

小尾寒羊 *GnRH* 基因组织表达、多态性及其与产羔性状关联分析

寸静宇^{1,2} 刘秋月¹ 王翔宇¹ 狄冉¹ 胡文萍¹

张效生³ 张金龙³ 赵永聚^{2*} 储明星^{1*}

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所/农业部动物遗传育种与繁殖重点实验室,北京 100193;

2. 西南大学 动物科技学院,重庆 400715;

3. 天津市畜牧兽医研究所,天津 300381)

摘要 为揭示 *GnRH* 基因在小尾寒羊下丘脑-垂体-卵巢轴(Hypothalamic-pituitary-ovarian axis, HPOA)中的表达规律、多态性及其与产羔数的关系,深入了解其对小尾寒羊多羔的作用,采用实时荧光定量 PCR 技术对 6 只小尾寒羊(*FecB* 十型单、多羔母羊各 3 只)的生殖组织及脑组织中 *GnRH* 基因的表达谱进行分析,同时采用 Sequenom MassARRAY® SNP 技术对 380 只小尾寒羊和共 380 只的小尾寒羊、滩羊、苏尼特羊、策勒黑羊、湖羊和草原型藏羊 *GnRH* 基因 2 个单核苷酸多态性位点(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)的进行多态性检测,并与小尾寒羊产羔数进行关联分析。结果显示,*GnRH* 基因在下丘脑、卵巢和子宫组织均有表达,其中在下丘脑高表达。在小尾寒羊多羔群体中,*GnRH* 基因在卵巢、大脑、下丘脑、垂体的表达均极显著高于单羔群体($P < 0.01$),暗示其可能参与了小尾寒羊多羔性状调控。分型发现 *GnRH* 基因 2 个位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔品种间差异均不显著($P > 0.05$)。关联分析表明,*GnRH* 基因的 2 个 SNPs 位点的多态性与小尾寒羊各胎产羔数差异均不显著($P > 0.05$);2 个 SNPs 在所有绵羊品种中均表现为低度多态($PIC < 0.25$);卡方适合性检验表明,2 个 SNPs 在各个绵羊品种中均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$)。

关键词 绵羊; 多羔; *GnRH* 基因; 组织表达; SNP; 关联

中图分类号 S826.8

文章编号 1007-4333(2019)06-0073-08

文献标志码 A

Analysis on the tissue expression, polymorphism of *GnRH* gene and its association with prolificacy in Small Tail Han sheep

CUN Jingyu^{1,2}, LIU Qiuyue¹, WANG Xiangyu¹, DI Ran¹, HU Wenping¹, ZHANG Xiaosheng³,
ZHANG Jinlong³, ZHAO Yongju^{2*}, CHU Mingxing^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381, China)

Abstract This study was undertaken to evaluate the expression patterns and polymorphisms of *GnRH* gene in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis (HPOA) and its association with litter size in Small Tail Han sheep. The real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression of the *GnRH* gene in reproductive

收稿日期: 2018-09-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772580,31772564);国家肉羊产业技术体系专项(CARS-38);中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS13);重庆高校创新团队建设计划资助项目(CXTDG201602004)

第一作者: 寸静宇, 硕士研究生, E-mail: 763949512@qq.com

通讯作者: 赵永聚, 教授, 主要从事羊遗传育种研究, E-mail: zyongju@163.com

储明星, 研究员, 主要从事羊优异繁殖性状分子机理研究, E-mail: mxchu@263.net

tissues and brain tissues of six Small Tail Han sheep (Three polytocous and three monotocous ewes from the *FecB* ++ genotype) in this study. 380 Small Tail Han sheep and 380 in total for Small Tail Han sheep, Tan, Sunite, Cele Black, Hu and Prairie Tibetan sheep were selected and Sequenom MassARRAY® SNP assay was applied to genotype 2 single nucleotide polymorphism sites (SNPs) of *GnRH* gene. Then the association was analyzed between *GnRH* and litter size in Small Tail Han sheep. The results showed that *GnRH* gene was expressed in hypothalamus, ovary and uterus tissues and among which, *GnRH* was highly expressed in hypothalamus. The expression of *GnRH* gene in ovary, hypothalamus and uterus of polytocous Small Tail Han ewes was extremely significant higher ($P < 0.01$) than that of monotocous ewes, and the *GnRH* gene might be involved in the regulation of multiple lambs in Small Tail Han sheep. From genotyping, we found the genotype frequencies and allele frequencies of the 2 SNPs were not significantly different between uniparous and multiparous sheep ($P > 0.05$), association analysis showed that these 2 SNPs in *GnRH* gene were not significantly correlated with litter size in Small Tail Han sheep ($P > 0.05$). The population genetic analysis indicated that 2 SNPs showed low polymorphism in all sheep breeds ($PIC < 0.25$), and the result of chi-square test showed that 2 SNPs were at Hardy-Weinberg equilibrium in most sheep breeds ($P > 0.05$).

Keywords sheep; prolificacy; *GnRH* gene; tissue expression; SNP; association

促性腺激素释放激素(Gonadotropin releasing hormone, GnRH), 又称促黄体素释放激素(Luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH), 是下丘脑分泌的十肽激素, 是动物生殖过程中最重要的激素之一^[1]。在调节生殖功能方面, 下丘脑-垂体-性腺轴(HPG)扮演着重要的角色, 而随着分子遗传学的飞速发展, GnRH是HPG轴的关键激素^[2]。GnRH通过脉冲的方式由丘脑下部分泌到垂体前叶, 并与垂体促性腺激素细胞上的高亲和力受体结合, 促进卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)的合成并分泌^[3], 最终经血液循环调控外周靶性腺激素的产生和配子发生。除此之外, GnRH也参与性腺的繁殖功能。GnRH首先作用于性腺, 进而影响性腺激素的合成与分泌^[4]。GnRH在哺乳动物中含量极低, 但其作用异常重要。GnRH可在垂体、性腺等多个水平上影响生殖系统^[5]。龚建文等^[6]研究发现, 通过使用GnRH及其类似物可以使母猪的排卵数和产仔数得到不同程度的提高。丁赫等^[7]研究发现, 在初情期启动过程中, *GnRH* mRNA表达量可能与下丘脑*GnRH*基因启动子区特定位点甲基化水平存在一定的关系。李志惠等^[8]对*GnRH*基因多态性进行研究, 在榕江小香羊中检测到1个SNP位点T68G, 结果显示该位点可作为提高山羊繁殖性能分子遗传标记。

全基因组重测序是找到功能基因的主要方式^[9-12], 因此, 本实验室前期对10个绵羊品种中的99个绵羊个体进行全基因组重测序^[13], 筛选出与小尾寒羊产羔数相关的候选基因*GnRH*的g. 40001529 C>T和g. 40001530 A>G 2个位点。同

时本试验在小尾寒羊群体中, 使用Taqman探针法对*FecB*基因进行分型, 确定了小尾寒羊*FecB*基因++型中产单羔和产多羔的个体, 并以此作为研究对象, 使用实时荧光定量PCR技术检测*GnRH*基因在生殖轴相关组织中的表达情况, 以及对*GnRH*基因2个SNPs的多态性进行分析, 旨在探讨*GnRH*基因表达、多态性与小尾寒羊产羔数之间的相关性, 为小尾寒羊多羔性状的机理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验样品及主要试剂

随机选取2~3周岁健康状况良好的小尾寒羊母羊6只(*FecB*++型多羔和单羔各3只), 用孕酮阴道栓(CIDR)对6只小尾寒羊进行处理, 12天后撤栓, 在撤栓后45h屠宰并立即采集大脑、下丘脑、子宫、小脑、卵巢、垂体和输卵管7种组织, 液氮中保存, 转移到-80℃冰箱保存备用。

分型样品选择: 共760只绵羊, 其中小尾寒羊380只(有产羔数记录), 共380只的小尾寒羊(27)、苏尼特羊(21)、滩羊(22)、湖羊(101)、策勒黑羊(48)和草原型藏羊(161), 其中多羔品种为: 小尾寒羊、湖羊和策勒黑羊, 单羔品种为: 滩羊、苏尼特羊和草原型藏羊。

荧光定量染料(SYBR®Premix Ex Taq™II)和反转录试剂盒(PrimeScript™RT Reagent Kit)(TaKaRa公司(大连)提供)、RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司(北京)提供)。

1.2 RNA提取

上述组织总RNA用RNAprep pure动物组织

总 RNA 提取试剂盒及 Trizol 提取。RNA 的浓度和 OD 值用 Nanodrop 2000 进行检测, 提取的 RNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行检测, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.3 cDNA 合成

cDNA 由反转录试剂盒来合成, 反应体系总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$: $12\text{ }\mu\text{L}$ RNase-Free ddH₂O, $1.0\text{ }\mu\text{L}$ Oligo dT Primer, $1.0\text{ }\mu\text{L}$ PrimeScript RT Enzyme Mix E, $1.0\text{ }\mu\text{L}$ Random 6 mers, $1.0\text{ }\mu\text{g}$ RNA, $4.0\text{ }\mu\text{L}$ $5\times$ PrimeScript Buffer (for Real Time)。反应条件为: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s。将反转录后得到的产物 5 倍稀释, 用 β actin 进行 PCR 检测。最终, cDNA 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 以便用于目的基因表达的检测。

1.4 引物设计

依据 GenBank 所登录的绵羊 *GnRH* 基因 mRNA 序列(登录号为: XM_015093089.1), 使用 Primer Premier 6.0 软件进行引物设计, β actin (NM_001009784.2) 为内参基因。北京天一辉远生物科技有限公司合成引物。引物名称、序列和扩增片段大小见表 1。

表 1 荧光定量引物信息

Table 1 Primers used in qPCR

名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/ bp Product size
<i>GnRH</i>	F: CCTGCTGACTTTCTGTGTGG R: TCTACTGGCTGATCGACCTC	148
β actin	F: CCAACCGTGAGAAGATGACC R: CCAGAGCGTACAGGGACAG	97

1.5 实时荧光定量 PCR

用 Roche Light Cycler[®] 480 II 型荧光定量 PCR 仪检测 *GnRH* 基因的表达量, 每个样品重复 3 次。反应体系总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 具体见表 2。PCR 程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 反应终止后分析溶解曲线。

1.6 基因分型

对 *GnRH* 基因 g. 40001529C > T 和 g. 40001530A > G 位点进行分型, 采用 Sequenom MassARRAY[®] SNP 技术检测这 2 个位点的基因型。分型样品为从绵羊血液中提取的 DNA, 每个样

品体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$, DNA 浓度为 $40\sim 80\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

表 2 实时荧光定量 PCR 体系

Table 2 System of real-time fluorescence quantitative PCR

试剂 Reagent	体积 Volume
SYBR Premix Ex Taq II	10.0
Forward primer	0.8
Reverse primer	0.8
cDNA	2.0
RNase-Free ddH ₂ O	6.4

1.7 统计分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算荧光定量得到的数据结果, 使用 SPSS 19.0 软件分析数据显著性, 用单因素方差分析(one-way ANOVA)方法进行组间比较, 用最小显著差异法(least significant difference, LSD)对数据进行多重比较。

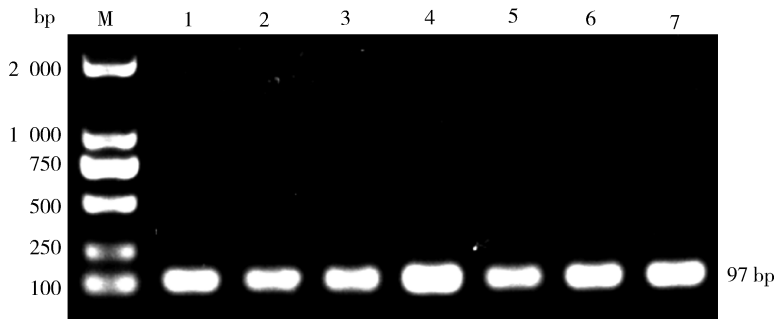
使用 Microsoft Excel 2016 软件统计绵羊 *GnRH* 基因 g. 40001529C > T 和 g. 40001530A > G 位点的等位基因频率、基因型频率、杂合度(He)、多态信息含量(PIC)和有效等位基因数(Ne), 然后进行 Hardy-Weinberg 检测。采用 $y_{ijkl} = \mu + LS_i + P_j + G_k + e_{ijkl}$ 模型进行最小二乘分析, 其中: y_{ijkl} 表示产羔数的记录值; μ 表示群体平均值; LS_i 表示第 i 个产羔季节的固定效应; P_j 表示第 j 个胎次的固定效应; G_k 表示 *GnRH* 基因第 k 种基因型的固定效应; e_{ijkl} 表示随机残差效应。

用 SPSS 19.0 软件程序的一般线性模型对小尾寒羊基因型与产羔表型数据关联分析, 所有数据以“均值±标准误”表示。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

使用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取小尾寒羊各组织的 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 结果显示所提取的小尾寒羊各组织的 RNA 完整度好。再使用持家基因对获得的绵羊 cDNA 进行 PCR 扩增, 检测结果见图 1。目的片段与预期一致, 可用于后续的荧光定量试验。



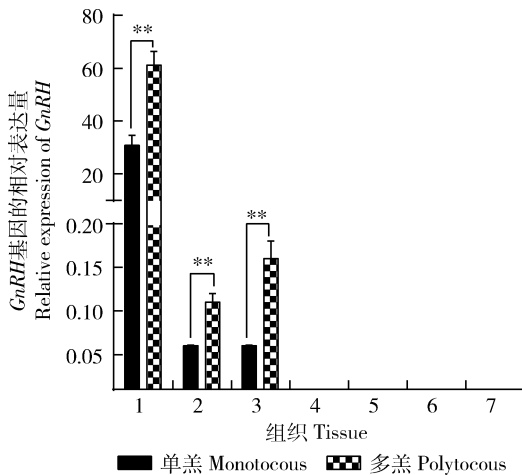
M. DL2000 DNA 分子量标记;1~7 分别代表下丘脑、卵巢、子宫、大脑、小脑、输卵管、垂体,下同。
M. DL2000 DNA marker;1-7 represent hypothalamus, ovary, uterus, brain, cerebellum, oviduct and pituitary, respectively. The same below.

图1 利用持家基因检测获得的绵羊 cDNA 的结果

Fig.1 cDNA using housekeeping gene amplification products of Small Tail Han sheep

2.2 *GnRH* 基因在小尾寒羊(单羔和多羔)性腺组织的表达

使用荧光定量 PCR 技术对 *GnRH* 基因在大脑、小脑、下丘脑、卵巢、子宫、输卵管和垂体组织的表达水平进行研究,结果见图 2。结果显示:*GnRH* 基因在下丘脑组织高表达,在卵巢、子宫低表达,在大脑、小脑、输卵管、垂体组织不表达。*GnRH* 基因在小尾寒羊多羔群体下丘脑、卵巢和子宫组织表达量均极显著高于小尾寒羊单羔群体($P < 0.01$)。



** 表示差异极显著($P < 0.01$)。

** means highly significant difference ($P < 0.01$).

图2 小尾寒羊各组织 *GnRH* 的表达水平

Fig.2 Expression of *GnRH* gene in different tissues in Small Tail Han sheep

2.3 *GnRH* 基因多态性分析

对 *GnRH* 基因 2 个 SNP 位点的分型发现,2 个 SNPs 在单羔品种中均存在 3 种基因型,

g. 40001529C > T 位点是 CC、CT 和 TT 型, g. 40001530A > G 位点是 GG、AG 和 AA 型;在多羔品种中均只存在 2 种基因型, g. 40001529C > T 位点是 CT 和 CC 型, g. 40001530A > G 位点是 AG 和 AA。

GnRH 基因 g. 40001529C > T 和 g. 40001530A > G 位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔品种间差异均不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。就 g. 40001529C > T 位点而言,多羔和单羔品种中 CC 为优势基因型, C 为优势等位基因;就 g. 40001530A > G 位点而言,多羔和单羔品种中 AA 为优势基因型, A 为优势等位基因。

GnRH 基因的 g. 40001529C > T 和 g. 40001530A > G 位点在小尾寒羊、策勒黑羊、苏尼特羊、湖羊、草原型藏羊以及滩羊 6 个品种中表现为低度多态 ($PIC < 0.25$) (表 4)。卡方适合性检验结果发现,除了草原型藏羊在 g. 40001529C > T 和 g. 40001530A > G 位点中处于哈代温伯格不平衡状态以外 ($P < 0.05$),其余位点在各品种中均处于哈代温伯格平衡状态 ($P > 0.05$)。

2.4 *GnRH* 基因多态位点与小尾寒羊产羔数的关系

GnRH 基因 g. 40001529C > T 和 g. 40001530A > G 的多态性与小尾寒羊各胎产羔数均没有显著相关 ($P > 0.05$) (表 5)。2 个位点野生纯合型的产羔数大多都高于杂合子。

3 讨论

3.1 *GnRH* 基因表达

目前,国内外 *GnRH* 基因表达研究主要集中在

表 3 *GnRH* 基因不同 SNP 位点在单、多羔绵羊品种中的等位基因频率和基因型频率

Table 3 Allele frequencies and genotype of different SNPs at the *GnRH* gene in uniparous and multiparous sheep

位点 Locus	基因型 Genotype	多羔品种中	单羔品种中	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	等位 基因 Allele	多羔品种中	单羔品种中	<i>P</i> 值 <i>P</i> value		
		基因型频率 (样本量) Genotype frequency in multiparous sheep (sample size)	基因型频率 (样本量) Genotype frequency in uniparous sheep (sample size)			基因频率 Allele frequency in multiparous sheep	基因频率 Allele frequency in uniparous sheep			
g. 40001529C>T	CC	0.96(529)	0.97(198)	0.17	C	0.96	0.97	0.18		
	CT	0.04(21)	0.02(5)						0.04	0.03
	TT	0.00(0)	0.01(1)						0.04	0.03
g. 40001530A>G	AA	0.96(538)	0.97(198)	0.14	A	0.96	0.97	0.62		
	AG	0.04(23)	0.02(5)						0.04	0.03
	GG	0.00(0)	0.01(1)						0.04	0.03

注: $P > 0.05$ 表示差异不显著。

Note: $P > 0.05$ indicates the difference is not significant.

表 4 *GnRH* 基因 g. 40001529C>T 位点在不同绵羊品种中的群体遗传学分析

Table 4 Population genetic analysis of g. 40001529C>T at *GnRH* gene in different sheep breeds

品种 Breed	基因型频率(样本量) Genotype frequency (sample size)			基因频率 Allele frequency	
	CC	CT	TT	C	T
小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.96(381)	0.04(16)	0.00(0)	0.98	0.02
湖羊 Hu sheep	0.97(98)	0.03(3)	0.00(0)	0.99	0.01
策勒黑羊 Cele Black sheep	0.96(50)	0.04(2)	0.00(0)	0.98	0.02
苏尼特羊 Sunite sheep	1.00(21)	0.00(0)	0.00(0)	1.00	0.00
滩羊 Tan sheep	0.91(20)	0.09(2)	0.00(0)	0.95	0.05
草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.98(157)	0.01(3)	0.01(1)	0.98	0.02

品种 Breed	多态信息含量 Polymorphism information content		有效等位 基因数 Effective number of alleles	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
	杂合度 Heterozygosity			
小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.04	0.04	1.04	0.68
湖羊 Hu sheep	0.03	0.03	1.03	0.88
策勒黑羊 Cele Black sheep	0.04	0.04	1.04	0.89
苏尼特羊 Sunite sheep	0.00	0.00	1.00	
滩羊 Tan sheep	0.08	0.09	1.10	0.82
草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.03	0.03	1.03	0.00

注: $P > 0.05$ 表示位点在该品种中处于哈代温伯格平衡状态。

Note: $P > 0.05$ indicates the locus is under Hardy-Weinberg equilibrium.

表5 *GnRH* 基因不同位点各基因型小尾寒羊产羔数最小二乘均值及标准误Table 5 Least squares means and standard errors of litter size of different genotypes of SNPs at *GnRH* gene in Small Tail Han sheep

位点 Locus	基因型 Genotype	第1胎	第1胎	第2胎	第2胎	第3胎	第3胎
		样本数 No. of the 1st parity	产羔数 Litter size of the 1st parity	样本数 No. of the 2nd parity	产羔数 Litter size of the 2nd parity	样本数 No. of the 3rd parity	产羔数 Litter size of the 3rd parity
g. 40001529C>T	CC	329	2.15±0.05	312	2.35±0.05	124	2.82±0.10
	CT	14	1.93±0.23	14	2.00±0.24	6	3.17±0.44
g. 40001530A>G	AA	336	2.16±0.05	319	2.34±0.05	133	2.82±0.10
	AG	16	1.86±0.21	15	2.00±0.23	6	3.17±0.44

GnRH 在下丘脑组织中的表达^[14-19],而在其他组织中表达的相关研究较少。本研究对 *GnRH* 基因在绵羊大脑、小脑、下丘脑、卵巢、子宫、输卵管和垂体组织的表达水平进行研究,结果显示:*GnRH* 基因在下丘脑组织高表达,这与已有研究结果相一致^[14-19]; *GnRH* 基因在卵巢、子宫低表达,在大脑、小脑、输卵管、组织不表达,这与张克山^[20]的研究结果相一致。说明 *GnRH* 基因可能在卵巢和子宫组织有一定作用。*GnRH* 的主要作用还是促进 FSH 和 LH 的合成和分泌,进而影响排卵功能提高产羔数^[2-4],因此,也可能是造成 *GnRH* 在这些组织低表达或不表达的原因。*GnRH* 在四川白鹅、溱浦鹅^[20]、布氏田鼠^[21]和老鼠^[22]的垂体组织中有表达,而本研究发现 *GnRH* 在小尾寒羊的垂体组织中不表达,猜测表达结果不一致的原因是不同的物种、不同的组织,*GnRH* 的表达模式也有一定的差异。*GnRH* 基因的卵巢、下丘脑和子宫组织表达量在小尾寒羊多羔群体极显著高于小尾寒羊单羔群体 ($P < 0.01$),提示 *GnRH* 是影响小尾寒羊产多羔的关键基因,对绵羊的繁殖活动起重要作用。

3.2 *GnRH* 基因与绵羊产羔数之间的关系

GnRH 基因的 g. 40001529C>T 和 g. 40001530A>G 位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔品种间差异均不显著 ($P > 0.05$),提示这些位点可能与绵羊的产羔数没有显著的相关性;群体遗传学分析发现,这 2 个位点在各个绵羊品种中均表现为低度多态 ($PI < 0.25$),说明 2 个位点在这些绵羊品种中的选择潜力低,可能由某些绵羊品种遗传多样性贫乏和所选择的各品种样本量不足导致。另外,

g. 40001529C>T 和 g. 40001530A>G 位点在小尾寒羊、滩羊、苏尼特羊、策勒黑羊和湖羊品种中均处于哈代温伯格平衡状态 ($P > 0.05$),经过长期选择和进化,这 2 个位点在适应性能力上有遗传优势;苏尼特羊在 2 个位点均没有突变型,可能由于突变致死或突变型适应性差在出生时死亡。通过关联分析发现,*GnRH* 基因 2 个位点的多态性与小尾寒羊各胎产羔数均没有显著相关 ($P > 0.05$),但是这 2 个位点的野生型各胎的产羔数均高于杂合型,这 2 个位点的突变可能在一定程度上降低了小尾寒羊的产羔能力,同时这 2 个位点可能也不是影响绵羊产羔数的关键位点。

4 结 论

本研究中,2 个 SNP 位点的多态性与小尾寒羊各胎产羔数均无显著关联,但是 *GnRH* 基因的表达与小尾寒羊产羔性状存在一定程度的正相关,其可能参与了小尾寒羊多羔性状调控,深入研究该基因功能,可为小尾寒羊产羔数性状的选育提供依据。

参考文献 References

- [1] Moore P Jr, Wray S. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) biosynthesis and secretion in embryonic LHRH neurons[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(12): 4486-4495
- [2] Cao C Y, Ding Y F, Kong X J, Feng G D, Xiang W, Chen L, Yang F, Zhang K, Chu M X, Wang P Q, Zhang B Y. Reproductive role of miRNA in the hypothalamic-pituitary axis [J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2018(88): 130-137
- [3] Mijiddorj T, Kanasaki H, Sukhbaatar U, Oride A, Hara T, Kyo

- S. Mutual regulation by GnRH and kisspeptin of their receptor expression and its impact on the gene expression of gonadotropin subunits[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2017 (246):382-389
- [4] 高广亮,王阳铭. *GnRH* 基因的研究进展[J]. 畜禽业, 2016 (6):48-50
- Gao G L, Wang Y M. Research progress of *GnRH* gene[J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2016 (6):48-50 (in Chinese)
- [5] Asa S L, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(11):836.
- [6] 龚建文, 黄峰, 陶斌, 浅析 *GnRH* 对提高母猪产仔数及存活数的作用[J]. 黑龙江动物繁殖, 2011, 19(3):49
- Gong J W, Huang F, Tao B. Analysis of the effect of *GnRH* on increasing litter size and survival number of sows[J]. *Heilongjiang Journal of Animal Reproduction*, 2011, 19(3):49 (in Chinese)
- [7] 丁赫, 宫永胜, 王军, 吕文发. 初情期启动过程中小尾寒羊下丘脑 *GnRH* 基因甲基化状态及表达量关系研究[J]. 中国畜牧杂志, 2018, 54(5):58-61
- Ding H, Gong Y S, Wang J, Lv W F. Relationship between methylation status and expression of *GnRH* gene in Small Tail Han sheep during onset of puberty[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2018, 54(5):58-61 (in Chinese)
- [8] 李志惠, 李德. 榕江小香羊 *GnRH* 基因多态性及其与繁殖性状关联性分析[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(8):2058-2061
- Li Z H, Li D. Association analysis on polymorphism of *GnRH* gene and reproduction traits in Rongjiang Small Xiang goat [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(8):2058-2061 (in Chinese)
- [9] 宋娜娜, 钟金城, 柴志欣, 汪琦, 何世明, 吴锦波, 蹇尚林, 冉强, 蒙欣, 胡红春. 三江黄牛全基因组数据分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(1):183-194
- Song N N, Zhong J C, Chai Z X, Wang Q, He S M, Wu J B, Jian S L, Ran Q, Meng X, Hu H C. The whole genome data analysis of Sanjiang cattle[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50 (1):183-194 (in Chinese)
- [10] 潘章源, 贺小云, 刘秋月, 郭晓飞, 曹晓涵, 胡文萍, 狄冉, 王翔宇, 储明星. 全基因组测序(WGS)在畜禽群体进化和功能基因挖掘中的应用[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(12):1945-1954
- Pan Z Y, He X Y, Liu Q Y, Guo X F, Cao X H, Hu W P, Di R, Wang X Y, Chu M X. Application of whole genome sequencing (WGS) in population evolution and gene discovery of domestic animals[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24 (12):1945-1954 (in Chinese)
- [11] 汪文强, 赵生国, 马利青, 郭继军, 马月辉, 赵倩君. 动物基因组学重测序的应用研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(10):1947-1953
- Wang W Q, Zhao S G, Ma L Q, Guo J J, Ma Y H, Zhao Q J. The research progress and application of resequencing based on animal genomics[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(10):1947-1953 (in Chinese)
- [12] Ai H S, Fang X D, Yang B, Huang Z Y, Chen H, Mao L K, Zhang F, Zhang L L, Cui L L, He W M, Yang J, Yao X M, Zhou L S, Han L J, Li J J, Sun S L, Xie X H, Lai B X, Su Y, Lu Y, Yang H, Huang T, Deng W J, Nielsen R, Ren J, Huang L S. Adaptation and possible ancient interspecies introgression in pigs identified by whole-genome sequencing [J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(3):217-225
- [13] 曾滔, 赵福平, 王光凯, 吴明明, 魏彩虹, 张莉, 李利, 张红平, 杜立新. 基于群体分化指数 FST 的绵羊全基因组选择信号检测[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(12):1891-1899
- Zeng T, Zhao F P, Wang G K, Wu M M, Wei C H, Zhang L, Li L, Zhang H P, Du L X. Genome-wide detection of selection signatures in sheep populations with use of population differentiation index FST[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(12):1891-1899 (in Chinese)
- [14] 陈树林, 毛海鹏, 赵慧英, 卿素珠, 范光丽, 张艳, 李耀辉, 周建平. 青年奶山羊下丘脑 *GnRH* 神经元的分布特点[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(1):45-48+53
- Chen S L, Mao H P, Zhao H Y, Qing S Z, Fan G L, Zhang Y, Li Y H, Zhou J P. Distribution characteristics of *GnRH* neurons in hypothalamus of young dairy goats[J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2007, 35(1):45-48+53 (in Chinese)
- [15] 陈树林, 林磊, 蒋田园, 雷治海, 李文献, 曾明华, 张艳, 范光丽, 隋治国. 妊娠期奶山羊下丘脑 *GnRH* 和 OT 免疫反应双标记细胞的分布[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9):966-971
- Chen S L, Lin L, Jiang T Y, Lei Z H, Li W X, Zeng M H, Zhang Y, Fan G L, Sui Z G. Localization of double-labeled immunoreactive cells of gonadotropin releasing hormone and oxytocin in hypothalamus of dairy goat during pregnancy[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(9):966-971 (in Chinese)
- [16] 宫永胜, 苑志宇, 张涛, 吕文发, 王军. 初情期启动过程中 MeCP2 和 *GnRH* 在母羊下丘脑的分布定位[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(12):53-55
- Gong Y S, Fan Z Y, Zhang T, Lv W F, Wang J. Distribution of MeCP2 and *GnRH* in the hypothalamus of ewes during initiation of puberty[J]. *Chinese Journal of Animal Science*,

- 2017,53(12):53-55 (in Chinese)
- [17] 徐元青,王建林,宋国强,王凤玲,邵宝平. *GnRH* 在妊娠期黄牛下丘脑-垂体-卵巢轴中的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(12):1649-1654
- Xu Y Q, Wang J L, Song G Q, Wang F L, Shao B P. Expression of *GnRH* in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of the pregnant cattle[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(12):1649-1654 (in Chinese)
- [18] 徐元青,邵宝平,王建林. 促性腺激素释放激素在妊娠牦牛下丘脑主要核团中的表达[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(2):82-84
- Xu Y Q, Shao B P, Wang J L. *GnRH* expression in hypothalamic nuclei of pregnant yaks[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, 48(2):82-84 (in Chinese)
- [19] Voigt C, Bennett N C. *GnRH* mRNA expression in the brain of cooperatively breeding female Damaraland mole-rats[J]. *Reproduction*, 2017, 153(4):453-460
- [20] 张克山,胡彦竞科,韩笑哲,高广亮,钟航,王启贵. 鹅不同繁殖时期 *GnRH* 和 *GnIH* 基因表达和激素浓度变化分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(8):1720-1726
- Zhang K S, Hu Y J K, Han X Z, Gao G L, Zhong H, Wang Q G. Analysis of the serum concentrations and mRNA expression levels of *GnRH* and *GnIH* in geese during different reproductive periods [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(8):1720-1726 (in Chinese)
- [21] 刘岚,陈燕,李宁,王大伟,任飞,宋英,郭聪,刘晓辉. 布氏田鼠 *GnRH* 基因克隆及不同组织和发育阶段的基因表达特征[J]. 四川动物, 2017, 36(5):498-506
- Liu L, Chen Y, Li N, Wang D W, Ren F, Song Y, Guo C, Liu X H. Molecular cloning, tissue distribution and expression of *GnRH* gene in different developmental stages of *Lasiodopomys brandtii*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2017, 36(5):498-506 (in Chinese)
- [22] Sun J R, Hui C C, Xia T J, Xu M, Deng D T, Pan F M, Wang Y M. Effect of hypothyroidism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive function of pregnant rats[J]. *BMC Endocrine Disorders*, 2018, 18(1):30

责任编辑:杨爱东