind* III 酶切位点,小写字母为 HA 标签的编码序列),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.5 绵羊 *EDAR* 基因克隆

以中国美利奴羊皮肤组织 cDNA 为模板,利用设计的 *EDAR* 基因特异性引物进行 PCR 扩增,反应体系:cDNA 模板 2.0 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,dNTP(2.5 mmol/U)2.0 μ L,上、下游引物(10 mol/mL)各 1.0 μ L,高保真 DNA 聚合酶(1.0 U/ μ L)1.0 μ L,灭菌去离子水补至 25 μ L。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,33 个循环;72 ℃ 10 min。取 5.0 μ L 反应液用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。利用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物,用 T_4 DNA 连接酶连接 PCR 产物和 PCR[™] Blunt II-TOP[®] 克隆载体,连接产物转化至感受态细胞 DH5 α ,重组质粒经过限制性内切酶鉴定后,送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.6 生物信息学分析

利用 DNAMAN 5.0 软件进行序列拼接;使用 Mega 5.0 软件构建 *EDAR* 蛋白的系统进化树,分析不同物种之间的序列差异;利用 TM-HMM server 2.0、NetPhos 3.1 serve 软件预测 *EDAR* 蛋白的跨膜结构域、磷酸化位点;利用 Signal 4.0、NetNGlyc 1.0 和 NetOGlyc 4.0 软件预测信号肽及 N 糖基化位点。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

分别以中国美利奴羊毛囊发育第 55、75、85、105 和 135 天的体侧皮肤组织 cDNA 为模板,以绵羊 *GAPDH* 为内参,进行实时荧光定量 PCR 检测,引物见表 1。反应体系 25 μ L,其中:cDNA 模板 1.0 μ L,2 $\times$ TransStart Green qPCR SuperMix 10 μ L,上下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μ L,ddH₂O 8.0 μ L。每个样品设 3 个生物学重复。PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 5 s,58 ℃ 复性 15 s,72 ℃ 延伸 10 s,共 45 个循环。扩增结束后,以 0.1 ℃/s 的速度进行熔解曲线分析。分别读取目的基因和持家基因的 *Ct* 值,利用 *Ct* 法($Q_r = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) 计算 *EDAR* 基因在中国美利奴羊毛囊发育不同时期体侧皮肤组织 mRNA 的相对表达量,并利用 SPSS 软件进行单因素方差分析。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	复性温度/℃ Anneal temperature	片段长度/bp Length
<i>EDAR</i>	EDAR-GX1	F:CCTGGCTACTACATGCTGG R:ACATGATGATGAGGACGATGG	56	271
<i>GAPDH</i>	GAPDH-GX1	F: CCTTCTGCTGACGCTCCC R: TCATAAGTCCCTCCACGATGC	56	138

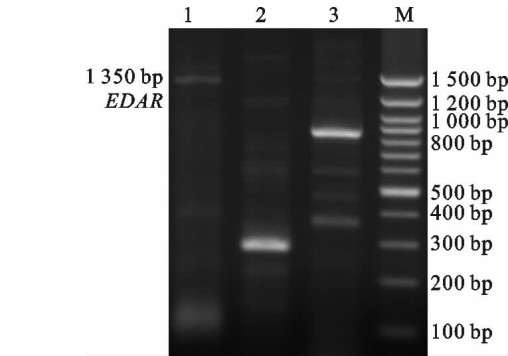
2 结果与分析

2.1 毛囊组织总 RNA 的提取

中国美利奴羊毛囊发育各阶段组织样本总 RNA 经 8 g/L 变性琼脂糖凝胶电泳检测,均可见到 28 S、18 S 和 5 S 3 条带(图略),无蛋白和基因组污染。经核酸蛋白分析仪检测,所有样品的 A_{260}/A_{280} 比值均为 1.8~2.0。说明提取的总 RNA 质量较好,符合反转录和后续定量分析试验的要求。

2.2 *EDAR* 基因的克隆、重组子鉴定

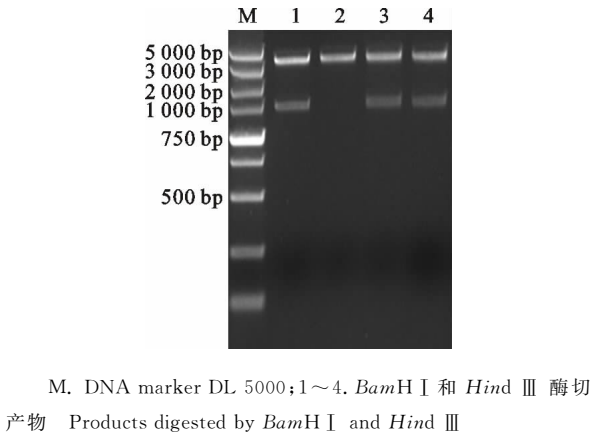
以中国美利奴羊毛囊发育第 135 天的体侧皮肤组织 cDNA 为模板,经特异性引物 PCR 扩增,获得条带大小约为 1 500 bp 的片段且特异性良好(图 1),可以切胶回收进行克隆,随后提取质粒并用 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶双酶切鉴定重组质粒,得到约 1 300 bp 的插入片段(图 2),与预期相符。所获得的序列经与 GenBank 公布的人类、小鼠和牛 *EDAR* 基因 CDS 序列比对分析,结果显示克隆获得的序列与人类、小鼠和预测的牛 *EDAR* 编码区序列相似性分别为 83.41%、79.56% 和 96.3%,确定为绵羊 *EDAR* 基因(GenBank 登录号:KX900497)。



M. DNA marker; 1~3. PCR 产物 PCR Product

图 1 绵羊 *EDAR* PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of sheep *EDAR*



M. DNA marker DL 5000;1~4. *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切产物 Products digested by *Bam*H I and *Hind* III

图 2 绵羊 *EDAR* 酶切

Fig. 2 Digestion of sheep *EDAR*

2.3 绵羊 *EDAR* 序列分析

测序结果表明,绵羊 *EDAR* 编码区序列为 1 350 bp,编码 449 个氨基酸,相似性分析发现,绵羊 *EDAR* 的氨基酸序列与人、大鼠、小鼠、鸡和牛(预测)等物种的同源性较高,分别为 85.75%、82.41%、82.63%、78.4% 和 98.22%(图 3)。结合系统进化树分析可知,绵羊和牛处于同一个分枝上,亲缘关系最近(图 4)。SMART 在线软件预测分析发现绵羊 *EDAR* 蛋白含有 1 个信号肽区域(第 1~26 位氨基酸)、1 个蛋白跨膜区域(第 189~211 位氨基酸)、2 个 TNFR(Tumor necrosis factor receptor)区域(第 31~71 位氨基酸,第 74~113 位氨基酸)和一个 Death 区域(第 350~432 位氨基酸)(图 3)。通过 ProParam 软件得到其分子质量为 48.34 ku,等电点为 5.06,脂肪系数为 78.08,负电荷残基总数 59,正电荷残基总数 44。磷酸化位点预测发现,*EDAR* 蛋白存在 27 个丝氨酸磷酸化位点,12 个苏氨酸磷酸化位点和 6 个酪氨酸磷酸化位点。糖基化位点预测发现,*EDAR* 蛋白含有 17 个潜在的 O-糖基化位点和 2 个 N-糖基化位点。蛋白疏水性结果显示 *EDAR* 蛋白具有较少的疏水性区域,N 段和中间区域存在多个亲水性区域,C 段完全是疏水性区

域。采用 Targetp 1.1 server 软件分析蛋白亚细胞定位,结果显示,线粒体靶向肽数值(mTP)为 0.052,信号肽数值(SP)为 0.912。此外,EDAR

蛋白三级结构分析发现,绵羊 EDAR 蛋白存在 11 个 α -螺旋区和 6 个 β -折叠区,其三级结构如图 5 所示。

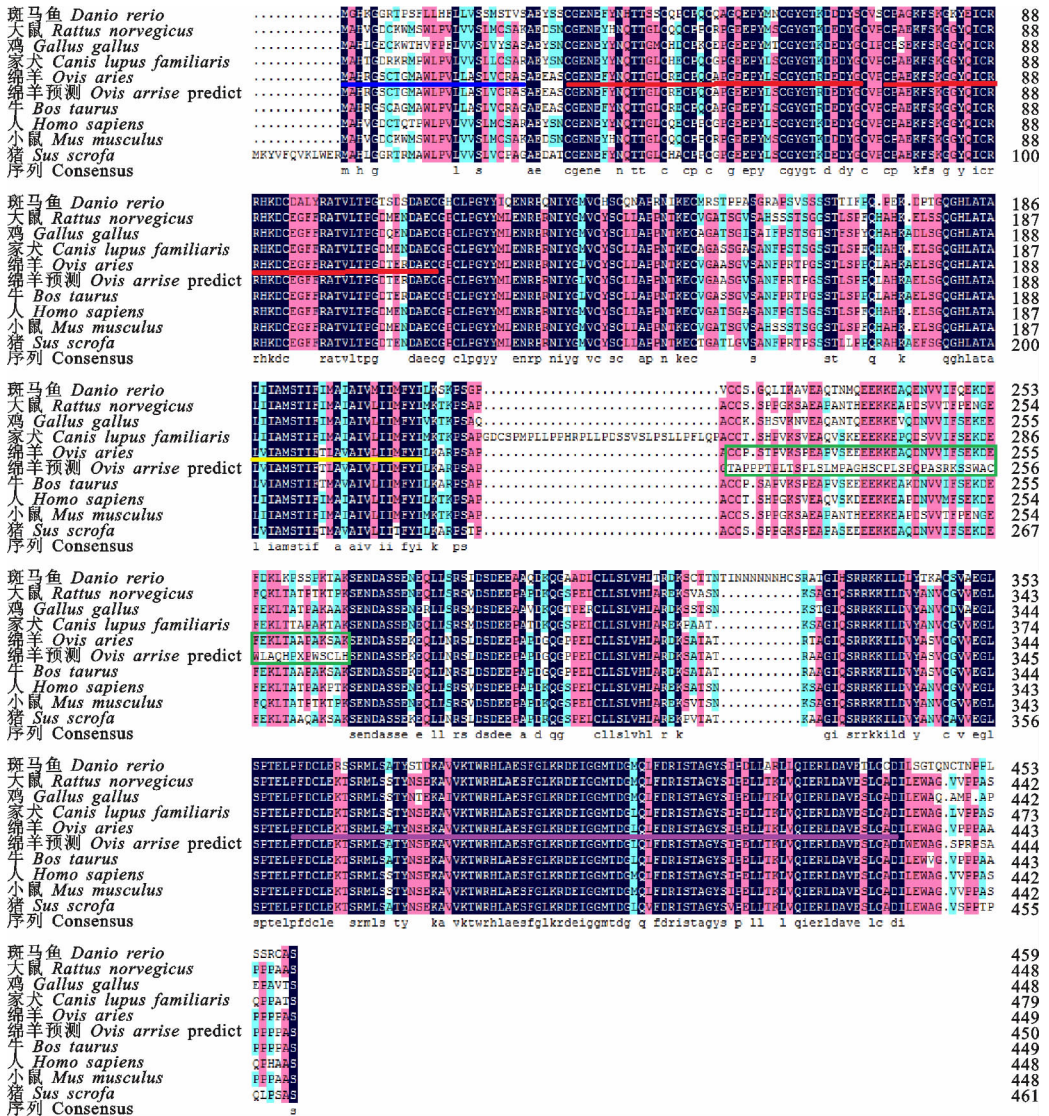


图 3 9 个物种 EDAR 氨基酸序列分析

Fig. 3 Multiple alignment of EDAR amino acid sequences in 9 species

2.4 EDAR 基因在毛囊发育过程中的表达分析

为了确定 EDAR 基因在中国美利奴羊胚胎期毛囊生长发育过程中的表达差异,提取中国美利奴羊毛囊生长发育第 55、75、85、105 和 135 天体侧部皮肤组织的总 RNA,以 GAPDH 为内参,进行实时荧光定量表达分析。经检测,EDAR

和 GAPDH 基因的扩增效率(Amplification efficiency)分别为 1.906 和 1.901,满足实时荧光定量 PCR 要求。结果表明(图 6),EDAR 基因第 135 天表达量最高,在第 55 天表达量次之,在第 75、85 和 105 天表达量相近,呈现逐渐上升的趋势。

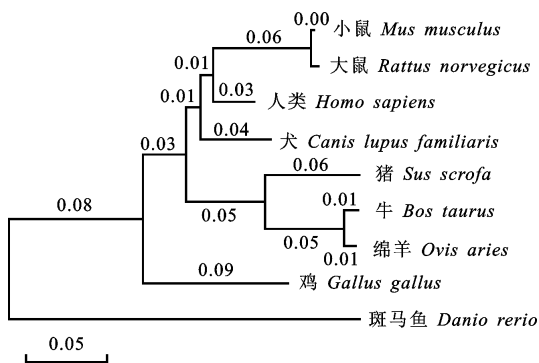


图 4 9 个物种 EDAR 蛋白系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed for EDAR protein of 9 species

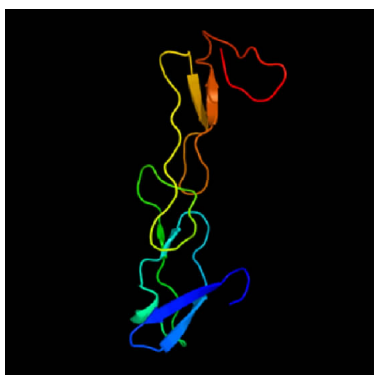
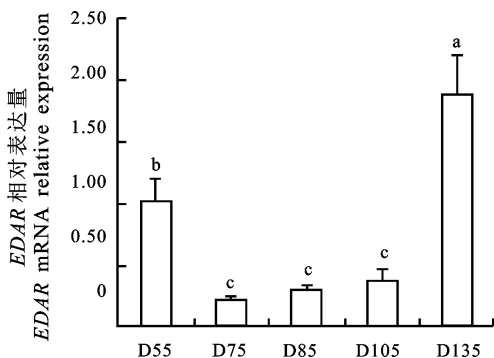


图 5 绵羊 EDAR 蛋白三级结构预测

Fig. 5 Predicted tertiary structure of sheep EDAR protein



EDAR 在毛囊不同发育阶段的 mRNA 水平;图中所标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

The mRNA level of EDAR in different hair follicle development period; the different letter indicated significant difference ($P < 0.05$)

图 6 EDAR 在绵羊毛囊不同发育阶段中的表达量

Fig. 6 Expression of EDAR in sheep hair follicle in different development period

3 讨论

3.1 绵羊 EDAR 基因克隆与结构分析

目前,EDAR 基因在调控动物毛囊生长发育

方面已开展较为广泛的研究,而有关绵羊 EDAR 基因的功能研究较为少见,且尚未获得完整的 EDAR 基因编码区全长序列。本研究根据 EDAR 基因编码区序列在哺乳动物间高度保守的特点,利用 PCR 测序的方法首次克隆获得绵羊 EDAR 基因的编码区全序列,其编码区序列全长 1 350 bp,与绵羊预测序列比对发现本试验克隆获得的绵羊 EDAR 基因编码区序列纠正 NCBI 数据库 EDAR 预测序列 221~269 位氨基酸上的错误(图 3),填补绵羊 EDAR 序列的缺失。序列相似性分析发现,绵羊 EDAR 基因编码的氨基酸序列与牛的序列具有非常高的相似性(98.22%以上),这与以氨基酸序列构建的系统进化树结果相一致,从而进一步证实 EDAR 序列在物种间的高度保守性。

3.2 绵羊 EDAR 蛋白结构分析

绵羊 EDAR 基因定位于 3 号染色体,编码 449 个氨基酸,属 I 型跨膜蛋白,一级结构含有 1 个信号肽区域、1 个蛋白跨膜区域、2 个 TNFR 区域和 1 个 Death 结构域,该结果与其他物种 EDAR 蛋白结构相一致^[6]。绵羊 EDAR 基因编码的氨基酸序列中存在信号肽序列,说明其为分泌型蛋白,同时氨基酸序列相似性分析发现各物种信号肽具有不同的结构特征,说明该蛋白在行使信号功能时发挥的作用不尽相同,进而在调控 EDAR 蛋白的生物学功能中发挥不同作用。此外,研究发现 EDAR 是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员之一,在毛囊、牙齿和汗腺等组织器官发育中具有重要作用^[11],本研究分析绵羊 EDAR 蛋白结构发现,该蛋白含有 2 个肿瘤坏死因子受体(TNFR)位点,由此推测绵羊 EDAR 蛋白在调控组织发育过程的作用与其同源蛋白的生物学功能存在一定相似性。另外,绵羊 EDAR 蛋白含有一个跨膜区和死亡结构域,二者使该蛋白较容易区别于其他 TNFR 超家族蛋白^[11],并且死亡结构域在 EDAR 参与的一个信号转导中发挥作用。该蛋白跨膜区域两端不同物种间的氨基酸序列存在一定差异,影响靠近膜两端的蛋白结构形式,说明该蛋白在发挥生物学作用的途径存在物种特异性。

3.3 EDAR 与绵羊毛囊发育的关系

EDAR 基因在细胞命运决定,外胚层发育以及组织器官的形成等领域研究取得明显进展,此外,EDAR 基因及其参与的 EDA/EDAR/NF-

KB 细胞信号通路在器官发育和毛囊生长周期调控中也发挥着重要作用^[18-21]。目前, *EDAR* 的研究主要集中在人类^[13]、小鼠^[15]和鸡^[11]上, 关于 *EDAR* 调控绵羊毛囊生长发育过程的资料报道较少。本研究以中国美利奴羊为研究对象, 分析 *EDAR* 在毛囊发育过程中的表达规律, 结果发现 *EDAR* 基因在绵羊胚胎期第 55 天和第 135 天的表达量显著高于其他发育时期, 其中在胚胎期第 135 天 *EDAR* 基因表达量最高, 第 55 天次之, 说明 *EDAR* 基因很可能在毛囊基板发生和毛发结构中具有重要功能, 这与已知的研究结果较相近^[22]。羊毛的发生始于出生前胎儿时期, 其毛囊的生长发育和成熟是一个动态过程, 其发生和发育受到多种信号通路和功能基因的调控^[23-24]。由于 *EDAR* 基因能够与 *Wnt/β-catenin*、*BMP* 等调控毛囊发育相关的信号通路相互作用影响毛囊的发育过程^[15-16], 因此研究中国美利奴羊胚胎期毛囊生长发育过程中 *EDAR* 基因的表达, 对研究其在毛囊生长发育过程中的调控机制提供重要依据。

本研究初步分析 *EDAR* 基因在中国美利奴羊毛囊生长发育过程中的表达规律, 为研究 *EDAR* 调控毛囊生长发育机制奠定基础。前期大量的研究已经证明, *EDAR* 基因与动物毛囊的发育以及毛品质性状密切相关^[25]。本研究结果表明, *EDAR* 基因参与绵羊毛囊的发育, 并在毛囊发育过程中具有重要作用, 初步推测 *EDAR* 基因可能在绵羊毛囊基板向下生长和毛囊成熟过程中发挥重要的调控作用。然而, 其作用机制目前尚不清楚, 有必要进行深入研究。

4 结 论

本试验成功克隆绵羊 *EDAR* 基因编码区序列, 分析表明 *EDAR* 蛋白在物种间存在高度保守性。同时利用实时定量 PCR 方法获得该基因在中国美利奴羊毛囊发育不同时期的表达特性。上述研究表明, *EDAR* 基因参与中国美利奴羊毛囊的生长和发育过程, 为进一步阐述绵羊毛囊发育的分子调控机制提供理论依据, 为研究 *EDAR* 在绵羊毛囊发育过程中的作用机制奠定基础。

参考文献 Reference:

- [1] MILLAR S E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2002, 118(2): 216-225.
- [2] FUCHS E, RAGHAVAN S. Getting under the skin of epi-

- dermal morphogenesis [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(3): 199-209.
- [3] BOTCHKAREV V A, PAUS R. Molecular biology of hair morphogenesis: development and cycling [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 2003, 298(1): 164-180.
- [4] SCHMIDT-CHMIDT-ULLRICH R, PAUS R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis [J]. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2005, 27(3): 247-261.
- [5] RISHIKAYSH P, DEV K, DIAZ D, *et al.* Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(1): 1647-1670.
- [6] HEADON D J, OVERBEEK P A. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(4): 370-374.
- [7] KUMAR A, EBY M T, SINHA S, *et al.* The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factor- κ B, JNK, and cell death pathways and binds to ectodysplasin A [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(4): 2668-2677.
- [8] SMAHI A, COURTOIS G, RABIA S H, *et al.* The NF- κ B signalling pathway in human diseases: from incontinencia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes [J]. *Human Molecular Genetics*, 2002, 11(20): 2371-2375.
- [9] TUCKER A S, HEADON D J, SCHNEIDER P, *et al.* Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis [J]. *Development*, 2000, 127(21): 4691-4700.
- [10] LAURIKKALA J, PIAPA J, JUNG H S, *et al.* Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar [J]. *Development*, 2002, 129(10): 2541-2553.
- [11] DREW C F, LIN C M, JIANG T X, *et al.* The Edar subfamily in feather placode formation [J]. *Developmental Biology*, 2007, 305(1): 232-245.
- [12] BOTCHKAREV V A, FESSING M Y. Edar signaling in the control of hair follicle development [J]. *The Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2005, 10(3): 247-251.
- [13] SABETI P C, VARILLY P, FRY B, *et al.* Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations [J]. *Nature*, 2007, 449(7164): 913-918.
- [14] KAMBEROV Y G, WANG S, TAN J, *et al.* Modeling recent human evolution in mice by expression of a selected *EDAR* variant [J]. *Cell*, 2013, 152(4): 691-702.
- [15] TOMANN P, PAUS R, MILLAR S E, *et al.* Lhx2 is a direct NF- κ B target gene that promotes primary hair follicle placode down-growth [J]. *Development*, 2016, 143(9): 1512-1522.
- [16] ZHANG Y, TOMANN P, ANDI T, *et al.* Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways in hair follicle induction [J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(1): 49-61.
- [17] PUMMILA M, FLINIAUX I, JAATINEN R, *et al.* Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis;

inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression [J]. *Development*, 2007, 134(1):117-125.

[18] MIKKOLA M L, THESLEFF I. Ectodysplasin signaling in development [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003, 14(3/4):211-224.

[19] BAYES M, HARTUNG A J, EZER S, *et al.* The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats [J]. *Human Molecular Genetics*, 1998, 7(11):1661-1669.

[20] HYMOWITZ S G, COMPAAAN D M, YAN M, *et al.* The crystal structures of EDA-A1 and EDA-A2: splice variants with distinct receptor specificity [J]. *Structure*, 2003, 11(12):1513-1520.

[21] HEADON D J, EMMAL S A, FERGUSON B M, *et al.* Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development [J]. *Nature*, 2001, 414(6866):913-916.

[22] STECKSEN-BLICKS C, FALK KIERI C, HAGG D, *et al.* Hair shaft structures in EDAR induced ectodermal dysplasia [J]. *BMC Medical Genetics*, 2015, 16(1):79.

[23] 韩新艳, 郁枫, 何婷, 等. 藏山羊胚胎毛囊的形态发生及 p-catenin 和 SHH 的两类表达模式 [J]. *西北农业学报*, 2009, 18(6):23-28.

HAN X Y, YU F, HE T, *et al.* Hair follicles morphogenesis and two expression patterns of β -catenin and SHH in Tibetan goat embryos [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18(6):23-28 (in Chinese with English abstract).

[24] 毛青青, 代蓉, 沈思军, 等. BMP4 对小鼠毛囊数量的影响 [J]. *西北农业学报*, 2012, 21(5):13-17.

MAO Q Q, DAI R, SHEN S J, *et al.* Influence of BMP4 on hair follicles quantity of mice [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2012, 21(5):13-17 (in Chinese with English abstract).

[25] WU S J, TAN J Z, YANG Y J, *et al.* Genome-wide scans reveal variants at EDAR predominantly affecting hair straightness in Han Chinese and Uyghur populations [J]. *Human Genetics*, 2016, 135(11):1279-1286.

Cloning, Sequencing and Quantitative Expression of *EDAR* Gene in Sheep During Hair Follicle Development Period

CHEN Lei, HE Sangang, LIU Shudong, MAYILA and LI Wenrong
(Livestock Breeding and Biotechnology Laboratory of Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Xinjiang Autonomous Region, Biotechnology Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China)

Abstract The aim of this study was to clone the coding sequence(CDS)of sheep EDAR(ectodysplasin A receptor)coding sequence(CDS), to analyze its sequence characteristics, and to investigate its expression during hair follicle different development periods. It could provide the data for further investigation on the function and the expression regulation of *EDAR* Gene in the hair follicle growth and development period. PCR products were cloned into PCRTM- Blunt II -TOPO[®] vector and sequenced. The protein structure of sheep EDAR was analyzed by bioinformatic methods. The expression patterns during hair follicle development period were detected by real-time RT-PCR. The results showed that the sheep *EDAR* CDS was 1 350 bp (GenBank accession KX900497) in length, which coded 449 amino acids and shared highly identity with other species. The phylogenetic tree analysis indicated that the sheep EDAR was closely related to cattle, but distantly related to the zebrafish. The sheep EDAR protein contained a signal peptide and a transmembrane helice; According to the analysis of real-time PCR, mRNA expression of sheep EDAR was detected during hair follicle development period, and EDAR mRNA expression levels was higher in the 55th day and the 135 th day, and it was the lowest in the 75th day. Therefore, EDAR was cloned and its expression patterns during hair follicle period were investigated. The sequence characteristics of EDAR was conservative in different species. EDAR expression in the hair follicle development period indicated that EDAR may play an important role in the hair follicle growth and development period.

Key words Sheep; EDAR ; Gene cloning; Real-time PCR; Hair follicle

Received 2016-10-24 **Returned** 2016-12-19
Foundation item The Natural Science Foundation of Xinjiang(2014211B042).
First author CHEN Lei, male, assistant research fellow. Research area: hair follicle development. E-mail: chenlei0991@126.com
Corresponding author LI Wenrong, female, research fellow. Research area: sheep breeding. E-mail: xjlwr@126.com
(责任编辑:顾玉兰 **Responsible editor:** GU Yulan)