

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01314

Slc7a11 基因在不同被毛颜色哈萨克羊皮肤组织中的表达分析

李洪涛^{1,3}, 何新², 周志勇², 赵松华¹, 张文祥¹, 刘钢³, 赵宗胜¹, 贾斌¹

1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832003;
2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;
3. 石河子大学医学院, 石河子 832003

摘要: *Slc7a11* 基因属于溶质转运家族, 编码胱氨酸/谷氨酸 xCT 转运载体, 经证实该基因调控黑色素与伪黑色素的转换。文章利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *Slc7a11* 基因在 3 种不同毛色哈萨克绵羊羔羊皮肤组织中的 mRNA 转录水平, 构建原核表达载体, 诱导表达融合蛋白, 并对包涵体蛋白进行纯化, 免疫新西兰大白兔制备抗血清, 最后检测不同毛色皮肤中该蛋白的表达水平。结果表明, *Slc7a11* 基因在 3 种毛色皮肤中的表达水平有显著差异, 棕色被毛皮肤中表达水平最高, 其次是黑色, 在白色中表达最少。利用纯化的融合蛋白制备多克隆抗体, 发现 sxCT 蛋白在棕色被毛中表达最高, 其次是黑色, 白色最低, 因此, *Slc7a11* 基因可能与哈萨克绵羊毛色表型有相关性。

关键词: 哈萨克绵羊; *Slc7a11*; 融合蛋白; 多克隆抗体

Expression levels of *Slc7a11* in the skin of Kazakh sheep with different coat colors

LI Hong-Tao^{1,3}, HE Xin², ZHOU Zhi-Yong², ZHAO Song-Hua¹, ZHANG Wen-Xiang¹, LIU Gang³, ZHAO Zong-Sheng¹, JIA Bin¹

1. College of Animal Science and Tecnology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
3. Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832003, China

Abstract: *Slc7a11* belongs to solute transporter gene family, encoding cystine/glutamate transporter xCT. It regulates switching between eumelanin and pheomelanin synthesis. In the present study, Real-time PCR was used to detect the mRNA expression levels of *Slc7a11* in the skin of Kazakh lambs with different coat colors (black, brown and white), and then the prokaryotic expression plasmid PET-32a-sxCT was constructed to induce the expression of fusion protein. The

收稿日期: 2012-06-22; 修回日期: 2012-08-20

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2009ZX08009-158B)资助

作者简介: 李洪涛, 博士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 13239930213; E-mail: lht_fangfang@yahoo.com.cn

通讯作者: 赵宗胜, 博士, 教授, 研究方向: 动物分子育种。E-mail: zhaozongsh@shzu.edu.cn

贾斌, 博士, 教授, 研究方向: 动物分子遗传学和动物生长调控的神经内分泌学。E-mail: jiabin@shzu.edu.cn

网络出版时间: 2012-9-10 03:18:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120910.1518.008.html>

target protein was purified by Ni-NTA affinity chromatographic separation, and then was used to immunize rabbit in order to produce rabbit anti-sxCT polyclonal antibody. Finally, the expression levels of sxCT were detected in the skin of Kazakh lambs with different hair colors by Western blotting analysis. Results showed that the mRNA expression levels of *Slc7a11* differed significantly in the skin of Kazakh lambs with different coat colors, with the highest level in brown coat color, followed by the black, and then the white. The sxCT protein was also detected in the skin of different coat colors by polyclonal antibody, with the highest level in brown coat color, followed by the black, and then the white. It is, therefore, concluded that *slc7a11* gene might be associated with the phenotype of coat color in Kazakh sheep.

Keywords: Kazakh sheep; *Slc7a11*; fusion protein; polyclonal antibody

动物体内存在控制被毛颜色的真黑色素(Eumelanin)和伪黑色素(Pheomelanin)两种色素成分,分别形成被毛的黑色和金黄色。伪黑色素(红/黄)是通过过多的半胱氨酸形成多巴醌造成的^[1]。

Slc7a11 基因属于溶质转运第 7 家族的第 11 个成员,该基因编码胱氨酸/谷氨酸xCT 转运载体,是Na⁺ 独立阴离子氨基酸转运系统,命名为X_C⁻转运体。该X_C⁻系统由催化轻链xCT和调控重链 4F2hc构成,xCT 蛋白位于细胞膜表面,将细胞外的胱氨酸摄入细胞内,同时与谷氨酸以 1:1 交换将谷氨酸运出细胞外。胱氨酸进入细胞内后会很快还原成半胱氨酸,它是谷胱甘肽(GSH)合成的限速底物^[2,3]。*Slc7a11* 基因直接作用于多巴醌到半胱氨酸多巴途径从而维持动物体内正常的伪黑色素的合成^[4]。

当*Slc7a11* 基因突变后,其编码的xCT蛋白缺乏,这种氨基酸转运载体失去功能后,细胞不能摄取足够的胱氨酸来还原成半胱氨酸以满足细胞内合成伪黑色素的需要,因此毛色主要表现为真黑色素的黑色,而缺乏伪黑色素所产生的金黄色。*Slc7a11* 基因突变的小鼠(*sut*)毛发中表现为明显的伪黑色素水平降低,而真黑色素水平基本不变,从而使黄色背景的野生型小鼠表现为灰色^[5]。

这一发现解释了突变小鼠被毛变色的原因,目前该同源基因在绵羊中已被克隆。与绵羊毛色相关的基因有*MC1R*^[6]、*ASIP*^[7]和*TYRP-1*^[8]等,但这些都不足以说明毛色形成的机制。哈萨克绵羊是我国新疆特殊的地理条件和气候条件下长期进化和适应而形成的地方品种,有着丰富的被毛颜色,是研究绵羊毛色形成机制的很好样本。本研究通过实时荧光定量PCR检测*Slc7a11* 基因在不同毛色哈萨克羔羊皮肤组织中的mRNA表达水平,构建原核表达载体,

表达融合蛋白,将蛋白纯化制备抗血清,利用Western blotting进一步检测该基因表达的蛋白sxCT在不同被毛皮肤中的含量,探索*Slc7a11* 在哈萨克羊毛色形成过程中的作用,期望能丰富绵羊被毛颜色形成的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用皮肤组织采自新疆农九师 165 团 2 周龄的哈萨克羔羊,白色、棕色和黑色被毛各 5 只。取左肩胛部 0.5 cm²的皮肤组织,置于液氮中保存,用于提取RNA。性成熟的雄性新西兰大白兔 3 只由石河子大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 实时定量 PCR 检测

以持家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)为内参(GenBank 登录号: AF030943),根据绵羊 *Slc7a11* mRNA 序列(GenBank 登录号: JQ085938),用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1),由北京华大基因公司合成。

总RNA按照TRIzol提取试剂说明书进行提取。提取的总RNA经 0.8%的琼脂糖凝胶电泳和全分光光度计检测确定其质量和纯度($OD_{260}/OD_{280}=1.8 \sim 2.0$)。用含有gDNA Eraser的试剂盒(TaKaRa)对总RNA进行反转录,产物保存于-20 °C 备用,剩余RNA于-80 °C 保存。

扩增目的基因 *Slc7a11* 及 *GAPDH*,将 PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化。回收的 DNA 片段与

表 1 扩增 *Slc7a11* 和 *GAPDH* 基因的引物信息

目的基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
<i>Slc7a11</i>	F : TTCACAACCATTAGTGCCGAGG	274
	R : GCATTATCATTGTCAAAGGGTG	
<i>GAPDH</i>	F : GTCCGTTGTGGATCTGACCT	130
	R : GGAGACAACCTGGTCCTCAG	

pGM-T 载体连接, 并转化感受态 *E. coli* DH5 α 菌株。挑取阳性克隆, 提取质粒, PCR 鉴定后, 送北京华大基因公司测序。

采用两步法 SYBR Green 荧光实时定量 PCR 检测 *Slc7a11* 基因的 mRNA 表达水平, 每个样品做 3 个重复, 用克隆有目的片段的质粒稀释后作为标准品, 将质粒 10 倍梯度稀释制作标准曲线。反应体系为 25 μ L : 1 μ L 质粒或 cDNA 产物, 0.5 μ L 上游和下游引物 (10 μ mol/L), 11.25 μ L 2 \times SYBR green, 11.75 μ L ddH₂O。反应程序为: 95 预变性 4 min; 95 15 s, 53 复性 30 s, 72 1 min, 40 个循环; 95 1 min; 53 复性 30 s; 95 30 s。

1.2.2 *Slc7a11* 基因的原核表达及抗血清的制备

利用抗原表位预测网站“<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>”预测 *Slc7a11* 基因的抗原表位, 设计原核表达引物, 上游引物为 5'-TATGAATTTCGAAATCTGGTGGTCATTA CAC-3' (划线为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物为 5'-TATCTCGAGAGCTGCATCACTCCAGGGAC-3' (划线为 *Xho* I 酶切位点)。PCR 扩增程序: 94 预变性 5 min; 94 30 s, 57 30 s, 72 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化。回收的 DNA 片段与 pGM-T 载体连接, 并转化感受态 *E. coli* DH5 α 菌株, 提取质粒、酶切、测序鉴定。利用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 从克隆载体 pGM-T-sxCT 中得到 sxCT cDNA, 电泳回收目的片段, 与经相同处理得到的线性原核表达载体 pET-32a 连接, 构建原核表达载体 pET-32a-sxCT。

将正确的重合质粒 pET-32a-sxCT 转化入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 提取质粒、酶切鉴定。挑选单菌落接种于 1 mL 含氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 培养基, 37 振荡培养过夜; 取过夜培养物以 1 : 100 ~ 1 : 200 的比例接入新的含氨苄青霉素 LB 培养基中, 培养至对数期 ($OD_{600} \approx 0.6$) 时, 加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续诱导 5 h, 收集菌体。用 2 \times 上

样缓冲液裂解, 沸水煮 10 min, 收集上层裂解液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

重组蛋白包涵体的纯化。离心收集 1 L 诱导表达的菌液, 用冰的 PBS 洗涤菌泥 3 次, 加入裂解缓冲液 (20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L 氯化钠, 15 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 30 mL, 混匀后用液氮反复冻融 2 次, 加入溶菌酶 (100 mmol/L) 1 : 100, 冰上静置 30 min。然后再加入 Triton X-100 1 : 100, 蛋白酶抑制剂 (100 \times) 1 : 100, 冰浴超声 (200 瓦, 超 3 s, 停 4 s, 30 min)。10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀加入 8 mol/L 尿素 20 mL, 4 过夜。12 000 r/min 离心 20 min, 取上清与 2 mL Ni-NTA (Qiagen) 树脂亲和柱冰浴结合 30 min (在摇床中进行 50 r/min)。1 500 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入洗涤液 (20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L 氯化钠, 30 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素 pH 7.4) 5 mL, 冰上摇 10 min, 离心弃上清, 洗 3 次。加入洗脱液 (20 mmol/L 磷酸钠, 500 mmol/L 氯化钠, 400 mmol/L 咪唑, 8 mol/L 尿素 pH 7.4) 1 mL, 冰上摇 10 min, 离心收集上清, 洗脱 5 次。将洗脱液加入透析袋中, 分别用 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、1 mol/L 尿素和蒸馏水进行透析, 用磁力搅拌器搅拌, 6 ~ 8 h/次, 4 。最后用蔗糖进行浓缩, -80 保存蛋白。

抗血清的制备及抗原性检测。用纯化的重组 sxCT 蛋白为免疫原与等体积弗氏完全佐剂混合, 冰上研磨充分乳化, 于家兔背部多点皮下注射, 剂量为 1 mg/只。注射间隔时间为 10 d, 将相同剂量的纯化蛋白与等量弗氏不完全佐剂乳化后进行第 2 次免疫。第 3、4、5 次免疫同第 2 次, 第 3 次免疫后进行试血, 用双向琼脂扩散法检测抗体效价。最后一次免疫后第 6 d 心脏采血, 分离血清, -20 。

1.2.3 哈萨克绵羊 sxCT 蛋白在不同被毛皮肤中的表达

将绵羊皮肤组织在液氮中研磨, 取 20 mg 加入 200 μ L 的 RIPA 裂解液、2 μ L 蛋白酶抑制剂 (Sigma,

100×), 混匀后冰浴 30 min, 期间颠倒混匀 5 次。12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 对蛋白样品进行 BCA 法蛋白定量, 取 50 μ L 加入 2×上样缓冲液, 100 变性 10 min, 取 20 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白用半干法转到硝酸纤维素(NC)膜上, 用 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 用 PBST 洗膜 2 次, 每次 10 min, 然后分别用相应抗体(sxCT 1:100; β -actin 1:1000) 4 孵育过夜, 用 PBST 洗膜 4 次, 每次 10 min。将 NC 膜与 IgG/HRP 标记的山羊抗兔抗体(1:2000)室温孵育 1.5 h, 用 PBST 洗膜 4 次, 10 min/次。用 DAB 试剂显色。

1.2.4 数据分析

实验数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS17.0 For Windows 软件进行数据分析, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及 LSD 进行检验。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量的方法表示两个样本的相对表达量^[9], 公式为:

平均相对含量=目的样品的相对含量/对照样品的相对含量= $2^{-\text{平均数}\Delta\Delta CT}$

其中 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{目的样品}} - \Delta CT_{\text{对照样品}}$, $\Delta CT_{\text{目的样品}} = CT_{\text{目的样品}} - CT_{\text{内参}}$, $\Delta CT_{\text{对照样品}} = CT_{\text{对照样品}} - CT_{\text{内参}}$, 内参为绵羊 *GAPDH* 基因。

2 结果与分析

2.1 扩增片段的分析

扩增的哈萨克绵羊 *Slc7a11* 及克隆的原核表达基因 *sxCT* 的片段大小分别为 274 bp 和 324 bp, 符合预测结果, 条带清晰。将扩增的片段胶回收后克隆到 PGM-T 载体, 对阳性克隆测序。通过 DNAMAN 软件进行比对分析, 克隆的 *Slc7a11* 和 *sxCT* 序列与原序列的序列相似性都为 100%。克隆的 *Slc7a11* 序列通过 Blastn 分析, 与 GenBank 中牛、猪、犬、人的 *Slc7a11* 基因对应序列相似性都为 95%。

2.2 *Slc7a11* 在不同被毛哈萨克羊皮肤组织中的 qRT-PCR 表达情况

利用实时定量 PCR 检测 *Slc7a11* 基因在不同被毛颜色哈萨克羊皮肤组织中均有表达(图 1)。结果表明, 该基因在棕色被毛皮肤中的表达量最高, 是白色的 5.3 倍, 黑色是白色的 3.7 倍, 棕色和黑色与

白色比较差异极显著($P < 0.01$), 黑色和棕色比较差异显著($P < 0.05$)。在棕色中有 1 只羊的表达量略低于黑色。

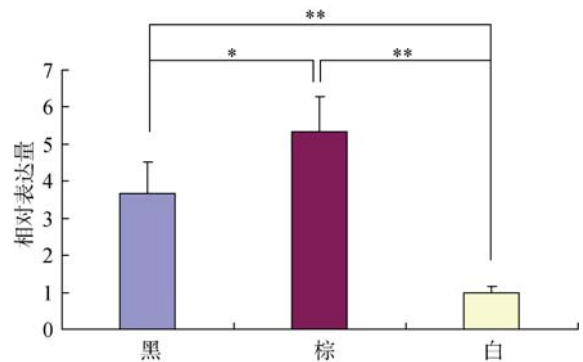


图 1 *Slc7a11* mRNA 在不同被毛哈萨克羊中的定量表达: 黑: 黑色被毛皮肤; 棕: 棕色被毛皮肤; 白: 白色被毛皮肤; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 融合蛋白的表达、纯化及抗体制备

将重组质粒 pET-32a-sxCT 在大肠杆菌 BL21 (DE2) 中大量表达, 优化 IPTG 诱导浓度为 0.5 mmol/L, 诱导 5 h 产物经 SDS-PAGE 电泳显示一条较浓的约 30 kDa 的蛋白条带, 而空载体和未诱导对照组未出现该蛋白大小条带(图 2)。菌液超声后, 在沉淀中检测到有目的条带, 上清在相应的位置没有条带, 证明表达蛋白以包涵体的形式存在。

对融合蛋白形成的包涵体利用 8 mol/L 尿素溶解, 通过 Ni-NTA 树脂亲和层析进行纯化, 纯化产物经 SDS-PAGE 检测, 呈现单一蛋白带。将纯化后的蛋白免疫新西兰大白兔, 免疫第 5 次后心脏采血,

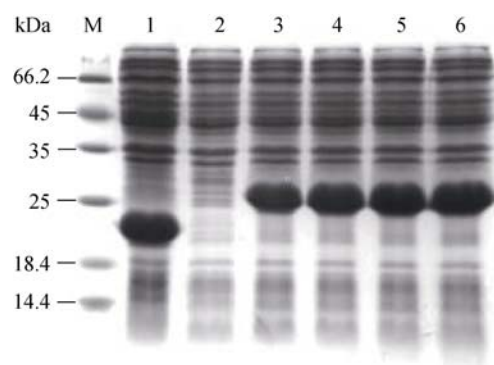


图 2 原核表达 PET-32a-sxCT 融合蛋白的 SDS-PAGE 检测 M: 非预染 Marker; 1: 诱导的空载体 PET-32a; 2: 诱导前的 PET-32a-sxCT; 3~6: 诱导后的 PET-32a-sxCT。

分离血清进行琼脂双向免疫扩散试验, 可以看到明

显的抗原抗体复合物沉淀带,证明纯化的重组蛋白有良好的抗原性(图 3)。

2.4 Western blotting 检测不同毛色皮肤 sxCT 蛋白的表达

提取被毛颜色为黑色、棕色和白色的哈萨克羔羊皮肤组织中的总蛋白,取 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白电转到 NC 膜上,用制备的抗 sxCT 血清按 1:100 倍稀释作为一抗,以 Western blotting 方法分别检测 3 种被毛颜色哈萨克羔羊皮肤组织中 sxCT 的表达水平(图 4),从结果中可以看出,在棕色羊中该蛋白表达水平最高,黑色羊次之,白色羊最少。



图 3 纯化的融合蛋白与兔抗血清的双向琼脂免疫扩散结果

箭头所指的位置是抗原抗体复合物沉淀。



图 4 sxCT 在不同毛色哈萨克羔羊皮肤组织中的表达情况

3 讨论

溶质转运家族(Solute carrier family, SLC)是哺乳动物细胞膜转运蛋白的主要成员。*Slc7a11* 是 SLC 家族的成员之一,SLC 由阳离子氨基酸转运体(CAT 家族, *Slc7a 1-4*)和糖蛋白相关氨基酸转运体(gpaAT 家族, *Slc7a 5-11*)两个亚群组成。辅助糖蛋白(重链)4F2hc(CD89)或rBAT形成 SLC3 家族。糖蛋白相关

氨基酸转运体有 12 个假定跨膜区,没有糖基化,它需要和 SLC3 家族(重链 4F2hc 或 rBAT)的糖蛋白结合才能在细胞表面表达^[10,11]。*Slc7a11* (xCT)参与编码异二聚体氨基酸转运体系统 X_C⁻。系统 X_C⁻ 由 *Slc7a11* 和 SLC3A2(4F2hc 或 CD89)两个亚单位组成。该系统将细胞外的胱氨酸摄入细胞内,同时与谷氨酸以 1:1 交换将谷氨酸运出细胞外^[11]。系统 X_C⁻ 的活性转移依赖于 xCT。4F2hc 重链是一些氨基酸转运体的常见配对物,它作为伴侣蛋白的主要功能是引导配对蛋白到质膜^[11]。

毛色是受色素生物合成过程中不同基因控制的,其颜色的不同主要由于伪黑色素(红、黄色)和真黑色素(黑色)的不同比例而产生。目前提出的主要模式是,哺乳动物色素中真黑色素/伪黑色素的比例是单独或间接由酪氨酸酶的活性调控,它是黑色素合成的限速酶^[12]。这个模式推断在低浓度的酪氨酸酶存在时,黑色素体中多巴醌和半胱氨酸反应生成半胱氨酸多巴,从而使伪黑色素的含量增加^[13],但这个模式对真黑色素/伪黑色素的比例的调控是不完全的。Chintala 等^[5]证明, xCT 转运体对色素的调控是关键性的,在毛发中的黑色素和培养的 *sut* 小鼠黑色素细胞中,它直接影响伪黑色素的增加。

Chintala 等分析了带有色素突变的鼠,浅灰色 (*sut*) 突变,它的特点是减少了黄色素。利用位置克隆,他们分析了 *Sut/sut* 鼠 3 号染色体上有大的缺失区域 (481,280) 映射到了 *Slc7a11* 基因(基因编码 xCT 蛋白),因此 *Slc7a11* 基因外显子 12 被另一个下游外显子代替,导致 *Slc7a11* 转录 3' 末端的改变。从分离到的 *Sut/sut* 小鼠细胞,发现只有少量的胱氨酸吸收的活性,进一步证实了系统 X_C⁻ 活性的丢失。*Sut/sut* 小鼠的脑和黑色素细胞内没有检测到 *Slc7a11* 的转录,表明没有功能蛋白 xCT 的表达。它的功能失调导致细胞不能摄取足够的胱氨酸来还原成半胱氨酸以满足细胞内合成伪黑色素的需要,使生成伪黑色素的途径受阻,而真黑色素的含量没有变化,小鼠毛色由黄色变成灰色。*Sut/sut* 小鼠和表达含有 *Slc7a11* 的 BAC 克隆的小鼠进行繁育,后代能恢复伪黑色素缺失的缺陷,证明胱氨酸的吸收对体内合适的色素沉着是必须的^[5],半胱氨酸是伪黑色素的前体^[14]。

何新等^[15]利用转睾丸注射转基因技术,成功获得选择性过表达 sxCT 的转基因绵羊,绵羊的被毛出

现棕黄色斑点,增加了伪黑色素的含量,从转基因角度证实了该基因对绵羊毛色的调控作用。但是 *Slc7a11* 基因在自然条件下对绵羊毛色的影响尚未见报道,本研究利用哈萨克羊丰富的毛色研究 *Slc7a11* 基因在不同颜色被毛皮肤组织中的表达,揭示了该基因在哈萨克绵羊毛色调控中的作用。首先通过实时定量发现 *Slc7a11* 基因在棕色毛的皮肤中表达量最高,其次是黑色,最后是白色,所以推测可能是由于该基因高表达生成的胱氨酸较多,胱氨酸还原生成半胱氨酸,进而合成的伪黑色素相对较高导致了毛色显现为棕色。为了进一步在蛋白水平分析该基因的表达量,成功构建了原核表达载体 pET-32a-sxCT,诱导表达融合蛋白 sxCT,经过纯化将蛋白免疫新西兰大白兔制备该蛋白的抗体,并用双向琼脂免疫扩散实验观看到抗原抗体复合物沉淀带,说明抗体具有特异性。最后利用制备的抗体检测哈萨克绵羊黑色、棕色、白色被毛皮肤组织中 sxCT 蛋白的表达量,发现该蛋白在棕色被毛的皮肤中的表达量最高,其次是黑色,最后为白色,这与实时定量检测 *Slc7a11* 基因的 mRNA 水平是一致的,说明该基因在哈萨克绵羊毛色形成中确实扮演了重要角色。本研究结果丰富了绵羊毛色形成的机理,为进一步开展“绿色羊毛”产业打下基础。

参考文献(References):

- [1] Lamoreux ML, Wakamatsu K, Ito S. Interaction of major coat color gene functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Pigm Cell Res*, 2011, 14(1): 23–31. [DOI](#)
- [2] Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine / glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 11455–11458. [DOI](#)
- [3] Kim JY, Kanai Y, Chairoungdua A, Cha SH, Matsuo H, Kim DK, Inatomi J, Sawa H, Ida Y, Endou H. Human cystine/glutamate transporter: cDNA cloning and upregulation by oxidative stress in glioma cells. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1512(2): 335–344. [DOI](#)
- [4] 苗鲁旭, 孙守荣, 席冬梅, 催嘉, 何奕多, 毛华明, 邓卫东. *Slc7a11* 基因与动物色素的形成. 家畜生态学报, 2009, 30(4): 1–5. [DOI](#)
- [5] Chintala S, Li W, Lamoreux ML, Ito S, wakamatsu K, Sviderskaya EV, Bennett BC, Park YM, Gahl WA, Huizing M, Spritz RA, Ben S, Novak EK, Tan J, Swank RT. *Slc7a11* gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 10964–10969. [DOI](#)
- [6] Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Dall’Olio S, Calascibetta D, Russo V, Portolano B. Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene in sheep with different coat colours and identification of the putative *e* allele at the ovine Extension locus. *Small Ruminant Res*, 2010, 91(2–3): 200–207. [DOI](#)
- [7] Norris BJ, Whan VA. A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Res*, 2008, 18(8): 1282–1293. [DOI](#)
- [8] Gratten J, Beraldi D, Lowder BV, Mcrae AF, Visscher PM, Pemberton JM, Slate J. Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proy Soc B-Bio Sci*, 2007, 274(1610): 619–626. [DOI](#)
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. [DOI](#)
- [10] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): 2003–2007. [DOI](#)
- [11] Dahlin A, Royall J, Hohmann JG, Wang J. Expression profiling of the solute carrier gene family in the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(2): 558–570. [DOI](#)
- [12] Wagner CA, Lang F, Bröer S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(4): C1077–C1093. [DOI](#)
- [13] Ito S. A chemist’s view of melanogenesis. *Pigm Cell Res*, 2003, 16(3): 230–236. [DOI](#)
- [14] Wakamatsu K, Ito S. Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigm Cell Res*, 2002, 15(3): 174–183. [DOI](#)
- [15] He X, Li HT, Zhou ZY, Zhao ZS, Li W. Production of brown/yellow patches in the SLC7A11 transgenic sheep via testicular injection of transgene. *J Genet Genome*, 2012, 39(6): 281–285. [DOI](#)