

网络出版时间:2021-04-25 15:44 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.10.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20210425.0954.001.html

鸡 *WDR5* 基因真核表达载体构建及对 PGCs 形成相关基因表达的影响

张 晨,左其生,邹艺琛,赵娟娟,张亚妮,李碧春

(扬州大学 动物科学与技术学院,农业科技发展研究院,教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室,江苏 扬州 225009)

【摘 要】【目的】对鸡色氨酸天冬氨酸重复域 5(WD repeat domain 5,WDR5)进行生物信息学分析,构建真核表达载体,并检测其对原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)形成相关基因表达的影响,探索 WDR5 在鸡 PGCs 形成中的调控作用。【方法】利用 ProtParam、NCBI 保守结构域分析、Uniport、TMHMM Server v. 2.0 和 SignalP 在线网站,分析 WDR5 的氨基酸序列、保守结构域、亲疏水性、跨膜结构域和信号肽表达。利用 SWISS-MODEL 进行同源建模预测其三级结构,借助 String 网站进行互作蛋白的预测。构建重组载体 pcDNA3.1-WDR5-GST,进行双酶切和测序鉴定;将重组载体 pcDNA3.1-WDR5-GST 转染 PGCs,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和 Western blot 检验 WDR5 重组蛋白在 PGC 中的表达情况;用 RT-qPCR 检测过表达 WDR5 对 PGCs 形成相关基因(*DDX4*、*C-KIT*、*BLIMP1*、*LIN28B* 和 *PRDM14*)表达水平的影响。【结果】WDR5 蛋白含有 1 个高度保守的 WD40 结构域,内含 7 个典型的 WD40 重复序列;其亲水性高、不含跨膜结构域、无信号肽表达,可用于构建重组真核表达载体。同源建模和互作蛋白预测显示 WDR5 高度保守,互作蛋白为类 ASH2 蛋白(ASH2 Like,ASH2L)、RB 结合蛋白 5(RB Binding Protein 5,RBBP5)、DPY30 和 KAT8 调控因子 NSL 复合物亚基 3(KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 3,KANSL3)。双酶切和测序结果表明,重组载体 pcDNA3.1-WDR5-GST 构建成功。RT-qPCR 结果显示 PGC 中重组载体可使 WDR5 过量表达;Western blot 结果表明,PGC 中可表达重组蛋白。WDR5 过表达可使 PGCs 形成相关基因的表达水平升高。【结论】构建的 WDR5 重组载体在鸡 PGCs 中能够表达;WDR5 基因表达上调后,PGCs 形成相关基因表达水平升高,推测其可调控鸡 PGCs 的形成。

【关键词】 WDR5;鸡;真核融合表达载体;原始生殖干细胞

【中图分类号】 S831.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2021)10-0009-06

Construction of eukaryotic fusion expression vector of chicken (Gallus gallus) *WDR5* gene and its effect on expression of genes related to PGCs formation

ZHANG Chen,ZUO Qisheng,ZOU Yichen,ZHAO Juanjuan,ZHANG Yani,LI Bichun

(Institutes of Agricultural Science and Technology Development,College of Animal Science and Technology,Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety of Ministry of Education of China,Yangzhou,Jiangsu 225009,China)

Abstract: 【Objective】This study analyzed the chicken WD repeat domain 5 (WDR5) by bioinformatics,constructed a eukaryotic fusion expression vector of WDR5,detected primordial germ cells (PGCs) related genes,and explored the regulatory mechanism of WDR5 in PGCs formation. 【Method】The ProtParam,NCBI conserved domain analysis,Uniport,TMHMM Server v. 2.0 and SignalP online website were

〔收稿日期〕 2020-11-13
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(31772582,31972547);国际合作重点研发专项(2017YFE0108000);扬州市科技计划项目(YZ2019146)
〔作者简介〕 张 晨(1994—),女,江苏无锡人,在读博士,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:m160647@yzu.edu.cn
〔通信作者〕 李碧春(1963—),女,陕西大荔人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:yubcli@yzu.edu.cn

used to analyze the amino acid sequence, conserved domain, hydrophobicity, transmembrane domain and signal peptide expression of WDR5. SWISS-MODEL was used for homology modeling to predict its tertiary structure, and String website was used to predict interacting proteins. The recombinant vector pcDNA3.1-WDR5-GST was identified by double enzyme digestion and sequencing, and the expression of WDR5 in PGC was verified by RT-qPCR and Western blot. The RT-qPCR was used to detect expression of PGCs related genes (*DDX4*, *C-KIT*, *BLIMP1*, *LIN28B* and *PRDM14*) after overexpression of WDR5. 【Result】 The WDR5 protein contained a highly conserved structural domain-WD40 domain with 7 typical WD40 repeats. WDR5 was highly hydrophilic without transmembrane domain and signal peptide expression, and it can be used for constructing recombinant eukaryotic expression vector. Homology modeling and prediction of interacting proteins showed that WDR5 was highly conserved, and the interacting proteins included ASH2 Like (ASH2L), RB Binding Protein 5 (RBBP5), DPY30 and KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 3 (KANSL3). Double enzyme digestion and sequencing showed that the recombinant vector pcDNA3.1-wdr5-gst was successfully constructed. The results of RT-qPCR showed that the recombinant vector in PGC could overexpress WDR5. The results of Western blot showed that the recombinant protein could be expressed in PGC. The expression of PGCs related genes increased with overexpression of WDR5. 【Conclusion】 WDR5 recombinant vector could express in chicken PGCs. PGCs formation related genes increased after overexpression of WDR5, indicating that WDR5 could regulate PGCs formation.

Key words: WDR5; chicken; eukaryotic fusion expression vector; primordial germ cell

组蛋白甲基化作为重要的表观遗传修饰,在不改变染色质结构的条件下参与许多生物学过程,包括细胞分化、细胞增殖等^[1-3]。Xu 等^[4]发现,组蛋白 H3K4me2 能促进自我更新基因的表达,以维持滋养层干细胞生长;Lee 等^[5]发现, H3K4me3 能够促进肌肉和脂肪细胞的形成; H3K4me3 还能通过在心脏特异基因启动子区的富集促进胚胎干细胞向心肌细胞分化^[6]。目前,对 H3K4 甲基化在细胞分化中的作用研究较多,但对胚胎干细胞向生殖细胞分化过程中组蛋白甲基化的作用机制研究尚不多见,尤其是在鸟类研究上。本课题组前期研究发现, H3K4me2 能促进鸡原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)的形成,色氨酸天冬氨酸重复域 5(WD repeat domain 5, WDR5)可改变 H3K4me2 水平,但是关于 WDR5 在 PGCs 形成中的具体调控作用还不清楚。

WDR5 是组蛋白甲基化修饰酶的关键蛋白之一,参与组蛋白二甲基化和三甲基化的修饰过程^[7],进而参与多种生物学过程^[8-11]。研究表明,小鼠过表达 WDR5 后,可激活 Wnt 信号通路,促进软骨细胞的分化^[12]; WDR5 还能维持胚胎干细胞的自我更新和重编程^[8,13]。在生殖干细胞调控方面,干扰 WDR5 可控制爪蟾 H3K4me3 的水平,引起其发育缺陷^[7];在突变线虫中, WDR5 可引起 H3K4me2/3 水平降低,最终影响生殖干细胞的正常发育^[14]。目前对 WDR5 的研究主要集中在哺乳动物上,尽管已

有不少 WDR5 在生殖干细胞方面的研究报道,但其对鸡 PGCs 形成的调控机理尚不清楚。为此,本研究对 WDR5 进行生物信息学解析,构建重组真核表达载体 pcDNA3.1-WDR5-GST,并检测其对 PGCs 形成相关基因表达的影响,以期为后续探究 WDR5 在鸡 PGCs 形成中的调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜如皋黄鸡受精蛋,由中国农业科学院家禽研究所试验禽场提供。PGCs 和 pcDNA3.1(+)载体,由扬州大学动物科学与技术学院教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室保存。高糖 DMEM、丙酮酸钠、胎牛血清、胰酶、鸡血清,购自 Gibco 公司(美国);L-谷氨酰胺、 β -巯基乙醇、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、非必需氨基酸、人干细胞因子(hSCF),购自 Sigma(美国);青、链霉素和牛血清白蛋白,购自(北京)索莱宝科技有限公司;小鼠白血病抑制因子(mLIF),购自 Millipore(德国);FuGENE® HD,购自 Promega 公司(美国);TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂、反转录试剂盒、定量试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;BCA 试剂盒、放射免疫沉淀分析(Radio Immunoprecipitation Assay, RIPA)裂解液、超敏 ECL 化学发光试剂盒,购自碧云天生物技术有限公司(上海)。GST

抗体,购自 Abcam 公司(美国);山羊抗兔 IgG 抗体,购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 WDR5 氨基酸序列分析 利用 NCBI 在线网站获得 WDR5(NM_001006198.1)的核酸序列,将其导入 ProtParam 在线分析网站进行氨基酸序列分析,同时利用 NCBI 保守结构域分析在线网站对 WDR5 的结构域进行分析。

1.2.2 WDR5 蛋白质理化性质分析 利用 Uniport 网站、TMHMM Server v. 2.0 在线网站和 SignalP 在线网站,分别对 WDR5 的亲、疏水性及跨膜结构域和信号肽表达进行分析。

1.2.3 WDR5 蛋白质三级结构和互作蛋白预测 用 SWISS-MODEL 对 WDR5 的氨基酸序列进行同源建模,对获得结果的可用性、序列一致性、蛋白保守性进行分析。利用 String 在线网站对 WDR5 的互作蛋白进行预测,分析保守的互作蛋白。

1.2.4 重组真核表达载体 pcDNA3.1-WDR5-GST 的构建 利用 NCBI 网站获得 WDR5 的 CDS 区序列,在其起始密码子和终止密码子的前面分别添加 kozak 结构(GCCACC)和 GST 蛋白的编码序列,5'端和 3'端分别添加 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切位点,合

成该序列后,利用 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切 3 h,回收产物。将回收产物与经同样双酶切的载体 pcDNA3.1(+)连接,构建重组真核表达载体 pcDNA3.1-WDR5-GST。将连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞,涂布于氨苄抗性的平板过夜培养,次日挑菌,摇菌后提取重组真核表达载体进行 *Kpn* I / *Eco*R I 双酶切鉴定。鉴定成功后,将待测菌液送往南京擎科生物科技有限公司进行测序。

1.2.5 WDR5 重组蛋白在 PGCs 中的表达 (1)mRNA 水平的检测。将 pcDNA3.1-WDR5-GST 重组真核表达质粒(g)和 Eugene 转染试剂(L)按 1:3 的体系转染 PGCs 细胞,同时设置空白组(未处理组)和对照组(转染 pcDNA3.1(+)空载体组)。培养 48 h 后收集细胞。用 Trizol 裂解液进行裂解,提取 RNA,按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA 备用。利用 Primer 5.0 软件,针对 WDR5 基因 CDS 区设计引物,交由南京擎科生物科技有限公司合成。引物信息见表 1。以 β actin 为内参基因,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)试剂盒检测 WDR5 基因 mRNA 的表达,试验重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Real-time fluorescent quantitative PCR primer sequences

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer sequence	下游引物(5'→3') Reverse primer sequence
β actin	CAGCCATCTTTCTTGGGTAT	CTGTGATCTCCTTCTGCATCC
WDR5	CCTCCTCAACCAATCAG	TTCTCAAACCTGCCATC
DDX4	TTCTTGTTGGCAACTTCGG	AACTTCCTGCTGGGCTTC
C-KIT	GCAATCCAGCAATGGTGAC	AAGTTGCGTTGGGTCTAT
BLIMP1	AAGAATCTGGTGAAAGGGAG	GCAGTTTGATGCGTATTTTG
LIN28B	CGGTTGATGTCTTTGTGC	CCTTTGGGTCGTCTTTCA
PRDM14	GCAGAGCCGCAGGTTCCA	ACCCCGAGGTGCCAAACG

(2)蛋白水平的检测。采用 Western blot 法检测 WDR5 重组蛋白的表达情况。收集转染后的 PGCs 细胞,用 RIPA 裂解液进行蛋白裂解,冰上孵育 40 min 后,4 ℃、12 000 g 离心 15 min,收集上清液。用 BCA 试剂盒测定上清液蛋白浓度后,取 20 μ g 蛋白样品,将其用 RIPA 裂解液稀释至 20 μ L,加入 4 μ L 6 $\times$ SDS-PAGE 蛋白缓冲液后,100 ℃变性 30 min。将各组蛋白用 12%的 SDS-PAGE 进行分离,半干法将蛋白转移到硝酸纤维素膜。室温下用体积分数 1%的牛血清白蛋白封闭液孵育 2 h,4 ℃下将膜和特定一抗(GST 抗体)孵育过夜,TBST 清洗 3 次后,加入相应二抗(羊抗兔 IgG)孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,用 ECL 化学发光试剂盒进行显影。

1.2.6 WDR5 蛋白过表达对 PGCs 形成相关基因

的影响 以 β actin 为内参基因,采用 RT-qPCR 试剂盒检测 WDR5 对 PGCs 形成相关基因(*DDX4*、*C-KIT*、*BLIMP1*、*LIN28B* 和 *PRDM14*)表达的影响。试验重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析相对表达量。利用 Primer 5.0 软件,针对上述各基因 CDS 区设计引物,交由南京擎科生物科技有限公司合成。引物信息见表 1。

1.2.7 数据分析 利用 SPSS 统计软件建立数据库并处理数据,用单因素方差分析检验组间差异,采用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 WDR5 氨基酸序列分析

分析结果显示,WDR5 核酸序列可编码 334 个

氨基酸,分子质量为 36 565. 41 u,理论等电点(PI)为 8. 54,半衰期为 30 h,不稳定指数为 30. 81。WDR5 含有 1 个保守结构域 WD40,该结构域含有 7 个 WD40 重复序列。结果说明,WDR5 蛋白质为稳定蛋白,保守结构域为 WD40。

2.2 WDR5 蛋白质理化性质分析

结果显示,WDR5 亲水性高,不属于膜蛋白;WDR5 不含跨膜结构域,无信号肽表达。结果表明,WDR5 不属于跨膜蛋白,可能为核表达蛋白。

2.3 WDR5 三级结构和互作蛋白分析

用 SWISS-MODEL 对鸡 WDR5 进行同源建模,结果匹配到的蛋白质描述为 WDR5,与鸡的 WDR5 一致度为 96. 71%,大于 30%,说明数据可

用;全球性模型质量估测(Global Model Quality Estimation, GMQE)值为 0. 93,说明数据质量较好;匹配度 QMEAN4 为一0. 68,接近 0,说明待测蛋白与模板蛋白匹配度高。以上结果说明,鸡 WDR5 蛋白保守性较高。

利用 String 在线网站对 WDR5 的互作蛋白进行预测,结果表明鸡上预测到的与 WDR5 结合的蛋白包括 DPY30、类 ASH2 蛋白(ASH2 Like,ASH2L)、RB 结合蛋白 5(RB Binding Protein 5,RBBP5)和 MLL2 等组蛋白甲基化酶 compass 组分。该结果进一步说明,WDR5 的保守性较高,属于 compass 组分成员(图 1)。

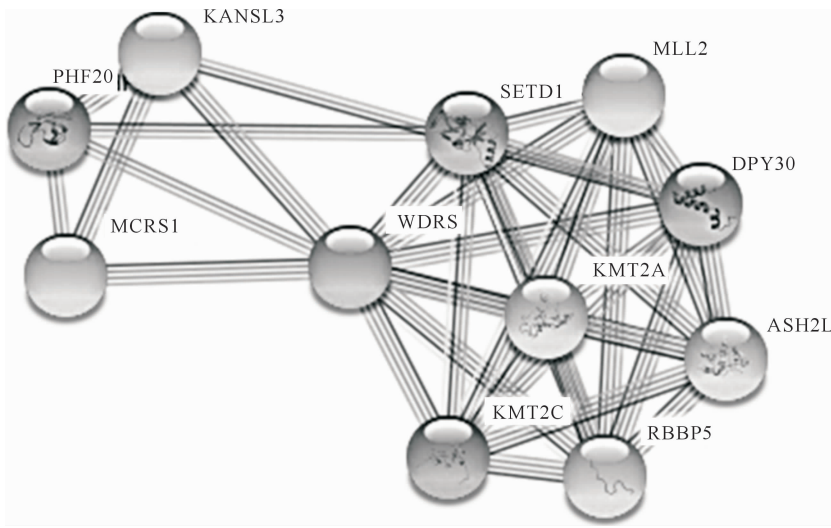


图 1 鸡 WDR5 互作蛋白分析

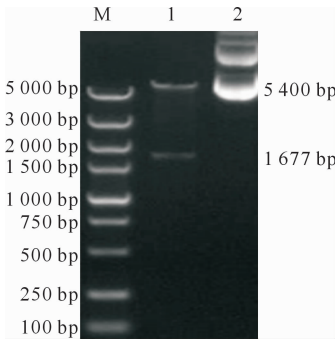
Fig. 1 Interaction protein analysis of chicken WDR5

2.4 重组真核表达载体 pcDNA3. 1-WDR5-GST 的鉴定

对构建的 pcDNA3. 1-WDR5-GST 进行 *Kpn* I/*Eco*R I 双酶切,获得了 1 677 bp 的目的片段和约 5 400 bp 的载体片段(图 2)。测序结果显示,WDR5 已插入 pcDNA3. 1(+)载体,未发生移码和突变现象。*Kpn* I/*Eco*R I 双酶切和测序结果说明,重组真核表达载体 pcDNA3. 1-WDR5-GST 构建成功,可用于后续试验。

2.5 WDR5 重组蛋白在 PGCs 细胞中的表达

RT-qPCR 结果(图 3-A)显示,转染 pcDNA3. 1-WDR5-GST 载体后,WDR5 基因的表达水平极显著高于对照组($P<0. 01$)。Western blot 结果(图 3-B)显示,重组蛋白分子质量约为 62 ku(GST 标签蛋白约 26 ku,WDR5 约 36 ku)。以上结果说明,重组真核表达载体能稳定表 WDR5 重组蛋白。

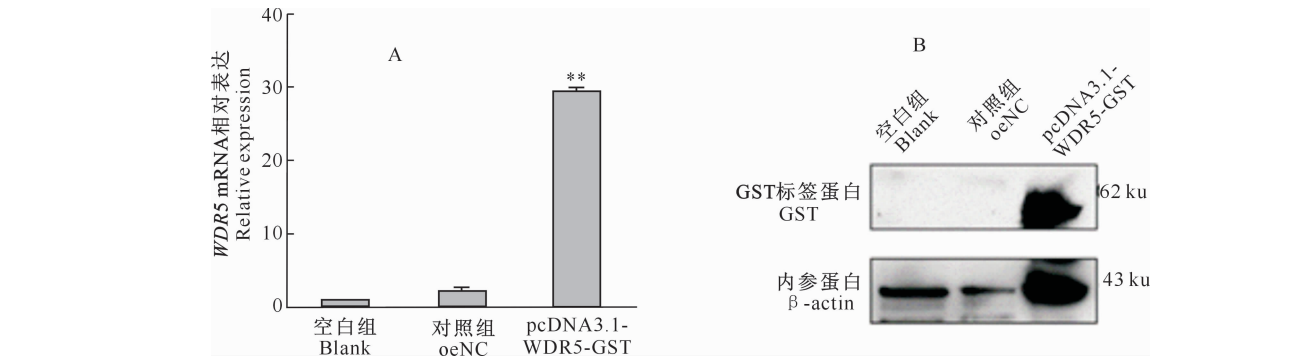


M. DL10000 DNA Marker;1. *Kpn* I/*Eco*R I 双酶切产物;
2. pcDNA3. 1-WDR5-GST

M. DL10000 DNA Marker;1. Restriction enzyme fragments by
Kpn I/*Eco*R I ;2. pcDNA3. 1-WDR5-GST

图 2 重组真核表达载体 pcDNA3. 1-WDR5-GST
的双酶切鉴定

Fig. 2 Double enzyme digestion identification of recombinant
plasmid pcDNA3. 1-WDR5-GST



A. 基因水平检测;B. 蛋白水平检测。* * . 表示与对照组差异极显著($P<0.01$),图 4 同
A. The detection of gene expression;B. The detection of protein expression. * *. This means that the difference between the two groups is very significant ($P<0.01$),the same for Fig. 4

图 3 WDR5 重组蛋白在 PGCs 中的表达
Fig. 3 Expression of WDR5 recombinant protein in PGCs

2.6 WDR5 过表达对 PGCs 形成相关基因的影响

收集转染后的 PGCs 细胞进行 RT-qPCR 检测,结果(图 4)显示,过表达 WDR5 后,PGCs 标记基因 *DDX4*、*C-KIT*、*BLIMP1*、*LIN28B* 和 *PRDM14* 表达水平均极显著升高($P<0.01$),说明 WDR5 过表达对 PGCs 形成相关基因的表达具有重要的调控作用。

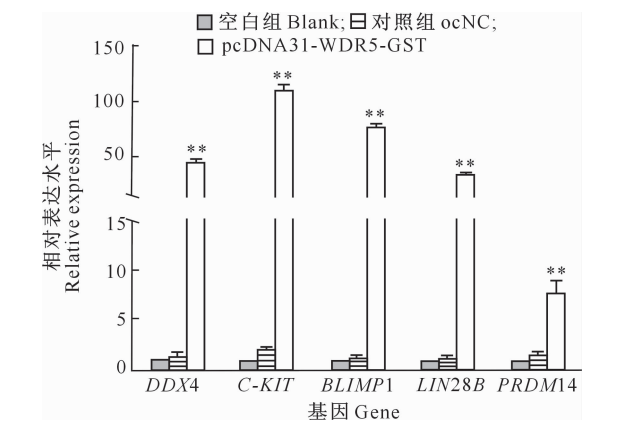


图 4 WDR5 过表达条件下 PGCs 相关基因表达水平的变化
Fig. 4 Expression of PGCs related genes after overexpression of WDR5

3 讨论

WDR5 是组蛋白甲基化复合物组分之一,具有典型的 WD40 核心亚基。WD40 结构域通常以螺旋形式出现,包含 7 个区域。特异性的 WD40 螺旋结构有助于蛋白之间的结合^[7,15]。本研究通过生物信息学分析发现,鸡 WDR5 蛋白具有典型的 WD40 结构域,该结构域含有 7 个 WD40 重复序列,说明在鸡上 WDR5 具有物种保守性。现有研究认为,WD40

结构域参与了多种生物学过程,包括信号转导、囊泡运输、细胞骨架组装、细胞周期调控、细胞凋亡、染色质动力学和转录调控等^[16-20]。含有 WD40 亚基的 WDR5 可作为组蛋白甲基化酶复合体成分,基于前期研究得出的 H3K4me2 参与鸡 PGCs 形成^[21]的结果,本研究发现,WDR5 基因过表达会提高 PGCs 相关基因的表达水平。有研究表明,在鸡上降低 *DDX4* 会减少 PGCs 的数量^[22]; *BLIMP1*、*PRDM14* 是决定生殖细胞命运的关键基因^[23-24], *C-KIT* 和 *LIN28B* 则是 PGCs 生长发育必不可少的基因^[25]。Robert 等^[26]发现,WDR5 在维持秀丽隐杆线虫生殖细胞多能性方面有重要作用。据此推测,WDR5 在鸡 PGCs 形成中可能也有重要作用,而其具体机制仍需进一步研究。

本研究发现,WDR5 不含跨膜结构域,亲水性强,无信号肽表达,说明其不属于膜蛋白。研究表明,WDR5 是高度保守的核蛋白,参与许多与染色质相关的生物学过程^[27],因此推测鸡 WDR5 可能在细胞核中表达。三级结构分析发现,鸡 WDR5 具有高度保守性,匹配一致度为 96.71%。有研究表明,WDR5 通常与 ASH2L、DPY30 和 RBBP5 组成甲基化酶复合体^[28],可激活甲基转移酶 MLL 家族活性。且 WDR5 含有特殊的“Win motif”结构,而该结构是其与 MLL 家族蛋白结合所必需的。以上研究说明,WDR5 通常以“支架”蛋白的形式在复合体中发挥作用^[29-30]。本研究发现,鸡 WDR5 的互作蛋白包括人们所熟知的复合体组分 ASH2L、RBBP5 和 DPY30,复合体蛋白激活的核心蛋白可能为 MLL 家族的 MLL2 蛋白。Dias 等^[30]发现,果蝇中 WDR5 与 NSL 的 2 个亚基 KANSL1 和

KANSL2 发生相互作用,这与本研究结果(KAT8 调控因子 NSL 复合物亚基 3(KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 3,KANSL3)可能与 WDR5 结合)不同,造成这一差异的原因可能是物种不同所致,但这还需进一步验证。

基于 WDR5 蛋白的互作能力,探究 WDR5 在原始生殖细胞形成过程中的作用机制时,需要可用于 Co-IP 和 CHIP 试验的抗体。然而由于鸡种属的特殊性,目前尚无同时满足二者要求的商品化抗体。因此,本研究构建了重组 pcDNA 3.1-WDR5-GST 真核表达载体,通过定量和 Western blot 验证其活性,以用于后续 Co-IP 和 CHIP 试验。

4 结 论

鸡 WDR5 蛋白含有典型的 WD40 亚基,不含跨膜结构域,也无信号肽表达,为亲水性蛋白,具有高度保守性,互作蛋白包括 ASH2L、RBBP5、DPY30 和 KANSL3。成功构建了 pcDNA3.1-WDR5-GST 重组真核表达载体,并验证了其 mRNA 和蛋白水平的活性;过表达 WDR5 可提高 PGCs 形成相关基因的表达水平。

[参考文献]

- [1] Sha Q Q, Jiang Y, Yu C, et al. CFP1-dependent histone H3K4 trimethylation in murine oocytes facilitates ovarian follicle recruitment and ovulation in a cell-nonautonomous manner [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 77(15): 2997-3012.
- [2] Larsson C, Cordeddu L, Siggins L, et al. Restoration of KMT2C/MLL3 in human colorectal cancer cells reinforces genome-wide H3K4me1 profiles and influences cell growth and gene expression [J]. Clinical Epigenetics, 2020, 12(1): 74.
- [3] Mei Q, Xu C, Gogol M, et al. Set1-catalyzed H3K4 trimethylation antagonizes the HIR/Asf1/Rtt106 repressor complex to promote histone gene expression and chronological life span [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(7): 3434-3449.
- [4] Xu J, Kidder B L. KDM5B decommissions the H3K4 methylation landscape of self-renewal genes during trophoblast stem cell differentiation [J]. Biology Open, 2018, 7(5): bio031245.
- [5] Lee J E, Wang C, Xu S, et al. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation [J]. Elife, 2013, 2(2): e01503.
- [6] Wan X, Liu L, Ding X, et al. Mll2 controls cardiac lineage differentiation of mouse embryonic stem cells by promoting H3K4me3 deposition at cardiac-specific genes [J]. Stem Cell Reviews and Reports, 2014, 10(5): 643-652.
- [7] Wysocka J, Swigut T, Milne T A, et al. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3K4 methylation and vertebrate development [J]. Cell, 2005, 121(6): 859-872.
- [8] Ang Y S, Tsai S Y, Lee D F, et al. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network [J]. Cell, 2011, 145(2): 183-197.
- [9] Gori F, Friedman L, Demay M B. Wdr5, a novel WD repeat protein, regulates osteoblast and chondrocyte differentiation *in vivo* [J]. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions, 2005, 5(4): 338.
- [10] Zhu E D, Demay M B, Gori F. Wdr5 is essential for osteoblast differentiation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(12): 7361-7367.
- [11] Nakagawa T, Xiong Y. X-linked mental retardation gene CUL4B targets ubiquitylation of H3K4 methyltransferase component WDR5 and regulates neuronal gene expression [J]. Molecular Cell, 2011, 43(3): 381-391.
- [12] Gori F, Friedman L G, Demay M B. Wdr5, a WD-40 protein, regulates osteoblast differentiation during embryonic bone development [J]. Developmental Biology, 2006, 295(2): 498-506.
- [13] Chen X, Xie W, Gu P, et al. Upregulated WDR5 promotes proliferation, self-renewal and chemoresistance in bladder cancer via mediating H3K4 trimethylation [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8293.
- [14] Li T, Kelly W G. A role for Set1/MLL-related components in epigenetic regulation of the caenorhabditis elegans germ line [J]. PLoS Genetics, 2011, 7(3): e1001349.
- [15] Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins [J]. Protein Cell, 2011, 2(3): 202-214.
- [16] Couture J F, Collazo E, Trievel R C. Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5 [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2006, 13(8): 698-703.
- [17] Patricia E, Vakoc C R. WRAD: enabler of the SET1-family of H3K4 methyltransferases [J]. Briefings in Functional Genomics, 2012, 11(3): 217-226.
- [18] Buddhi P J, Shweta P. Wd40 repeat proteins: signalling scaffold with diverse functions [J]. Protein Journal, 2018, 37(5): 391-406.
- [19] Alicea-Velázquez N L, Shinsky S A, Loh D M, et al. Targeted disruption of the interaction between WD-40 repeat protein 5 (WDR5) and mixed lineage leukemia (MLL)/SET1 family proteins specifically inhibits MLL1 and SETD1A methyltransferase complexes [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(43): 22357-22372.
- [20] Hodul M, Ganji R, Dahlberg C L, et al. The WD40-repeat protein WDR-48 promotes the stability of the deubiquitinating enzyme USP-46 by inhibiting its ubiquitination and degradation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(33): 11776-11788.
- [21] Zhang C, Zuo Q, Wang M, et al. Narrow H3K4me2 is required for chicken PGC formation [J]. Journal of Cellular Physiology, 2021, 236(2): 1391-1400.

[23] 于庆华. 不同动物源食品中大肠杆菌分离鉴定与耐药性分析[J]. 饲料研究,2019,42(2):50-52.
Yu Q H. Isolation,identification and drug resistance analysis of *Escherichia coli* in foods of different animal origin [J]. Animal Husbandry and Feed Science,2019,42(2):50-52.

[24] Tenaillon O,Skurnik D,Picard B,et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli* [J]. Nature Reviews Microbiology,2010,8(3):207-217.

[25] Barilli E,Vismarra A,Frascolla V,et al. *Escherichia coli* strains isolated from retail meat products:evaluation of biofilm formation ability,antibiotic resistance,and phylogenetic group analysis [J]. Journal of Food Protection,2020,83(2):233-240.

[26] 曾 莉. 不同来源大肠杆菌 ESBLs 基因分子流行病学研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
Zeng L. Molecular characteristics of plasmid-mediated ESBLs genes in *Escherichia coli* isolated from animals, retail meat and humans [D]. Guangzhou: South China Agricultural University,2016.

[27] Ana M V,Verónica M A,Gildardo R S,et al. Prevalence,antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* i-solated from retail meat in Tamaulipas,Mexico [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance,2018,14:266-272.

[28] Badi S,Cremonesi P,Abbassi M S,et al. Antibiotic resistance phenotypes and virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolated from animals and animal food products in Tunisia [J]. FEMS Microbiology Letters, 2018,365(10):1-22.

[29] Papp-Wallace K M. The latest advances in β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections [J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy,2019,20(17):2169-2184.

[30] Barlow R S,McMillan K E,Duffy L L,et al. Antimicrobial susceptibility of bacteria from healthy cattle and sheep at slaughter [J]. Australian Veterinary Journal, 2019, 97 (8): 285-287.

[31] Boerlin P,Reid-Smith R J. Antimicrobial resistance;its emergence and transmission [J]. Animal Health Research Reviews,2008,9(2):115-126.

[32] Xi M L,Wu Q,Wang X,et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from retail foods in Shaanxi Province,China [J]. Journal of Food Protection,2015,78(5):1018-1023.

[33] Bevan E R,Jones A M,Hawkey P M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases;temporal and geographical shifts in genotype [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72 (8):2145-2155.

(上接第 14 页)

[22] Aduma N,Izumi H,Mizushima S,et al. Knockdown of DEAD-box helicase 4 (DDX4) decreases the number of germ cells in male and female chicken embryonic gonads [J]. Reproduction, Fertility and Development,2019,31(5):847-854.

[23] Ohinata Y,Payer B,O’Carroll D,et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice [J]. Nature,2005,436(7048):207-213.

[24] Sybirna A,Tang W W C,Smela M P,et al. A critical role of PRDM14 in human primordial germ cell fate revealed by inducible degrons [J]. Nature Communications, 2020, 11 (1): 1282.

[25] Matzuk M M. Lin28 lets blimp1 take the right course [J]. Developmental Cell,2009,17(2):160-161.

[26] Robert V J,Mercier M G,Bedet C,et al. The SET-2/SET1 histone H3K4 methyltransferase maintains pluripotency in the *Caenorhabditis elegans* germline [J]. Cell Reports, 2014, 9 (2):443-450.

[27] Bryan A F,Jing W,Howard G C,et al. WDR5 is a conserved regulator of protein synthesis gene expression [J]. Nucleic Acids Research,2020,48(6):2924-2941.

[28] Sun Z,Tang X,Lin F,et al. The WD40 repeat protein WDR26 binds G β γ and promotes G β γ -dependent signal transduction and leukocyte migration [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011,286(51):43902-43912.

[29] Wen P,Quan Z,Xi R. The biological function of the WD40 repeat-containing protein p55/Caf1 in *Drosophila* [J]. Developmental Dynamics,2012,241(3):455-464.

[30] Dias J, Van Nguyen N,Georgiev P,et al. Structural analysis of the KANSL1/WDR5/KANSL2 complex reveals that WDR5 is required for efficient assembly and chromatin targeting of the NSL complex [J]. Genes & Development, 2014, 28 (9): 929-942.