

DOI:CNKI:61-1390/S.20120109.1219.010

网络出版时间:2012-01-09 12:19

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120109.1219.010.html>

山羊 *Eda* 基因的克隆、序列分析及表达

姜 维, 薛 鹏, 何永新, 陈玉林

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**克隆山羊 *Eda* 基因 CDS 区全序列, 并对其进行序列分析, 研究 *Eda* 基因在毛囊生长周期不同阶段皮肤组织中的表达规律。**【方法】**以太行黑山羊为研究对象, 采集其毛囊生长休止期、生长期和退行期背部皮肤组织, 采用 RT-PCR 技术克隆山羊 *Eda* 基因, 通过在线软件 Blastn 进行基因 cDNA 序列分析, 用 SMART 进行氨基酸序列分析, 利用 SWISS-MODEL 软件进行蛋白质结构分析; 以 β actin 为看家基因, 采用实时荧光定量 PCR 技术对 *Eda* mRNA 在毛囊生长不同时期皮肤组织中的表达规律进行分析。**【结果】**太行黑山羊 *Eda*-A1 基因 CDS 区全长 1 176 bp, 编码 391 个氨基酸; *Eda*-A2 比 *Eda*-A1 少 6 个碱基(nt1161—1166), 编码 389 个氨基酸; 山羊 *Eda* 蛋白氨基酸序列相似性在不同物种间均大于 90%。SMART 分析表明, CDS 编码的蛋白质包含了 TNF、跨膜区以及胶原等结构域。SWISS-MODEL 软件预测结果表明, *Eda*-A2 与 *Eda*-A1 在蛋白质表面结构上存在明显差异。毛囊退行期的皮肤组织中, *Eda* mRNA 表达量最高, 且极显著高于毛囊休止期和毛囊生长期 ($P < 0.01$), 毛囊生长期的表达量中等且显著高于休止期 ($P < 0.05$), 毛囊休止期的表达量较低。**【结论】***Eda* 基因 CDS 区在物种间保守性较强, *Eda* mRNA 在毛囊生长周期不同阶段表达量有差异, 推测 *Eda* 基因对毛囊生长周期的调控有一定影响。

[关键词] 山羊; *Eda* 基因; 分子克隆; 实时荧光定量 PCR; 表达

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)02-0007-06

Molecular cloning, sequence analysis and expression of goat *Eda* gene

JIANG Wei, XUE Peng, HE Yong-xin, CHEN Yu-lin

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The objective of the present study was to obtain and analyze CDS sequence of goat Ectodysplasin-A gene (*Eda*), and to investigate the expression patterns of *Eda* in key stages of hair follicle cycles. **【Method】**The dorsal skin biopsys were surgically collected from three adult male Taihang black goats at telogen, anagen and catagen. The CDS of *Eda* gene were obtained by RT-PCR. The expression of *Eda* mRNA in different stages of hair follicles cycle was analyzed by real-time quantitative PCR. The β actin was used as housekeeping gene. **【Result】**The size of *Eda*-A1 CDS was 1 176 bp encoding 391 amino acid residues. The *Eda*-A2 was 6 bases (nt1161—1166) shorter than *Eda*-A1 encoding 389 amino acid residues. The amino acid sequences shared more than 90% identity with other *Eda* species. Analysis by SMART suggested that the encoded protein contained TNF motif, collagen and transmembrane segment. Analysis with SWISS-MODEL suggested that the surface shape of the *Eda*-A2 protein showed distinct difference compared to *Eda*-A1. The *Eda* mRNA levels in skin were most abundant at catagen, and were significantly higher than that at anagen and telogen ($P < 0.01$). The expression levels were medium at ana-

* [收稿日期] 2011-08-22

[基金项目] 科技部转基因生物新品种培育科技重大专项“高产绒量转基因绒山羊新品种培育”(2008ZX08008-002)

[作者简介] 姜 维(1981—), 女, 陕西户县人, 在读博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: jiangwei197981@163.com

[通信作者] 陈玉林(1964—), 男, 河南鄢陵人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

E-mail: myxy11@yahoo.com.cn

gen, and were significantly higher than that at telogen ($P < 0.05$). The expression levels were lowest at telogen. 【Conclusion】 The result indicates that *Eda* gene is highly conservative among species, and expression of *Eda* mRNA fluctuates in a hair cycle-dependent manner. It is inferred that *Eda* gene may be involved in molecular regulation of hair cycle.

Key words: goat; *Eda* gene; molecular cloning; real-time quantitative PCR; expression

外胚叶发育不全蛋白(Ectodysplasin-A, *Eda*)是在研究人类 X 连锁少汗性外胚层发育不良症(HED)及 Tabby 小鼠的致病基因过程中,发现的一个肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)家族新成员^[1-3]。*Eda* 不仅参与初级毛囊毛芽及毛干的形成,而且还调控着毛囊细胞的凋亡,在毛囊形态发生及毛囊生长周期的调控中发挥着极为重要的作用。

人类 *Eda* 基因位于 X 染色体,其 cDNA 全长大约为 5 kb。在选择性剪接的作用下,*Eda* 基因产生了 *Eda-A1*、*Eda-A2*、*Eda-B* 及 *Eda-C* 等多种不同类型的转录体^[4]。目前,仅对 *Eda-A1* 和 *Eda-A2* 的生物学功能有比较深入的研究。如 *Eda-A1* 在毛囊毛芽的形成过程中发挥着重要的作用,敲除 *Eda* 基因的小鼠皮肤组织不能形成毛芽^[5-6];*Eda-A1* 基因过表达小鼠初级毛囊毛芽较对照组增大,相邻的毛芽间甚至发生融合^[7]。在对毛囊生长周期分子调控的研究中发现,*Eda-A1* 基因过表达小鼠毛囊进入退行期的时间比对照组推后^[8],药物抑制 *Eda-A1* 基因的表达,小鼠毛囊进入退行期的时间比对照组显著提前^[9],其具体机制可能是 *Eda-A1* 调控 X-连锁的细胞凋亡抑制蛋白(XIAP)的表达量所导致^[9]。因此,对 *Eda* 基因进行深入研究,探索其与毛囊形态发生及生长周期的关系有着深远的意义。

目前,对 *Eda* 的研究主要集中在人和试验动物的外胚层发育异常疾病等领域,而在山羊上的研究很少。山羊具有独特的被毛类型,是研究次级毛囊形态发生与生长周期的很好材料,也是研究次级毛囊生长周期遗传特性的理想试验动物。本试验以太行黑山羊为研究对象,采用 RT-PCR 技术克隆了山羊 *Eda* 基因 CDS 全序列,对其进行了生物信息学分析,并采用实时荧光定量 PCR 技术,检测了毛囊不同发育时期皮肤组织中 *Eda* 基因 mRNA 的表达模式,以期为进一步揭示 *Eda* 基因的生物学功能及研究其分子遗传机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 山羊皮肤样品的采集

试验动物由山西省沁水县保种场提供。选择健

康无病,符合品种标准的成年太行黑山羊公羊 3 只,参考内蒙古绒山羊次级毛囊生长周期的分期^[10]方法,分别于休止期(2011-03-21)、生长期(2010-07-29)和退行期(2010-10-29),局部剪毛、消毒后,手术法分离脂膜以上背部皮肤组织 2 cm² 左右,迅速投入液氮,−80 ℃ 冷冻保存备用。

1.2 山羊皮肤组织总 RNA 的提取与反转录

用 Tizol 一步法提取山羊皮肤组织总 RNA,具体步骤参照试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书,然后进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,以检测总 RNA 的质量及完整性。将不同生长时期样品的总 RNA 混合后,用 RevertAid cDNA Synthesize Kit (加拿大 Fermentas 公司)进行反转录。反应总体积为 20 μL: 0.5 μg/μL 总 RNA 4 μL, 0.5 μg/μL OligodT 引物 1 μL, 5×Buffer 4 μL, 20 U/μL Rnase 抑制剂 1 μL, 10 nmol/L dNTP 2 μL, 200 U/μL 反转录酶 1 μL, 双蒸水 7 μL。反应条件为:先混合总 RNA 与 OligodT 引物,65 ℃ 变性 5 min,再加入其他试剂,混匀后,42 ℃ 反应 60 min,70 ℃ 灭活 2 min。反转录产物于 −20 ℃ 保存备用。

1.3 引物的设计与合成

首先参照 GenBank 中牛 *Eda* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号:NM 001081743.2),采用 Primer premier 5.0 软件设计山羊 *Eda* 基因特异性引物(*Eda*_{p1});然后以获得的 *Eda* 基因序列为模板,采用 Primer premier 5.0 软件设计 *Eda* 基因实时荧光定量 PCR 引物(*Eda*_{p2}),同时设计看家基因 β actin 实时荧光定量 PCR 引物(β -actin_{p3})。引物信息见表 1。引物由大连宝生物公司合成。

1.4 山羊 *Eda* 基因的克隆及测序

以山羊皮肤组织 cDNA 为模板,利用设计的 *Eda* 基因特异性引物进行 Touchdown PCR 反应。PCR 反应体系为 25 μL: 10×Taq Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 5 U/μL Taq DNA polymerase (加拿大 Fermentas 公司) 1 μL, 10 μmol/L 上游和下游引物各 1 μL, 双蒸水补至 25 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 30 s, 65 ℃ 45 s, 72 ℃ 90 s, 10 个

循环,每一循环退火温度降低 1 ℃;94 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 120 s,20 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收试剂盒(北京百泰克公司)纯化后,用 TA 克隆连接至 pEGM-Teasy 载体(美国

Promega 公司),电击转化 *E. coli* DH5 α 细胞。通过蓝白斑筛选、质粒提取、酶切鉴定后,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

表 1 *Eda* 基因和内参基因特异性引物及实时荧光定量引物

Table 1 Primer pairs designed for *Eda* and β *actin* gene cloning and real-time quantitative PCR analysis

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ T _m	产物大小/bp Product size
Eda _{p1}	F 5'-ATGGGCTACCCCAGGT-3',R 5'-CTAGGATGCAGGGGCTC-3'	55.0	1 176
Eda _{p2}	F 5'-GGTCAGCGATCCAAGTCAAGAATG-3', R 5'-TATAGATGAAGTAGGTGCCGTCCAC-3'	59.8	144
β -actin _{p3}	F 5'-TGAACCCCAAAGCCAACC-3',R 5'-AGAGGCGTACAGGGACAGCA-3'	62.0	107

1.5 山羊 *Eda* 基因的序列分析

使用 Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行基因 cDNA 序列比对;使用 Blustal W 程序对人、牛、小鼠、山羊等 4 种哺乳动物 *Eda* 基因编码的氨基酸序列同源性进行比较。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对山羊 *Eda* 基因编码的氨基酸序列结构域进行在线预测;利用 SWISS-MODEL 软件(<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>)^[11-12] 构建山羊 *Eda* 蛋白三维结构模型。

1.6 山羊 *Eda* 基因 mRNA 的实时荧光定量 PCR 分析

1.6.1 总 RNA 的提取及反转录 分别提取 3 只成年太行黑山羊公羊毛囊休止期、生长期和退行期皮肤组织总 RNA,将不同时期的总 RNA 分别混合后,用 Rnase-free Dna I (大连宝生物公司)于 37 ℃ 消化部分总 RNA 1 h,用于实时荧光定量试验。用 RevertAid cDNA Synthesize Kit (加拿大 Fermentas 公司)对总 RNA 进行反转录。

1.6.2 反应体系及条件 反应体系为: 0.5 μ g/ μ L cDNA 2.5 μ L,10 μ mol/L 目的基因上游和下游引物各 0.75 μ L,FastStart[®] SYBR Green qPCR Master Mix (德国 Roche 公司) 12.5 μ L,双蒸水 3.5 μ L,共 20 μ L。反应程序:94 ℃ 预变性 1 min;94 ℃ 变性 18 s,56 ℃ 退火 18 s,72 ℃ 延伸 20 s,85 ℃ 读板,40 个循环。每个待测样本设置 3 个技术重复,并设置空白对照。对得到的 3 个循环阈值取算术平均值。

1.6.3 数据处理 用 Excel 软件进行数据分析,以各目的基因在各待测样品中的 Ct 值减去相应内参基因 β *actin* 的 Ct 值,得出各个基因的 Δ Ct,使用 Power(2,- Δ Ct)^[13] 公式计算目的基因的相对表达量。使用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析。结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 山羊 *Eda* 基因的克隆

以山羊皮肤组织 cDNA 为模板,利用设计的 *Eda* 基因特异性引物进行 Touchdown PCR 扩增,获得了长度为 1 176 bp 的目的片段(图 1A)。将 *Eda* 基因扩增产物与 pEGM-Teasy 载体连接,提取质粒后,进行 *Eco*R I 酶切鉴定,得到了 3 000 和 1 176 bp 2 条条带(图 1B),结果正确,说明山羊 *Eda* 基因克隆可用于测序。

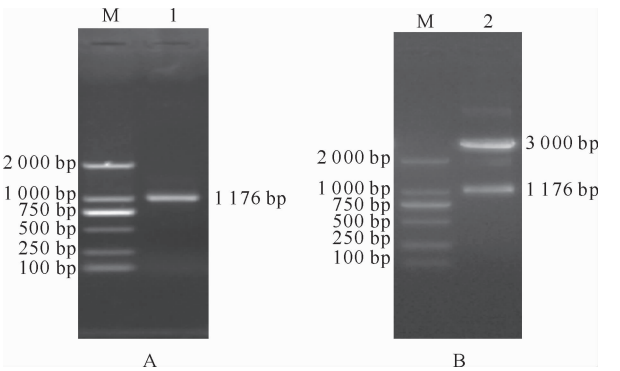


图 1 山羊 *Eda* 基因 PCR 扩增及酶切鉴定结果
A. *Eda* 基因的 PCR 扩增;B. *Eda* 基因的
*Eco*R I 酶切鉴定;M. DNA Marker DL2000;

1. *Eda* 基因扩增产物;2. *Eda* 基因 *Eco*R I 酶切产物

Fig. 1 Electrophoresis maps for goat *Eda* gene PCR amplification and restriction endonuclease
A. PCR products of *Eda* gene;B. *Eco*R I enzyme
detection of *Eda* gene;M. DNA Marker DL2000;
1. PCR products of *Eda* gene;2. Recombination
plasmid with *Eda* gene digested by *Eco*R I

2.2 山羊 *Eda* 基因 CDS 区序列分析

经过序列比对、分析,得到太行黑山羊 *Eda* 基因 2 种剪切体 *Eda*-A1 和 *Eda*-A2。 *Eda*-A1 基因全长 1 176 bp,包含了全部的 ORF,编码 391 个氨基酸残基; *Eda*-A2 基因全长 1 170 bp,包含了全部的

ORF,编码 389 个氨基酸残基。*Eda*-A2 比 *Eda*-A1 少 6 个碱基(图 2),其编码的产物较 *Eda*-A1 少 2 个氨基酸(Val 307 和 Glu 308)。将其提交至 Gen-

Bank,*Eda*-A1 的序列登录号为 JF506861,*Eda*-A2 的序列登录号为 JF506862。

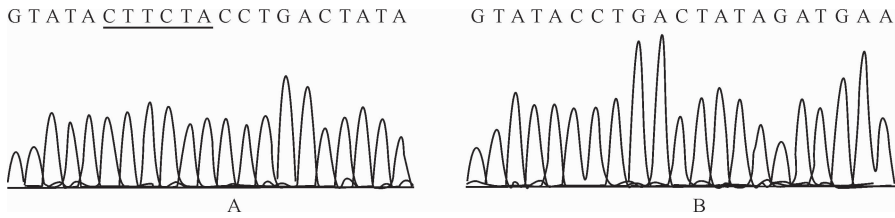


图 2 山羊 *Eda*-A1 基因(A)与 *Eda*-A2 基因(B)序列分析
下划线部分为 *Eda*-A2 基因缺失的核苷酸

Fig. 2 Sequence analyses of the goat *Eda*-A1 (A) and *Eda*-A2 (B) genes
The underlined sequences in A indicates the missing nucleotides of *Eda*-A2

2.3 山羊 *Eda* 蛋白同源性的比较

用 BioEdit 软件中 Blustal W 程序,对人、牛、小鼠和山羊等 4 种哺乳动物 *Eda* 基因的氨基酸序列同源性进行比对,结果(图 3)显示,太行黑山羊 *Eda* 基因编码的氨基酸序列同其他物种具有较高的同源性,山羊 *Eda*-A1 与 山羊 *Eda*-A2、牛 *Eda*(GenBank

号:DAA12927.1)、人 *Eda*-A1(GenBank 号:CAM17680.1)、人 *Eda*-A2(GenBank 号:AAC77371.1)及小鼠 *Eda*-A1(GenBank 号:CAM26730.1)、小鼠 *Eda*-A2(GenBank 号:CAM19583.1)的氨基酸序列同源性分别为 99%,98%,92%,92%,91%和 92%。



图 3 4 个物种 *Eda* 蛋白的氨基酸序列比对结果

Fig. 3 Alignment of *Eda* amino acid sequences for 4 species

2.4 山羊 *Eda* 蛋白的结构分析

SMART 分析表明,在 *Eda*-A1 蛋白质中第 42—64 位氨基酸是一个跨膜结构域(Transmembrane segment),第 160—247 位氨基酸是一个胶原结构域(collagen),第 272—385 位氨基酸是 TNF 结

构域(TNF motif)(图 4A);在 *Eda*-A2 蛋白质中第 42—64 位氨基酸是一个跨膜结构域;第 160—247 位氨基酸是一个胶原结构域(collagen);第 249—383 位氨基酸是 TNF 结构域(TNF motif)(图 4B)。

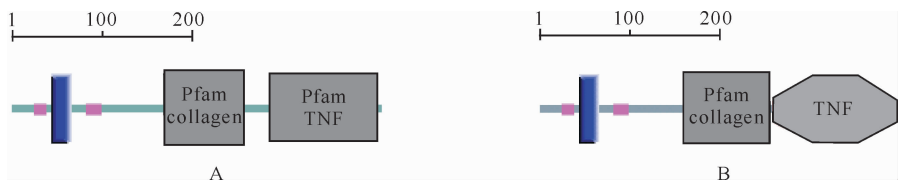


图 4 山羊 *Eda*-A1(A)和 *Eda*-A2(B)基因编码蛋白质的 SMART 分析

Fig. 4 SMART analysis of the protein translated from *Eda*-A1 gene (A) and *Eda*-A2 gene (B)

利用 SWISS-MODEL 软件,分别以人 *Eda*-A1 蛋白(PDB ID: 1rj7)和人 *Eda*-A2 蛋白(PDB ID: 1rj8)为骨架,构建山羊 *Eda*-A1 和 *Eda*-A2 蛋白三聚

体三维结构,结果见图 5。图 5 结果显示,*Eda*-A2 和 *Eda*-A1 在蛋白质表面结构上存在明显差异。

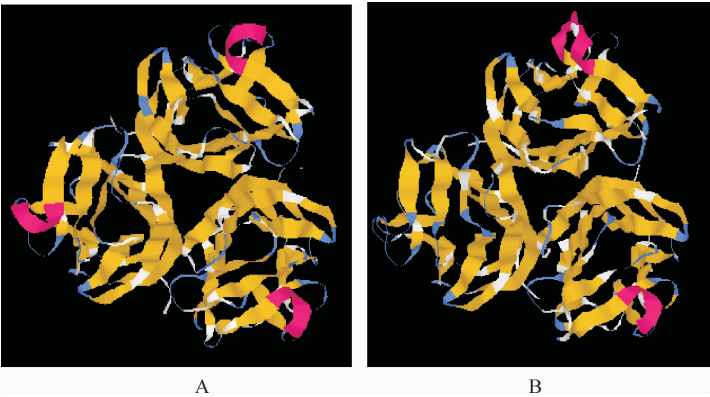


图 5 山羊 *Eda*-A1(A)和 *Eda*-A2(B)蛋白的三聚体三维结构

Fig. 5 Three-dimensional structure of protein trimers of goat *Eda*-A1 (A) and *Eda*-A2 (B)

2.5 山羊 *Eda* 基因 mRNA 在毛囊生长不同时期皮肤组织中的表达

采用相对定量方法,用内参基因 β actin 矫正起始组织量、RNA 提取效率等不可控制因素,对山羊 *Eda* mRNA 在毛囊生长不同时期皮肤组织中的表达水平进行相对定量,结果见图 6。

生长期和退行期的皮肤组织中均有表达,其中在毛囊休止期表达量较低($0.015\ 793\pm0.001\ 407$);在毛囊生长期表达量较高($0.030\ 191\pm0.002\ 114$),且显著高于休止期($P<0.05$);在毛囊退行期表达量达到最大值($0.206\ 635\pm0.026\ 15$),且极显著高于毛囊休止期和毛囊生长期($P<0.01$)。

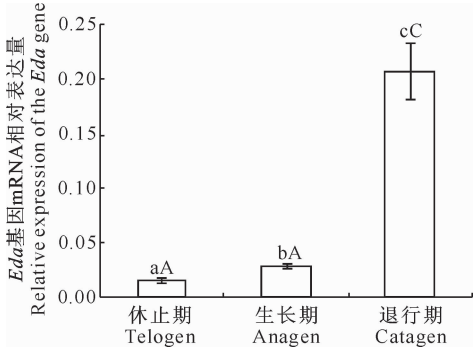


图 6 山羊 *Eda* mRNA 在毛囊生长不同时期的表达
不同大、小写字母表示 $P<0.01$, $P<0.05$ 差异水平

Fig. 6 Expression of the *Eda* genes
in differential stages of hair cycle

A small letter means difference ($P<0.05$) and a capital letter means extreme difference ($P<0.01$)

由图 6 可见,山羊 *Eda* mRNA 在毛囊休止期、

3 讨论

1996 年,Kere 等^[1]在研究人类 X 连锁少汗性外胚层发育不良症的过程中,首次克隆了其致病基因 *Eda*。人类 *Eda*-A1 基因 cDNA 全长 5 278 bp, *Eda*-A2 基因全长 5 272 bp,均包含 8 个外显子和 8 个内含子^[4]。其编码的蛋白质均为 II 型跨膜蛋白,在结构上包含 TNF、跨膜区以及由 19 个 G-X-Y 重复形成的胶原等结构域^[14]。本试验克隆的太行黑山羊 *Eda*-A1 及 *Eda*-A2 基因预测的氨基酸序列与其他物种相比,序列相似性在 90% 以上,其 ORF 编码的蛋白质经 SMART 程序分析具有 TNF、跨膜区和胶原 3 个保守位点。这些结果证实了克隆测定的 cDNA 序列为山羊 *Eda*-A1 及 *Eda*-A2 基因,物种间的高度保守同时也说明了 *Eda*-A1 及 *Eda*-A2 基因具有重要的生物学功能。

研究发现,小鼠 *Eda* 基因存在 9 种不同类型的剪切体,其中剪切体 *Eda-A1* 和 *Eda-A2* 最为重要,其 mRNA 达到 *Eda* mRNA 总量的 80% 左右^[15]。*Eda-A1* 编码含 391 个氨基酸的蛋白质,*Eda-A2* 较 *Eda-A1* 少 6 bp(nt1161—1166),编码 389 个氨基酸的蛋白,该蛋白在 TNF 序列上比 *Eda-A1* 少 2 个氨基酸(Val 307 和 Glu 308),导致其蛋白质表面结构、蛋白质化学特性及受体结合位点的结构发生改变^[16]。*Eda-A1* 和 *Eda-A2* 均属于 TNF 配体家族成员,通过结合不同的受体引起细胞效应,其中 *Eda-A1* 与受体 *Edar* 结合,激活其下游的 NF- κ B 信号传导,而 *Eda-A2* 与配体 *Xedar* 结合^[17-20]。本研究克隆的太行黑山羊 *Eda-A2* 比 *Eda-A1* 少 6 个碱基,其编码的产物较 *Eda-A1* 少 2 个氨基酸(Val 307 和 Glu 308);编码的蛋白质经 SWISS-MODEL 软件分析发现,*Eda-A2* 和 *Eda-A1* 在蛋白质表面结构上存在明显差异。上述研究表明,*Eda* 基因在不同物种间呈现出相似的转录产物,表明该基因在不同物种间的转录剪切方式是相对保守的,同时也说明了山羊 *Eda-A2* 和 *Eda-A1* 可能具有不同的生物学功能。

Fessing 等^[9]采用半定量 RT-PCR 检测了 *Eda* mRNA 在小鼠毛囊生长不同时期皮肤组织中的表达情况,结果表明,在毛囊休止期 *Eda* mRNA 不表达,而在生长期表达较强,在毛囊兴盛期后期及退行期早期,达到最大值,之后随着退行期发育,表达量开始下降。本试验结果表明,*Eda* mRNA 在山羊毛囊生长不同时期的皮肤组织中的表达差异与小鼠略有不同,*Eda* mRNA 表达量在毛囊休止期较低,而在生长期较高,在毛囊退行期达到最大值。虽然采用的检测方法不同,但 *Eda* 基因在不同物种间呈现相似的表达规律,表明该基因在不同物种毛囊生长周期不同阶段的表达是相对保守的,显示了其功能的重要性。

毛囊生长周期的调控是一个十分复杂的生理生化过程,目前,关于 *Eda* 的生理功能和调节毛囊生长分化的作用机制仍在研究和探索阶段。太行黑山羊 *Eda* 基因的克隆及其表达模式的分析,将为进一步研究其在次级毛囊生长周期中的调控功能提供条件。

4 结 论

本研究成功克隆了太行黑山羊 *Eda-A1* 和 *Eda-A2* 基因,其中 *Eda-A1* 基因编码区序列全长

1 176 bp,编码 391 个氨基酸;*Eda-A2* 基因编码区序列全长 1 170 bp,编码 389 个氨基酸。*Eda-A2* 比 *Eda-A1* 仅缺少 6 bp(nt1161—1166)。山羊 *Eda-A1* 和 *Eda-A2* 基因推测的氨基酸序列与牛 *Eda* 具有高度的同源性。*Eda* mRNA 在山羊毛囊生长周期不同阶段的皮肤组织中呈现出不同程度的表达。

[参考文献]

- [1] Kere J, Srivastava A K, Montonen O, et al. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein [J]. *Nat Genet*, 1996, 13: 409-416.
- [2] Mikkola M L, Thesleff I. Ectodysplasin signalling in development [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14: 211-224.
- [3] Drögemüller C, Distl O, Leeb T. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (ED1) in men, mice, and cattle [J]. *Genet Sel Evol*, 2003, 35 (Suppl. 1): 137-145.
- [4] 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]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7: 1661-1669.
- [5] Laurikkala J, Pispä J, Jung H S, et al. Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor *Edar* [J]. *Development*, 2002, 129: 2541-2553.
- [6] Headon D J, Overbeek P A. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction [J]. *Nat Genet*, 1999, 22: 370-374.
- [7] Mustonen T, Ilmonen M, Pummila M, et al. Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages [J]. *Development*, 2004, 131: 4907-4919.
- [8] Mustonen T, Pispä J, Mikkola M L, et al. Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1 [J]. *Dev Biol*, 2003, 259: 123-136.
- [9] Fessing M Y, Sharova T Y, Sharov A A, et al. Involvement of the *Edar* signaling in the control of hair follicle involution (catagen) [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169: 2075-2084.
- [10] 李玉荣, 范文斌, 李长青, 等. 内蒙古绒山羊次级毛囊组织形态周期性变化研究 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41 (11): 3920-3926.
- [11] Li Y R, Fan W B, Li C Q, et al. Histomorphology research of the secondary follicle cycling of Inner Mongolia cashmere goat [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (11): 3920-3926. (in Chinese)
- [12] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [13] Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, et al. The SWISS-MODEL repository and associated resources [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: 387-392.