

MITF 基因表达与绵羊季节性发情及产羔数关系初探

李春艳^{1,2} 狄冉¹ 张子军² 任春环² 张彦² 汤继顺¹ 刘秋月¹

王翔宇¹ 胡文萍¹ 张效生³ 张金龙³ 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. 安徽农业大学 动物科技学院,合肥 230036;

3. 天津市畜牧兽医研究所,天津 300381)

摘要 为初步探究 *MITF* 基因表达和绵羊季节性发情及产羔数的关系,本试验以季节性发情的苏尼特羊 (Sunite sheep, SNT) 和常年发情的小尾寒羊 (Small Tail Han sheep, STH) 为研究对象,利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术分析 SNT 在不同光照条件下 (短光照、长光照) 及 STH 不同繁殖时期 (卵泡期、黄体期) 的下丘脑等组织中 *MITF* 基因的表达差异及该基因在 STH 单、多羔母羊卵泡期繁殖器官 (卵巢、子宫体、输卵管) 中的表达差异。结果表明:1) *MITF* 基因在 2 个绵羊品种的不同组织中广泛表达且繁殖器官 (卵巢、子宫体和输卵管) 中该基因表达量较高;2) 在长光照条件下 SNT 垂体中 *MITF* 表达量极显著高于短光照条件下表达量 ($P < 0.01$);3) STH 卵巢中 *MITF* 表达量在卵泡期极显著高于黄体期 ($P < 0.01$),而子宫体、输卵管中该基因表达量在黄体期显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 高于卵泡期;4) 单羔组 STH 子宫体、输卵管中 *MITF* 表达水平极显著 ($P < 0.01$) 或显著 ($P < 0.05$) 高于多羔组。综上,*MITF* 基因表达与绵羊季节性发情及产羔数存在一定关联,需要进一步进行生物学功能验证。

关键词 绵羊; *MITF* 基因; 发情; 繁殖时期; 组织表达; 产羔数

中图分类号 S826.2

文章编号 1007-4333(2018)12-0091-06

文献标志码 A

Relationship between *MITF* gene expression and the seasonal estrus and litter size of sheep (*Ovis aries*)

LI Chunyan^{1,2}, DI Ran¹, ZHANG Zijun², REN Chunhuan², ZHANG Yan²,

TANG Jishun¹, LIU Qiuyue¹, WANG Xiangyu¹, HU Wenping¹,

ZHANG Xiaosheng³, ZHANG Jinlong³, CHU Mingxing^{1*}

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

2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

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

Abstract Aiming to tentatively explore the relationship between *MITF* gene expression and seasonal estrus and litter size in sheep, the real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) method was used to detect the expression difference of *MITF* gene in nine tissues including hypothalamus in seasonal estrous sheep (Sunite sheep, SNT) at different photoperiods (short photoperiod, long photoperiod) and year-round estrous sheep (Small Tail Han sheep, STH) at different reproduction stages (follicular stage and luteal stage), and the expression difference of *MITF* gene between single birth tissues and multiple birth tissues including ovary, uterine body and oviduct of STH at follicular stage. The

收稿日期: 2018-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572371); 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)

第一作者: 李春艳, 硕士研究生, E-mail: 3010992163@qq.com;

狄冉, 副研究员, 博士, 主要从事羊优异繁殖性状分子机理研究, E-mail: dirangirl@163.com

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

results showed that; The *MITF* gene was widely expressed in different tissues and its' expression level in ovary, uterine body and oviduct tissues were higher than that in other tissues of two breeds. The expression level of *MITF* gene in pituitary gland was extremely higher at long photoperiod than that at short photoperiod in SNT ($P < 0.01$). The expression level of *MITF* in ovary was extremely higher at follicular stage than that at luteal stage ($P < 0.01$), while its expression level in uterine body was significantly higher at luteal stage than that at follicular stage ($P < 0.05$) and its expression in oviduct was extremely higher at luteal stage than that at follicular stage ($P < 0.01$) in STH. The expression level of *MITF* gene in uterine body in single birth group was extremely higher than that in multiple birth group ($P < 0.01$), while its' expression level in oviduct in single birth group was significantly higher than that in multiple birth group ($P < 0.05$) of STH at follicular stage. In conclusion, the research results indicated that *MITF* gene expression may be related to sheep seasonal estrus and litter size and further biological function verification will be required.

Keywords sheep; *MITF* gene; estrus; reproductive stage; tissue expression; litter size

绵羊(*Ovis aries*)的季节性繁殖性状受外界环境因素(光照、温度、食物等)影响,这些周期性变化的外界信号传输至体内,在一系列调控基因的作用下引起机体下丘脑-垂体-性腺轴(Hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPGA)系统激素分泌变化,从而调控其季节性繁殖活动^[1-3]。此外,已有研究发现主效基因如 *FecB*^[4-5]、*BMP15*^[6]、*GDF9*^[7-8]等影响绵羊产羔数。因此,探究绵羊季节性繁殖和产羔数关键基因对深入研究绵羊季节性发情和多羔分子机制有重要意义。

本课题组对国内 10 个绵羊品种进行重测序后利用 Fst 方法分析多羔常年发情组和单羔季节性发情组间的选择信号,筛选到与绵羊多羔和季节性发情有关的基因中包括 *MITF* 基因。*MITF* (Microphthalmia-associated transcription factor)属于 MiT 转录因子家族成员^[9],即呈碱性螺旋-一环-螺旋亮氨酸拉链(bHL HZip)结构的小眼畸形相关转录因子^[10],其主要通过 bHL HZip 结构形成二聚体来识别靶基因启动子区高度保守的 E-box 和 M-box,从而启动下游靶基因转录^[11]。在研究小鼠的小眼畸形相关基因位点突变时首次发现了 *MITF* 基因^[12],该基因在成年小鼠卵巢细胞中表达并影响小鼠正常排卵^[13]。进一步研究发现 *MITF* 基因影响动物皮毛颜色,是黑色素生成途径中的主要调节因子,当动物受到外界的紫外光照射时,其皮肤上的黑色素细胞合成的黑素增加,有助于色素沉积^[14],此过程中 *MITF* 作为色素细胞信号转导途径下游的信号分子通常与其它因子互作,调控黑色素细胞增殖、分化和黑色素合成^[15-16]。该基因也在脊椎动物的视网膜色素上皮细胞^[17]、宫颈间质细胞^[18]等细胞中表达。

MITF 基因在绵羊中的组织表达特征、在不同

繁殖状态下绵羊各组织中的表达差异以及该基因表达与绵羊产羔数的关系等尚未见报道。因此,本试验拟以苏尼特羊(典型的季节性发情品种)和小尾寒羊(典型的常年发情品种)为研究对象,采样下丘脑等组织,利用 qPCR 技术初步探究 *MITF* 基因在不同繁殖状态下绵羊不同组织中的表达情况,并研究其分别在卵泡期小尾寒羊单羔组和多羔组的生殖器官内的表达差异,为进一步研究 *MITF* 在绵羊繁殖性能调控方面的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物及组织样采集

苏尼特羊(Sunite sheep, SNT)和小尾寒羊(Small Tail Han sheep, STH)来自课题组试验羊场(天津)。人工光控条件下饲养空怀 SNT,选取短光照(光照 8 h,黑暗 16 h,短光照第 21 天,模拟发情季节)和长光照(光照 16 h,黑暗 8 h,长光照第 49 天,模拟休情季节)的母羊各 3 只,光控开灯后 4 h 内屠宰并采样。挑选 2~3 岁健康状况良好的 STH 母羊 6 只,对其放置阴道孕酮栓(CIDR,新西兰)并注射 5~6 mL 维生素 AD 以保护阴道内膜。放栓 12 d 后撤栓,撤栓当天记为第 1 天。撤栓后采用腹腔镜检测母羊卵泡发育状况以确定卵泡期取样时间;利用公羊试情确定母羊发情状态及时间。连续试验 2 个情期并在撤栓后 45 h(卵泡期)和第 10 天(黄体期)屠宰采样,2 个时期各取 3 只羊^[19]。课题组前期采集 STH 颈静脉血样后进行 Taqman 分型获得 *FecB* 野生纯合型(++)的 STH 母羊群体,并根据产羔数记录(连续 3 胎仅产 1 羔的母羊记为单羔组,连续 3 胎均产 2 羔或 2 羔以上的母羊记为多羔组)对其进行同期发情处理获得卵泡期 *FecB*++型(排除 *FecB* 基因突变对母羊产羔数的影响)STH 6 只,单

羔组和多羔组各选 3 只。屠宰绵羊后迅速采集下丘脑、垂体、大脑、小脑、卵巢、输卵管、子宫体、肾脏、肾上腺等新鲜组织样,分别装入 2 mL RNase-Free 冻存管后立即置于液氮中暂时保存。待所有样品采集完成后转入干冰运输,带回实验室并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取及其 cDNA 合成

参照动物组织 RNA 提取试剂盒(天根,北京)操作说明依次提取各组织总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 1.8~2.1, $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} > 1.8$)。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测发现 28S 条带亮度大于 18S 条带且 5S 处无特异条带,表明所提 RNA 质量合格,暂存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

冰箱。利用 cDNA 快速合成试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit)反转录合成 cDNA,反应总体积 20 μL ,反应条件为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s,反转录产物用 RNase-Free ddH₂O 5 倍稀释后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[20]。全程操作在冰上进行。

1.3 定量引物设计

参照 NCBI 数据库公布的绵羊 *MITF* 基因序列(GenBank 收录号: XM_012099677.1),利用 Genome Browser 在线软件和 Primer 5.0 软件排列基因序列并跨外显子区域设计特异性荧光定量 PCR 引物 1 对,以基因 *β actin* (GenBank 收录号: NM_001009784) 作内参。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。引物具体信息见表 1。

表 1 荧光定量引物信息

Table 1 The information of primer sequences for real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature	扩增产物长度/bp Amplification product length	扩增效率/% Efficiency
<i>MITF</i>	F: GAGATCCTGGGCTTGATGGA R: AGGAGTTACTGATGGTGAGGC	60	124	91.8
<i>βactin</i>	F: CCAACCGTGAGAAGATGACC R: CCCGAGGCGTACAGGGACAG	60	87	97.5

1.4 荧光定量 PCR(qPCR)

1.4.1 标准曲线建立

5 倍稀释后的合格 cDNA 按 2 倍浓度梯度稀释,分别获得 8 个浓度梯度(1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128)的 cDNA 样品。以这些 cDNA 为模板对目的基因和持家基因进行 qPCR 反应。以浓度梯度的对数值(10 为底数)为横坐标,以检测所得 *Ct* 值为纵坐标,绘制目的基因和持家基因的标准曲线^[21]。各阳性样品模板反应后期熔解曲线呈单峰、峰值尖锐的形态,引物扩增效率 90%~105%,符合 qPCR 试验要求。

1.4.2 qPCR 体系和程序

利用罗氏 480 II qPCR 仪依次检测不同繁殖状态下 2 个品种绵羊各组织和卵泡期不同产羔数 STH 繁殖器官组织中 *MITF* 基因的表达,每种样品做 3 个技术重复,以 *β actin* 为内参,设置阴性对照(H₂O 为模板)。qPCR 总体积 20 μL : $2 \times$ SYBR premix Ex Taq II (TaKaRa, Dalian, China) 10 μL , RNase Free ddH₂O 6.4 μL , 上、下游引物(10 pmol/L)各

0.8 μL , cDNA 模板 2 μL 。qPCR 程序设置: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环^[22]。反应结束后分析熔解曲线并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[23] 计算目的基因的相对表达量。

1.5 数据统计

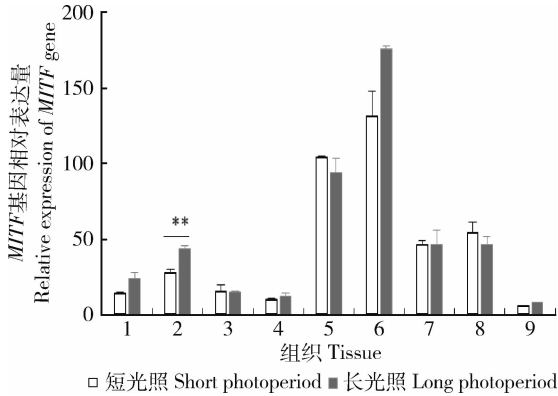
用 ΔCt 值表示 qPCR 反应结果数值,所得 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值通过 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析。最终数据用平均数±标准误(Mean±SEM)表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *MITF* 基因在短光照和长光照条件下苏尼特羊组织中的表达分析

应用 qPCR 检测不同光控条件下的 SNT 下丘脑等 9 种组织中 *MITF* 的表达情况,结果如图 1 所示; *MITF* 基因在 SNT 各组织中均有表达;其中,卵巢、子宫体、输卵管及肾脏中该基因表达量较高;在长光照第 49 天(模拟休情状态)的垂体组织中

MITF 表达量极显著高于短光照第 21 天(模拟发情状态)($P < 0.01$)。



1. 下丘脑;2. 垂体;3. 大脑;4. 小脑;5. 卵巢;6. 子宫体;7. 输卵管;8. 肾脏;9. 肾上腺。* 表示差异显著($P < 0.05$), ** 表示差异极显著($P < 0.01$),下同。

1. Hypothalamus; 2. Pituitary; 3. Brain; 4. Cerebellum; 5. Ovary; 6. Uterine body; 7. Oviduct; 8. Kidney; 9. Adrenal gland. * indicates significant difference ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$). The same below.

图 1 不同光照条件下苏尼特羊各组织中 *MITF* 基因的表达

Fig. 1 Expression of *MITF* gene in related tissues of SNT at different photoperiods

2.2 *MITF* 基因在卵泡期和黄体期小尾寒羊组织中的表达分析

应用 qPCR 检测卵泡期和黄体期的 STH 下丘脑等 9 种组织中 *MITF* 的表达情况,结果如图 2 所示;*MITF* 基因在 STH 各组织中广泛表达;其中,卵巢、子宫体、输卵管组织中该基因表达量较高;卵

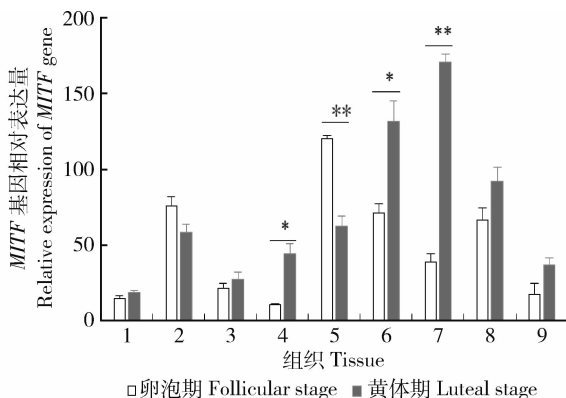


图 2 不同繁殖时期小尾寒羊各组织中 *MITF* 基因的表达

Fig. 2 Expression of *MITF* gene in related tissues of STH at different reproductive stages

巢中 *MITF* 表达量在卵泡期极显著高于黄体期($P < 0.01$),子宫体、输卵管中该基因表达量在黄体期显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于卵泡期。

2.3 *MITF* 基因在不同产羔数小尾寒羊繁殖器官中的表达分析

应用 qPCR 检测卵泡期单羔组和多羔组 STH 繁殖器官(卵巢、子宫体、输卵管)中 *MITF* 的表达差异,结果如图 3 所示:卵巢、子宫体、输卵管中 *MITF* 基因表达量较高;单羔组的子宫体中 *MITF* 基因表达量极显著高于多羔组($P < 0.01$),单羔组的输卵管中该基因表达量显著高于多羔组($P < 0.05$)。

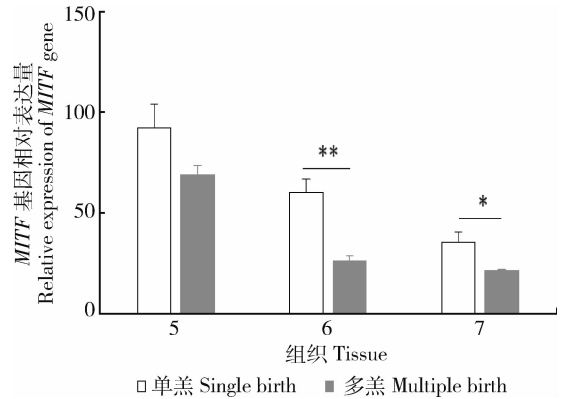


图 3 不同产羔数小尾寒羊繁殖器官中 *MITF* 基因的表达

Fig. 3 Expression of *MITF* gene in reproductive organs of STH between single birth group and multiple birth group

3 讨论

动物机体接收并转换外界光信号后引起垂体结节部(Pars tuberalis, PT)表达的一系列上游调控因子变化,并通过 HPGA 实现季节性发情和繁殖^[24-25]。因此,这些上游调控因子的表达变化模式及其调控作用显得十分重要。研究认为,在长光照条件下动物 PT 受调控因子影响其促甲状腺细胞之间紧密连接^[26],促甲状腺细胞中 *Eya3* 表达上升^[27],与其他调控因子协同作用激活并诱导 *TSHβ* 表达^[28-29],从而促进 HPGA 激素分泌变化。本课题组前期发现,光控条件下的 SNT 母羊在短光照条件转为长光照条件后其垂体中 *Eya3* 与 *TSHβ* 的表达量升高,且长光照第 49 天(休情状态)垂体中 *TSHβ* 表达量极显著高于短光照第 21 天(发情状态)^[30]。在本试验中,光控开灯后 4 h 内的 SNT 母羊垂体中

MITF 基因在长光照第 49 天的表达量极显著高于短光照第 21 天 ($P < 0.01$), 与上述 *Eya3* 和 *TSH β* 基因的变化趋势一致。因此推测 *MITF* 基因可能与 *Eya3*、*TSH β* 一样, 能通过 mRNA 转录水平差异参与 SNT 季节性发情上游基因的调控。另一方面, 发现 STH 繁殖器官(卵巢、子宫体、输卵管)中 *MITF* 基因表达量较高且卵泡期卵巢中该基因表达量极显著高于黄体期 ($P < 0.01$), 这与小鼠卵巢细胞中 *MITF* 基因高表达以促进排卵的结果相似^[13]。*MITF* 基因与线粒体自噬通路有关, 其可以通过自噬体-溶酶体融合参与自噬, 在细胞溶酶体合成和细胞自噬过程中发挥重要作用^[31-32]。绵羊和小鼠卵巢中 *MITF* 基因表达结果暗示 *MITF* 基因在卵泡期高表达, 有助于功能卵泡中颗粒细胞自噬以打开排卵通道, 促进排卵。早期研究发现, 哺乳动物输卵管-子宫连接处(宫管连接部)的黏膜皱褶管腔收缩可以抑制精子反向由峡部向壶腹部运送, 即抑制精子入卵^[33]。本试验选择卵泡期 *FecB*+十型的 STH 繁殖器官(卵巢、子宫体、输卵管)进行 qPCR 检测, 在排除 *FecB* 基因突变对绵羊产羔数影响因素后分析 *MITF* 基因表达对产羔数的作用, 结果显示单羔组子宫体、输卵管中 *MITF* 基因表达量极显著 ($P < 0.01$) 或显著 ($P < 0.05$) 高于多羔组, 说明 *MITF* 基因表达水平高低可能与精卵结合、胚胎附植有关。

4 结 论

本研究初步探索了 *MITF* 基因表达与绵羊繁殖的关系, 结果提示 *MITF* 基因可能通过垂体中 mRNA 表达差异来影响绵羊季节性发情, 该基因对绵羊产羔数有一定影响。

参考文献 References

- [1] Greives T J, Mason A O, Scotti M A, Levine J, Ketterson E D, Kriegsfeld L J, Demas G E. Environmental control of kisspeptin: Implications for seasonal reproduction [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(3): 1158-1166
- [2] 黄冬维, 储明星, 狄冉, 刘秋月, 胡文萍, 王翔宇, 潘章源, 郭晓飞. 山羊繁殖季节性相关基因 *KiSS-1* 与 *RFRP* 的表达研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(6): 924-931
Huang D W, Chu M X, Di R, Liu Q Y, Hu W P, Wang X Y, Pan Z Y, Guo X F. Study on expression of *KiSS-1* and *RFRP* genes related to reproductive seasonality in goats [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2015, 46(6): 924-931 (in Chinese)
- [3] Dallmann R, Brown S A, Gachon F. Chronopharmacology: New insights and therapeutic implications [J]. *Annual Review of Pharmacology*, 2014, 54(1): 339-361
- [4] Montgomery G W, Crawford A M, Pentyl J M, Dodds K G, Ede A J, Henry H M, Pierson C A, Lord E A, Galloway S M, Schmack A E. The ovine Booroola fecundity gene (*FecB*) is linked to markers from a region of human chromosome 4q [J]. *Nature Genetics*, 1993, 4(4): 410-414
- [5] Souza C J, Campbell B K, Webb R, Baird D T. Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (*FecB*) [J]. *Endocrinology*, 1997, 138(12): 5333-5340
- [6] Galloway S M, McNatty K P, Cambridge L M, Laitinen M P, Juenge J L, Jokiranta T S, McLaren R J, Luiro K, Dodds K G, Montgomery G W, Beattie A E, Davis G H, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner [J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(3): 279-283
- [7] Dong J, Albertini D F, Nishimori K, Kumar T R, Lu N, Matzuk M M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis [J]. *Nature*, 1996, 383(6600): 531-535
- [8] Bodensteiner K J, Clay C M, Moeller C L, Sawyer H R. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries [J]. *Biology of Reproduction*, 1999, 60(2): 381-386
- [9] Xia Q Y, Wang X T, Ye S B, Wang X, Li R, Shi S S, Fang R, Zhang R S, Ma H H, Lu Z F, Shen Q, Bao W, Zhou X J, Rao Q. Novel gene fusion of *PRCC-MITF* defines a new member of *MiT* family translocation renal cell carcinoma: Clinicopathological analysis and detection of the gene fusion by RNA sequencing and fish [J]. *Histopathology*, 2018, 72(5): 786-794
- [10] Meadows N A, Sharma S M, Faulkner G J, Ostrowski M C, Hume D A, Cassady A I. The expression of *Cln7* and *Ostml* in osteoclasts is coregulated by microphthalmia transcription factor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(3): 1891-1904
- [11] Martina J A, Diab H I, Li H Q, Puertollano R. Novel roles for the *MITF/TFE* family of transcription factors in organelle biogenesis, nutrient sensing, and energy homeostasis [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71(13): 2483-2497
- [12] Hodgkinson C A, Moore K J, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland N G, Jenkins N A, Arnheiter H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein [J]. *Cell*, 1993, 74(2): 395-404
- [13] Watanabe H, Tatsumi K, Yokoi H, Higuchi T, Iwai M, Fukuoka M, Fujiwara H, Fujita K, Nakayama H, Mori T, Fujita J. Ovulation defect and its restoration by bone marrow transplantation in osteopetrotic mutant mice of *Mitf*(*mi*)/*Mitf*(*mi*) genotype [J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57(6): 1394-1400

- [14] Vachtenheim J, Borovansky J. Transcription physiology of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF[J]. *Experimental Dermatology*, 2010, 19(7): 617-627
- [15] Monika R, Arne L. Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2013, 24(6-7): 576-586
- [16] Bauer G L, Praetorius C, Bergsteinsdóttir K, Hallsson J H, Gísladóttir B K, Schepsky A, Swing D A, Osullivan T N, Arnheiter H, Bismuth K, Debbache J, Fletcher C, Warming S, Copeland N G, Jenkins N A, Steingrímsson E. 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
- [17] Bharti K, Liu W, Csermely T, Bertuzzi S, Arnheiter H. Alternative promoter use in eye development: The complex role and regulation of the transcription factor MITF [J]. *Development*, 2008, 135(6): 1169-1178
- [18] Lu S Y, Wan H C, Li M, Lin Y L. Subcellular localization of MITF in monocytic cells [J]. *Histochemistry & Cell Biology*, 2010, 133(6): 651-658
- [19] 曹晓涵,刘秋月,王翔宇,狄冉,胡文萍,张效生,张金龙,曾宪垠,储明星. 小尾寒羊黄体期和卵泡期生殖轴凋亡基因的表达研究及其与发情的关系[J]. 畜牧兽医学报,2017,48(11): 2091-2097
- Cao X H, Liu Q Y, Wang X Y, Di R, Hu W P, Zhang X S, Zhang J L, Zeng X Y, Chu M X. Expression levels of apoptotic gene in HPG axis during luteal and follicular periods and their association with estrus in small-tail Han sheep[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48(11): 2091-2097 (in Chinese)
- [20] 董新龙,胡文萍,贺小云,郭晓飞,潘章源,狄冉,刘秋月,王翔宇,曹晓涵,王金玉,储明星. 绵羊 BMP15 组织表达特征及 $FecX^{Gr}$ 、 $FecX^O$ 和 G971A 突变的检测[J]. 农业生物技术学报,2016,24(12): 1810-1819
- Dong X L, Hu W P, He X Y, Guo X F, Pan Z Y, Di R, Liu Q Y, Wang X Y, Cao X H, Wang J Y, Chu M X. Tissue expression and detection of the $FecX^{Gr}$, $FecX^O$ and G971A mutations of BMP15 gene in sheep [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(12): 1810-1819 (in Chinese)
- [21] 周梅,狄冉,胡文萍,王翔宇,张效生,张金龙,刘秋月,储明星. 小尾寒羊和苏尼特羊 CRH 和 $POMC$ 基因在繁殖相关组织中的差异性表达[J]. 中国草食动物科学,2017,37(04): 1-4
- Zhou M, Di R, Hu W P, Wang X Y, Zhang X S, Zhang J L, Liu Q Y, Chu M X. Different expression of CRH and $POMC$ genes in reproductive related tissues in small-tail Han sheep and Sunite sheep [J]. *China Herbivore Science*, 2017, 37(04): 1-4 (in Chinese)
- [22] 汤继顺,狄冉,刘秋月,王翔宇,张效生,张金龙,胡文萍,储明星. 精卵融合相关基因 CD9 和 CD81 在绵羊组织中的表达分析[J]. 农业生物技术学报,2018,26(1): 87-95
- Tang J S, Di R, Liu Q Y, Wang X Y, Zhang X S, Zhang J L, Hu W P, Chu M X. Tissue expression analysis of $CD9$ and $CD81$ genes associated sperm-egg fusion in sheep [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(1): 87-95 (in Chinese)
- [23] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108
- [24] Dardente H. Circannual biology: The double life of the seasonal thyrotroph [J]. *Current Biology*, 2015, 25(20): 988-991
- [25] Tamai T K, Yoshimura T. Molecular and neuroendocrine mechanisms of avian seasonal reproduction [J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2017, 1001: 125-136
- [26] Proudman J A, Clerens S, Van D B G, Garrett W M, Verhaert P D, Vandesande F, Berghman L R. Immunohistochemical localization of chromogranin A in gonadotrophs and somatotrophs of the turkey and chicken pituitary [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2003, 132(2): 293-303
- [27] Dardente H, Wyse C A, Birnie M J, Dupré S M, Loudon A S, Lincoln G A, Hazlerigg D G. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals [J]. *Current Biology*, 2010, 20(24): 2193-2198
- [28] Masumoto K, Ukaitadenuma M, Kasukawa T, Nagano M, Uno K D, Tsujino K, Horikawa K, Shigeyoshi Y, Ueda H R. Acute induction of $Eya3$ by late-night light stimulation triggers TSH β expression in photoperiodism [J]. *Current Biology*, 2010, 20(24): 2199-2206
- [29] Dardente H, Lomet D, Robert V, Decourt C, Beltramo M, Pellicer-Rubio M T. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back [J]. *Theriogenology*, 2016, 86(1): 324-332
- [30] 夏青,张效生,刘秋月,王翔宇,贺小云,郭晓飞,胡文萍,张金龙,储明星,狄冉. $Eya3$ 和 TSH β 在季节性发情和常年发情绵羊中的表达模式[J]. 畜牧兽医学报,2018,49(2): 263-269
- Xia Q, Zhang X S, Liu Q Y, Wang X Y, He X Y, Guo X F, Hu W P, Zhang J L, Chu M X, Di R. Expression patterns of $Eya3$ and TSH β in seasonal estrus and year-round estrus sheep [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2018, 49(2): 263-269 (in Chinese)
- [31] Arena G, Valente E M. PINK1 in the limelight: Multiple functions of an eclectic protein in human health and disease [J]. *Journal of Pathology*, 2017, 241(2): 251-263
- [32] Yamano K, Matsuda N, Tanaka K. The ubiquitin signal and autophagy: An orchestrated dance leading to mitochondrial degradation [J]. *Embo Reports*, 2016, 17(3): 300-316
- [33] Ziskind G, Paltiel Y, Eibschitz I, Ohel G, Weichselbaum A. The effect of human fallopian tube epithelium on human sperm velocity motility and binding [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2000, 17(3): 147-150