

# 羊毛蛋白组学研究进展

金雨婷<sup>1</sup> 胡馨予<sup>1</sup> 石国庆<sup>2</sup> 万鹏程<sup>2</sup> 代蓉<sup>2</sup> 管峰<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018; <sup>2</sup>新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000)

**摘要** 和其他哺乳动物的毛发一样, 羊毛是皮肤衍生物, 主要成分是角蛋白, 其生长发育过程受到严格的基因调控并受多种因素的影响, 另外还有绵羊品种的多样性和羊毛的多样化特征, 因此, 羊毛生长发育是一个复杂的过程。通过对羊毛的表型特征和成分分析, 结合羊毛蛋白分离鉴定技术, 已经在羊毛成分分析和生长发育机制方面取得了大量成果。羊毛主要由角蛋白中间丝蛋白和角蛋白联合蛋白组成, 二者均有多个亚家族, 且构成了羊毛的主体, 同时也决定了羊毛的化学结构与理化特征。该文从羊毛研究技术、角蛋白家族分类和生长发育方面阐述羊毛蛋白组学的研究进展概况, 以期为羊毛发育及分子标记育种研究提供理论参考。

**关键词** 羊毛纤维; 角蛋白; 基因表达; 生长发育

## Advance in the Research of Wool Proteomics

JIN Yuting<sup>1</sup>, HU Xinyu<sup>1</sup>, SHI Guoqing<sup>2</sup>, WAN Pengcheng<sup>2</sup>, DAI Rong<sup>2</sup>, GUAN Feng<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>China Jiliang University, College of Life Sciences, Hangzhou 310018, China;

<sup>2</sup>Animal Husbandry and Veterinary Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

**Abstract** Wool fiber is like the hair of many other mammals, and they all belong to skin derivatives. Wool is almost entirely composed of proteins, the major components of which are IFPs (keratin intermediate filament proteins) and KAPs (keratin associated proteins). The growth and development processes of wool fiber are strictly controlled by multiple genes and influenced by many factors, such as nutrient levels, seasons and breeds, so the development procedure is complex. Great progress has been made in the protein identification and development of wool through analyzing the phenotypes and compositions of wool. The developing technologies such as protein separation and identification have made an important contribution to the wool proteomic study. Furthermore, many subfamilies of IFPs and KAPs have been found and identified in the wool, which decide the physical and chemical structure and characteristics of wool fiber. In this review, the progress of wool proteomics is summarized, including wool study techniques, protein classification and growth procedure. The aim of this study is to provide some data for wool growth study and molecular marker assisted selection in sheep breeding.

**Keywords** wool fiber; keratin; gene expression; growth and development

羊毛属于天然纤维材料, 是人类开发利用的主要纺织品原材料之一。人类利用羊毛的历史最早可追

溯到新石器时代, 自此以后羊毛成为亚欧大陆的重要纺织原料。羊毛纤维柔软而富有弹性, 还具有隔热、

收稿日期: 2019-12-21 接受日期: 2020-03-19

国家自然科学基金(批准号: 31672394)、国家重点研发计划项目(批准号: 2017YFD0501904)、兵团科技攻关与成果转化计划项目(批准号: 2016AC027)、国家绒毛用羊产业技术体系(批准号: CARS-40-07)和兵团中青年科技创新领军人才专项(批准号: 2018CB025)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-86835772, E-mail: guanfengzgj@163.com

Received: December 21, 2019 Accepted: March 19, 2020

This work was supported by the National Natural Foundation of China (Grant No.31672394), the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFD0501904), the Project of the Corps' Scientific and Technological Breakthrough and the Project Transformation Project (Grant No.2016AC027), the National Technical System of Fine Wool Sheep Industry (Grant No.CARS-40-07), and the XPCC's Young and Middle-aged Science and Technology Innovation Leading Talent Project (Grant No.2018CB025)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86835772, E-mail: guanfengzgj@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5299>

阻燃和透气性好等优点,是制作呢绒、绒线和毛毯等多种纺织品的主要材料,更是当今高档纺织品不可或缺的材料。羊毛的分类方法有多种,根据羊毛的细度和长度,可将其分为细羊毛、半细毛、长羊毛、杂交种毛、粗羊毛等类型,决定羊毛品质的主要因素是细度、卷曲、色泽和强度等<sup>[1-2]</sup>。澳大利亚、新西兰、中国和印度是羊毛产量较多的国家,且中国同时也是羊毛需求大国,在中国一半以上的高档羊毛依靠进口。羊毛作为动物来源的重要纤维材料,被广泛用于工业和传统产品制造业中,在多个以畜牧业为主的国家经济中占有重要地位,即使在动物纤维替代品日益发达的现代化工业经济中,羊毛仍然是最常见和最普遍使用的动物纤维,尤其在阿根廷、南非、澳大利亚和新西兰等畜牧业为主的国家,羊毛仍在国家经济中发挥着战略作用<sup>[3]</sup>。

羊毛的重要地位和经济价值促进了绵羊和山羊的育种工作,其主要在于随着生物技术的发展在羊毛生长发育和蛋白组学方面开展了大量研究。世界上现已有多个细毛羊绵羊品种,其中以澳大利亚美利奴细毛羊最为著名。我国固有的细毛羊品种稀缺,主要培育品种有中国美利奴细毛羊、敖汉细毛羊和吉林细毛羊;此外,还有内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊等山羊品种。随着对粗细不同的羊毛和产不同羊毛绵羊品种的研究,发现了一系列组成羊毛的蛋白组分以及蛋白编码基因及其调控羊毛发育的模式。本文就羊毛研究技术、蛋白组学和基因表达与羊毛生长发育研究概况作一综述,旨在为羊毛研究和细毛羊育种提供参考资料。

## 1 羊毛的组成与基本结构

羊毛作为重要的纺织原料之一,其细度、弯曲和弹性等特点决定了其在纺织中的用途和经济价值,其中细度是最重要的指标,即羊毛的直径。羊毛的生长发育基本分为生长期、退化期和终止期3个阶段,其生长周期受到营养水平、季节和日照长短等因素影响而有所不同。羊毛由外向内一般分为毛表皮(即鳞片层)、毛皮质(即皮质层)和髓质层,细羊毛一般无髓质层。羊毛纤维本身起源于皮肤真皮中的毛囊球,毛囊细胞在生长发育中经历复杂的调控过程,毛囊表达的总蛋白将其内部蛋白含量降低至大纤维结构,并经历角质化过程,从而形成羊毛纤维。1934年美国学者GODDARD等<sup>[4]</sup>首次分解并证明这些大纤维几乎完全

由蛋白质组成,且中心结构为 $\alpha$ -螺旋的大纤维丝。羊毛纤维的实体主要由皮质层组成,其占洁净羊毛纤维重量的90%甚至98%以上<sup>[5-6]</sup>,皮质层的细胞又可分为正皮质、副皮质和中间皮质3种类型,均由角蛋白(keratin, K)组成<sup>[7-9]</sup>。同时,在不同羊毛纤维中3种细胞的分布和含量变化较大,但总体来说不论是在横向还是纵向分布中,正皮质细胞都有绝对的含量优势,其含量一般都在50%以上<sup>[10]</sup>。羊毛结构的典型特征是,在弯曲度良好的纤维中,正副皮质细胞呈两侧分布,正皮质分布于弯曲的外侧,而副皮质在弯曲的内侧,中间皮质则少量见于如弯曲良好的美利奴羊毛正副皮质的连接处<sup>[11-12]</sup>。弯曲少的羊毛则中间皮质细胞增多,副皮质细胞减少,同样的现象也出现在直径变粗的羊毛中,随着羊毛变粗,副皮质被中间皮质所代替,正皮质含量增加<sup>[13]</sup>。不同羊毛角蛋白之间这种含量的变化引起了诸多外在表型和理化特性的改变,因此诸多与羊毛经济性状相关的研究都集中于角蛋白及其编码基因的表达模式上。

羊毛角蛋白属于纤维性的、非营养性的“硬”蛋白,也是维持毛囊结构并在毛囊中表达最丰富的蛋白质,其构成元素主要包括50%的碳、7%的氢、22%~25%的氧、16%~17%的氮和3%~4%的硫<sup>[14]</sup>。毛角蛋白包括30多个蛋白家族,目前已经从羊毛中分离得到100多种蛋白质。按照羊毛角蛋白的结构和组成,皮质层主要由两种蛋白质构成,即以 $\alpha$ -螺旋为主的角蛋白中间丝蛋白(intermediate filament proteins, IFPs)和作为基质成分的角蛋白联合蛋白(keratin associated proteins, KAPs),前者是羊毛纤维的骨架结构成分,占羊毛蛋白总量的58%<sup>[6]</sup>,后者则通过半胱氨酸间的二硫键将前者横向联结成微丝束,两种蛋白形成交叉链接,经角质化后形成羊毛纤维,二者占羊毛总蛋白成分的85%<sup>[15]</sup>。双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)分离羊毛蛋白的结果表明,羊毛各组分蛋白的分子量普遍较小,大部分在15~58 kDa的范围内<sup>[16]</sup>,也有少量小于10 kDa<sup>[17]</sup>。在结构特点上,IFPs含量较高的正皮质细胞构成羊毛纤维骨架,成 $\alpha$ -螺旋状,规则整齐,KAPs内嵌其中;而副皮质区的骨架结构中KAPs包裹不规则,且IFPs含量较低,中间皮质结构介于二者中间<sup>[18]</sup>。也就是说,正皮质区以IFPs为主的细胞骨架结构紧密,而副皮质区以IFPs为主的细胞骨架结构较为松散,以KAPs为主的基质在正皮质中比在副皮质中的含量低<sup>[19]</sup>。利用透射电镜对粗细不

同的毛发进行扫描的研究证明了这一结果, IFPs在正皮质区的含量为67%~70%,而在副皮质的含量显著较低,含量为33%~48%<sup>[18]</sup>;也有研究表明,正副皮质中IFPs的含量分别为74%和45%<sup>[20]</sup>。而在羊毛表皮层中,IFPs和KAPs含量分别为13%和27%,其余成分的60%包括细胞支架蛋白、黏附蛋白、转运蛋白、调节蛋白、修饰和代谢蛋白以及免疫蛋白等<sup>[21]</sup>。不过,IFPs和KAPs的含量及KAPs中各组分蛋白的含量不是固定不变的,在不同绵羊品种和不同个体间存在较大差异。美利奴羊毛的正副皮质中的IFPs含量分别为58%和39%,中间皮质中的IFPs含量为46%<sup>[18]</sup>;而罗姆尼羊毛中IFPs在正副皮质中的含量分别为34%和52%<sup>[11,18]</sup>。在毛囊发育的晚期,KAPs围绕在IFPs的周围并以二硫键相连,在皮质细胞中形成微纤维。在空间结构上,IFPs位于羊毛纤维的中间,而KAPs则位于羊毛纤维的外层,羊毛的物理和机械特征在很大程度上由二者的含量和结构决定<sup>[22]</sup>。不过,尽管研究证明,IFPs在正副皮质以及中间皮质细胞中的含量和结构有差异,但是对羊毛的弯曲无显著影响<sup>[23]</sup>,弯曲不同的美利奴羊和林肯羊的羊毛蛋白差异主要在于KAPs家族中含硫量较高的蛋白<sup>[16]</sup>。另外,羊毛中还有其他蛋白质成分,如毛发菌丝蛋白,其位于毛发纤维的内根鞘和髓质中,但是这些蛋白质并不是纤维结构的必需成分,对结构和特性的影响也很小。粗细和弯曲不同的羊毛中正副皮质细胞的数量和分布在羊毛横向和纵向分布中都有较大变化,总体来说不论在品种间还是在品种内,这种差别主要在于正副皮质细胞的表达调控过程,即最后生成的羊毛中IFPs和KAPs的含量和分布决定了羊毛的特性。

## 2 羊毛蛋白组学研究技术

羊毛的蛋白质组成分析是羊毛质量性状与基因表达差异关联分析的前提,也是细毛羊育种的前提和基础,其主要包括毛发蛋白裂解、沉淀和分离鉴定方面的技术,毛发蛋白裂解和沉淀主要采用化学方法,而分离鉴定主要采用2-DE、色谱和质谱技术等。羊毛是成型的纤维,其理化性质相对稳定,对酸碱均有一定的耐受性,不溶于水和普通的蛋白溶剂,也不能直接被胰蛋白酶和胃蛋白酶消化,其结构稳定性限制了早期对羊毛组成和结构的研究。后来,通过对羊毛进行碱处理(pH值为10~13)以及氧化(溴、高锰酸钾和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和酶解(胰蛋白酶和胃蛋白酶)处理,发现羊毛主

要由蛋白质组成<sup>[4]</sup>。此后,利用现代生物分离和鉴定技术开展了羊毛组分、结构、基因表达等诸多方面的研究。

羊毛蛋白分离是组分鉴定研究的基础,蛋白分离常用的技术是2-DE,在该技术不断发展的过程中还进一步优化并由此创新出了诸多衍生技术,其中不均衡双向电泳(non-equalizing two-dimensional electrophoresis, NE-2DE)和等电聚焦双向电泳(isoelectric focusing, IEF)是其中两项重要的技术,也是用于羊毛蛋白分离的主要技术,还辅以蛋白浓缩、凝胶浓度优化、pH优化、蛋白定量和染色技术<sup>[6,21]</sup>。研究发现,胶考马斯亮蓝G-250是优于考马斯亮蓝R-250且能对所有羊毛蛋白组分染色的最佳染料,结合银染法可以有效降低凝胶染色的背景和假阳性;梯度为12%~20%的凝胶更适于分离分子量较小的毛发蛋白<sup>[16]</sup>,而经尿素裂解和丙酮沉淀处理的羊毛能够获得更清晰的2-DE图谱<sup>[24]</sup>,这些影响因素和条件的优化研究为羊毛蛋白的分离鉴定提供了技术参考。基于2-DE还筛选鉴定出了可用于羊毛细度辅助选择的差异蛋白成分<sup>[16]</sup>。对内蒙古绒山羊毛囊兴盛期和休止期的蛋白进行差异表达分析,结果表明2-DE具有良好的分离效果<sup>[25]</sup>。对NE-2DE进行酸碱优化和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离,使得羊毛蛋白更易分开,优化的2-DE可以从人类头发角蛋白分离出400多个蛋白点<sup>[26]</sup>。但是,2-DE在分离羊毛蛋白时也存在局限性,由于羊毛蛋白组分同源性高、分离难度大,蛋白斑点回收测序难度大,导致部分信息丢失<sup>[6]</sup>。2-DE结合蛋白酶解技术,利用生物酶和化学水解方法,发现了与细度相关的差异表达基因<sup>[27]</sup>。色谱技术与质谱技术结合后形成的一系列蛋白分离技术,如液相色谱-二级质谱联用(liquid chromatography-tandem mass chromatography, LC-MS/MS)、基质辅助激光解吸附质谱技术(liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption ionization, LC-MALDI)、二维液相色谱-质谱联用(2D-LC-MS/MS)还有液相色谱技术(liquid chromatography, LC)或单向电泳(one-dimensional electrophoresis, 1-DE)、液相色谱-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrograph, LC-MS),都被广泛应用于羊毛蛋白质的分离鉴定。用LC-MS/MS、LC和1-DE LC-MS分离技术结合质谱技术鉴定出了羊毛的113种蛋白质,这些成分不仅有羊毛的主要蛋

白,还有一些如细胞骨架蛋白、组蛋白、桥粒蛋白和酶等非毛发角蛋白组分<sup>[28]</sup>,为羊毛研究提供了重要信息。

在羊毛结构研究中大量采用了电子成像和结构化学研究技术,如扫描电镜、冷冻电镜(cryo-electron microscopy, cryo-EM)和X衍射等技术。基于cryo-EM和低温电子断层扫描技术(cryo-electron tomography, cryo-ET)的研究成果基本阐明了毛囊中毛发蛋白的结构特征<sup>[29]</sup>。结合蛋白分离和鉴定技术对美利奴羊毛正皮质和副皮质细胞中蛋白的表达情况进行分析,为羊毛结构中各组分变化以及结构变化的研究提供了基础。

通过借鉴其他蛋白质组学的研究成果,结合基因组学研究的有关羊毛基因型以及毛囊早期发育中蛋白表达水平的信息,从而把蛋白组学获得的羊毛纤维的表型,即实际存在的蛋白及其相对含量与基因表达水平进行相关性分析,为羊毛成分和差异的研究提供了很多帮助,也为分子育种和基因组选育提供了基础。更重要的是,蛋白组学还可以揭示翻译后修饰以及由于环境因素或加工而发生的羊毛修饰的信息。蛋白质组学和烷基化研究相结合还可以检测角蛋白及其相关KAPs之间的相互作用,为揭示羊毛的形成过程和表型

特征之间的关系提供技术手段。

### 3 IFPs的组成和分类

IFPs是羊毛的主要蛋白成分且为羊毛纤维的骨架,因此IFPs的组成和结构研究对于阐明不同表型羊毛的组分差异和羊毛的特性具有重要价值。运用聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白层析技术把从羊毛中分离出的IFPs鉴定为I型和II型2个蛋白家族,并依据结构特征进一步把每个IFPs家族分成4个亚家族。在IEF图谱上,II型IFPs为一条链状跨酸碱区的蛋白质带,而I型IFPs以4个独立的斑点带分布在比较窄的酸性区域内,I型和II型IFPs的序列同源性高达92%~93%<sup>[6]</sup>。在羊毛角蛋白的分离鉴定中,用碱性磷酸酶处理硫醇修饰的角蛋白会减少2-DE图谱上II型IFPs的蛋白点<sup>[30]</sup>,且蛋白质的糖基化或磷酸化都影响最后分离出的蛋白的数量。

与IFPs相关的研究证明,I型和II型蛋白分别包含11和7种蛋白质<sup>[15]</sup>,I型蛋白包括角蛋白K31~K40,其中K33又分为K33a和K33b 2种亚型,不过在羊毛中缺少K37蛋白<sup>[31]</sup>;II型蛋白包括角蛋白K81~K87,人类头发中缺少K87型蛋白,这些蛋白全部在羊毛的皮质层和表皮层表达<sup>[6,31-33]</sup>(表1),I型和II型蛋白亚家族内部也均具有较高

表1 人类头发和羊毛中IFPs的分类及定位(根据参考文献[6]修改)

Table 1 Classification and locations of sheep and human IFPs (modified from reference [6])

分类	羊毛	头发	定位
Classification	Wool	Hair	Location
Type I	K31	K31	Cortex
	K32	K32	Cuticle
	K33a	K33a	Cortex
	K33b	K33b	Cortex
	K34	K34	Cortex
	K35	K35	Cuticle and cortex
	K36	K36	Cortex
	-	K37	Cortex-vellus (humans only)
	K38	K38	Cortex
	K39	K39	Cortex (sheep); cuticle and cortex (humans)
	K40	K40	Cortex (sheep); cuticle and cortex (humans)
Type II	K81	K81	Cortex
	K82	K82	Cuticle
	K83	K83	Cortex
	K84	K84	Cuticle (wool); tongue (humans)
	K85	K85	Cuticle and cortex
	K86	K86	Cortex
	K87	-	Cortex

“-”代表未发现该蛋白。

“-” represents the protein was not found.

的同源性,分别达到92%~96%和78%~89%<sup>[21]</sup>,也有研究认为后者为93%~96%<sup>[15]</sup>。在二级结构上,IFPs主要为 $\alpha$ -螺旋,每4个 $\alpha$ -螺旋肽链之间由一段非螺旋肽链连接,螺旋区表现为七肽结构,第1个与第4个氨基酸残基一般为非极性氨基酸,使右旋的 $\alpha$ -肽链上出现了1条左旋的非极性氨基酸带,这个非极性氨基酸残基带使不同的中间纤维蛋白分子的螺旋部分聚集在一起形成二聚体,二聚体是羊毛微纤维物理结构的亚单位。电镜下的羊毛超微结构为16个中间纤维蛋白分子二聚体构成的中空的中空纤维<sup>[34]</sup>。这个二聚体在角质化作用下生成羊毛的大纤维丝,且这种大纤维丝在羊毛和其他哺乳动物的毛发中均呈左手螺旋状卷曲,并可能是形成毛发卷曲的基本因素<sup>[35]</sup>。IFPs分子的尾端富含半胱氨酸残基,其在中间丝纤维与KAPs的交联中起到重要作用,KAPs通过与IFPs的基因表达的时空变化和相互作用而影响羊毛的理化和机械特征。

#### 4 KAPs的组成和分类

KAPs是毛发纤维的基质蛋白,被认为在决定毛发纤维的机械特性中起着重要作用。KAPs是构成羊毛基质的主要成分,在空间结构上主要是附着于羊毛骨架IFPs并镶嵌其中,通过含硫氨基酸生成大量的二硫键交联或经由桥粒细胞间连接与IFPs结合,从而产生坚硬的毛干。依据半胱氨酸含量可把动物KAPs分为3类:半胱氨酸含量小于30%的为高硫蛋白(high-sulfur KAPs, HSPs)(包括KAP1~KAP3、KAP10~KAP16和KAP23),半胱氨酸含量大于30%的为超高硫蛋白(ultra-high-sulfur KAPs, UHSPs)(包括KAP4、KAP5、KAP9和KAP17),还有同时含有高水平甘氨酸和酪氨酸(35%~60%)这两种氨基酸的高甘氨酸酪氨酸蛋白(high-glycine-tyrosine KAPs, HGTPs)(包括KAP6~KAP8和KAP18~KAP22)<sup>[22,36-37]</sup>,然后根据氨基酸序列同源性将它们分为不同的亚家族。成熟羊毛纤维的KAPs在2-DE图谱中聚集在酸性和碱性pH区域,且可分为2个主要类型。在酸性pH下分离出2个蛋白质家族,HSP家族KAP1的4个成员集中在20~30 kDa之间,且其中3个蛋白成员为KAP1.1、KAP1.3和KAP1.4<sup>[38]</sup>;KAP3家族成员的分子量更小,在10~15 kDa之间;碱性区域的KAPs则进一步分成2大类群,HSPs的分子量在15~20 kDa范围内,HGTPs的分子量低于15 kDa甚至低于10 kDa<sup>[16,21]</sup>;HSPs家族KAP2的3个蛋白成员分布于跨度较大的

碱性区域,从分子量大小来看,KAP11.1分子量较大,约为20 kDa,然后依次为KAP13.1和KAP2,最小的为KAP15.1。HGTPs在羊毛角蛋白组分中分子量最小,位于2-DE图谱碱性区域最下方,3个主要成员KAP6、KAP7和KAP8聚集在一起<sup>[21]</sup>。羊毛蛋白的分离结果表明,酸碱结合且广泛pH分布的2-DE具有较好的分离效果。

迄今为止,已经鉴定了30多种哺乳动物的KAPs,加上单孔类和袋类动物的KAPs,共计有35个家族<sup>[15]</sup>,这些蛋白家族在哺乳动物中表现出复杂的基因表达和结构多样性,产生了多种毛发表型。依据KAPs家族的分类方法,即先后参照半胱氨酸含量、甘氨酸和酪氨酸含量、氨基酸重复结构的类型和数量以及是否含有独特序列的基序,把最近在人类中发现的KAP24.1和KAP26.1也划分到HSP家族<sup>[9,22,39]</sup>,而在绵羊和山羊中发现的KAP36.1则属于HGTPs家族<sup>[40]</sup>。在人类毛发中已鉴定的88个功能性KAPs基因已被划分到25个家族中,编号为KAP1~KAP27,但不包括仅在小鼠中发现的KAP14和KAP18<sup>[41-42]</sup>。HGTPs在人类头发中发现了8个家族成员,但是羊毛中目前仅发现3个<sup>[43]</sup>。在KAPs中还发现了富含半胱氨酸和甘氨酸的蛋白质以及至少8个含硫较高的蛋白家族,这些高硫蛋白的半胱氨酸的含量从12%到41%不等<sup>[36]</sup>,某些归类为UHSPs家族的蛋白中半胱氨酸含量不足30%,有些毛发蛋白含有更低(7%~20%)的半胱氨酸,还含有大约20%的丝氨酸<sup>[44]</sup>,还发现一些富含HGTPs但不含半胱氨酸的KAPs<sup>[40]</sup>,同时羊毛中还包含一些非角质化的蛋白组分,如角蛋白锚定蛋白桥粒蛋白(desmoplakin)、桥粒芯蛋白(desmoglein)和片珠蛋白(plakophilin),以及一些填充蛋白如核纤层蛋白和微管蛋白等<sup>[6,21]</sup>,且KAPs的命名和分类较为复杂<sup>[9]</sup>,因此目前依据半胱氨酸含量进行分类的方式并不足以描述KAPs家族的复杂性和多样性。

就绵羊KAP来说,已在绵羊中鉴定出89种羊毛KAPs,共分为17个家族(表2),包括44种多态亚家族<sup>[6,45-49]</sup>,具体是KAP1~KAP13、KAP15~KAP17和KAP19~KAP27,并根据半胱氨酸含量将这89种羊毛KAPs分为3大类<sup>[6,15]</sup>。其中,KAP1家族包括4个成员(KAP1.1、KAP1.2、KAP1.3和KAP1.4);KAP2在绵羊中有3个亚家族,但仅有2个蛋白质序列(BIIIA3A和BIIIA3)被报道,与人KAP2的5个家族相比,绵羊

BIIIA3A被称为人KAP2.1的直向同源物, 绵羊BIIIA3与人KAP2.3的部分DNA序列编码氨基酸相同, 迄今为止尚未报道绵羊KAP2.2的编码基因。KAP3家族包括4种蛋白, 已经分离并测序了3种主要蛋白质的完整序列, 即KAP3.2、KAP3.3和KAP3.4, 还在KAP3家族编码基因中发现1个假基因<sup>[15,21]</sup>。绵羊KAP4具有一个重复结构, 该结构覆盖了蛋白中段的大部分序列, 并且由含单个半胱氨酸和双半胱氨酸的五聚体重复结构串联体组成, 此外在绵羊中发现的27个亚家族均有较高的半胱氨酸含量<sup>[6]</sup>。KAP5具有富含半胱氨酸/丝氨酸或甘氨酸的重复结构, 也是最大的KAPs家族之

一, 该家族包括4个亚家族和1个假基因蛋白, 在绵羊中已鉴定出3个完整的DNA编码序列和1个部分DNA序列, 这些序列被命名为KAP5.1、KAP5.2、KAP5.4和KAP5.5。KAP6由甘氨酸-酪氨酸和甘氨酸-酪氨酸-甘氨酸重复单元组成, 是羊毛KAPs中含量较高且变化较大的重要组分之一。Southern杂交分析表明, 绵羊KAP6有多个家族成员, 小鼠中可能有多达20个家族成员。早期研究确定了绵羊中的两个KAP6成员, 分别命名为KAP6.1和KAP6.2, 但最近在绵羊基因组中发现并鉴定了另外3个成员(KAP6.3、KAP6.4和KAP6.5)<sup>[28,50-51]</sup>。绵羊KAP7和KAP8一直被认为仅包

表2 人类头发和(山羊和绵羊)羊毛中KAPs的分类及定位(根据参考文献[6,15]修改)

Table 2 Classification and locations of human, goat, and sheep KAPs (modified from references [6,15])

分类 Classification	家族 Family	亚家族及数量 Subfamily and number			定位 Location
		绵羊 Sheep	山羊 Goat	人 Human	
		HSPs	KAP1	4 (29)	
	KAP2	3	1	5+1	Cortex
	KAP3	3+1	2	3+1	Cortex
	KAP10	1		11+1 (10)	Cortex
	KAP11	1	1	1	Cortex
	KAP12	1	1	4+1	Cuticle
	KAP13	2	1	4+2	Cuticle/cortex
	KAP15	1	1	1	Cuticle/cortex
	KAP16	-	4	1	-
	KAP23	-		1	Cuticle/cortex
	KAP24	1		1	Cuticle
	KAP25	-		1	-
	KAP26	1		1	Cuticle
	KAP27	1		1	-
UHSPs	KAP4	27		11+1	Cortex
	KAP5	4+1 (6)		12+2	Cuticle
	KAP9	7	1	7+1	Cortex
	KAP17	-		1	Cuticle
HGTPs	KAP6	4 (4)	6	3	Cortex
	KAP7	1 (2)	1	1	Cortex
	KAP8	2 (3)	2	1+2	Cortex
	KAP16	4		-	Cortex
	KAP19	4		7+4	Cuticle/cortex
	KAP20	-		2	Cortex
	KAP21	2		2+1	Cuticle/cortex
	KAP22	-		1	-

“-”代表未发现该蛋白; “+”表示假基因数量; “()”中表示目前发现的亚家族多样性; 人KAP16.1和山羊KAP16为HSP, 绵羊KAP16.1为HGTP。

“-” represents the protein was not found; “+” represents the number of pseudogenes; the data in “()” represents the subfamily diversity found so far; human KAP16.1 and goat KAP16 belong to HSP, and sheep KAP16.1 belongs to HGTP.

含单一的蛋白家族成员,但最近发现并证实了KAP8的另一个成员,称为KAP8.2<sup>[52]</sup>。与KAP6家族相比,KAP8在物种间表现出更高的保守性,但其中甘氨酸-酪氨酸重复结构较少。KAP8.2则具有高达4.8%的天冬氨酸和谷氨酸含量,这与其他HGTPs显著不同,因此其等电点更低,而在物理特性方面KAP8的两个成员也表现出了明显差异,KAP8.1为弱碱性,而KAP8.2则为弱酸性<sup>[52]</sup>。在KAP9中发现了7个亚家族成员,而KAP10、KAP11和KAP12在绵羊中均仅有1个成员。命名为KAP11.1的蛋白是KAP11的唯一成员,其甘氨酸含量不高,但具有一定比例的丝氨酸和苏氨酸残基,二者占KAP11.1中残基的30%,虽不清楚这两种氨基酸的具体生物学功能,推测其可能与此蛋白的磷酸化有关<sup>[37]</sup>。绵羊KAP11.1的编码基因具有多态性,且与人、牛的同源基因具有高度相似性,证明绵羊KAP11.1与羊毛的细度有关<sup>[53]</sup>。与人类KAP13不同的是绵羊KAP13家族早期被认为只有1个成员,如今被认为有2个成员,而人毛发中有4个成员和2个假基因<sup>[6,54]</sup>。绵羊KAP13.3如同KAP11.1一样,其蛋白也含有大量的丝氨酸和苏氨酸,其中许多个氨基酸残基都可能在翻译后被修饰。KAP24在绵羊和人类中均只发现1个成员(KAP24.1),而在绵羊中存在多个等位基因,其含有中等水平的半胱氨酸和大量的丝氨酸和酪氨酸,而在其他HSPs或UHSPs中通常没有如此高含量的酪氨酸,这与人的KAP24.1无论在组分含量还是在C末端串联的十聚体重复结构上均有明显不同<sup>[37,39]</sup>,其在山羊中的基因多态性显著影响了羊绒纤维的直径<sup>[55]</sup>。在绵羊和山羊中新发现的KAP36.1有着高达63.2%的甘氨酸-酪氨酸含量,但其不含半胱氨酸,且人类中也不存在这一蛋白,KAP36.1与其他蛋白可能以氢键等形式相互作用<sup>[40]</sup>。随着蛋白研究技术的不断发展,或许有更多的毛发角蛋白家族会被发现并被不断加入到这一群体中。

## 5 HGTPs与羊毛特性

HGTPs即高甘氨酸-酪氨酸蛋白,是毛发KAPs家族的重要亚家族之一。羊毛HGTPs主要包含KAP6、KAP7和KAP8这3个成员,也是羊毛角蛋白中分子量最小的家族,因其相对富含甘氨酸-酪氨酸而得名。它们在不同羊毛中的含量不同,在结构与组成上,不同物种、同一物种不同品种动物的被毛中HGTPs的结构和含量差异也较大,这在很大程度上影响毛发纤

维的表型特征。据报道,在人的头发与绒山羊羊毛中,HGTPs含量大约只有3%~19%,但在针鼹鼠的刚毛中其含量可高达30%~40%,而在亮泽度增加的突变体绵羊的羊毛纤维中常常缺少HGTPs中的重要成分高甘氨酸-酪氨酸<sup>[56]</sup>,说明HGTPs的含量影响了毛发的表型特征。在来自同一个体绵羊的毛囊的转录组和基因组学研究中,发现羊毛的生长与HGTPs含量及其基因表达有关。鉴于羊毛中具有绝对含量优势的IFPs并不是影响羊毛弯曲的主要因素<sup>[23]</sup>,又有大量研究表明,表型不同的羊毛主要差异在于KAPs家族中的蛋白含量不同以及对应亚家族中蛋白种类不同<sup>[27,57]</sup>,因而推测HGTPs是影响羊毛表型特征的主要蛋白家族之一。利用多种分析技术对美利奴羊毛进行的研究表明,在正皮质细胞区HGTPs高度表达,在副皮质区HSPs高度表达<sup>[21,27]</sup>。研究还证明,美利奴羊毛中正副皮质呈两侧对称且均匀分布,这种分布被认为是形成羊毛弯曲的基础<sup>[18,58]</sup>。正皮质富含HGTPs且分布在弯曲的凸面,副皮质富含HSPs和半胱氨酸,分布在弯曲的凹面;而在相对弯曲较少的羊毛纤维中,HGTPs含量较低<sup>[7]</sup>。这些研究结果和正副皮质中所分别高度表达的HGTPs和HSPs具有高度一致性,也和羊毛蛋白分离鉴定的结果高度一致,即正皮质中富含酪氨酸、甘氨酸和苯丙氨酸,而其半胱氨酸含量低于副皮质<sup>[7]</sup>。人类头发也有着类似的结构,蒙古人的直发横截面中只有副皮质细胞,而高加索人的卷发中外围有一层正皮质细胞(但大部分为副皮质细胞),类似羊毛弯曲的黑人头发中正副皮质细胞呈不对称分布<sup>[7]</sup>。因此可以推测,正副皮质的相对含量和分布是决定羊毛细度和弯曲的重要因素,正皮质中的HGTPs含量和结构与羊毛的细度等特征具有重要关系。美利奴羊突变体的羊毛纤维本身的HGTPs的相对丰度很低,这表明突变体羊毛中HGTPs编码基因的转录或翻译减少甚至完全不表达。转录水平的检测表明,在突变体绵羊的毛囊中KAP6.1、KAP7.1和KAP8.1基因的转录水平下调,而KAP2.12和KAP4.2的转录水平上调,且在美利奴羊突变体中仅存在副皮质细胞,含有HGTPs的正皮质细胞缺失<sup>[59]</sup>,因此推测HGTPs影响了羊毛的表型特征,且其含量高低是主要影响因素。

KAP6的杂交定位研究显示,其在毛囊细胞皮层有明显表达,该层为分化的毛干角质化细胞层,而在其他部位均不表达<sup>[7]</sup>,毛囊蛋白组学的研究也证明了HGTPs家族基因表达的高度特异性<sup>[33]</sup>。KAP6的这

种高度组织特异性和不对称的表达方式和羊毛纤维结构高度一致,说明其对羊毛形成及特性有重要作用。绵羊KAP7和KAP8的研究相对很少,辽宁绒山羊KAP7.1和KAP8的研究结果表明,二者在表达量和组织定位上均具有高度特异性,KAP7.1和KAP8对绒山羊羊毛纤维的发育具有重要作用,同时KAP8.1被认为是调控绒山羊羊绒发育的主基因<sup>[60-61]</sup>。绵羊KAP8分子量较小,但其含量在不同毛发纤维中差异极大,在林肯羊羊毛中其含量为3%,在美利奴羊毛中为13%,在针鼹毛中为30%~40%<sup>[7]</sup>。绵羊KAP8和KAP6在羊毛发育中共同表达并且具有关联性,二者的表达量和羊毛纤维细度具有直接关系<sup>[62]</sup>。对转基因美利奴羊的研究表明,随着羊毛变粗,弯曲减少,KAP8的表达量显著下调<sup>[63]</sup>,这与美利奴羊自然突变体KAP6、KAP7和KAP8的表达显著下降的结果一致<sup>[59]</sup>,说明KAP6、KAP7和KAP8的表达直接影响了羊毛的细度和弯曲。同时多项研究表明,HGTPs家族中多个编码基因的多态性影响了羊毛的细度和其他重要经济性状,因此推测HGTPs基因家族的表达调控不但具有高度特异性,而且HGTPs家族是诸多KAPs中影响羊毛表型的关键蛋白。

## 6 角蛋白表达与羊毛的生长发育

不同绵羊品种以及品种内不同个体的羊毛在细度、弯曲和强度等多个性状上存在差异,尽管这些差异受多种因素的影响,但细度遗传力高达0.59<sup>[64]</sup>,可见遗传力是决定羊毛性状的主要因素。羊毛的组成成分复杂多样,基因表达错综复杂,发育过程由编码IFPs和KAPs两大家族蛋白的多基因调控,这些基因的时空表达对羊毛的物理和化学特性都具有直接且重要的影响。IFPs在羊毛中的含量和作用已经被证明对羊毛的细度无明显影响,而KAPs在羊毛中的含量差异和作用表明其与羊毛特征密切相关,且KAPs家族多个基因已被证实是分析羊毛纤维经济性状的重要候选基因<sup>[65-66]</sup>。KAPs呈现高度特异性的时空表达模式,除了在鳞片层或髓质中表达的少量KAPs以外,大多数KAPs基因的表达局限于在毛干生长的皮质区,但在各个KAPs亚家族中,mRNA或蛋白质表达的丰度和部位也有所不同。对弯曲羊毛的组织分析表明,凸凹面两侧的生长速度差异是造成羊毛弯曲的主要因素,这种差异的根本原因在于胚胎发育时期或更早就存在的非对称表达

现象<sup>[67]</sup>。具体表现在副皮质生长速度慢,正皮质生长速度快<sup>[68]</sup>。副皮质富含HSPs,正皮质富含HGTPs,相比之下正皮质受到失水的影响更大,在羊毛生成的角质化过程中更多的IFPs向正皮质区聚集,这种正副皮质的分布和两侧排列形成了羊毛的弯曲。但羊毛弯曲是一个复杂的表型特征,与多个基因的调控有关,正副皮质的表达分布与最终羊毛的特征的关系尚不完全清楚<sup>[67]</sup>。毛囊蛋白的表达是羊毛纤维生成的基础,2-DE研究表明,毛囊蛋白经过了大量变化才最终生成羊毛纤维。在毛囊球的上部,I型IFPs在较低pH环境中生成紧密连接的二聚体,II型IFPs在高pH环境下呈长条状,K35和大量上皮角蛋白集结在I型和II型蛋白之间。在毛囊蛋白表达和毛囊挤压物理作用下,这些蛋白迁移到毛囊的角质生成区,逐渐生成近似成熟的羊毛纤维。在角质化过程中I型蛋白发生了较小的变化,主要改变是角质化部分增加机械强度并变长,这种改变在2-DE图谱中也呈现出从单点到狭窄条纹带的蛋白斑点变化<sup>[21]</sup>。

羊毛生成起始阶段的初级结构是I型和II型IFPs生成的螺旋型卷曲的异源二聚体,随后两个异源二聚体反向平行生成四聚体,最后生成微纤维结构填充在毛囊细胞中<sup>[19]</sup>。羊毛蛋白在毛囊中的表达呈现严格的时空顺序,质谱鉴定证明在毛囊中表达的蛋白至少有87种<sup>[33]</sup>。原位杂交结果表明I型K35和II型K85在毛囊根鞘中最早表达,随后是K31,这些IFPs表达形成骨架,其他蛋白沿着毛发生成的方向依次表达<sup>[21,69]</sup>。同样,KAPs家族的原位杂交表明,IFPs形成骨架之后UHSPs家族的KAP4.3在毛囊副皮质表达,随后是KAP6.1在正皮质表达<sup>[31]</sup>,同时HSPs和UHSPs家族在另一侧的副皮质表达,然后在毛囊组织中HGTPs和HSPs呈交替、对称表达<sup>[7,70]</sup>,最早表达的这些毛发透明KAPs定位在毛囊球的球茎部,随着毛发的生长沿着延伸部位表达的是KAP11.1,在角质生成区表达的是KAP2.3和KAP13.1,在角质化部位表达的是KAP3.2、KAP4.7和KAP19.6<sup>[71]</sup>,HGTPs家族的KAP6和KAP7只在毛干部位表达<sup>[21,33]</sup>,这些蛋白最终经过角质化作用形成羊毛。在毛囊至毛干的不同部位,蛋白的表达也存在极大差异,在最终的羊毛纤维中根本看不到在毛发生成过程中表达的上皮角蛋白、锚定蛋白、胶原蛋白、核糖体蛋白和核酸蛋白,只有IFPs和KAPs蛋白家族<sup>[21]</sup>,而HGTPs和HSPs在毛囊组织中的交替表达模式形成了正皮质



位于凸面、副皮质位于凹面的对称分布<sup>[42]</sup>。利用免疫组化和显微分析对美利奴羊毛纤维(直径20 μm)蛋白组分进行的研究也证实了这一时空表达特点,即HGTPs在正皮质区高度表达, HSPs在副皮质区高度表达<sup>[27]</sup>。羊毛组分中氨基酸含量测定结果也和这些蛋白表达特点一致, 即正皮质中甘氨酸和酪氨酸含量高于副皮质<sup>[7]</sup>, 这也和HGTPs在正皮质中高度表达的结果完全一致<sup>[27]</sup>, 这种时空表达模式与人类头发的生长模式也几乎完全一致。绵羊羊毛角蛋白基因的表达还具有品种特异性及毛囊依赖性, 即不同品种的羊毛具有不同的基因表达模式, 而同一个体的不同毛囊之间的基因表达也存在差异, 这种表达差异或许是导致同一绵羊个体不同部位羊毛性状差异的根本原因。

同时, 羊毛生长过程中随着毛囊球细胞的分化, 不同的KAPs在不同时间和不同细胞位置被激活并受到严格的调控。在美利奴羊毛的毛囊中, IFPs编码基因首先被激活并出现在皮层区域, 随后才是KAPs的表达以及各基因的依次表达, 所有角蛋白基因的表达均受到严格调控, 并极具复杂性, 其中不同的角蛋白基因在纤维形成的不同阶段和毛囊的不同区域被激活。据此推测, 羊毛角蛋白的基因表达可能受到神经网络的严格调控, 研究并阐明调控这些基因表达差异的机制对于阐明羊毛的发育过程和细毛羊育种都有重要意义。

## 7 小结与展望

羊毛和其他很多哺乳动物的毛发和指甲一样, 都是皮肤衍生物, 主要成分是角蛋白, 但是羊毛的生长发育受到多种因素的影响, 加上不同的绵羊品种羊毛存在差异, 所以羊毛发育研究是一个复杂的课题。通过对羊毛的表型特征和成分进行分析, 结合不断发展的蛋白质分离鉴定技术, 在羊毛成分鉴定方面已经取得了巨大进展, 也在诸多角蛋白编码基因方面做了大量研究, 发现了大量与羊毛细度和弯曲等重要性状相关的基因信息, 为后续阐明这些角蛋白基因的表达调控与羊毛表型的关系提供了大量参考。但是羊毛的发育调控是一个极其复杂的过程, 也是哺乳动物随着对环境的适应不断进化的表型之一, 其角蛋白基因的复杂性和被毛量的多少有直接关联, 如树懒的被毛和角蛋白基因数量(175个KAPs基因)远超被毛稀少的海豚(35个KAPs基因), 而穿山

甲和刺猬的角蛋白基因表达情况又与众不同<sup>[72]</sup>。这些现象都足以说明毛发生长发育的多样性和复杂性, 同时基因表达的变化也直接决定了毛发的多样性, 虽然人类与猿类具有相同的KAPs基因库<sup>[72]</sup>, 但人类的头发和被毛与猿类却截然不同。毛发的生长发育是一个动物适应环境并相互作用的复杂过程, 也是一个动态变化的过程, 我们要用发展变化的科学态度来研究这一复杂的课题。

羊毛的转录组和蛋白组研究是继蛋白分离鉴定后对羊毛发育进行研究的重要手段, 但目前的研究显示, 转录组和蛋白组研究结果以及不同动物的毛发生长过程变化多样, 从另一方面表明了其特异性(绵羊品种、生长时期、毛囊部位)以及多样性和复杂性, 也说明不同物种的角蛋白在进化中可能有其自身的进化特点和环境适应性。不过也有人认为转录组和蛋白组是两个时空表达的物质, 相关性本来就不高。另外, 羊毛的毛干和毛囊不同部位的角蛋白含量和组分各有不同, 角蛋白在通过角质化形成毛干的过程中发生蛋白的修饰, 但磷酸化可能仅发生在某些特异性的蛋白和毛囊部位, 也有研究认为羊毛发育中不存在蛋白的磷酸化过程<sup>[73]</sup>, 这些都是需要进一步研究的问题。随着未来蛋白质研究技术的不断革新和研究的深入, 研究人员会越来越了解并阐明这些生命中的奥秘, 也会为细毛羊的选育提供更加便捷的标记, 更好地开发动物资源, 造福人类。

## 参考文献 (References)

- [1] 陈睿. 羊毛的主要物理特性及其影响因素[J]. 甘肃畜牧兽医(CHEN R. The main physical characteristics of wool and its influencing factors [J]. Gansu Animal Husbandry and Veterinary), 2015, 45(3): 46-57.
- [2] 牛春娥, 高雅琴, 郭天芬. 羊毛纤维细度检验方法及研究进展[J]. 现代畜牧兽医(NIU C E, GAO Y Q, GUO T F. Wool fiber fineness inspection methods and research progress [J]. Mod J Anim Husb Vet Med), 2007, (6): 66-8.
- [3] 李少斌. 世界羊毛业现状和发展趋势[J]. 养殖与饲料(LI S B. Status and development trend of world wool industry [J]. Animals Breeding and Feed), 2018, 11: 5-8.
- [4] GODDARD D R, MICHAELIS L. A study on keratin [J]. J Biol Chem, 1934, 106(2): 605-14.
- [5] MCLAREN R J, ROGERS G R, DAVIES K P, et al. Linkage mapping of wool keratin and keratin-associated protein genes in sheep [J]. Mamm Genome, 1997, 8(12): 938-40.
- [6] PLOWMAN J E, DEB-CHOUDHURY S. Wool Proteomics [M]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 211-23.
- [7] KOEHN H, CLERENS S, DEB-CHOUDHURY S, et al.

- Higher sequence coverage and improved confidence in the identification of cysteine-rich proteins from the wool cuticle using combined chemical and enzymatic digestion [J]. *J Proteomics*, 2009, 73(2): 323-30.
- [8] MCKITTRICK J, CHEN P Y, BODDE S G, et al. The structure, functions, and mechanical properties of keratin [J]. *Jom*, 2012, 64: 449-68.
- [9] GONG H, ZHOU H, MCKENZIE G W, et al. An updated nomenclature for keratin-associated proteins (KAPs) [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 258-64.
- [10] ZHOU H, VISNOVSKA T, GONG H, et al. Contrasting patterns of coding and flanking region evolution in mammalian keratin associated protein-1 genes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2019, 133: 352-61.
- [11] CALDWELL J P, MASTRONARDE D N, WOODS J L, et al. The three-dimensional arrangement of intermediate filaments in Romney wool cortical cells [J]. *J Struct Biol*, 2005, 151(3): 298-305.
- [12] ROGERS G E. Biology of the wool follicle: an excursion into a unique tissue interaction system waiting to be re-discovered [J]. *Exp Dermatol*, 2006, 15(12): 931-49.
- [13] ORWIN D F G, WOODS J L. Wool-fibre diameter and cortex cell type [J]. *J Text I*, 1980, 71(6): 315-17.
- [14] 郭颖杰, 佟金. 角蛋白材料结构与力学特性研究进展 [J]. *农业工程学报* (GUO Y J, TONG J. Research progress in structure and mechanical properties of keratin materials [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*), 2004, 20(3): 266-70.
- [15] PLOWMAN J E. Diversity of trichocyte keratins and keratin associated proteins [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1054: 21-32.
- [16] PLOWMAN J E, BRYSON W G, JORDAN T W. Application of proteomics for determining protein markers for wool quality traits [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(9): 1899-906.
- [17] 管峰, 石国庆, 刘守仁, 等. 角蛋白家族及其对羊毛生长发育的调控 [J]. *生命的化学* (GUAN F, SHI G Q, LIU S R, et al. Keratin family and its regulation on wool growth and development [J]. *Chem Life*), 2007, 27(1): 92-4.
- [18] PLOWMAN J E, PATON L N, BRYSON W G. The differential expression of proteins in the cortical cells of wool and hair fibres [J]. *Exp Dermatol*, 2007, 16(9): 707-14.
- [19] MARSHALL R C, ORWIN D F, Gillespie J M. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin [J]. *Electron Microsc Rev*, 1991, 4(1): 47-83.
- [20] BRADBURY J H. The structure and chemistry of keratin fibers [J]. *Adv Protein Chem*, 1973, 27: 111-211.
- [21] PLOWMAN J E. *Proteomics in wool and fibre research* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2018, 281-96.
- [22] KOEHN H, CLERENS S, DEB-CHOUDHURY S, et al. The proteome of the wool cuticle [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 2920-8.
- [23] HARLAND D P, VERNON J A, WOODS J L, et al. Intrinsic curvature in wool fibres is determined by the relative length of orthocortical and paracortical cells [J]. *J Exp Biol*, 2018, 221(6): jeb172312.
- [24] 白玲荣, 杨佐青, 陶金忠. 滩羊羊毛蛋白质双向电泳图谱体系的建立及优化 [J]. *中国草食动物科学* (BAI L R, YANG Z Q, TAO J Z. Establishment and optimization of the system of bidirectional electrophoresis of sheep wool protein [J]. *China Herbivore Science*), 2018, 38(1): 18-22.
- [25] 高丽霞, 张燕军, 张文广, 等. 内蒙古白绒山羊毛囊发育周期蛋白质表达谱分析 [J]. *农业生物技术学报* (GAO L X, ZHANG Y J, ZHANG W G, et al. Analysis of protein expression profile of hair follicle cycle of inner mongolia cashmere goat (capra cashmere) [J]. *Chin J Agric Biotechnol*), 2014, 22(6): 727-35.
- [26] WONG S Y, HASHIM O H, HAYASHI N. Development of high-performance two-dimensional gel electrophoresis for human hair shaft proteome [J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0213947.
- [27] PLOWMAN J E, DEB-CHOUDHURY S, BRYSON W G, et al. Protein expression in orthocortical and paracortical cells of merino wool fibers [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(6): 2174-80.
- [28] PLOWMAN J E, DEB-CHOUDHURY S, CLERENS S, et al. Unravelling the proteome of wool: towards markers of wool quality traits [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(14): 4315-24.
- [29] KIRMSE R, BOUCHET-MARQUIS C, PAGE C, et al. Three-dimensional cryo-electron microscopy on intermediate filaments [J]. *Methods Cell Biol*, 2010, 96: 565-89.
- [30] HERBERT B R, CHAPMAN A L P, RANKIN D A. Investigation of wool protein heterogeneity using two-dimensional electrophoresis with immobilised pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 1996, 17(1): 239-43.
- [31] YU Z, WILDERMOTH J E, WALLACE O A, et al. Annotation of sheep keratin intermediate filament genes and their patterns of expression [J]. *Exp Dermatol*, 2011, 20(7): 582-8.
- [32] YU Z, GORDON S W, NIXON A J, et al. Expression patterns of keratin intermediate filament and keratin associated protein genes in wool follicles [J]. *Differentiation*, 2009, 77(3): 307-16.
- [33] PLOWMAN J E, HARLAND D P, GANESHAN S, et al. The proteomics of wool fibre morphogenesis [J]. *J Struct Biol*, 2015, 191(3): 341-51.
- [34] WATTS N R, JONES L N, CHENG N, et al. Cryo-electron microscopy of trichocyte (hard alpha-keratin) intermediate filaments reveals a low-density core [J]. *J Struct Biol*, 2002, 137(1/2): 109-18.
- [35] HARLAND D P, NOVOTNA V, RICHENA M, et al. Helical twist direction in the macrofibrils of keratin fibres is left handed [J]. *J Struct Biol*, 2019, 206(3): 345-8.
- [36] POWELL B C. The keratin proteins and genes of wool and hair [J]. *Wool Tech Sheep Bree*, 1996, 44: 100-18.
- [37] GONG H, ZHOU H, FORREST R H, et al. Wool keratin-associated protein genes in sheep-a review [J]. *Genes (Basel)*, 2016, 7(6): 24.
- [38] PLOWMAN J E, BRYSON W G, FLANAGAN L M, et al. Problems associated with the identification of proteins in homologous families: the wool keratin family as a case study [J]. *Anal Biochem*, 2002, 300(2): 221-9.
- [39] 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): 62-5.

- [40] GONG H, ZHOU H, WANG J, et al. Characterisation of an ovine keratin associated protein (KAP) gene, which would produce a protein rich in glycine and tyrosine, but lacking in cysteine [J]. *Genes*, 2019, 10(11): 848.
- [41] ROGERS M A, SCHWEIZER J. Human KAP genes, only the half of it? Extensive size polymorphisms in hair keratin-associated protein genes [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(6): vii-ix.
- [42] ROGERS M A, LANGBEIN L, PRAETZEL-WUNDER S, et al. Human hair keratin-associated proteins (KAPs) [J]. *Int Rev Cytol*, 2006, 251: 209-63.
- [43] 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.
- [44] RECHICHE O, PLOWMAN J E, HARLAND D P, et al. Expression and purification of high sulfur and high glycine-tyrosine keratin-associated proteins (KAPs) for biochemical and biophysical characterization [J]. *Protein Express Purif*, 2018, 146: 34-44.
- [45] ROGERS G R, HICKFORD J G H, BICKERSTAFFE R. Polymorphism in two genes for B2 high sulfur proteins of wool [J]. *Anim Genet*, 1994, 25(6): 407-15.
- [46] ITENGE-MWEZA T O, FORREST R H, MCKENZIE G W, et al. Polymorphism of the KAP1.1, KAP1.3 and K33 genes in Merino sheep [J]. *Mol Cell Probes*, 2007, 21(5/6): 338-42.
- [47] GONG H, ZHOU H, PLOWMAN J E, et al. Analysis of variation in the ovine ultra-high sulphur keratin-associated protein KAP5-4 gene using PCR-SSCP technique [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31: 3545-7.
- [48] GONG H, ZHOU H, PLOWMAN J E, et al. Search for variation in the ovine KAP7-1 and KAP8-1 genes using polymerase chain reaction-single-stranded conformational polymorphism screening [J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(3): 367-70.
- [49] GONG H, ZHOU H, HICKFORD J G. Diversity of the glycine/tyrosine-rich keratin-associated protein 6 gene (KAP6) family in sheep [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 31-5.
- [50] FRATINI A, POWELL B C, ROGERS G E. Sequence, expression, and evolutionary conservation of a gene encoding a glycine/tyrosine-rich keratin-associated protein of hair [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 4511-8.
- [51] ZHOU H, GONG H, WANG J, et al. Identification of four new gene members of the KAP6 gene family in sheep [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24074.
- [52] GONG H, ZHOU H, DYER J M, et al. The sheep KAP8-2 gene, a new KAP8 family member that is absent in humans [J]. *SpringerPlus*, 2014, 3: 528.
- [53] GONG H, ZHOU H, DYER J M, et al. Identification of the ovine KAP11-1 gene (KRTAP11-1) and genetic variation in its coding sequence [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8): 5429-33.
- [54] ROGERS M A, WINTER H, LANGBEIN L, et al. The human type I keratin gene family: characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain [J]. *Differentiation*, 2004, 72(9/10): 527-40.
- [55] WANG J, ZHOU H, LUO Y, et al. Variation in the caprine KAP24-1 gene affects cashmere fibre diameter. *Animals*, 2019, 9(1): 15.
- [56] 高建军, 谢婷婷, 李树伟, 等. 和田羊毛囊KAP7基因的原核表达及其生物信息学分析 [J]. *中国畜牧杂志* (GAO J J, XIE T T, LI S W, et al. Prokaryotic expression and bioinformation analysis of wool follicle KAP7 of Hetian sheep [J]. *Chin J Anim Sci*), 2014, 50(21): 63-8.
- [57] HARLAND D P, CALDWELL J P, WOODS J L, et al. Arrangement of trichokeratin intermediate filaments and matrix in the cortex of Merino wool [J]. *J Struct Biol*, 2011, 173(1): 29-37.
- [58] 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]. *J Struct Biol*, 2013, 183(3): 484-94.
- [59] LI S W, OUYANG H S, ROGERS G E, et al. Characterization of the structural and molecular defects in fibres and follicles of the Merino felting lustre mutant [J]. *Exp Dermatol*, 2008, 18(2): 134-42.
- [60] ZHAO M, CHEN H, WANG X, et al. aPCR-SSCP and DNA sequencing detecting two silent SNPs at KAP8.1 gene in the cashmere goat [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(6): 1387-91.
- [61] JIN M, WANG L, LI S, et al. Characterization and expression analysis of KAP7.1, KAP8.2 gene in Liaoning new-breeding cashmere goat hair follicle [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 3023-8.
- [62] PARSONS Y M, COOPER D W, PIPER L R. Evidence of linkage between high-glycine-tyrosine keratin gene loci and wool fibre diameter in a Merino half-sib family [J]. *Anim Genet*, 1994, 25(2): 105-8.
- [63] BAWDEN C S, POWELL B C, WALKER S K, et al. Expression of a wool intermediate filament keratin transgene in sheep fibre alters structure [J]. *Transgenic Res*, 1998, 7: 273-87.
- [64] SAFARI E, FOGARTY N M, GILMOUR A R. A review of genetic parameter estimates for wool, growth, meat and reproduction traits in sheep [J]. *Livest Prod Sci*, 2005, 92(3): 271-89.
- [65] 石国庆, 管峰, 唐红, 等. 角蛋白HGTP及其对羊毛发育的影响 [J]. *中国细胞生物学报* (SHI G Q, GUAN F, TANG H, et al. Keratin HGTP gene and its effects on wool fiber development [J]. *Chin J Cell Biol*), 2011, 33(3): 322-6.
- [66] 管峰, 潘磊, 石国庆, 等. 羊毛经济性状主基因研究进展 [J]. *中国畜牧兽医* (GUAN F, PAN L, SHI G Q, et al. Research progress on major genes of wool economic traits [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2008, 35(8): 66-70.
- [67] 肖平, 仲涛, 刘占发, 等. 绵、山羊毛囊发育与毛发弯曲机制研究进展 [J]. *畜牧兽医学报* (XIAO P, ZHONG T, LIU Z F, et al. Research progress of mechanism of hair follicle development and hair curvature in sheep and goat [J]. *Acta Veterinaria et Zootecnica Sinica*), 2018, 49(8): 6-15.
- [68] ROGERS G E. Electron microscopy of wool [J]. *J Ultrastruct Res*, 1959, 2(3): 309-30.
- [69] LANGBEIN L, ROGERS M A, WINTER H, et al. The catalog of human hair keratins II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 35123-32.

- [70] DUNN S M, KEOUGH R A, ROGERS G E, et al. Regulation of a hair follicle keratin intermediate filament gene promoter [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111: 3487-96.
- [71] 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]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 48993-9002.
- [72] KHAN I, MALDONADO E, VASCONCELOS V, et al. Mammalian keratin associated proteins (KRTAPs) subgenomes: disentangling hair diversity and adaptation to terrestrial and aquatic environments [J]. *BMC genomics*, 2014, 15: 779.
- [73] PATON L N, GERRARD J A, BRYSON W G. Investigations into charge heterogeneity of wool intermediate filament proteins [J]. *J Proteomics*, 2008, 71(5): 513-29.