

网络出版时间:2019-06-12 09:41 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.12.004
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190612.0939.008.html

绵羊 *KRTAP20-1* 基因变异及其在不同组织的表达特征

李 涛,李少斌,王继卿,刘 秀,胡 江,罗玉柱

(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)

[摘 要] **【目的】**研究角蛋白关联蛋白(keratin-associated proteins,KAPs)编码基因的遗传变异对绒毛性状的影响,以丰富绵羊功能基因组学并开发基因标记。**【方法】**采用 PCR-SSCP 和 DNA 测序技术,检测 KAP20-1 编码基因(*KRTAP20-1*)在甘肃高山细毛羊(细毛羊)、青海半细毛羊(半细毛羊)和藏绵羊(粗毛羊)3 个群体中的变异情况;利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术,检测 *KRTAP20-1* 基因在甘肃高山细毛羊、小尾寒羊(粗毛羊)成年母羊和羔羊不同组织中的表达情况。**【结果】**3 个绵羊群体 *KRTAP20-1* 基因共检测到 4 个 SNPs,其中 3 个为非同义突变导致氨基酸的改变(P. Gly10Ser、P. Tyr29Phe 和 P. Ser61Gly),1 个为同义突变。等位基因 A 在 3 个绵羊群体中均为优势等位基因,其余 3 个等位基因在不同绵羊群体中分布差异较大。甘肃高山细毛羊 *KRTAP20-1* 基因的遗传杂合度、有效等位基因数和多态信息含量均高于其他 2 个群体。*KRTAP20-1* 基因只在绵羊皮肤中表达,在其他组织中均无表达;在小尾寒羊和甘肃高山细毛羊 2 个群体中,羔羊皮肤组织中 *KRTAP20-1* 表达量均高于母羊,且在小尾寒羊皮肤组织中的表达量高于同期甘肃高山细毛羊,即表现出明显的群体差异性和时空差异性。**【结论】**绵羊 *KRTAP20-1* 基因在不同用途毛用绵羊中的等位基因分布差异及组织表达的种群特异性和时空特异性提示,该基因对羊毛相关性状的形成和表型均有影响。

[关键词] 绵羊;*KRTAP20-1* 基因;基因表达;羊毛性状

[中图分类号] S826.9⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2019)12-0028-07

Characteristics of genetic variation and expression in different tissues of ovine *KRTAP20-1* gene (*Ovis aries*)

LI Tao, LI Shaobin, WANG Jiqing, LIU Xiu, HU Jiang, LUO Yuzhu

(College of Animal Science and Technology, Gansu Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology,

Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: **【Objective】** This study investigated the effects of genetic variation of keratin-associated proteins (KAPs) coding gene on wool and cashmere traits to enrich ovine functional genomics and develop genetic markers. **【Method】** Using Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) and DNA sequencing technology, *KRTAP20-1* gene variation and distribution in different groups of Gansu Alpine Merino (fine wool sheep), Qinghai Semi-fine wool sheep (semi-fine wool sheep) and Tibetan sheep (coarse wool) were detected. The quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression and distribution of *KRTAP20-1* gene in different tissues of Gansu Alpine Merino (fine wool sheep) and small-tailed Han sheep (coarse wool). **【Result】** Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected in *KRTAP20-1* gene of sheep, and three of them were non-synonymous mu-

[收稿日期] 2018-11-09

[基金项目] 甘肃省基础研究创新群体计划项目(17JR5RA137,18JR3RA190);甘肃省科技计划项目(18YF1WA082)

[作者简介] 李 涛(1992—),男,甘肃天水人,在读硕士,主要从事草食动物遗传育种研究。E-mail:812974620@qq.com

[通信作者] 罗玉柱(1962—),男,甘肃景泰人,教授,博士生导师,主要从事现代生物技术应用研究。E-mail:luoyz@gsau.edu.cn

tations causing amino acid changes (P. Gly10Ser, P. Tyr29Phe and P. Ser61Gly) and one was synonymous mutation. The allele A was dominant in the three sheep populations, and other alleles were significantly distributed differently between these sheep breeds. Population genetic analysis indicated that Qinghai Semi-fine wool sheep had higher genetic heterozygosity, effective allele number and polymorphism information content of *KRTAP20-1* gene than others. The gene was only expressed in skin tissue. The expression level in lamb skin tissue of the two sheep breeds was higher than that in ewes, and the expression level of small-tailed Han sheep was higher than Gansu Alpine Merino at same age. 【Conclusion】 The *KRTAP20-1* gene showed differences in allele distribution and breed specificity and time-space specificity on tissue expression, suggesting that this gene may have influence on formation and phenotype of wool related traits.

Key words: sheep; *KRTAP20-1* gene; gene expression; wool traits

25 000 年以前,瑞士湖附近的部落开始驯养绵羊,收集羊毛和使用羊毛制品^[1]。国际毛纺组织统计结果表明,澳大利亚和中国是世界上养羊数量和绵羊羊毛产量最多的国家^[2]。绵羊羊毛拥有巨大的市场需求和广阔的发展前景,其产品 in 地板、服饰、室内装潢、汽车和航空工业等领域广泛应用^[3-4],因此对羊毛性状的改良和提高意义重大。

角蛋白关联蛋白(KAPs)是羊毛和羊绒的主要结构蛋白,对羊毛物理性质起着决定性作用^[5],KAPs 蛋白最显著的特征是富含甘氨酸(Gly)、酪氨酸(Tyr)和半胱氨酸(Cys)^[6]。目前,根据氨基酸含量和种类差异,将 KAPs 蛋白分为高硫角蛋白关联蛋白(high sulphur, HS KAP)、超高硫角蛋白关联蛋白(ultra high sulphur, UHS KAP)和高甘氨酸/酪氨酸角蛋白关联蛋白(high glycine/tyrosine, HGT KAP)^[7]。KAP20-1 属于高甘氨酸/酪氨酸类 KAPs^[8],KAPs 通过广泛的二硫键交联形成基质,嵌入到角蛋白纤维丝的半胱氨酸残基中,从而形成羊毛纤维的主体结构并决定羊毛特性^[9],因此 KAPs 在确定绵羊羊毛纤维物理机械性能中起重要作用^[10]。KAPs 编码基因(*KRTAPs*)为小片段基因,大小为 600~1 500 bp,且不含内含子^[11]。

研究表明,*KRTAPs* 基因与羊毛性状存在相关性^[12]。艾买提·买买提^[13]通过对 *KRTAP9-2* 基因位点不同基因型与剪毛量的相关性分析,推测 *KRTAP9-2* 基因对剪毛量有显著影响;Li 等^[14]研

究发现,*KRTAP6-3* 基因和羊毛直径具有相关性;孙福亮等^[15]研究发现,新吉细毛羊 *KRTAP13-1* 基因与羊毛产量和羊毛拉伸长度有显著相关性,且羊毛性状的遗传力为 0.3~0.6^[16]。因此,以羊毛数量和质量性状的调控基因为基因标记来改善羊毛的生产具有重要意义。迄今为止,在羊 HGT-KAPS 家族中已鉴别出 *KRTAP6*,*KRTAP7*,*KRTAP8* 和 *KRTAP22* 4 个家族成员^[7,17]。人 HGT-KAPS 家族中的 *KRTAP20* 基因已被鉴定,定位于第 21 号染色体上^[18],由 *KRTAP20-1* 和 *KRTAP20-2* 组成,且 *KRTAP20* 基因在头发纤维的基质层和皮质层中表达^[19]。绵羊 *KRTAP20-2* 基因的相关研究已有报道^[10],但绵羊 *KRTAP20-1* 基因的研究尚未见报道。因此,本试验以绵羊 *KRTAP20-1* 基因为候选基因,采用 PCR-SSCP 结合 DNA 测序技术和实时荧光定量 PCR 技术,分析该基因在甘肃高山细毛羊、青海半细毛羊和藏绵羊群体中的变异及其在小尾寒羊及甘肃高山细毛羊羔羊和成年母羊不同组织中的表达特征,以期对绵羊毛用性状的基因标记及改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集 478 只绵羊血样,每只绵羊颈静脉采血 10 mL,柠檬酸葡萄糖溶液抗凝,-70 ℃ 冻存,用于基因组 DNA 提取。采样信息见表 1。

表 1 绵羊样品信息
Table 1 Sheep information

品种 Breed	采样地 Location	数量/只 Number	羊毛类型 Wool type
甘肃高山细毛羊	天祝县松山镇	190	细毛
Gansu Alpine Merino	Songshan County, Tianzhu		Fine wool
藏绵羊 Tibetan sheep	甘南州玛曲县 Maqu County, Gannan	181	粗毛 Coarse wool
青海半细毛羊	青海省河卡种羊场	107	半细毛
Qinghai Semi-fine wool sheep	Heka breeding sheep farm, Qinghai		Semi-fine wool

以甘肃高山细毛羊和小尾寒羊分别为细毛羊和粗毛羊代表,在天祝县松山镇分别采集 2 个品种羔

羊和成年母羊的心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、背最长肌和皮肤组织样品各 3 份,用于研究不同群体、不同组织 *KRTAP20-1* 基因的表达特征。

1.2 引物设计与合成

参照 GenBank 公布的人类 *KRTAP20-1* 基因 (GenBank 登录号:NC_000021.9)编码区序列,利用

GenBank 中 BLAST 软件在绵羊基因组中比对发现了一个高度同源区,用 Primer 5.0 设计引物,用 BLAST 在线检测其特异性,由六合华大基因公司 (北京)合成多态性筛选引物 P1、荧光定量 PCR 引物 P2 以及内参基因 β -actin (GenBank 登录号:No. NM001009784)引物。具体引物信息见表 2。

表 2 绵羊 *KRTAP20-1* 基因引物信息
Table 2 Primers of *KRTAP20-1* gene in sheep

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增长度/bp Product length	退火温度/℃ Annealing temperature
P1	F:TCATATTCTGCAAGCAAAGGC R:GCTGATGGGTCTCAGTCAC	294	60
P2	F:ACTACAGCAACTACTACGGTG R:AGAAGCTAGAGGACCAGTATCT	134	58
β -actin	F:AGCCTTCCTTCCTGGGCATGGA R:GGACAGCACCGTGTTGGCGTAGA	113	60

1.3 试验方法

1.3.1 PCR-SSCP 检测 (1)血液基因组 DNA 提取。采用试剂盒(天根生化科技有限公司)提取 478 只绵羊血液基因组 DNA, -20℃保存。

(2)常规 PCR 反应。PCR 反应体系:上、下游引物 (0.25 μ mol/L) 各 0.4 μ L, *Taq* 预混酶 (5 U/ μ L) 11 μ L, DNA 模板 (50 ng/ μ L) 0.8 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。

PCR 扩增程序:9700 型 PCR 仪 (ABI, 美国) 中 94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;72℃终延伸 10 min,PCR 产物保存于 4℃。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物的完整性和浓度。

(3)SSCP 检测。将 2 μ L PCR 产物混合到 8 μ L 变性缓冲液 (0.025%溴酚蓝,98%去离子甲酰胺、10 mmol/L EDTA (pH = 8.0) 和 0.025%二甲苯氰) 中,95℃热变性 10 min,置于低温环境中迅速点样至 1%甘油+10%非变性聚丙烯酰胺凝胶胶孔中,220 V、20℃条件下在 0.5×TBE 缓冲液中垂直电泳工作 18 h。再根据 Byun 等^[21]报道的银染法染色后判定 SSCP 带型,并干燥保存。

(4)等位基因序列测定。若 SSCP 条带为纯合子,直接对 PCR 扩增产物进行测序;若 SSCP 条带为杂合子,杂合子序列需进行切胶测序^[22]。每种等位基因均选用 2 个不同的样品进行测序。序列测定由上海生工生物有限公司完成。

(5)数据统计分析。将统计的基因型数据利用 Popgen 32.0 软件计算等位基因频率、遗传纯合度 (*H*_o)、遗传杂合度 (*H*_e) 和有效等位基因数 (*N*_e),再利用等位基因频率用 PIC 软件计算群体多态信息含量 (PIC)。

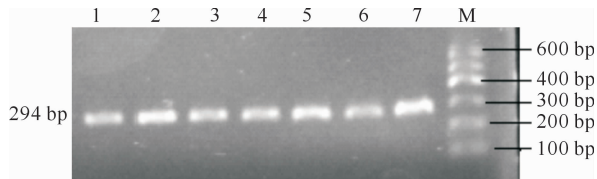
1.3.2 组织表达检测 (1)总 RNA 提取。按照 TRIzol 试剂使用说明书 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 从不同年龄甘肃高山细毛羊和小尾寒羊不同组织样品中提取总 RNA。结合凝胶电泳和分光光度法检测浓度和纯度, -80℃保存。

(2)qRT-PCR 反应。使用 PrimeScript™ RT 试剂盒和 gDNA Eraser (TaKaRa) 按照使用说明书步骤将总 RNA 反转录为 cDNA。扩增体系:cDNA 100 ng, 每种引物 0.25 μ mol/L, AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix (Vazyme, 南京, 中国) 10.0 μ L, ROX Reference Dye 2 0.4 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L 体系。热曲线先在 95℃5 min 进行 1 次循环,再在 95℃10 s、60℃30 s 和 72℃30 s 条件下进行 40 次循环。结果用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法^[23] 分析相对表达量。

2 结果与分析

2.1 绵羊 *KRTAP20-1* 基因变异分析

将 PCR 扩增产物置于 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测。结果显示 PCR 扩增产物单一,长度与目的片段大小一致 (图 1)。



M, DNA Marker;1 — 7, PCR 样品
M, DNA Marker. 1 — 7, PCR sample

图 1 绵羊 *KRTAP20-1* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *KRTAP20-1* gene in sheep

通过 SSCP 分析发现,*KRTAP20-1* 基因在 3 个绵羊群体中共检测到 A、B、C、D 4 个等位基因,4 种

基因型分别为 AA、AB、AC 和 AD(图 2)。

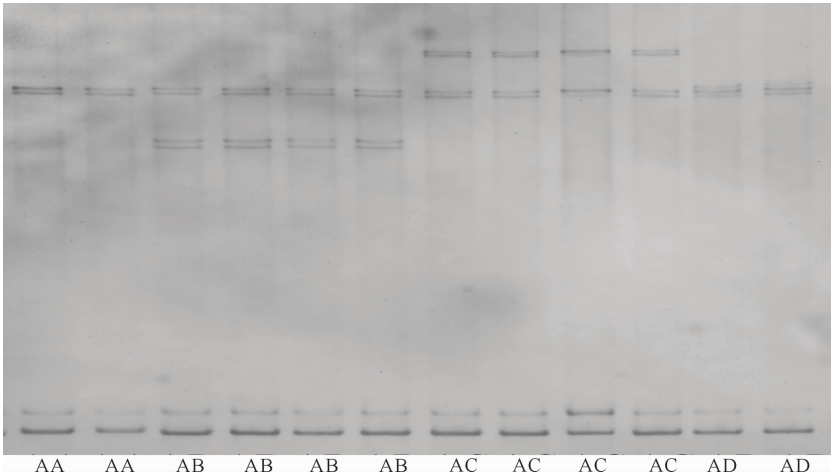


图 2 绵羊 *KRTAP20-1* 基因的 PCR-SSCP 检测结果
Fig. 2 PCR-SSCP of ovine *KRTAP20-1* gene

序列比对发现 3 个绵羊群体 *KRTAP20-1* 基因存在 4 个 SNPs 位点,均位于编码区,且 4 个 SNPs 位点均为转换位点,其中 G/A 转换最多,共有 3 处(c. 28G/A、c. 153G/A 和 c. 181A/G),A/T 转换有 1 处(c. 86A/T)。c. 28G/A、c. 86A/T 和

c. 181A/G 为非同义突变,分别导致甘氨酸转变为丝氨酸(P. Gly10Ser)、酪氨酸转变为苯丙氨酸(P. Tyr29Phe)和丝氨酸转变为甘氨酸(P. Ser61Gly); c. 153G/A 为同义突变(表 3)。

表 3 绵羊 *KRTAP20-1* 基因的 SNPs
Table 3 SNPs of *KRTAP20-1* gene in sheep

SNPs	等位基因 Allele				氨基酸变化 Aminoacid change
	A	B	C	D	
c. 28G/A	G	G	A	G	P. Gly10Ser
c. 86A/T	A	A	A	T	P. Tyr29Phe
c. 153G/A	G	A	G	G	—
c. 181A/G	A	A	A	G	P. Ser61Gly

注:“—”代表氨基酸未发生变化。
Note:“—” stands for no amino acid change.

由表 4 可以看出,等位基因 A 在 3 个绵羊群体中均为优势等位基因,其余 3 个等位基因在不同绵羊群体中分布差异较大。甘肃高山细毛羊基因型 AC 和 AD 频率最低,青海半细毛羊和藏绵羊中基

因型 AB 和 AC 频率最低。在 3 个群体中,甘肃高山细毛羊 *KRTAP20-1* 基因的遗传杂合度(*He*)、有效等位基因数(*Ne*)和多态信息含量(PIC)均最大,3 个群体的 PIC 值均小于 0.25,呈低度多态。

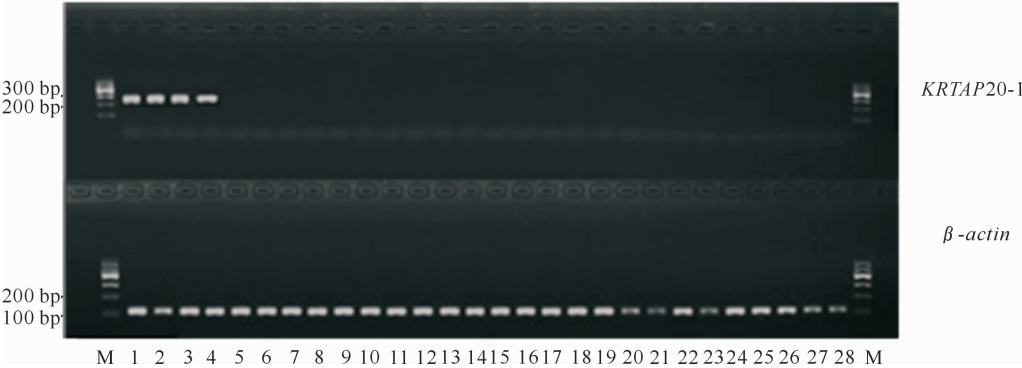
表 4 3 个绵羊品种 *KRTAP20-1* 基因的遗传多态性分析
Table 4 Genetic polymorphism of *KRTAP20-1* gene in three sheep breeds

品种 Breed	群体数量 Population number	基因型频率/% Genotypic frequency				等位基因频率/% Allelic frequency				遗传多态性 Genetic polymorphism				χ^2 值 χ^2 value
		AA	AB	AC	AD	A	B	C	D	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	PIC	
甘肃高山细毛羊 Gansu Alpine Merino	190	78.42	14.74	3.16	3.68	89.21	7.37	1.58	1.84	1.25	0.78	0.22	0.19	0.84
青海半细毛羊 Qinghai Semi-fine-wool sheep	107	81.31	3.74	6.54	8.41	90.65	1.87	3.27	4.21	1.21	0.81	0.19	0.17	0.98
藏绵羊 Tibetan sheep	181	83.42	5.52	1.66	11.05	91.03	2.72	0.82	5.43	1.20	0.82	0.17	0.16	0.94

2.2 *KRTAP20-1* 基因在绵羊不同组织的相对表达
利用 qRT-PCR 对甘肃高山细毛羊和小尾寒羊

的 *KRTAP20-1* 基因在心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、背最长肌和皮肤组织中的表达情况进行定量分析。结果(图 3)表明,*KRTAP20-1* 只在 2 种绵羊

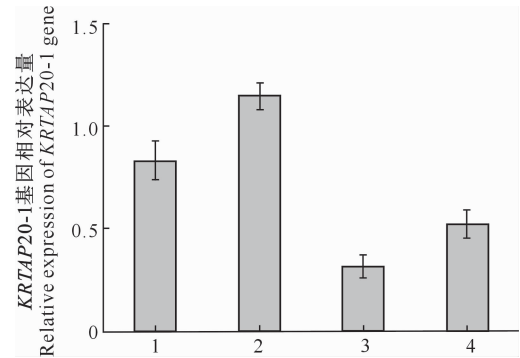
的皮肤组织中表达,且在不同品种和年龄段的表达量存在差异,其相对表达量见图 4。



1,5,9,13,17,21,25 分别为小尾寒羊羔羊的心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、背最长肌和皮肤组织;
2,6,10,14,18,22,26 分别为小尾寒羊母羊的心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、背最长肌和皮肤组织;
3,7,11,15,19,23,27 分别为甘肃高山细毛羊羔羊的心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、背最长肌和皮肤组织;
4,8,12,16,20,24,28 分别为甘肃高山细毛羊母羊的心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、背最长肌和皮肤组织
1,5,9,13,17,21,25;Small-tailed Han sheep lamb heart,liver,kidney,spleen,lung,longissimus dorsi,and cutis;
2,6,10,14,18,22,26;Small-tailed Han sheep ewe heart,liver,kidney,spleen,lung,longissimus dorsi,and cutis;
3,7,11,15,19,23,27;Gansu Alpine Merino lamb heart,liver,kidney,spleen,lung,longissimus dorsi,and cutis;
4,8,12,16,20,24,28;Gansu Alpine Merino ewe heart,liver,kidney,spleen,lung,longissimus dorsi,and cutis

图 3 KRTAP20-1 基因在绵羊不同组织中表达量的 qRT-PCR 结果

Fig. 3 qRT-PCR electrophoresis pattern of KRTAP20-1 gene in different tissues in sheep



1. 小尾寒羊成年母羊;2. 小尾寒羊羔羊;
3. 甘肃高山细毛羊成年母羊;4. 甘肃高山细毛羊羔羊
1. Small-tailed Han sheep ewe;2. Small-tailed Han sheep lamb;
3. Gansu Alpine Merino ewe;4. Gansu Alpine Merino lamb

图 4 KRTAP20-1 基因在甘肃高山细毛羊和小尾寒羊皮肤组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of KRTAP20-1 gene in skin tissue of Gansu Alpine Merino and small-tailed Han sheep

由图 4 可以看出,KRTAP20-1 基因在小尾寒羊皮肤中的相对表达量高于甘肃高山细毛羊,在 2 个群体羔羊皮肤中的相对表达量均高于其成年母羊,且小尾寒羊羔羊中的相对表达量是其成年母羊的 1.35 倍,甘肃高山细毛羊羔羊是其成年母羊的 1.65 倍.KRTAP20-1 基因在相同年龄不同群体中的表达量也存在差异,在小尾寒羊羔羊中的相对表达量是甘肃高山细毛羊羔羊的 2.16 倍,而在成年母羊群体中是 2.63 倍。

3 讨论

本研究结果表明,绵羊 KRTAP20-1 基因编码序列中检测到 4 个 SNPs,非同义突变中存在甘氨酸转变为丝氨酸(P. Gly10Ser)、络氨酸转变为苯丙氨酸(P. Tyr29Phe)和丝氨酸转变为甘氨酸(P. Ser61Gly),其中 2 个 SNPs 导致甘氨酸和丝氨酸含量的变化,这可能会改变蛋白质结构进而引起表型性状的改变。甘氨酸可能影响蛋白质的二级结构,主要是破坏多肽链中 α 螺旋的结构,甘氨酸也被称为“螺旋破坏剂”^[24]。因此,甘氨酸的存在导致 HGT-KAPs 结构更加灵活,从而更好地形成一个紧凑的蛋白质结构。丝氨酸残基会被磷酸化,这也会影响蛋白质纤维的结构和相互作用^[25]。

本研究发现,绵羊 KRTAP20-1 基因在甘肃高山细毛羊、青海半细毛羊和藏绵羊 3 个不同毛用绵羊群体中等位基因分布不同。Li 等^[26]报道绵羊 KRTAP26-1 基因 B、C 和 D 等位基因频率在美利奴羊杂种羊和新西兰罗姆尼羊 2 个不同毛用群体中存在差异,且基因分布特征和该基因影响的性状与 2 个群体绵羊的羊毛表型性状特征相吻合。等位基因在不同类型毛用绵羊中的分布差异表明该基因在不同群体中受到的选择压不同,提示该基因与毛用性状的选育相关。

本研究荧光定量结果显示,KRTAP20-1 基因

只在甘肃高山细毛羊和小尾寒羊皮肤组织中表达,而在其他组织中均无表达,这与 Gong 等^[7]得出的 *KRTAPs* 基因具有组织特异性表达特征的结论一致。*KRTAP20-1* 基因在小尾寒羊皮肤中的表达量高于甘肃高山细毛羊,且 2 个绵羊群体羔羊皮肤中 *KRTAP20-1* 表达量均高于母羊,进一步证实该家族基因的表达具有时空性^[7]。研究表明 *KRTAP* 基因在毛囊分化阶段的角质化细胞中起作用,对羊毛形成具有至关重要的影响^[27]。考虑到甘肃高山细毛羊和小尾寒羊分别为细毛羊和粗毛羊,*KRTAP20-1* 的表达量不同,提示该基因在羊毛发育中的重要作用。

4 结 论

KRTAP20-1 基因在不同绵羊群体中的分布存在差异,同时该基因的相对表达量在不同类型毛用羊品种间存在差异,且表现出时空特异性。说明 *KRTAP20-1* 基因对羊毛相关性状的形成和表型均有影响。

[参考文献]

- [1] 佟 昀. 纺织英语 [M]. 北京:中国纺织出版社,2014.
Tong Y. Textile English [M]. Beijing: Chinese Textile & Apparel Press, 2014.
- [2] 李少斌. 世界羊毛业现状和发展趋势 [J]. 养殖与饲料, 2018 (11): 5-8.
Li S B. Current situation and development trend of wool industry in the world [J]. Animals Breeding and Feed, 2018(11): 5-8.
- [3] 张 莹, 肖海峰. 我国羊毛羊绒加工业发展现状及趋势分析 [J]. 农业经济与管理, 2014(2): 89-96.
Zhang Y, Xiao H F. Analysis on development condition and trend of wool and cashmere process in China [J]. Management of Agricultural Economy, 2014(2): 89-96.
- [4] 李少斌. 绵羊角蛋白关联蛋白家族基因新成员鉴定及其与羊毛性状的相关性分析 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
Li S B. Identification of new ovine *KRTAP* family genes and their effect on wool traits [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
- [5] Zhou H, Gong H, Yan W, et al. Identification and sequence analysis of the keratin-associated protein 24-1 (*KAP24-1*) gene homologue in sheep [J]. Gene, 2012, 511(1): 62-65.
- [6] Rogers M A, Langbein L, Praetzel-Wunder S, et al. Human hair keratin-associated proteins (*KAPs*) [J]. International Review of Cytology, 2006, 251(3): 209-263.
- [7] Gong H, Zhou H, Forrest R H, et al. Wool keratin-associated protein genes in sheep-a review [J]. Genes, 2016, 7(6): 24.
- [8] Wang J, Che L, Hickford J G, et al. A keratin-associated protein (*KAP*) gene that is associated with variation in Cashmere goat fleece weight [J]. Small Ruminant Research, 2018, 8: 19.
- [9] Matsunaga R, Abe R, Ishii D, et al. Bidirectional binding property of high glycine-tyrosine keratin-associated protein contributes to the mechanical strength and shape of hair [J]. Journal of Structural Biology, 2013, 183(3): 484-494.
- [10] Bai L, Gong H, Zhou H, et al. A nucleotide substitution in the ovine *KAP20-2* gene leads to a premature stop codon that affects wool fibre curvature [J]. Animal Genetics, 2018, 49(4): 357.
- [11] 朱建勋, 王继卿, 胡 江, 等. 五个绵羊群体 *KAP11-1* 基因核苷酸序列变异分析 [J]. 华北农学报, 2016, 31(5): 101-107.
Zhu J X, Wang J Q, Hu J, et al. Nucleotide sequence variations of *KAP11-1* gene in 5 Chinese sheep populations [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2016, 31(5): 101-107.
- [12] Purvis I W, Franklin I R. Major genes and QTL influencing wool production and quality: a review [J]. Genetics Selection Evolution, 2005, 37(1): 97-107.
- [13] 艾买提·买买提. 5 个 *KAP* 基因在中国美利奴羊(新疆型)群体中的多态性及其与毛性状关联性分析 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013.
Ai M T · M M T. Genetic polymorphism of five *KAP* gene and their associations with wool quality traits in Chinese merino sheep (Xinjiang type) group [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2013.
- [14] Li S, Zhou H, Gong H, et al. Variation in the ovine *KAP6-3* gene (*KRTAP6-3*) is associated with variation in mean fibre diameter-associated wool traits [J]. Genes, 2017, 8(8): 204.
- [15] 孙福亮, 曹 阳, 鲁 承, 等. 新吉细毛羊 *KAP13-1* 基因多态性及其对部分经济性性状的影响 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34 (12): 2022-2026.
Sun F L, Cao Y, Lu C, et al. Polymorphism of *KAP13. 1* gene and its effect on partial economic traits in Xinji fine wool sheep [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34 (12): 2022-2026.
- [16] Wang J, Che L, Hickford J G H, et al. Identification of the caprine keratin-associated protein 20-2 (*KAP20-2*) gene and its effect on cashmere traits [J]. Genes, 2017, 8(11): 328.
- [17] Li S, Zhou H, Gong H, et al. Identification of the ovine keratin-associated protein 22-1 (*KAP22-1*) gene and its effect on wool traits [J]. Genes, 2017, 8(1): 27.
- [18] Rogers M A, Langbein L, Winter H, et al. Characterization of a first domain of human high glycine-tyrosine and high sulfur keratin-associated protein (*KAP*) genes on chromosome 21q22. 1 [J]. Biol Chem, 2002, 277(50): 48993-49002.
- [19] Shimomura Y, Ito M. Human hair keratin-associated proteins [J]. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 2005, 10(3): 230-233.
- [20] Kanai N, Fujii T, Saito K, et al. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood [J]. Journal of Clinical Pathology, 1994, 47(11): 1043-1044.

[21] 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.

[22] Gong H,Zhou H,Hickford J G. Diversity of the glycine/tyrosine-rich keratin-associated protein 6 gene (KAP6) family in sheep [J]. Molecular Biology Reports,2011,38(1):31.

[23] Livak K J,Schmittgen,T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods,2001,25(4):402-408.

[24] Monne M,Nilsson I,Elofsson A,et al. Turns in transmembrane helices;determination of the minimal length of a “helical hairpin” and derivation of a fine-grained turn propensity scale [J]. Mol Biol,1999,293:807-814.

[25] 车陇杰,王继卿,李 涛,等. 山羊 *KRTAP26-1* 基因鉴定及其遗传特征研究 [J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(2):710-717.

[26] Che L J, Wang J Q, Li T, et al. Identification of caprine *KRTAP26-1* gene and its genes characteristics study [J]. Genomics and Applied Biology,2018,37(2):710-717.

[27] Li S,Zhou H,Gong H,et al. Identification of the ovine keratin-associated protein 26-1 gene and its association with variation in wool traits [J]. Genes,2017,8(9):225.

[28] 李正娟,李爱华,张 蕊,等. 滩羊 *KAP1. 1* 基因在胚胎及二毛期毛囊中的表达分析 [J]. 农业科学研究,2013,34(2):21-25.

[29] Li Z J,Li A H,Zhang R,et al. Expression of *KAP1. 1* gene in embryo stages and lamb hair follicle in Tan Sheep (*Ovis aries*) [J]. Journal of Agricultural Sciences,2013,34(2):21-25.

(上接第 18 页)

[20] Elseed A,Abusamra R M A. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on NDF digestibility and rumen ferfermentation of forage sorghum hay in Nubian goat’s kids [J]. Journal of Dairy Science,2007,3(3):133-137.

[21] 张永根,李春雷,王艳菲,等. 奶牛常用饲料干物质和蛋白质瘤胃降解特性及小肠消化率研究 [J]. 东北农业大学学报,2013,44(9):1-6.

[22] Zhang Y G,Li C L,Wang Y F,et al. Degradation characteristics and intestinal digestibility of common feed dry matter and protein in cows [J]. Journal of Northeast Agricultural University,2013,44(9):1-6.

[23] Paryad A,Rashidi M. Effect of yeast(*Saccharomyces cerevisiae*)off apparent digestibility and nitrogen retention of tomato pomace in sheep [J]. Pakistan Journal of Nutrition,2009,8(3):273-278.

[24] Yoon I K,Stern M D. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *asper gillusoryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows [J]. Journal of Dairy Science,1996,79(3):411-417.