

促性腺激素释放激素受体(GnRHR)基因多态性及其与山羊产羔数的相关性分析

黄杨河¹, 王凭青^{1*}, 杨力¹, 储明星², 张宝云¹, 邓腊梅¹, 谭颖¹, 樊奇¹

(1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所
农业部畜禽遗传资源与利用重点开放实验室, 北京 100193)

摘要: 本研究采用候选基因法对与繁殖性能有关的遗传标记进行筛选, 旨在为山羊高产仔数的标记辅助选择提供确切的遗传依据。参考牛的促性腺激素释放激素受体(Gonadotropin releasing hormone receptor, GnRHR)基因序列设计4对引物, 采用聚合酶链式反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)技术检测GnRHR基因在波尔山羊以及我国西南地区9个地方山羊品种中的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP), 同时在川东白山羊、古蔺马羊和贵州白山羊3个群体中研究该基因多态性与山羊产仔数之间的相关性。结果显示, 4对引物中只有引物P1扩增片段检测出多态性。对于P1的扩增片段, 在不同的山羊品种中检测到AA、GG和AG3种基因型, 测序分析表明GG与AA型相比有一处单碱基突变(154G→A)。AA基因型个体在3个群体中产羔数最小二乘均值都显著高于GG和AG基因型个体($P < 0.05$), GA基因型个体在古蔺马羊中的产羔数显著高于GG型个体($P < 0.05$), 而在其它2个品种中差异不显著($P > 0.05$)。本研究结果初步表明山羊GnRHR基因的突变与其繁殖性能有关, 可能是影响山羊繁殖率的一个因素。

关键词: 山羊; 繁殖力; GnRHR基因; PCR-SSCP

中图分类号: S827; Q343.15

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0022-07

Polymorphism of Gonadotropin Releasing Hormone Receptor (GnRHR) Gene and Its Relationship with Litter Size in Goats

HUANG Yang-he¹, WANG Ping-qing^{1*}, YANG Li¹, CHU Ming-xing², ZHANG Bao-yun¹,
DENG La-mei¹, TAN Ying¹, FAN Qi¹

(1. Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The objectives of the present study were to search for genetic markers associated with high prolificacy by candidate gene approach and to give a scientific genetic basis for marker-assisted selection for high reproductivity in goats. According to the *Bos taurus* GnRHR gene sequence, four pairs of primers were designed to detect single nucleotide polymorphisms of GnRHR gene in Boer and other nine breeds of goats in southwest China by PCR-SSCP. The relationship between the polymorphism of GnRHR gene and litter size was observed in Chuandong White goat, Gulin Ma goat and Guizhou White goat. Only the sequences amplified by primers P1 showed polymorphisms. Genotypes (AA, AG and GG) were detected in different goat breeds. The sequencing results revealed that the genotype GG had one mutation (154G→A) compared to AA genotype.

收稿日期: 2011-02-24

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-39); 重庆市自然科学基金重点项目(CSTC, 2009BA1066); 中央高校基本科研业务费(CDJXS11230009)

作者简介: 黄杨河(1987-), 男, 广西梧州人, 硕士生, 主要从事分子遗传学研究, E-mail: huangyanghe@126.com

* 通讯作者: 王凭青(1962-), 博士, 教授, 主要从事分子遗传学研究, Tel: 023-65112753, E-mail: wang_pq@21cn.com

The goats with genotype AA have significant higher litter size than those with genotype GG and AG in three breeds of goats ($P < 0.05$). And the goats with genotype GA were higher than those with genotype GG ($P < 0.05$) in Gulin Ma goat. The finding showed that the *GnRHR* gene was related to the prolificacy of goats, which may be a factor affecting the reproduction in goats.

Key words: goat; prolificacy; *GnRHR* gene; PCR-SSCP

标记辅助选择育种通过影响选择的时间、强度以及准确性而极大提高低遗传力性状的选择效果,要实现标记辅助选择首先要找到与性状基因座相连锁的分子遗传标记。下丘脑释放的促性腺激素释放激素(Gonadotropin releasing hormone, GnRH)在控制哺乳动物生殖生理和性腺发育中起着重要作用^[1-3]。GnRH 通过与定位于垂体促性腺细胞膜上的促性腺激素释放激素受体(Gonadotropin releasing hormone receptor, GnRHR)结合,促进垂体前叶合成和分泌促卵泡素(Follicle stimulating hormone, FSH)和促黄体素(Luteinizing hormone, LH),进而调控性腺的功能,包括激素合成与配子生成^[4-6]。GnRHR 属于 7 个跨膜结构的 G 蛋白偶联受体家族成员^[7],主要在垂体表面的促性腺细胞中表达,同时在淋巴细胞、乳腺、卵巢和前列腺中也有表达^[8]。Kim 等^[9]发现 *GnRH* 基因及其受体基因表达的抑制,限制了哺乳动物的生殖活动。近年来,许多科研人员把 *GnRHR* 基因作为影响家畜繁殖性能的候选基因来研究,取得了一系列科研成果。研究显示,梅山猪 *GnRHR* 基因 1 721 位点 G 等位基因与较高的第一胎产仔数和较高的黄体数显著相关^[10]。孙洁等^[11]发现 *GnRHR* 基因多态性与小尾

寒羊的高繁殖力也存在相关性。韩丹等^[12]在山羊 *GnRHR* 基因中发现 2 个多态位点,并且这 2 个多态位点都与其产羔数显著相关,但其仅分析了西农萨能奶山羊和波尔山羊 2 个品种。

我国西南地区山羊品种资源丰富,不同品种间繁殖性状差异明显,本研究拟以该地区山羊品种为研究对象,检测 *GnRHR* 基因的多态性,并在贵州白山羊、古蔺马羊和川东白山羊 3 个群体中研究 *GnRHR* 基因多态性与山羊繁殖性状之间的相关性,从而获得更全面准确的遗传信息,为选育高繁殖力山羊品种的标记辅助选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 基因组 DNA 提取

通过随机取样方法,从西南地区 8 个种羊场随机抽取样本。山羊品种、数量以及采样羊场信息见表 1。使用颈静脉采血,每只山羊采集 10 mL 血样,用柠檬酸葡萄糖抗凝,冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。基因组 DNA 的制备使用酚氯仿抽提法,并溶于 TE 缓冲液($1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0), $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0))中,保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

表 1 山羊的品种、数量和羊场

Table 1 The breed, number and goats farm of goat

品种 Breed	数量/只 Number	羊场 Goat farm
川东白山羊 Chuandong White	58	重庆市云阳县一口鲜种羊场
金堂黑山羊 Jintang Black	46	重庆市云阳县一口鲜种羊场
波尔山羊 Boer	40	重庆市云阳县一口鲜种羊场
板角山羊 Banjiao	49	重庆市巫溪县板角山羊种羊场
大足黑山羊 Dazu Black	55	重庆市大足县大足黑山羊种羊场
贵州白山羊 Guizhou White	106	贵州省沿河县贵州白山羊种羊场
南江黄羊 Nanjiang Brown	78	四川省南江县南江黄羊种羊场
成都麻羊 Chengdu Brown	40	四川省大邑县成都麻羊种羊场
古蔺马羊 Gulin Ma	65	四川省古蔺县古蔺马羊种羊场
马头山羊 Matou	46	湖北省郧西县马头山羊种羊场

1.2 主要试剂

dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 回收纯化试剂盒、pUM-T 载体等均购于大连宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

参照牛 *GnRHR* 基因序列 (NC_007304.3) 用 Oligo 6.0 软件设计 4 对引物, 扩增山羊 *GnRHR* 基

因的 3 个外显子。由深圳华大基因科技有限公司合成引物, 引物序列见表 2。

PCR 反应总体积为 25 μL , 体系包括: 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物各 1 μL , 10 \times *Taq* Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U (0.5 μL), 10.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 0.5 μL , 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 3.0 μL , 超纯水 16.5 μL 。

表 2 山羊促性腺激素释放激素受体基因的引物序列

Table 2 Primer sequences of goat *GnRHR* gene

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	扩增区域 Amplified region	产物大小/bp Products size
P1	F: ACAGGACTCCAAGTGCAATTAC R: CGAGAGTTTTTTCCTCTTCTC	外显子 1	301
P2	F: CGAGAATGAAGTTGCTTTTAAAAC R: CTGTGGTCCAGCAAAGAT	外显子 1	302
P3	F: CTATACATCTTTGGGATGATCCAT R: TGTGGGGATCCTGATGAAGG	外显子 2	220
P4	F: AACTACAACGAATCAGTCCAAGAAC R: CTTTCTATGCAGTCTAACAATTAT	外显子 3	265

PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s (引物 P1~P4 的退火温度分别为 60、60、56、56 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 SSCP 分析

将 3 μL PCR 产物和 7 μL 上样缓冲液 (98% 甲酰胺、10% 甘油、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0)、0.025% 二甲苯青、0.025% 溴酚蓝) 混匀, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 然后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 10 min。用交联度 (丙烯酸酰胺: 甲叉双丙烯酸酰胺) 为 39:1 的非变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳: 300 V 预电泳 10 min, 120 V 电泳 24 h。最后银染显色, 分析带型。

1.5 克隆测序

选择不同基因型个体进行 PCR 扩增, 并用 DNA 片段回收纯化试剂盒进行回收纯化, 然后与 pUM-T 载体进行连接反应, 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 构建重组质粒, 并转化入感受态细胞大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株, 菌落 PCR 鉴定后由深圳华大基因科技有限公司完成测序。

1.6 统计分析

使用如下模型对试验数据进行最小二乘方差分析, 用 SAS (V8.12) 的 GLM (General linear model) 过程分别比较川东白山羊、古罗马羊和贵州白山羊产仔数在 *GnRHR* 基因不同基因型之间的差异。

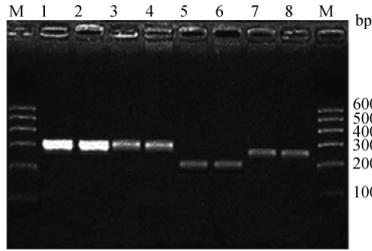
$$y_{ijklm} = \mu + S_i + KS_j + P_k + G_l + e_{ijklm}$$

其中: y_{ijklm} 为产仔数的记录值; μ 为群体平均值; S_i 为第 i 头公羊的固定效应; KS_j 为第 j 个产仔季节的固定效应; P_k 为第 k 个胎次的固定效应; G_l 为 *GnRHR* 基因第 l 种基因型的固定效应; e_{ijklm} 为随机残差效应。

2 结果

2.1 PCR 扩增

用引物 P1、P2、P3 和 P4 对不同山羊个体的基因组进行 PCR 扩增, 所得 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1)。图中可以看到扩增产物没有非特异性条带, 且片段大小与预期的序列长度相符, 因此可以用于下一步 SSCP 分析。



1,2. 引物 P1 的 PCR 产物;3,4. 引物 P2 的 PCR 产物;
5,6. 引物 P3 的 PCR 产物;7,8. 引物 P4 的 PCR 产物;
M. DNA 相对分子质量标准
1,2. PCR products of P1; 3,4. PCR products of P2; 5,
6. PCR products of P3; 7,8. PCR products of P4;
M. 600 bp DNA marker

图 1 引物 P1~P4 的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of four pairs of primers

2.2 多态性分析

对 4 对引物扩增的 PCR 产物分别进行了 SSCP 分析,发现只有引物 P1 的扩增片段存在多态性,其余 3 对引物的扩增片段均不存在多态性。引物 P1 的 SSCP 分析显示存在 3 种基因型,分别定义为 AA、GG 和 AG 型(图 2)。

2.3 序列分析

选取纯合型的 PCR 产物片段进行克隆、测序。以牛的 *GnRHR* 基因(NC_007304.3)序列作为对照,比对发现 GG 与 AA 基因型相比在 154 bp 处发生 G→A 的单碱基突变,该突变并未导致氨基酸的变化,为沉默突变(图 3)。

2.4 *GnRHR* 基因在 10 个山羊品种中的遗传多态性

表 3 10 个山羊品种中 *GnRHR* 基因的基因型和等位基因频率

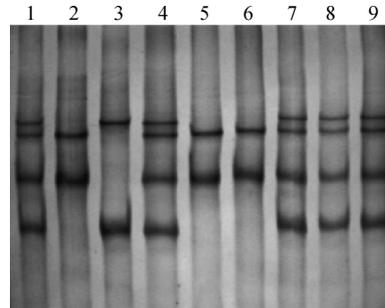
Table 3 Genotype and allele frequencies of *GnRHR* gene in ten goat breeds

品种 Breed	数量 Number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
		GG	AA	AG	G	A
波尔山羊 Boer	40	0.925 (37)	0(0)	0.075 (3)	0.962	0.038
川东白山羊 Chuandong White	58	0.310 (18)	0.275 (16)	0.414 (24)	0.517	0.483
大足黑山羊 Dazu Black	55	0.200(11)	0.236(13)	0.564(31)	0.482	0.518
贵州白山羊 Guizhou White	106	0.349(37)	0.189(20)	0.462(49)	0.580	0.420
金堂黑山羊 Jintang Black	46	0.326(15)	0.261(12)	0.413(19)	0.533	0.467
成都麻羊 Chengdu Brown	40	0.100(4)	0.400(16)	0.500(20)	0.350	0.650
板角山羊 Banjiao	49	0.163(8)	0.449(22)	0.388(19)	0.357	0.643
南江黄羊 Nanjiang Brown	78	0.500(39)	0.154(12)	0.346(27)	0.673	0.327
古蔺马羊 Gulin Ma	65	0.446(29)	0.215(14)	0.339(22)	0.616	0.384
马头山羊 Matou	46	0.630(29)	0.022(1)	0.348(16)	0.804	0.196

括号内的数字表示基因型的个体数

The numbers in the brackets are the individuals that belong to the respective genotypes

GnRHR 基因在 10 个山羊品种中的基因型和等位基因频率如表 3 所示。



1,4,7,8,9. AG 基因型;3. AA 基因型;2,5,6. GG 基因型
1, 4, 7, 8, 9. AG genotype; 3. AA genotype; 2, 5, 6. GG genotype

图 2 不同山羊品种引物 P1 扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 2 SSCP analysis of PCR amplification using primer P1 in different goat breeds

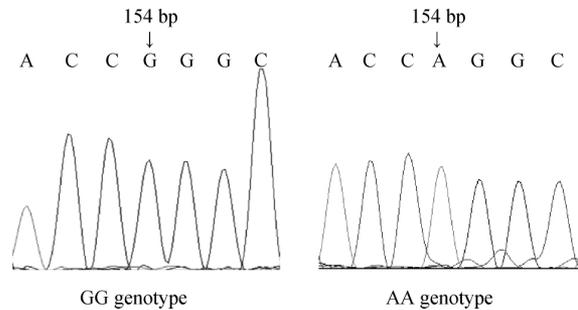


图 3 山羊 *GnRHR* 基因引物 P1 扩增产物中 GG 和 AA 基因型的序列比较

Fig. 3 Sequence comparison of GG and AA genotypes of primer P1 of goat *GnRHR* gene

经 χ^2 适合性检验, 贵州白山羊 ($\chi^2 = 0.28$, $P = 0.871$) 和川东白山羊 ($\chi^2 = 1.70$, $P = 0.426$) 在 P1 位点上均处于哈迪—温伯格平衡状态, 表明选择、突变或迁移等因素对这 2 个山羊品种在 P1 位点的基因型频率没有造成影响。古蔺马羊在 P1 位点上未达到哈迪—温伯格平衡状态 ($\chi^2 = 5.28$, $P = 0.071$), 表明选择、突变和迁移等因素影响了古蔺马羊 P1 位点的基因型频率。

2.5 固定效应对贵州白山羊、古蔺马羊和川东白山羊产羔数的影响

对于 P1 扩增片段, 方差分析结果表明, 贵州白山羊、古蔺马羊和川东白山羊的产羔数均受到了公羊、产羔季节和胎次的影响 (分别为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 和 $P < 0.05$), 而且 *GnRHR* 基因型对贵州白山羊、古蔺马羊和川东白山羊的产羔数也有影响 ($P < 0.05$)。不同 *GnRHR* 基因型的贵州白山羊、古蔺马羊和川东白山羊产羔数的最小二乘均值及标准误差见表 4。

表 4 不同 *GnRHR* 基因型的贵州白山羊、古蔺马羊和川东白山羊产羔数的最小二乘均值及标准误

Table 4 Least squares mean and standard error for litter size of different *GnRHR* genotypes in Guizhou White, Gulin Ma and Chuandong White goats

品种 Breed	基因型 Genotype	样本数/只 No.	产羔数 Litter size
贵州白山羊 Guizhou White	GG	37	1.42 ± 0.05 ^a
	GA	49	1.48 ± 0.04 ^a
	AA	20	1.62 ± 0.08 ^b
古蔺马羊 Gulin Ma	GG	29	1.58 ± 0.06 ^a
	GA	22	1.69 ± 0.06 ^b
	AA	14	1.82 ± 0.10 ^c
川东白山羊 Chuandong White	GG	18	1.67 ± 0.07 ^a
	GA	24	1.75 ± 0.06 ^a
	AA	16	1.95 ± 0.07 ^b

同一个品种具有相同字母肩标的平均值间差异不显著 ($P > 0.05$), 具有不同字母肩标的平均值间差异显著 ($P < 0.05$)

Least squares means with the same superscript for the same goat breed have no significant difference ($P > 0.05$), least square means with the different superscripts for the same goat breed differ significantly ($P < 0.05$)

由表 4 可以看出, 对于贵州白山羊, AA 基因型个体的产羔数最小二乘均值分别比 GG 和 GA 基因型个体多 0.20 ($P < 0.05$) 和 0.14 只 ($P < 0.05$), GG 和 GA 基因型个体间的产羔数最小二乘均值没有显著差异 ($P > 0.05$); 对于古蔺马羊, AA 基因型个体产羔数最小二乘均值比 GA 基因型个体多 0.13 只 ($P < 0.05$), 比 GG 基因型个体多 0.24 只 ($P < 0.05$), GA 基因型个体产羔数最小二乘均值比 GG 基因型个体多 0.11 只 ($P < 0.05$); 对于川东白山羊, AA 基因型个体的产羔数最小二乘均值分别比 GG 和 GA 基因型个体多 0.28 ($P < 0.05$) 和 0.20 只 ($P < 0.05$), GG 和 GA 基因型个体间的产羔数最小二乘均值没有显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

GnRH 信号通路由于其在性别分化与生殖功能中的重要作用已被广泛研究。人卵巢中 GnRH/*GnRHR* 系统的基因表达调控受到性腺类固醇、促性腺激素类激素和促性腺激素释放激素的控制^[13-14]。GnRH 分泌的增加以及垂体 *GnRHR* 浓度的升高促进了哺乳动物排卵的发生, 而 *GnRHR* 的缺失能引起排卵障碍, 从而导致不育^[15]。He 等人^[16]的研究表明, 日本鲟 *GnRHR* 基因外显子 2 和 3 中的 SNP 位点与血清中雌二醇水平和性腺生长激素指数显著相关, 这些突变影响性腺类固醇的合成, 从而影响了日本鲟的生殖过程。Antelli 等^[17]研

究发现了位于人 GnRHR 的第一个胞外环上 104 和 108 位的基因突变,这些突变影响了与配体的结合能力,导致人第二性征的发育受阻。Vagenakis 等^[18]在特发性促性腺激素型性腺功能减退(Idopathic hypogonadotropic hypogonadism,IHH)患者中对 GnRHR 基因进行了检测,在 146 位发现了脯氨酸到丝氨酸的突变。Lin 等^[19]研究表明,GnRHR 基因和公猪精子质量以及繁殖力显著相关。Yang 等^[20]报道了荷斯坦牛 GnRHR 基因的 Mbo II 和 BspMI 限制性内切酶多态位点,在第 286 位多态位点,GA 基因型较 GG 基因型的公牛具有更强的精子活力,340 位多态位点上,具有 A 或者 C 等位基因的公牛具有更好的精子质量。因此,GnRHR 基因可以作为影响精子质量的一个较好的遗传标记。Dunn 等^[21]在母鸡群体中使用 PCR-RFLP 检测 GnRHR 基因型的多态性,结果显示,GnRHR 基因对母鸡产双黄蛋和产蛋数分别具有加性效应和显性效应。本研究检测了 10 个山羊品种 GnRHR 基因第 1、2 和 3 外显子的多态性,只在第 1 外显子发现 1 个 G154A 的突变。该突变为沉默突变,但有研究表明沉默突变也可影响体内蛋白的折叠和功能,以及基因的表达和表现型^[22-23]。韩丹等^[12]在波尔山羊第 2 外显子发现 C1440A 突变,但在本研究的 10 个品种中都没有发现这个突变位点,这可能是由于该突变位点 A 等位基因频率低造成的,在其所研究的 100 只波尔山羊中,A 等位基因的频率仅为 0.07,与 C1440A 突变位点相比,本研究检测到的 G154A 突变显示出更高的多态信息含量,尤其是在我国西南地方品种中,但不同品种等位基因频率差异较大,G 等位基因在马头山羊中的频率高达 0.804,而在成都麻羊中仅为 0.350。固定效应分析显示,AA 基因型个体在贵州白山羊、古蔺马羊和川东白山羊 3 个群体中产羔数都显著高于 GG 和 AG 基因型个体($P < 0.05$),GA 基因型个体仅在古蔺马羊中的产羔数显著高于 GG 型个体($P < 0.05$),而在其它 2 个品种中差异不显著($P > 0.05$),这可能是由于不同群体中样本数不同造成的,也可能是由于品种间的差异造成的。

4 结 论

本研究在山羊 GnRHR 基因第 1 外显子 154 位上检测到了 G→A 的单碱基突变。统计分析结果初步表明山羊 GnRHR 基因的突变与其繁殖性能有

关,可能是影响山羊繁殖率的一个因素。

参考文献:

- [1] KUMAR R S, TRANT J M. Piscine glycoprotein hormone (gonadotropin and thyrotropin) receptors : a review of recent developments[J]. *Comp Biochem Phys B Biochem Mol Biol*, 2001, 129(2-3): 347-355.
- [2] KAH O, LETHIMONIER C, SOMOZA G, et al. GnRH and GnRH receptors in metazoan : A historical, comparative, and evolutive perspective[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 153(1-3):346-364.
- [3] IKEMOTO T, ENOMOTO M, PARK M K. Identification and characterization of a reptilian GnRH receptor from the leopard gecko[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 214(12):137-147.
- [4] MILLAR R P, LU Z L, PAWSON A J, et al. Gonadotropin-releasing hormone receptors [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(2):235-275.
- [5] FINCH A R, SEDGLEY K R, CAUNT C J, et al. Plasma membrane expression of GnRH receptors, regulation by antagonists in breast, prostate, and gonadotrope cell lines [J]. *J Endocrinol*, 2008, 196(2):353-367.
- [6] NAOR Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): Studies on the GnRH receptor[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2009, 30(1):10-29.
- [7] STOJILKOVIC S S, REINHART J, CATT K J. Gonadotropin-releasing hormone receptors, structure and signal transduction pathways[J]. *Endocr Rev*, 1994, 15(4):462-499.
- [8] ALBERTSON A J, NAVRATIL A, MIGNOT M, et al. Immunoreactive GnRH type I receptors in the mouse and sheep brain [J]. *J Chem Neuroanat*, 2008, 35(4):326-333.
- [9] KIM J H, KIM H J, NOH H S, et al. Suppression by ethanol of male reproductive activity[J]. *Brain Res*, 2003, 989(1):91-98.
- [10] JIANG Z H, GIBSON J P, ARCHIBALD A L, et al. The porcine gonadotropin-releasing hormone receptor gene (GnRHR): Genomic organization, polymorphisms, and association with the number of corpora lutea[J]. *Genome*, 2001, 44(1):7-12.
- [11] 孙 洁,储明星,陈宏权,等. GnRHR 基因多态性及其与小尾寒羊高繁殖力关系[J]. *农业生物技术学报*, 2008,16(2):230-236.
- [12] 韩 丹,李 广,曹斌云,等. 促性腺激素释放激素受体基因(GnRHR)多态性及其与西农萨能奶山羊产羔

- 性状关系的研究[J]. 中国农业大学学报, 2009, 14(5):93-97.
- [13] METALLINO C, ASIMAKOPOULOS B, SCHROER A, et al. Gonadotropin-releasing hormone in the ovary [J]. *Reprod Sci*, 2007, 14(8):737-749.
- [14] YEUNG C M, AN B S, CHENG C K, et al. Expression and transcriptional regulation of the GnRH receptor gene in human neuronal cells[J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(11):837-842.
- [15] WISE M E, NIEMAN D, STEWART J, et al. Effect of number of receptors for gonadotropin-releasing hormone on the release of luteinizing hormone [J]. *Biol Reprod*, 1984, 31:1007-1013.
- [16] HE F, WEN H S, LI J F, et al. Single nucleotide polymorphisms of the *GnRHR* gene associated with reproductive traits of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2011, 24(4): 463-470.
- [17] ANTELLI A, BALDAZZI L, BALSAMO A, et al. Two novel *GnRHR* gene mutations in two siblings with hypogonadotropic hypogonadism [J]. *Eur J Endocrinol*, 2006, 155(2):201-205.
- [18] VAGENAKIS G A, SGOUROU A, PAPACHATZOPPOULOU A, et al. The gonadotropin releasing hormone (*GnRH*)-1 gene, the GnRH receptor gene and their promoters in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism with or without resistance to GnRH action [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(6):1762-1765.
- [19] LIN C L, PONSUKSILI S, THOLEN E. Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar [J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 92(3-4): 349-363.
- [20] YANG W C, TANG K Q, YU J N, et al. Effects of *Mbo II* and *BspM I* polymorphisms in the gonadotropin releasing hormone receptor (*GnRHR*) gene on sperm quality in Holstein bulls [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(5): 3411-3415.
- [21] DUNN I C, MIAO Y W, MORRIS A. A study of association between genetic markers in candidate genes and reproductive traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population [J]. *Heredity*, 2004, 92(2):128-134.
- [22] KIMCHI-SARFATY C, OH J M, KIM I W, et al. A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity [J]. *Science*, 2007, 315(5811): 525-528.
- [23] SAUNA Z E, KIMCHI-SARFATY C, AMBUDKAR S V, et al. Silent Polymorphisms speak: How they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(20):9609-9612.

(编辑 郭云雁)