

山羊 *Wnt5A* 基因序列变异及其组织表达特征

李少斌 张瑞国 何兆华 赵鹏飞 赵芳芳 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, 兰州 730070

*通讯作者, luoyz@gsau.edu.cn

摘要 羊绒的质量和产量决定着绒山羊(*Capra hircus*)的经济价值,而毛囊是调控羊绒生长和性状的直接组织,通过调控毛囊发育可实现羊绒性状的改良。无翅型鼠乳腺肿瘤病毒整合位点家族成员5A(wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 5A, *Wnt5A*)基因是毛囊发育信号通路中的关键因子,在毛囊的发育过程中起着关键作用,但其在山羊中的研究还非常有限。为全面掌握山羊 *Wnt5A* 的分子遗传特征,本研究利用 PCR-单链构象多态性(PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)结合测序,检测分析该基因在中卫山羊、柴达木绒山羊和陇东绒山羊群体中的变异特征;利用 qPCR 技术,分析 *Wnt5A* 在辽宁绒山羊和陇东绒山羊组织表达特征。结果显示:在陇东绒山羊、柴达木绒山羊和中卫山羊群体中, *Wnt5A* 的 exon 4 扩增区存在 2 个突变位点,分别为 c.334C>A 和 c.213A>G,形成 A、B 和 C 3 个等位基因并表现为 AA、AB、AC、BB 和 BC 5 种基因型。A 和 AB 分别为柴达木绒山羊和陇东绒山羊中的优势等位基因和优势基因型,而中卫山羊中分别为 B 和 BB。在该基因 exon 6 扩增区检测到由 D 和 E 2 个等位基因构成的 DD、DE 和 EE 3 种基因型,序列比对发现 c.685-5C>T 和 c.685-55G>A 2 个 SNPs。3 个群体中 E 均为优势等位基因,DE 均为优势基因型。2 个扩增区构成 H1~H6 6 种单倍型,其中频率最高的为 H2。 *Wnt5A* 基因在辽宁绒山羊和陇东绒山羊的 7 种组织中均表达,品种间具有差异性,同时在皮肤中的表达差异显著,推测是由于 *Wnt5A* 基因的表达与羊绒性状相关造成的。该研究通过比较不同品种山羊 *Wnt5A* 基因的变异和表达特征,分析了该基因的分子遗传特征,为丰富山羊基因组内容及该基因的开发利用提供了基础资料。

关键词 *Wnt5A*; 绒山羊; 序列变异; 特异性表达

中图分类号 S826 文献标识码 A

Sequence Variation and Tissue Expression Characteristics of *Wnt5A* Gene in Goat (*Capra hircus*)

LI Shao-Bin ZHANG Rui-Guo HE Zhao-Hua ZHAO Peng-Fei ZHAO Fang-Fang WANG Ji-Qing
LIU Xiu HU Jiang LUO Yu-Zhu*

College of Animal Science and Technology/Gansu Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

* Corresponding author, luoyz@gsau.edu.cn

Abstract The quality and yield of cashmere determine the economic value of cashmere goats (*Capra hircus*), and hair follicle is the direct tissue to regulate the growth and properties of cashmere. The properties of cashmere can be improved by regulating the development of hair follicle. Wingless-type mouse mammary

基金项目:国家自然科学基金(32060140);甘肃省杰出青年基金(21JR7RA857);甘肃农业大学伏羲青年英才项目(Gaufx-03Y04);甘肃省草食动物生物技术重点实验室开放课题(GKLAB-201702)

收稿日期:2021-07-07 接受日期:2021-08-21

tumor virus integration site family, member 5A (*Wnt5A*) gene is an key member in the signaling pathway relates with hair follicle development and play a key role in hair follicle development, but its research in goat is still very limited. In order to well know the molecular genetic characteristics of goat *Wnt5A*, the variation of this gene was detected by combining PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and sequencing in Zhongwei goats, Chaidamu Cashmere goats and Longdong Cashmere goats. The tissue expression characteristics of *Wnt5a* in Liaoning Cashmere goats and Longdong Cashmere goats were analyzed by qPCR. The results showed that, in the 3 populations, there were 2 mutation sites in the *Wnt5A* exon 4 amplification region, which were c.334c>A and c.213a>G, respectively. Three alleles (A, B and C) were formed and showed five genotypes (AA, AB, AC, BB and BC). In Chaidamu cashmere goat and Longdong cashmere goat, A was the dominant allele, AB was the dominant genotype, while B in Zhongwei goat was the dominant allele and BB was the dominant genotype. Two mutation sites c.685-5 C > T and c.685-55 G>A were detected in *Wnt5A* exon 6, forming 2 alleles D and E, forming 3 genotypes DD, DE and EE. E was the dominant allele and DE was the dominant genotype in the 3 populations. Six haplotypes of H1~H6 were constituted by 2 amplified regions, and the most common one was H2. *Wnt5A* gene was expressed in all these 7 tissues of Liaoning Cashmere goat and Longdong Cashmere goat, with differences between breeds. At the same time, the expression difference in skin was significant, which speculated that resulted from the correlation between *Wnt5A* gene expression and the cashmere traits. By comparing the variation and expression characteristics of *Wnt5A* gene in different goat breeds, the molecular genetic characteristics of the gene were analyzed, which provided basic data for enriching the content of goat genome and the development and utilization of the gene.

Keywords *Wnt5A*; Cashmere goats; Sequence variation; Specific expression

羊绒的质量和产量决定着绒山羊 (*Capra hircus*) 的经济价值, 而毛囊是调控羊绒生长和性状的直接组织, 通过调控毛囊发育可实现羊绒性状的改良。无翅型鼠乳腺肿瘤病毒整合位点家族 (wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family, Wnt) 信号通路在毛囊发育过程中起关键调控作用。*Wnt5A* 是非经典 Wnt 信号通路 Wnt/Ca²⁺ 中的成员之一, 在山羊中 *Wnt5A* 基因被定位在 22 号染色体上, 全长 19 640 bp, 由 6 个外显子对应编码氨基酸 381 个。*Wnt5A* 蛋白序列中有一段疏水信号肽富含半胱氨酸 (cysteine), 其中有一半存在于该蛋白的羧基端 (韩姝等, 2005), 另外存在一个位点在该蛋白与 Frizzled 受体结合过程中有重要作用 (Kurayoshi et al., 2006)。*Wnt5A* 是 Wnt 家族中研究较多的蛋白, 在胚胎发育过程中, 其对多种组织正常形态的形成起着关键性作用 (Miyoshi et al., 2012; Cha et al., 2014)。对鸡 (*Gallus gallus*) 的研究表明, *Wnt5A* 有助于 Wnt 信号通路调控胚胎干细胞分化为精原干细胞 (He et al., 2017)。*Wnt5A* 信号失调会引发生出生缺陷, 且与成年人的动脉粥样硬化的炎症疾病和癌症转移等多种疾病有关 (Sus-

man et al., 2017)。沉默 *Wnt5A* 可抑制牙髓干细胞矿化结节的形成, 而过表达能显著地促进其形成 (柳鑫等, 2018)。*Wnt* 家族基因也与毛囊生长发育紧密相关。有多种经典 Wnt 家族基因和 *Wnt5A* 等非经典 Wnt 家族基因在毛囊中表达 (Reddy et al., 2001)。*Wnt5A* 可抑制毛发的生长, 为毛囊生长周期中的动态调控因子 (Xing et al., 2011), 可通过非经典途径拮抗 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制小鼠 (*Mus musculus*) 毛囊的生长发育 (Gilbert et al., 2003)。

Wnt5A 基因在毛发生长过程中有着关键性的调控作用, 目前其研究大多在人类 (*Homo sapiens*) 疾病方面, 有关山羊绒毛生长发育方面的研究还很少。柴达木绒山羊、陇东绒山羊和中卫山羊是甘青宁地区饲养的 3 个主要山羊品种, 其中前 2 个为绒用品种, 第 3 个为裘皮用羊。为全面掌握山羊 *Wnt5A* 的分子遗传特征, 本研究分析了 *Wnt5A* 基因在中卫山羊、柴达木绒山羊和陇东绒山羊群体中的单核苷酸多态性情况, 进而分析了其在辽宁绒山羊和陇东绒山羊中的组织表达特征, 以期山羊分子改良提供基础数据。

1 材料与amp;方法

1.1 血样和组织样的采集

本研究采集了3个绒山羊群体的453份血样(详见表1)。采血部位为颈静脉,抗凝剂采用肝素钠(Heparin sodium)。在甘肃省庆阳市某养殖场选择2岁且毛囊处于生长期的陇东绒山羊和辽宁绒山羊公羊各3只,采集皮肤、后腿骨骼肌、心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏等7个部位的组织样品,-80℃保存备用。

1.2 DNA和总RNA的提取

山羊血液样品的全基因组DNA的提取采用EasyPure®Blood Genomic DNA Kit试剂盒(全式金,北京)。山羊组织中总RNA提取采用Trizol法,之后用反转录试剂盒HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(诺唯赞,南京)将mRNA反转录为cDNA。

1.3 引物设计

根据dbSNP(single nucleotide polymorphism database)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)预测,结合已有报道筛查山羊*Wnt5A*基因可能具有多态性的外显子为exon 4和exon 6。利用软件

Primer Premier 5.0设计扩增山羊*Wnt5A*基因exon 4和exon 6的引物P1和P2,以及qPCR的引物P3,内参基因选用β-actin,引物特异性用BLAST检测。引物由北京华大基因生物工程有限公司合成,详细信息见表2。

1.4 PCR扩增

PCR扩增体系(20 μL):浓度为0.25 μmol/L的上、下游引物各0.8 μL,100 ng/μL的基因组DNA 0.8 μL, Taq DNA 预混酶(诺唯赞,南京) 10 μL, ddH₂O 7.6 μL。反应条件:94℃下预变性5 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环;最后72℃延伸10 min。用1%的琼脂糖凝胶进行电泳,检测扩增效果。

1.5 qPCR扩增

qPCR反应体系为20 μL,具体如下:10.0 μL AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix(诺唯赞,南京),上、下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL,cDNA 2 μL, ddH₂O 7.2 μL。反应条件:95℃预变性5 min;95℃10 s,62℃30 s,40个循环;溶解曲线:95℃15 s,62℃30 s,95℃15 s。每种组织设3个生物学重复和3个技术重复,内参基因选用β-actin。

表1 山羊群体的采样信息

Table 1 Sample information of goat population

品种	数量/只	采集地区
Breed	Number	Area
陇东绒山羊 Longdong Cashmere goat	293	甘肃环县 Huan County, Gansu
柴达木绒山羊 Chaidamu Cashmere goat	110	青海漠河清牧场 Qinghai Moheqing Ranch
中卫山羊 Zhongwei goat	50	甘肃景泰 Jingtai, Gansu

表2 基因引物序列信息

Table 2 Sequence information of gene primers

基因	引物	引物序列(5'~3')	T _m /°C	扩增片段长度/bp	用途
Gene	Primer	Primer sequence		Amplified fragment length	Purpose
<i>Wnt5A</i>	P1	F: GGCCACCTTGAGAGTTCA R: CCTACCGATCTGCATGACCC	60	311	扩增 exon 4 Amplification of exon 4
	P2	F: CACAAAAGGCTCCAGGTCTG R: GAGTTGAAGCGCTGTTGAC	62	310	扩增 exon 6 Amplification of exon 6
	P3	F: GCTAATCTTGGTGGTCGCT R: TGGTCCTGATACAAGTGGA	63	140	qPCR
<i>β-actin</i>	P4	F: ACTACAGCAACTACTACGGTG R: GGACAGCACCGTGTGGCGTAGA	60	113	内参基因 Reference gene

Wnt5A:无翅型鼠乳腺肿瘤病毒整合位点家族5A;下同

Wnt5A:Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 5A; The same below

1.6 单链构象多态性(SSCP)检测和测序

在PCR产物中加入由98%去0.025%二甲苯氰、0.025%溴酚蓝、离子甲酰胺和10 mmol/L EDTA组成的变性上样缓冲液,混合比列为1:4,取混合液10 μ L,在105 $^{\circ}$ C变性5 min后,立即冰浴,并上样于14%的非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺(acrylamide):亚甲基双丙烯酰胺(bisacrylamide)=37.5:1)中,设置电泳条件为240 V,25 $^{\circ}$ C,0.5 \times TBE,19 h。最后对凝胶进行银染(Byun et al., 2009)并判型。纯合子对应的PCR产物直接测序,判型为杂合子的条带进行切胶测序(Gong et al., 2011)(天润奥科,杨凌)。

1.7 数据统计与分析

Wnt5A 等位基因的氨基酸或核苷酸序列比对采用DNAMAN8.0。利用Popgene32统计并计算*Wnt5A*基因SNPs的遗传杂合度(*He*)、等位基因频率、遗传纯合度(*Ho*)、基因型频率、多态性信息含量(*PIC*)和有效等位基因数(*Ne*)。用卡方检验检测Hardy-Weinberg平衡;单倍型分析用SHEsis网站(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)在线进行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法以皮肤组织为参照计算*Wnt5A*在陇东绒山羊和辽宁绒山羊各组织中的相对表达量。用SPSS 21.0对实验数据进行*T*检验。

2 结果与分析

2.1 山羊 *Wnt5A* 基因的变异分析

2.1.1 *Wnt5A* 基因的PCR扩增

Wnt5A 的 exon 4 和 exon 6 对应扩增产物大小

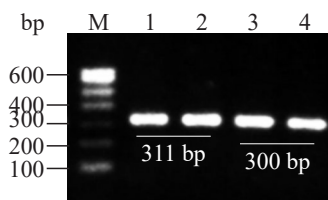


图1 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 区琼脂糖凝胶电泳检测结果

Figure 1 The results of agarose gel electrophoresis in the exon 4 and exon 6 regions of goat *Wnt5A* gene

M: DNA 分子量标准 Marker B (100~600 bp); 1~2: *Wnt5A* 基因 exon 4 区的扩增产物; 3~4: *Wnt5A* 基因 exon 6 区的扩增产物

M: DNA Marker B (100~600 bp); 1~2: Amplified products of *Wnt5A* gene exon 4; 3~4: Amplified products of *Wnt5A* gene exon 6

分别为311和300 bp,符合预期大小,琼脂糖凝胶电泳结果显示其条带清晰,且无杂带(图1)。

2.1.2 山羊 *Wnt5A* 基因 SSCP 检测结果

在山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 扩增区检测到5种带型,分别由A、B和C 3种等位基因构成AC、BC、AB、AA(图2)。在 exon 6 扩增区检测到3种带型,由D和E 2种等位基因构成DD、DE和EE 3种基因型(图3)。

2.1.3 山羊 *Wnt5A* 基因等位基因序列比对

对山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 扩增区的A、B和C 3个等位基因进行核苷酸序列比对,发现了c.213A>G和c.334A>C 2处突变(图4),氨基酸序列比对发现这2个突变都属于同义突变,没有引起氨基酸的改变;对 exon 6 扩增区的D和E 2个等位基因进行序列比对,发现了c.685-55G>A和c.685-5C>T 2处突变(图5),且都位于同时扩增的部分intron 5区。

2.1.4 山羊 *Wnt5A* 基因遗传学分析

山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 区的等位基因频率和基因型频率分别见表3和表4。在 exon 4 区,A和AB分别为柴达木绒山羊和陇东绒山羊中

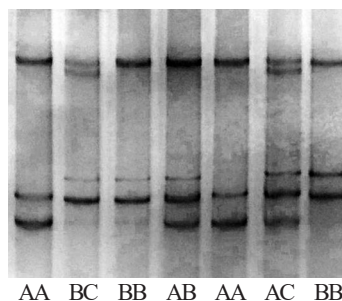


图2 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 区 SSCP 检测结果

Figure 2 SSCP detection results of the exon 4 region of goat *Wnt5A* gene

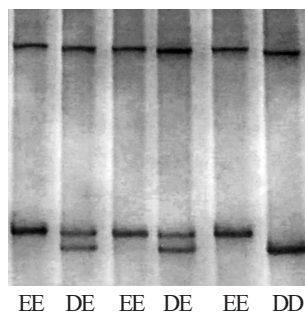


图3 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 6 区 SSCP 检测结果

Figure 3 SSCP detection results of the exon 6 region of goat *Wnt5A* gene

的优势等位基因和优势基因型,而中卫山羊中分别为B和BB。在 exon 6 区,等位基因E和基因型DE是3个山羊群体的优势等位基因和优势基因型。

山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 区的遗传学参数见表5和表6,2个外显子区在3个山羊群体中均表现为中度多态($0.25 \leq PIC \leq 0.5$)。哈代温伯格平衡检验结果表明(表5,表6),在陇东绒山羊和中卫山羊中,2个外显子区均处于哈代温伯格平衡状态($P > 0.05$),而在柴达木绒山羊中,均偏离哈代温伯

格状态($P < 0.05$)。

2.1.5 山羊 *Wnt5A* 基因的单倍型分析

山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 区4个突变位点的连锁不平衡分析结果见表7。其中位点 c.685-55G>A 和 c.685-5C>T 的 D' 为 1.000, r^2 远大于 0.33, 说明其处于完全连锁不平衡状态。位点 c.334C>A 和 c.213A>G 处于强连锁平衡状态($D' = 0.953, r^2 = 0.066$); 其他 SNPs 之间都处于连锁平衡状态($D' < 0.8, r^2 < 0.33$)。山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 与 exon 6 区

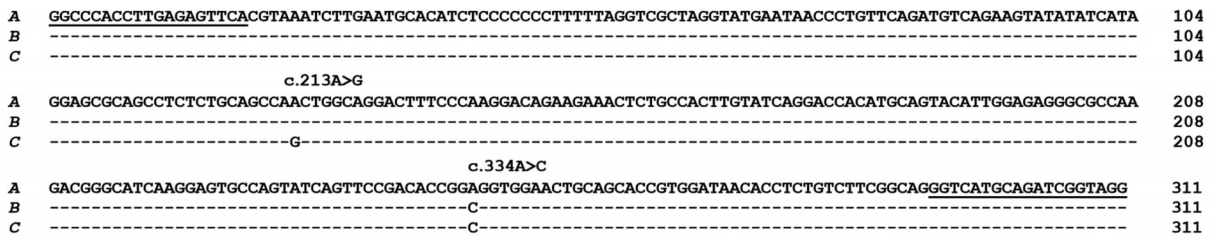


图4 山羊 *Wnt5A* 基因 A、B 和 C 等位基因的序列比对

Figure 4 Sequence alignment of A, B and C alleles of goat *Wnt5A* gene

下划线处表示引物序列;下同

The underlined areas indicate the design area of primers; The same below

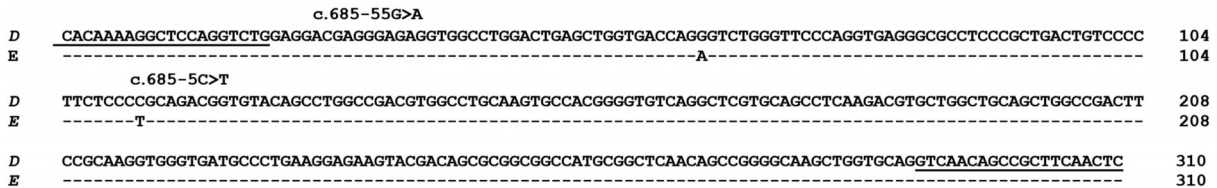


图5 山羊 *Wnt5A* 基因 D 和 E 等位基因的序列比对

Figure 5 Sequence alignment of D and E alleles of goat *Wnt5A* gene

表3 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 区的等位基因频率和基因型频率

Table 3 Allele frequency and genotype frequency of goat *Wnt5A* gene exon 4

品种 Breed	数量/只 Number	等位基因频率 Allelic frequency			基因型频率 Genotype frequency				
		A	B	C	AA	AB	AC	BB	BC
陇东绒山羊 Longdong Cashmere goat	293	0.5307	0.4113	0.0580	0.2833	0.4198	0.0751	0.1809	0.0409
柴达木绒山羊 Chaidamu Cashmere goat	110	0.5364	0.4182	0.0454	0.1818	0.6364	0.0727	0.0909	0.0182
中卫山羊 Zhongwei goat	50	0.2900	0.6900	0.0200	0.0600	0.4400	0.0200	0.4600	0.0200

表4 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 6 区的等位基因频率和基因型频率

Table 4 Allele frequency and genotype frequency of goat *Wnt5A* gene exon 6

品种 Breed	数量/只 Number	等位基因频率 Allelic frequency		基因型频率 Genotype frequency		
		D	E	DD	DE	EE
陇东绒山羊 Longdong Cashmere goat	293	0.4693	0.5307	0.2321	0.4744	0.2935
柴达木绒山羊 Chaidamu Cashmere goat	110	0.4000	0.6000	0.0909	0.6182	0.2909
中卫山羊 Zhongwei goat	50	0.3000	0.7000	0.0600	0.4800	0.4600

4个突变位点的单倍型分析结果见表8,共构成了6种单倍型,其中单倍型H2和H6的频率分别为最高(0.317)和最低(0.011)。

2.2 山羊 *Wnt5A* 基因组织表达特异性分析

Wnt5A 基因在陇东绒山羊与辽宁绒山羊的7种组织中均有不同程度的表达(图6)。在辽宁绒山羊各组织中,表达量由低到高依次为肺、脾、心、皮肤、肾、骨骼肌、肝;在陇东绒山羊中,表达量由低到高

依次为脾、皮肤、肺、肾、骨骼肌、心、肝;*Wnt5A* 基因在辽宁绒山羊在皮肤中的表达量显著地低于陇东绒山羊($P < 0.05$),且其肺、脾、心中的表达量极显著地低于陇东绒山羊($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究首次分析了山羊 *Wnt5A* 基因的变异和表达特征。在山羊 *Wnt5A* 的 exon 4 和 exon 6 扩增

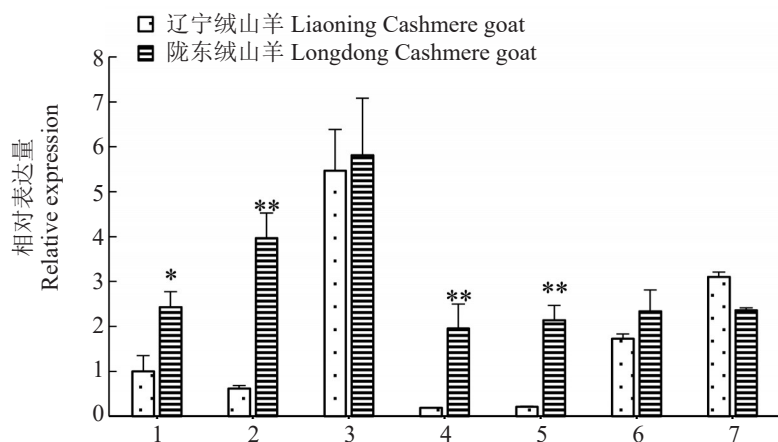


图6 *Wnt5A* 基因在2个山羊品种的不同组织中的表达分析

Figure 6 mRNA expression of *Wnt5A* gene in different tissues of two goat breeds

1: 皮肤; 2: 心脏; 3: 肝脏; 4: 脾脏; 5: 肺脏; 6: 肾脏; 7: 骨骼肌; *: 在不同品种山羊的相同组织间差异显著($P < 0.05$); **: 表示在不同品种山羊的相同组织间差异极显著($P < 0.01$); 内参基因: β -actin; n=3

1: Skin; 2: Heart; 3: Liver; 4: Spleen; 5: Lung; 6: Kidney; 7: Skeletal muscle; *: Significant difference between the same tissues of different breeds of goats ($P < 0.05$); **: Extremely significant difference between the same tissues of different breeds of goats ($P < 0.01$); Reference gene: β -actin; n=3

表5 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 区的遗传参数及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 5 Genetic parameters and Hardy-Weinberg equilibrium test of goat *Wnt5A* gene exon4

品种 Breed	遗传参数 Genetic parameters				卡方检测 χ^2 test
	有效等位基因数 N_e	纯合度 H_o	杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	
	陇东绒山羊 Longdong Cashmere goat	2.2018	0.4642	0.5358	
柴达木绒山羊 Chaidamu Cashmere goat	2.1523	0.2727	0.7273	0.4328	9.59 ($P=0.02$)
中卫山羊 Zhongwei goat	1.7838	0.5200	0.4800	0.3589	1.68 ($P=0.83$)

表6 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 6 区的遗传参数及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 6 Genetic parameters and Hardy-Weinberg equilibrium test of goat *Wnt5A* gene exon 6

品种 Breed	遗传参数 Genetic parameters				卡方检测 χ^2 test
	有效等位基因数 N_e	纯合度 H_o	杂合度 H_e	多态信息含量 PIC	
	陇东绒山羊 Longdong Cashmere goat	1.9925	0.5256	0.4744	
柴达木绒山羊 Chaidamu Cashmere goat	1.9231	0.3818	0.6182	0.3648	4.28 ($P=0.04$)
中卫山羊 Zhongwei goat	1.7241	0.5200	0.4800	0.3318	0.89 ($P=0.35$)

表7 山羊 *Wnt5A* 基因各突变位点之间的连锁不平衡分析Table 7 Linkage disequilibrium analysis of goat *Wnt5A* gene mutation sites

突变位点 Mutation site	c.334C>A	c.685-55G>A	c.685-5C>T
c.213A>G	$D'=0.953; r^2=0.066$	$D'=0.547; r^2=0.017$	$D'=0.547; r^2=0.017$
c.334C>A	-	$D'=0.313; r^2=0.074$	$D'=0.313; r^2=0.074$
c.685-55G>A	-	-	$D'=1.000; r^2=0.987$

表8 山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 区的单倍型及频率Table 8 Haplotypes and frequencies of the exon 4 and exon 6 regions of *Wnt5A* gene in goats

单倍型名称 Haplotype name	突变位点 Mutation site				频率 Frequency
	c.213A>G	c.334C>A	c.685-55G>A	c.685-5C>T	
H1	A	A	A	T	0.212
H2	A	A	G	C	0.317
H3	A	C	A	T	0.269
H4	A	C	G	C	0.140
H5	G	C	A	T	0.047
H6	G	C	G	C	0.011

区共检测到4个突变位点。exon 4 扩增区的2个突变位点都是同义突变。在 exon 6 扩增区检测到的2个突变位点都位于同时扩增的部分 intron 5 区。内含子虽然在蛋白质翻译过程不直接参与,但有可能影响 mRNA 的剪切和翻译效率和量,进而影响到蛋白质的合成量(张开慧, 2012)。第4外显子的2个变异位点处于强连锁不平衡状态,遗传时紧密连锁。位点 c.685-55G>A 与 c.334A>C 和 c.213>G 均处于连锁平衡状态,表明 *Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 扩增区的等位基因遗传时相互独立。

陇东绒山羊 *Wnt5A* 基因 exon 4 的等位基因和基因型频率分布与中卫山羊存在差异,但与柴达木绒山羊相似。陇东绒山羊和柴达木绒山羊的用途一致,而与中卫山羊不同,前两者为绒用山羊,后者是裘皮用羊。*Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 扩增区在3个山羊品种中的 PIC 都在 0.4 左右, H_e 都大于 0.45,说明该基因在3个山羊品种中具有较为丰富的多态性,选择潜力较大。*Wnt5A* 基因 exon 4 和 exon 6 扩增区在柴达木绒山羊中偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态,但中卫山羊和陇东绒山羊群体都处于哈温平衡状态。这可能是因为柴达木绒山羊的育成时间较晚,*Wnt5A* 基因由于人工干预正在受到选择,造成其基因频率偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态。有研究发现 *Wnt5A* 基因能抑制毛干生长和毛囊发育(李瑶, 2014),表明该基因有影响羊绒性状的潜力,在羊绒的生长和发育过程中起到一定作用。

本研究发现,*Wnt5A* 基因在山羊的皮肤、骨骼肌、心、肝、脾、肺和肾中均有不同程度的表达,说明该基因的表达具有广泛性,与对人的相关研究结果一致(秦月明, 梁文红, 2016)。*Wnt5A* 基因在辽宁绒山羊的皮肤、心、脾和肺中的表达量极显著或显著低于在陇东绒山羊中的表达量,说明该基因的表达具有品种特异性。而其在2个山羊品种肝脏中的表达量都是最高的,表明该基因在组织间的表达也具有特异性。这种品种间特异性和组织间特异性在绵羊中也有类似的结果(郝志云等, 2021)。*Wnt5A* 可以通过拮抗 β -catenin 途径来抑制小鼠毛囊的生长,避免毛发一直生长(星懿展, 2010),*Wnt5A* 高表达时抑制毛囊发育,当表达量降低时,次级毛囊的深度随之增加(李瑶等, 2014)。长毛兔 (*Oryctolagus curiculus*) 品种中 *Wnt5A* 的表达水平显著低于短毛兔品种(Zhao et al., 2018),而辽宁绒山羊的绒长大于陇东绒山羊,而其表达差异与兔的一致。可见,*Wnt5A* 基因在绒山羊皮肤中的表达程度与羊绒性状有一定的关联性。下一步,有必要对不同 *Wnt5A* 基因型和表达水平的绒山羊羊绒性状进行比较分析,进一步确定其生物学功能。

4 结论

本研究分析了 *Wnt5A* 基因在3个山羊群体中的序列变异和组织表达特征,在该基因的 exon 4 和 exon 6 扩增区各检测到2个 SNP 位点,构成6种单倍型,

其中 exon 4 的等位基因和基因型分布存在种间差异性,且该基因的表达也呈现出种间和组织间特异性,推断与毛绒性状相关。本研究分析了 *Wnt5A* 基因的变异和组织表达等分子遗传特征,为丰富山羊基因组内容及该基因的开发利用提供了基础资料。

参考文献

- 韩姝,师伟,裴雪涛. 2005. Wnt 基因对造血干细胞增殖、分化调控的研究进展[J]. 中华血液学杂志, (06): 379-381. (Han Z, Shi W, Pei X T. 2005. Research progress in the regulation of Wnt gene on the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells[J]. Chinese Journal of Hematology, (06): 379-381.)
- 郝志云,王继卿,罗玉柱,等. 2021. 绵羊 *WNT5A* 基因克隆及其组织表达分析[J]. 家畜生态学报, 42(02): 25-31. (Hao Z, Wang J, Luo Y, et al. 2021. Analysis of *WNT5A* gene cloning and tissue expression in sheep[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 42(02): 25-31.)
- 柳鑫,郭倩,肖燕,等. 2018. *Wnt5a* 对牙髓干细胞成骨/成牙本质向分化的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, (6): 311-320. (Liu X, Guo Q, Xiao Y, et al. 2018. Effect of *Wnt5a* on osteal/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells[J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, (6): 311-320.)
- 李瑶. 2014. *Wnt5A* 和 *FGF4* 基因对鹅毛囊及羽毛发育影响的研究[D]. 硕士学位论文,吉林农业大学,导师:高光. pp. 38-39. (Li Y. 2014. The research of *Wnt5a* and *FGF4* gene's mRNA expression in the goose feather follicles and feathers development[D]. Thesis for M.S., Jilin Agriculture University, Supervisor: Gao G, pp. 38-39.)
- 李瑶,孙远,鲍忠省,等. 2014. *Wnt5a* 基因在鹅皮肤中的定量定位表达特性[J]. 吉林农业大学学报, 36(04): 475-478, 493. (Li Y, Sun Y, BAO Z, et al. 2014 Characteristics of Quantitative and Positioning Expression of *Wnt5a* Gene in Goose Skin[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 36(04): 475-478, 493.)
- 秦月明,梁文红. 2016. Wnt 非经典通路中 *Wnt5a* 的研究现状[J]. 现代医药卫生, 32(05): 725-728. (Qin Y, Liang W. 2016. Research status of *Wnt5a* in Wnt non-canonical pathway[J]. Journal of Modern Medicine & Health, 032(005): 725-728.)
- 星懿展. 2010. *Wnt5A* 抑制毛囊生长的体外及体内实验研究[D]. 博士学位论文,第三军医大学,导师:杨恬, pp. 39-49. (Xing Y Z. 2010. A study of *Wnt5a* on inhibition of growth of hair follicles *in vitro* and *in vivo*[D]. Thesis for Ph.D., Third Military Medical University, Supervisor: Yang T, pp. 39-49.)
- 张开慧. 2012. 内含子的功能及应用[J]. 中国畜牧兽医, 39(7): 80-82. (Zhang K H. 2012. Function and Application of Intron[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 39(7): 80-82.)
- Byun S O, Fang Q, Zhou H, et al. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 385(1): 174-175
- Cha J, Bartos A, Park C, et al. 2014. Appropriate crypt formation in the uterus for embryo homing and implantation requires *Wnt5a*-ROR signaling[J]. Cell Reports, 8(2): 382-392.
- Gilbert W, Randall T, Moon L, et al. 2003. When Wnts antagonize Wnts[J]. The Journal of Cell Biology, 162: 753-755.
- Gong H, Zhou H, Hickford J G H. 2011. Diversity of the glycine/tyrosine-rich keratin-associated protein 6 gene (*KAP6*) family in sheep[J]. Molecular Biology Reports, 38(1): 31-35.
- He N, Wang Y, Zhang C, et al. 2017. Wnt signaling pathway regulates differentiation of chicken embryonic stem cells into spermatogonial stem cells via *Wnt5a*[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 119(2): 1689-170.
- Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, et al. 2006. Expression of *Wnt-5a* is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion[J]. Cancer Research, 66(21): 10439-10448.
- Miyoshi H, Ajima R, Luo C T, et al. 2012. *Wnt5a* potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury[J]. Science, 338(6103): 108-113.
- Reddy S, Andl T, Bagasra A, et al. 2001. Characterization of *Wnt* gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of *Wnt5A* as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis[J]. Mechanisms of Development, 107(1-2): 69-82.
- Susman M W, Karuna E P, Kunz R C, et al. 2017. Kinesin superfamily protein Kif26b links *Wnt5a*-Ror signaling to the control of cell and tissue behaviors in vertebrates[J]. eLife, 6: e26509.
- Xing Y Z, Xu W, Yang K, et al. 2011. Immunolocalization of *Wnt5A* during the hair cycle and its role in hair shaft growth in mice[J]. Acta Histochemica, 113(6): 608-612.
- Zhao B, Chen Y, Hao Y, et al. 2018. Transcriptomic analysis reveals differentially expressed genes associated with wool length in rabbit[J]. Animal Genetics, 49(5): 428-437.