

# 表达谱芯片筛选獭兔毛色相关候选差异表达基因

施丽娟<sup>1,2</sup>, 秦立志<sup>1,2</sup>, 王文洲<sup>1,2</sup>, 闫晓荣<sup>1,2</sup>, 翁巧琴<sup>3</sup>, 吴信生<sup>1,2\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 江苏省动物繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

3. 浙江省余姚市欣农兔业有限公司, 余姚 315400)

**摘要:** 本研究旨在了解青紫蓝色獭兔和白色獭兔毛色形成的分子遗传学机理。试验分为 3 组, 每组包含全同胞青紫蓝獭兔和白色獭兔各 1 只。利用安捷伦基因芯片技术分析不同分组之间差异基因表达情况, 并通过实时荧光定量 PCR 方法对部分差异显著基因进行验证。差异表达分析结果显示, 3 组青紫蓝色獭兔对白色獭兔分别筛选出 545、1 680 和 2 092 个差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs), 共有 172 个共同基因; GO (Gene Ontology) 分类结果显示, 这些基因主要参与细胞分化、增殖、凋亡、发育、离子转运、免疫应答等生物学过程。通过实时荧光定量 PCR 技术对 *Creb1*、*Wnt2*、*Gnaq* 和 *Gna14* 基因在组织样中的表达量进行检测, 结果与表达谱芯片一致。通过表达谱芯片结果结合生物信息学分析和文献报道, 筛选出了 *Creb1*、*TH*、*Wnt2*、*Gnaq*、*Dvl1*、*Mapk12* 等对毛色形成可能具有重要影响的候选基因。

**关键词:** 獭兔; 毛色; 差异表达基因; 基因芯片

中图分类号: Q81; S829.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)04-0568-08

## Screening Candidate Differentially Expressed Genes of Rex Rabbits' Fur Color with Gene Chips

SHI Li-juan<sup>1,2</sup>, QIN Li-zhi<sup>1,2</sup>, WANG Wen-zhou<sup>1,2</sup>, YAN Xiao-rong<sup>1,2</sup>, WENG Qiao-qing<sup>3</sup>, WU Xin-sheng<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics & Breeding and Molecular Design, Yangzhou 225009, China;

3. Zhejiang Yuyao Xinmang Rabbit Industry Co., Ltd., Yuyao 315400, China)

**Abstract:** In order to explore the molecular genetic mechanism of fur color formation between chinchilla rex rabbits and white rex rabbits. The experiments were divided into 3 groups, every group contained one chinchilla rex rabbit and one white rex rabbit, which came from full-sib family. The Agilent's rabbit gene expression microarray was used to determine the differentially expression genes between different fur color groups of rex rabbits, and the expression patterns of selected differentially expressed genes were further identified by quantitative real-time PCR. The results showed that 545, 1 680 and 2 092 differentially expressed genes associated with fur color of rex rabbits were screened out from 3 groups of chinchilla rex rabbits and white rex rabbits, respectively. A total of 172 mutual genes were found among these 3 rex rabbits groups. GO (Gene Ontology) analysis results revealed that the differentially expressed genes were related to cell differentiation, proliferation, apoptosis, growth, ionic transport altered and immune response, etc. The quantitative real-time PCR showed gene expression trend of *Creb1*, *Wnt2*, *Gnaq* and *Gna14* genes was consistent with that of gene expression microarray data, indicating that the result of gene chip was reliable. Combined with bioinformatic analysis and related literatures, some genes were potentially related

收稿日期: 2014-09-05

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-44-1); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD-2014-134)

作者简介: 施丽娟 (1990-), 女, 江苏南通人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: msbdmy@126.com

\* 通信作者: 吴信生, 教授, 博士, E-mail: xswu@yzu.edu.cn

to fur color formation, such as *Creb1*, *TH*, *Wnt2*, *Gnaq*, *Dvl1*, *Mapk12*, and so on.

**Key words:** rex rabbit; fur color; DEGs; gene chip

獭兔的毛皮柔软美观、轻便保暖,一直以来都备受人们的喜爱,特别是其自然形成的多种多样的毛色,更能满足不同消费者的审美需求。培育多色獭兔既可以增加獭兔的特色附加价值,也可以提高养兔业的经济效益。在獭兔的选育工作中,一般通过杂交方法,组合不同的基因型,培育出多种色型的獭兔。青紫蓝獭兔是獭兔的一个品种,全身被毛基部为瓦蓝色,中段为珍珠灰色,毛尖部为黑色。颈部毛色略浅于体侧部,背部毛色较深,腹部毛色呈浅蓝或白色。因为其被毛类似于青紫蓝兔,故得名。毛色遗传作为可以利用的遗传标记,在人、鼠、猪等多种哺乳动物中都有研究<sup>[1-2]</sup>。哺乳动物的毛色是遗传基础复杂的质量性状,而后天的环境也会对毛色有一定的调控作用<sup>[3]</sup>。D. C. Bennett 等<sup>[4]</sup>研究表明,小鼠体内控制毛色形成的多个通路中包含大约 127 个基因。哺乳动物的皮毛之所以出现从白到黑的多种颜色,主要是由体内黑色素细胞产生的真黑素和棕黑素之间的相对数量与分布决定的<sup>[5-6]</sup>。高文玉<sup>[7]</sup>通过对獭兔毛色遗传资料的收集整理,发现影响獭兔毛色的基因至少涉及 10 个系统或座位,其可通过等位基因和不同位点基因间的相互作用决定獭兔毛色的具体表达。许多研究已证实,*Mc1r*、*Mitf*、*Kit*、*Asip*、*Mlph*、*Pmel-17* 等基因参与了黑色素的产生,并与哺乳动物毛色的形成过程相关<sup>[8-13]</sup>。

自 1991 年基因芯片概念被首次提出开始<sup>[14]</sup>,基因芯片技术因其自动化、高通量、微型化检测等优点,迅速成为生命科学界的研究热点<sup>[15]</sup>,随着各种相关技术的发展,基因芯片已成为“后基因组时代”基因功能分析研究的最重要技术之一。基因芯片技术是一项由分子生物学、微电子学、物理学、化学和计算机学等多学科交叉融合而成的高新技术,高通量筛选的特点使其在基因表达分析、疾病诊断和治疗、新药发现等众多领域得到广泛应用<sup>[16]</sup>。本研究利用家兔全基因组表达谱芯片技术筛选青紫蓝色獭兔和白色獭兔背部皮肤组织差异表达基因,探索对毛色形成可能具有重要影响的功能基因,初步揭示相关基因的差异表达模式,为进一步筛选调控獭兔体内黑色素生成、多种多样毛色形成相关的主效基因以及毛色的进一步选育改良工作提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

选取 14 日龄青紫蓝色和白色獭兔各 3 只(由浙江省余姚市欣农兔业有限公司提供),来自于 3 对獭兔全同胞个体,其中每对全同胞个体均含有青紫蓝色獭兔和白色獭兔各 1 只。取背中部靠近脊椎处约 1.5 cm<sup>2</sup> 皮肤样,剪去表层毛发后将其剪成小块放入去 RNA 酶指形管,于液氮中保存备用。

### 1.2 基因芯片

本试验采用 Agilent 兔全基因组 4\*44K 芯片(design ID:020908),购自上海伯豪生物芯片有限公司。

### 1.3 RNA 提取和纯化

采用 Trizol 法提取样品的总 RNA,所得总 RNA 经 Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent technologies, US)电泳质检合格,并使用 RNeasy mini kit(QIAGEN, Germany)和 RNase-Free DNase Set(QIAGEN, Germany)纯化总 RNA。

### 1.4 荧光标记

采用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒提取试验样品总 RNA,按照 Low Input Quick Amp Labeling Kit,One-Color(Agilent technologies, US)的要求,对样品总 RNA 中的 mRNA 进行放大和荧光标记,并用 RNeasy mini kit(QIAGEN, Germany)对标记后的 cRNA 进行纯化。

### 1.5 芯片杂交

按照 Agilent 表达谱芯片所提供的杂交标准流程和配套试剂盒,将 1.65 μg 的 cRNA 样在 65℃ 滚动杂交炉中 10 r·min<sup>-1</sup> 滚动杂交 17 h,并在洗缸中洗片,洗片所用的试剂为 Gene Expression Wash Buffer Kit(Agilent technologies, US)。

### 1.6 芯片的洗涤及扫描

从杂交炉中取出已经完成杂交的芯片,用 GE Wash Buffer 洗涤芯片,并用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描。用 Feature Extraction software 10.7 读取数据,最后采用 Gene Spring Software 11.0 进行归一化处理,所用的算法为 Quantile。

### 1.7 数据分析

将读取的数据进行归一化处理后,以 Ratio≥2 或 Ratio≤0.5 筛选差异表达基因。对于筛选出的未

知基因,根据其登录号在 NCBI 上搜索其功能注释。

### 1.8 荧光定量 PCR 验证

利用与芯片同一批组织样提取 RNA 进行荧光定量 PCR 验证,随机选取 3 个芯片结果中的差异表达基因,以 *GAPDH* 作为内参基因,采用 SYBR Green I 法进行荧光定量试验,以验证芯片结果的可靠性,预混体系 UltraSYBR Mixture (With ROX) 购自北京康为世纪生物科技有限公司。引物

利用 Oligo7 软件根据芯片探针相对应的核酸序列设计(表 1)。采用 TaKaRa 公司的 PrimeSYB® Perfect Real Time 试剂盒制备 cDNA,标准曲线由 cDNA 梯度稀释后建立。每个样品设置 3 个重复,利用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,US)分析 PCR 过程中的荧光信号值,并获得各样品和基因的 Ct 值,以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因表达的差异倍数。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段大小/bp The fragment length
<i>GAPDH</i>	F:CGGCACGAAGCTGGTGAAAAGA R:GCGATCCAGGAAGGTGAGGAAGT	293
<i>Wnt2</i>	F:ACTTCAGGAAAACGGGCGAT R:CTGCCTCTCGGTCCCTGATA	115
<i>Creb1</i>	F:AGACTTCAGCACCTGCCATC R:TGTCCATCAGTGGTCTGTGC	140
<i>Gnaq</i>	F:AGGCTCATGCACAATTAGTTCG R:TTGTTGCGTAGGCAGGTAGG	212
<i>Gna14</i>	F:GGAAGAGCACCTTTATCAAGCAA R:TCTGCTCACACACGTAAGGGAT	165

## 2 结果

### 2.1 差异表达基因

本试验利用兔的表达谱芯片初步得到不同毛色全同胞獭兔皮肤组织表达谱,以每组的白色獭兔基因表达值为对照,青紫蓝色獭兔基因的表达值分别与其对比,按照差异倍数  $\geq 2$  或  $\leq 0.5$  的标准筛选差异基因,3 组分别筛选出了 545、1 680 和 2 092 个差异表达基因,经韦恩分析后发现 3 组共有差异表达基因 172 个(图 1)。在第 1 组中,111 个基因在青紫蓝色獭兔皮肤组织中表达上调,61 个基因表达下调;在第 2 组中,107 个基因在青紫蓝色獭兔皮肤组织中表达上调,65 个基因表达下调;在第 3 组中,92 个基因在青紫蓝色獭兔皮肤组织中表达上调,80 个基因在青紫蓝色獭兔皮肤组织中表达下调。172 个基因中有 89 个在 3 组中表达趋势一致,其中 62 个基因在青紫蓝色獭兔皮肤组织中表达上调,27 个基因在青紫蓝色獭兔皮肤组织中表达下调。表 2 列出了其中的 20 个差异表达基因。

### 2.2 GO 分类结果

筛选得到的差异基因经过 GO(<http://www.geneontology.org/>)进行功能分类,结果见表 3。这些差异基因参与生物学过程的调控、细胞、代谢等生物学过程(图 2)。其中生物学过程的调控、生物学调节、细胞过程、代谢过程占 10% 以上,多细胞有机

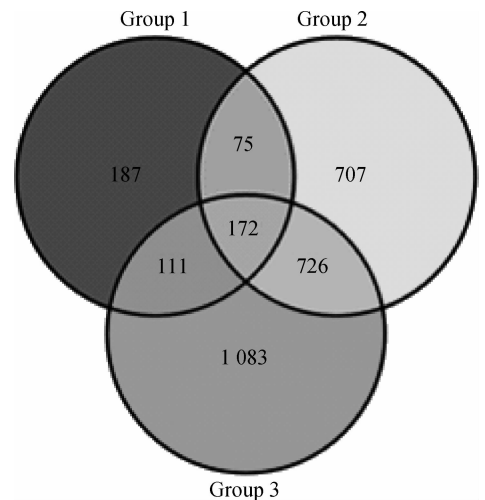


图 1 3 组差异基因的 Venn 分析

Fig. 1 Venn analysis of the DEGs in 3 groups

体过程、发育过程、定位、建立定位、一体化过程都占 5%~10%,其他的生物学过程都占 5% 以下。

### 2.3 相关差异表达基因信号通路富集

172 个共同差异表达基因中,大部分基因处于已研究发现的 KEGG、Biocarta 信号通路,他们存在于多条 KEGG、Biocarta 信号通路中,例如 *Creb1* 基因处于丝裂素活化蛋白激酶信号通路(MAPKinase Signaling Pathway)等 12 个 Biocarta 信号通路,以及黑素生成(Melanogenesis)等 5 个 KEGG 信号通路。本试验找出了一些与色素形成相关的信号通路以及相关的差异基因(表 4)。

表 2 3 组中表达趋势一致的 20 个差异基因

Table 2 20 common differentially expressed genes in 3 groups

基因名称 Genes name	GenBank 登录号 GenBank accession number	差异倍数 Fold change		
		第 1 组 Group 1	第 2 组 Group 2	第 3 组 Group 3
<i>Creb1</i>	NC_013675.1	3.38	2.35	2.68
<i>Gnaq</i>	NC_013669.1	3.75	2.72	3.73
<i>TH</i>	AF493546.1	3.07	2.81	2.66
<i>Gna14</i>	NC_013669.1	2.12	2.25	2.01
<i>Camk2a</i>	NC_013671.1	2.27	2.45	3.36
<i>Mapk12</i>	NM_013871.3	5.39	2.56	2.85
<i>Actn2</i>	NC_013684.1	2.05	2.03	2.02
<i>Dvl1</i>	NM_010091.3	2.36	2.12	2.56
<i>ST1A8</i>	NC_013674.1	3.16	3.27	3.18
<i>Ttn</i>	NC_013675.1	5.40	5.49	3.34
<i>Reg4</i>	NC_013681.1	2.06	4.06	2.85
<i>Htr5b</i>	NC_013675.1	4.16	2.05	2.65
<i>Zfp11</i>	NM_172462.4	2.07	2.16	0.28
<i>Igsf1</i>	NC_013690.1	2.06	3.35	3.95
<i>Adrbk2</i>	NM_177078.3	2.07	3.80	2.23
<i>Sctr</i>	NC_013675.1	0.32	0.29	0.12
<i>Cga</i>	NC_013680.1	0.31	0.46	0.08
<i>Wnt2</i>	NM_001171042.1	0.31	0.41	0.38
<i>Dnahc6</i>	NM_001370.1	0.11	0.46	0.42
<i>Egfr</i>	NC_013678.1	0.47	0.46	0.36

表 3 分子生物学过程相关基因 GO 分类

Table 3 GO term to gene in biological process

基因功能分类 The functional classification of genes	基因数 Number of genes	GO 分类号 GO No.
生物学过程的调节 Regulation of biological process	132	0050789
生物学过程的负调控 Negative regulation of biological process	35	0048519
生物学过程的正调控 Positive regulation of biological process	38	0048518
生物学调节 Biological regulation	135	0065007
一体化过程 Multi-organism process	70	0051704
建立定位 Establishment of localization	85	0051234
定位 Localization	90	0051179
刺激应答 Response to stimulus	42	0050896
运动 Locomotion	32	0040011
生长 Growth	4	0040007
发育过程 Developmental process	90	0032502
繁殖 Reproduction	3	0000003
免疫系统过程 Immune system process	48	0002376
代谢过程 Metabolic process	133	0008152
细胞生理过程 Cellular process	138	0009987
解剖结构形成 Anatomical structure formation	20	0010926
凋亡 Death	19	0016265
生殖过程 Reproductive process	8	0022414
生物黏附 Biological adhesion	12	0022610
多细胞有机体过程 Multicellular organismal process	112	0032501

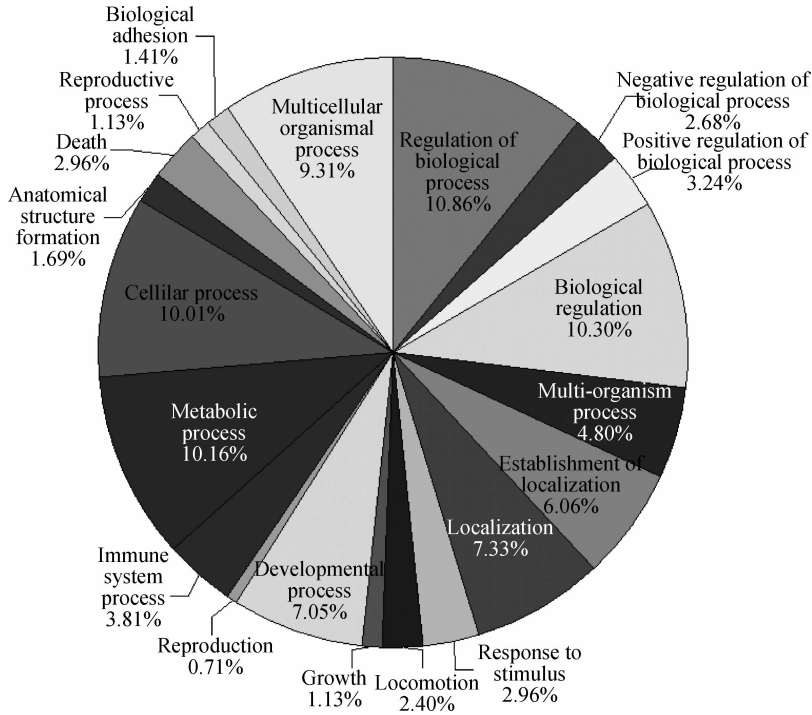


图 2 分子生物学过程相关基因 GO 分类

Fig. 2 GO term to gene in biological process

表 4 色素形成相关的信号通路

Table 4 Signal pathway related to pigment formation

通路名称 Name of pathway	差异表达基因 Differentially expressed genes
黑素生成 Melanogenesis	<i>Wnt2, Gnaq, Dvl1, Creb1</i>
黑素细胞发展和色素通路 Melanocyte development and pigmentation pathway	<i>Creb1</i>
酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	<i>TH</i>
丝裂素活化蛋白激酶信号通路 MAP kinase signaling pathway	<i>Mapk12, Creb1</i>

## 2.4 荧光定量 PCR 验证差异基因

为验证芯片结果的可靠性,本研究从芯片杂交结果中选取 4 个基因进行荧光定量 PCR 验证。芯片和实时定量 PCR 的结果比较见表 5。结果显示, *Creb1*、*Wnt2*、*Gnaq* 和 *Gna14* 各基因的表达谱芯片和荧光定量两个试验所得的表达倍数虽然不同,但二者的表达趋势基本相同(图 3),因此认为芯片的筛查结果可靠。

## 3 讨论

表达谱芯片是基因芯片的一个重要分支,其方

法已经相对成熟,并研制出许多物种的商品化表达谱芯片产品<sup>[17]</sup>。杨静等<sup>[18]</sup>利用表达谱芯片技术筛选子宫颈上皮内瘤变发展成宫颈癌危险性相关的差异表达基因发掘了 *ANKRD20A1*、*OLFM4*、*SN-ORD* 等 13 个在宫颈癌发生的早期阶段发挥重要作用的基因。李挺<sup>[19]</sup>通过表达谱芯片技术找到了新西兰白兔与福建黄兔背肌和腿肌中共有的 *Tnnc1*、*Myo5b*、*Tpm3* 等 7 个影响兔肌肉生长发育的基因。本研究利用 Agilent 兔全基因组表达谱芯片筛选出了青紫蓝色獭兔相对于白色獭兔的差异表达基因,并且选取部分基因进行荧光定量 PCR 验证,结果显示,芯片结果与荧光定量结果中基因表达量基本一致,说明利用表达谱芯片技术筛选毛色性状相关候选基因是可靠的途径。

本试验利用 GO 功能分类对筛选的差异表达基因进行生物学过程分析,结果显示,差异表达基因主要参与细胞黏附、增殖、分化及凋亡等细胞过程,以及发育、离子转运等生物学过程。本研究通过表达谱芯片结果结合生物信息学分析和文献报道,筛选出 *TH*、*Creb1*、*Wnt2*、*Dvl1*、*Gnaq*、*Mapk12* 等与獭兔毛色形成过程相关性较大的候选基因,与前人的研究结果一致。本研究中酪氨酸羟化酶基因 (Tyrosine hydroxylase, *TH*) 在 3 组不同毛色獭兔

表 5 荧光定量 PCR 与表达谱芯片的基因表达比较

Table 5 The comparison of gene expression level between quantification RT-PCR and chip

基因 Genes	组别 Groups	表达谱芯片差异倍数 Fold change chip	实时荧光定量 PCR 差异倍数 qRT-PCR fold change
<i>Creb1</i>	1	3.38	4.35
	2	2.35	2.28
	3	2.68	3.23
<i>Wnt2</i>	1	0.31	0.83
	2	0.41	0.33
	3	0.38	0.42
<i>Gnaq</i>	1	3.75	2.05
	2	2.72	3.85
	3	3.73	2.44
<i>Gna14</i>	1	2.12	1.88
	2	2.25	2.56
	3	2.01	1.92

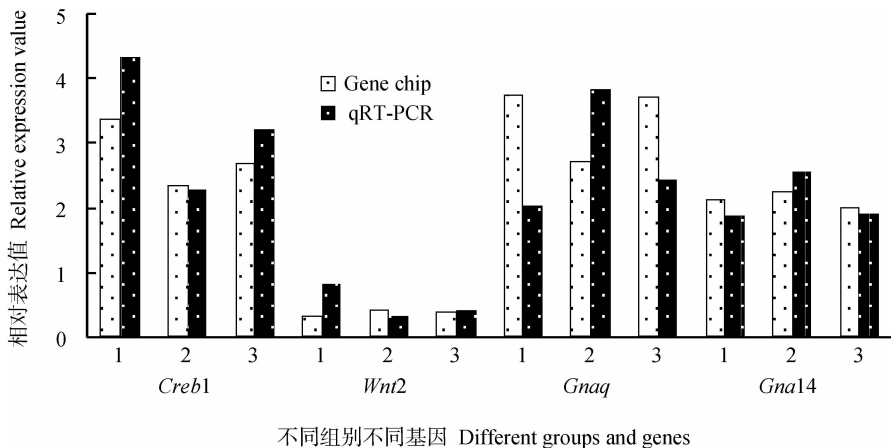


图 3 芯片与荧光定量 PCR 结果比对

Fig. 3 The comparisons on analysis result of microarray and qRT-PCR

表达谱芯片中的差异表达倍数均大于 2,提示该基因可能与獭兔毛色形成相关,其编码的酪氨酸羟化酶是一种以酪氨酸为底物,并催化酪氨酸形成多巴的酶,是多巴和儿茶酚胺生物合成过程中的关键步骤和第一个限速酶<sup>[20]</sup>。韩宇等<sup>[21]</sup>认为, *TH* 基因控制家蚕体内黑色素的形成。本研究中 cAMP 反应元件结合蛋白基因(cAMP response element binding protein, *Creb1*) 在 3 组不同毛色獭兔表达谱芯片中也具有差异表达。cAMP 反应元件结合蛋白是 G 蛋白耦合受体信号(GPCR)中最重要的一个核转

录因子。卜今<sup>[22]</sup>的研究表明,丹皮酚能通过活化 JNK/SAPK 途径,激活下游的酶性蛋白,抑制磷酸化 *Creb*,进而下调 *Mitf* 基因,减少 *Tyr* 基因的表达,抑制黑素合成。*Creb1* 基因是该 *Creb* 家族基因中非常重要的一员,E. R. Price 等<sup>[23]</sup>研究发现,在正常的黑色素细胞中,色素沉着信号从 *Mcl1r* 基因传递到 *Mitf* 基因需要 *Creb1* 基因的参与。在筛选得到的差异基因中, *Wnt2* 是 Wnt 家族的成员之一, Wnt/ $\beta$ -catenin 通路是一条保守的信号通路,广泛存在各种动物细胞内。Wnt 家族是一个非常庞大的

多基因家族,主要参与细胞的增殖与分化过程。Wnt 可以与细胞表面的 Frizzled 受体结合,通过 GPCR 激活 dishevelled (DVL) 蛋白从而调节  $\beta$ -catenin<sup>[24]</sup>。Dvl 在 Wnt 信号通路激活过程中,介导 Wnt 信号传递到不同的途径,起着信号分流作用。G. M. Boland 等<sup>[25]</sup>研究发现,过量表达 Dvl1 基因能够使  $\beta$ -catenin 在胞质中稳定积累。于秋菊等<sup>[26]</sup>研究表明, $\beta$ -catenin 在棕色羊驼皮肤组织中的基因表达量高于白色羊驼,可能与羊驼毛色形成具有相关性。K. Pham 等<sup>[27]</sup>研究发现,Wnt2 在恶性黑色素瘤中过表达。Gnaq 基因编码的 Gnaq 蛋白是异源三聚体 G 蛋白中  $\alpha$  亚基下游中的亚基基因,其功能是将信息从细胞表面受体传递到细胞内,在黑素细胞内皮素 B 受体中发挥重要作用,存在于包括皮肤在内的各种组织中。M. A. Davies 等<sup>[28]</sup>研究指出,黑色素细胞中 Gnaq 蛋白的突变体和其他一些基因协作诱导小鼠黑色素瘤的形成。C. D. Van Raamsdonk 等<sup>[29]</sup>研究表明,Gnaq 超效等位基因的突变会引起真皮内黑色素细胞增加从而导致皮肤色素扩散。Mapk12 基因编码的丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 参与生物体内的多种受体信号传递途径,C. D. Van Raamsdonk 等<sup>[30]</sup>研究表明,MAPK 信号通路作用于黑色素小体的转运,可能在眼色素瘤和色素痣中发挥作用。

#### 4 结 论

本研究利用基因芯片技术筛选出同一窝出生的青紫蓝色獭兔和白色獭兔中差异表达基因,共筛选出 172 个基因,参与了细胞的增殖、分化、凋亡,信号传递、离子转运、催化酶的活性、蛋白结合等多种细胞生物学过程。其中 Creb1、Gnaq、Mapk12、TH、Wnt2、Dvl1 基因的差异表达,表明这些基因可能是对獭兔毛色形成具有重要影响的候选基因。

#### 参考文献 (References):

[1] MARIE M, VERA S D, RICARDO M, et al. The developmental role of agouti in color pattern evolution [J]. *Science*, 2011, 331(25): 1062-1065.

[2] STURM R A. Molecular genetics of human pigmentation diversity [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(1): 9-17.

[3] TEASDELE R D, STURM R A, BOX N F. Human pigmentation genes: Identification, structure and consequences of polymorphic variation [J]. *Gene*, 2001,

277: 49-62.

- [4] BENNETT D C, LAMOREUX M L. The color loci of mice—a genetic century [C]. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society, 2003, 16(4): 333-344.
- [5] CONE R D, LU D, KOPPULA S, et al. The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation [J]. *Recent Prog Horm Res*, 1996, 51: 287-317, 318.
- [6] HARTMEYER M, SCHOLZEN T, BECHER E, et al. Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone [J]. *J Immunol*, 1997, 15(4): 1930-1937.
- [7] 高文玉. 关于家兔毛色遗传规律的探讨分析 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(8): 19-23.
- GAO W Y. Study and analysis on the genetic regulation of rabbit hair color [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(8): 19-23. (in Chinese)
- [8] KIJAS J M H, WALES R, TORNSTEN A, et al. Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs [J]. *Genetics*, 1998, 150: 1177-1185.
- [9] BAUER G L, PRAETORIUS C, BERGSLEINSDOTTIR K, et al. The role of MITF phosphorylation sites during coat color and eye development in mice analyzed by bacterial artificial chromosome transgene rescue [J]. *Genetics*, 2009, 183(2): 581-594.
- [10] MARKLUND S, MOLLER M, SANDBERG K, et al. Close association between sequence polymorphism in the KIT gene and the roan coat color in horses [J]. *Mamm Genome*, 1999, 10(3): 283-288.
- [11] MUNDY N I, KELLY J. Investigation of the role of the agouti signaling protein gene (ASIP) in coat color evolution in primates [J]. *Mamm Genome*, 2006, 17(12): 1205-1213.
- [12] PHILIPP U, HAMANN H, MECKLENBURG L, et al. Polymorphisms within the canine MLPH gene are associated with dilute coat color in dogs [J]. *BMC Genet*, 2005, 6: 34.
- [13] BRUNBERG E, ANDERSSON L, COTHRAN G, et al. A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse [J]. *BMC Genet*, 2006, 7: 46.
- [14] FODOR S P A, READ J L, PIRRUN G M C. Light directed spatially addressable parallel chemical syn-

- thesis[J]. *Science*, 1991, 251: 767-773.
- [15] CHEN C P, CHIANG M C, WANG T H, et al. Microvillus inclusion disease: prenatal ultrasound findings, molecular diagnosis and genetic counseling of congenital diarrhea[J]. *Taiwan J Obstet Gyne*, 2010, 49(4): 487-494.
- [16] 安利峰, 胜利. 基因芯片及其应用进展[J]. 西北民族学院学报, 2002, 23(2): 40-42.  
AN L F, SHENG L. Gene core and its application progress[J]. *Journal of Northwest Minorities University*, 2002, 23(2): 40-42. (in Chinese)
- [17] POLATI R, MENINI M, ROBOTTI E, et al. Proteomic changes involved in tenderization of bovine longissimus dorsi muscle during prolonged ageing[J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 2052-2069.
- [18] 杨静, 冯家成, 孟晓, 等. 基因表达谱芯片在预测子宫颈上皮内瘤变进展风险中应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(1): 53-57.  
YANG J, FENG J C, MENG X, et al. The role of gene expression profile chip in the prediction of cervical intraepithelial neoplasia to cervical cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2013, 29(1): 53-57. (in Chinese)
- [19] 李挺. 利用表达谱芯片技术筛选獭兔肌肉发育相关基因[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.  
LI T. Screening genes for muscle of rabbit by cDNA microarray [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013. (in Chinese)
- [20] LEVITT M, SPECTOR S, SJOERDSMA A, et al. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1965, 148: 1-8.
- [21] 韩宇, 刘春, 魏丽婉, 等. 家蚕酪氨酸羟化酶基因 BmTh 的表达及功能[J]. 昆虫学报, 2010, 53(9): 949-956.  
HAN Y, LIU C, WEI L W, et al. Expression profile and function of tyrosine hydroxylase gene BmTh in the silkworm[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2010, 53(9): 949-956. (in Chinese)
- [22] 卜今. 丹皮酚抑制黑素合成相关分子机制的研究及 KC-MC 共培养体系中细胞因子对黑素合成的反馈调节[D]. 北京: 北京协和医院, 2008.  
PU J. A study on the molecular mechanism of inhibition on melanogenesis induced by paeonol and the feedback regulation on melanin synthesis by cytokines in KC-MC co-culture system [D]. Beijing: Peking Union Medical Hospital, 2008. (in Chinese)
- [23] PRICE E R, HORSTMANN M A, WELLS A G, et al. Fisher DE alpha-melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 33042-33047.
- [24] DIJKSTERHUIS J P, PETERSEN J, SCHULTE G. WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance; IUPHAR review 3[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(5): 1195-1209.
- [25] BOLAND G M, PERKINS G, HALL D J, et al. Wnt 3 promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cell [J]. *Cell Biochem*, 2004, 93(6): 1210-1230.
- [26] 于秀菊, 董常生, 范阔海, 等.  $\beta$ -catenin 在不同毛色羊驼皮肤中的表达和定位[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(3): 335-340.  
YU X J, DONG C S, FAN K H, et al. Study on the expression and localization of  $\beta$ -catenin in alpaca skin of different colors[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(3): 335-340. (in Chinese)
- [27] PHAM K, MILOVANOVIC T, BARR R J, et al. Wnt ligand expression in malignant melanoma: pilot study indicating correlation with histopathological features [J]. *Mol Pathol*, 2003, 56(5): 280-285.
- [28] DAVIES M A, GERSHENWALD J E. Targeted therapy for melanoma: a primer [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2011, 20(1): 165-180.
- [29] VAN RAAMSDONK C D, FITCH KR, FUCHS H, et al. Effects of G-protein mutations on skin color[J]. *Nat Genet*, 2004, 36: 961-968.
- [30] VAN RAAMSDONK C D, BEZROOKOVE V, GREEN G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi[J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 599-602.