

doi:10.7668/hbxb.2014.06.015

GnRHR 基因多态性与崂山奶山羊产羔数的关联分析

柳楠¹, 马晓丽¹, 程明², 刘开东², 贺建宁¹, 刘积凤¹

(1. 青岛农业大学 动物科技学院, 山东 青岛 266109; 2. 青岛市畜牧兽医研究所, 山东 青岛 266200)

摘要:为阐明 *GnRHR* 基因的多态性与崂山奶山羊产羔数的关系,设计 7 对引物,采用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 技术检测 *GnRHR* 基因在不同产羔数崂山奶山羊的单核苷酸多态性,并分析其与产羔数的关系。结果显示:该基因存在 2 个多态位点,A261G 突变对于初产母羊 GA 型产羔数比 AA 型多 0.06 只,比 GG 型多 0.04 只,差异不显著 ($P > 0.05$);对于经产母羊 GA 型产羔数比 AA 型多 0.35 只,差异显著 ($P < 0.05$),比 GG 型多 0.45 只,差异不显著 ($P > 0.05$)。G55A 位点共检测到 GG 和 GA 这 2 种基因型,其中对于初产母羊 GG 型比 GA 型产羔数多 0.13 只,经产母羊 GG 型比 GA 型产羔数多 0.19 只,但差异均不显著 ($P > 0.05$)。因此,*GnRHR* 基因 A261G 突变位点可能是影响崂山奶山羊产羔性能一个潜在的有效分子标记。

关键词: *GnRHR* 基因;奶山羊;产羔数

中图分类号:S826.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)06-0078-06

Correlation Analysis Polymorphism of *GnRHR* Gene and Litter Size of Laoshan Dairy Goats

LIU Nan¹, MA Xiao-li¹, CHENG Ming², LIU Kai-dong², HE Jian-ning¹, LIU Ji-feng¹

(1. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. The Animal Husbandry and Veterinary Research Institute of Qingdao City, Qingdao 266200, China)

Abstract: The objectives of the present study were to elucidate the polymorphism of *GnRHR* gene and its relationship with litter size of Laoshan dairy goat. Seven pairs of primers were designed to detect single nucleotide polymorphism (SNP) of *GnRHR* gene in Laoshan dairy goat with different kids by PCR-RFLP and PCR-SSCP. The results showed two mutations (A261G and G55A) were detected. For A261G locus in exon1, the does with genotype GA had 0.06 and 0.04 kids more than those with genotype AA and GG in primipara ewes, but the differences were not significant ($P > 0.05$); the does with genotype GA had 0.35 and 0.45 kids more than those with genotype AA and GG in multiparity ewes ($P > 0.05$). For G55A locus, two genotypes (GG and GA) were detected, the does with genotype GG had 0.13 and 0.19 more than those with genotype GA in primipara ewes and multiparity ewes, respectively. However the differences were not significant ($P > 0.05$). These results preliminarily indicated that A261G locus of *GnRHR* gene is a potential molecular marker for improving litter size in dairy goats.

Key words: *GnRHR* gene; Dairy goats; Litter size

促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH), 是一种由脑组织分泌的十肽神经激素,它是下丘脑-垂体-性腺轴的关键神经内分泌调节因子^[1-3]。这种十肽小分子由下丘脑的神经内分泌细胞分泌然后进入门静脉系统随血流进入垂体,并与位于垂体前叶的促性腺激素细胞上的特异性受体 (GnRHR) 结合,从而刺激垂体细胞分泌黄体

生成激素 (Luteinizing hormone, LH) 和卵泡刺激激素 (Follicle-stimulating, FSH)^[4], 进而促进性腺的生长、成熟和调控哺乳动物的繁殖力^[5]。GnRHR 是位于垂体促性腺细胞表面的一种 G 蛋白耦联受体,转导 GnRH 信号,并调节 LH 和 FSH 的合成和分泌。Montgomery 等^[6] 通过研究将绵羊的 *GnRHR* 基因定位到 6 号染色体上。Campion 等^[7] 获得了绵羊 *GnRHR*

收稿日期:2014-07-27

基金项目:山东省科技发展计划项目(2011GNC11108)

作者简介:柳楠(1960-),男,黑龙江海伦人,教授,博士,主要从事羊的遗传育种研究。

基因完全的编码序列,绵羊 *GnRHR* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成,3 个外显子全长 984 bp。

1 材料和方法

1.1 材料来源

以青岛奥特种羊场饲养的崂山奶山羊为研究对象,选择产羔记录齐全的初产母羊 84 只和经产母羊 176 只,共 260 只,采取耳组织。

1.2 主要试剂

组织基因组 DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、TOP10 感受态细胞等购自天根生化科技(北京)有限公司。X-gal、IPTG、氨苄青霉素钠(Amp)、胰蛋白胨、酵母提取物、T 载体试剂盒等购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Dream TaqTMGreen PCR Master Mix (2 ×)、NaOH、Tris、

Na₂EDTA·2H₂O、NaCl、冰乙酸、溴化乙锭(EB)、无水乙醇、Tris 饱和酚、丙烯酰胺(Acr)、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(Bis)、过硫酸铵、亲和硅烷、剥离硅烷、去离子甲酰胺、二甲苯胺、溴酚蓝等购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 耳组织基因组提取采用 DNA 提取试剂盒。1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因的完整性及纯度,蛋白核酸分析仪测量其浓度, -20 °C 冷冻保存。

1.3.2 引物设计 根据绵羊的 *GnRHR* 基因 GenBank 登录号 AH004943. 2 和 L42937. 1 使用软件 Primer 5.0 设计 7 对引物并合成,引物序列如表 1 所示。

表 1 *GnRHR* 基因引物序列

Tab. 1 The sequence of *GnRHR* gene primers

引物名称 Primer	序列(5' - 3') Sequence	片段长度/ bp Fragment length	T _m 值/°C T _m	方法 Methods
<i>GnRHR1</i>	TGTTTCATAGAGAACAGGTCTGAA GATGCTGCTGTTGATCGCTG	663	56	PCR-RFLP
<i>GnRHR2</i>	CCATTTAGCAGATGACTC TAGGGTGAAGATGATTTT	172	50	PCR-SSCP
<i>GnRHR3</i>	TAAAGGATGGCAAACGGTG TCCAGCAGGTTGGCTAAAG	275	55	PCR-SSCP
<i>GnRHR4</i>	TCTTGAAGCTGTATCAGCCATA GTGTTGAAAATTGTGAGAGTAGA	187	50	PCR-SSCP
<i>GnRHR5</i>	AAAACATCAGAAGTGCC TCTTTCCTTTGAGTCCA	257	50	PCR-SSCP
<i>GnRHR6</i>	CCTACAGTTATACATCTTTGGGA GAGAAATACATACTGTGGGGAT	241	56	PCR-SSCP
<i>GnRHR7</i>	ATTTGCCACTTCATTTA GCCTTTCCTTTGACTTTC	207	45	PCR-SSCP

1.3.3 PCR-SSCP PCR 扩增的最佳条件为:94 °C 5 min;然后 94 °C 30 s,T_m 值 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增反应体系为 25 μL,包括: Dream Taq Green PCR Master Mix(2 ×) 12.5 μL、ddH₂O 9.5 μL、上下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL。配制 12% 聚丙烯酰胺凝胶,将 PCR 产物变性处理,取 2.5 μL 变性产物点样于点样孔,过夜电泳,观察不同的基因型。

1.3.4 克隆测序 将 PCR-SSCP 区分出的不同基因型各取 5 个样经过 PCR、胶回收、连接、转化、筛选、摇菌等步骤得到菌样,送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.3.5 DNA 混池 DNA 样品稀释成相同的浓度,各取 2 μL 混池。

1.3.6 PCR-RFLP 将 DNA 池与引物进行 PCR 扩增,产物胶回收后送公司测序。针对测序结果通过

NEB Cutter V2.0 网站找到合适的限制性内切酶,进行 PCR-RFLP 并区分不同基因型。

1.4 统计分析

1.4.1 哈代温伯格平衡检验 利用卡方检验群体是否处在哈代温伯格平衡状态。卡方检验是度量实际观测次数与理论次数偏离程度的一个统计量,公式如下:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

其中, *O* 代表每个基因型的观测数目, *E* 代表每一个基因型在哈代-温伯格平衡定律成立的假定下的期望数目。

1.4.2 有效等位基因数(*N_e*) 有效等位基因数是反映群体变异大小的指标。其公式如下:

$$N_e = 1/\sum P_i^2$$

1.4.3 杂合度(*H_e*) 杂合度是杂合性的一种状态

程度,反映一个位点具有两个以上的等位基因的状态。杂合度计算公式如下:

$$He = 1 - \sum P_i^2$$

1.4.4 多态信息含量(PIC) 多态信息含量用于对标记基因多态性的估计。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

其中, P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。 $PIC > 0.5$ 为高度多态; $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态; $PIC < 0.25$ 为低度多态。

1.4.5 各基因型与产羔性状的关联分析模型 采用 SAS 软件对各基因型与产羔性状进行关联分析。所选用的线性模型为:

$$Y_{ijk} = \mu + G_j + T_k + E_{ijk}$$

式中, Y_{ijk} 为第 i 个个体的第 j 个基因型第 k 个胎次个体的性状表型值; μ 为群体平均值; G_j 为第 j 个个体的基因型效应值; T_k 为第 k 胎次效应; E_{ijk} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 引物 *GnRHRI* 扩增产物检测结果及与产羔数的关联分析

DNA 混池的 PCR 结果如图 1 所示;引物 *GnRHRI* 测序峰图如图 2 所示,可知在该引物扩增的目的片段在 261 位置处出现 A→G 碱基的突变。野生型标记为 AA 型,纯突变型标记为 GG 型,杂合型用 GA 型表示,突变位点用 A261G 表示。不同基因型间的碱基序列对比如图 3 所示。

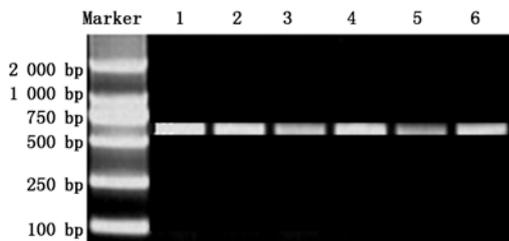


图 1 DNA 混池引物 *GnRHRI* PCR 结果

Fig.1 PCR result about DNA mix pool of primer *GnRHRI*

由于引物 *GnRHRI* 扩增的片段较长,寻找突变位点处的限制性内切酶存在一些问题,为解决这一问题,针对包括突变位点在内的碱基序列重新设计引物 N1。引物序列如下:上游引物:5'-GCTCAGCA TTGTGTGATTG-3';下游引物:5'-CTTGT TTTGTGGC CTTGTA-3';总目的片段长为 370 bp,PCR 结果如图 4。A261G 位点不存在突变时,限制性内切酶 *Ssp* I 可以识别该位点,将目的片段切成 260 bp 和 100 bp,表现出 2 条带型,标记为 AA 型;当存在 2 条链突变时,限制性内切酶 *Ssp* I 无法识别突变位点表现出 1

种带型,标记为 GG 型;当只存在 1 条链突变时,突变的 1 条链显示 2 条不完整的条带,未突变的 1 条链则表现出 1 条完整的条带,结果会导致出现不同的 3 条带,标记为 GA 型(图 5)。

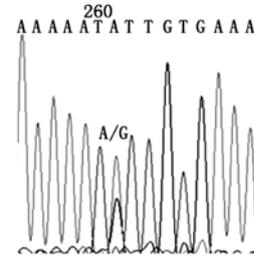


图 2 引物 *GnRHRI* 测序峰图

Fig.2 Sequence map of primer *GnRHRI*



图 3 引物 *GnRHRI* 碱基序列对比

Fig.3 Comparison about base sequence of primer *GnRHRI*

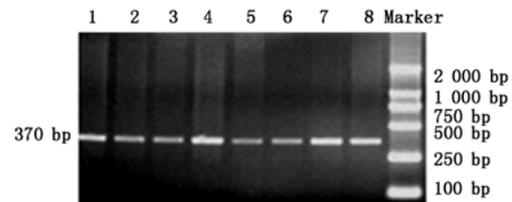


图 4 引物 N1 PCR 结果

Fig.4 PCR result of primer N1

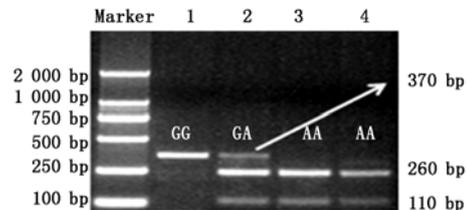


图 5 引物 N1 酶切结果

Fig.5 Enzyme digestion result of primer N1

根据酶切结果,统计 A261G 突变位点的基因频率和基因型频率,统计结果如表 2 所示。A261G 突变位点 AA 型基因型频率最大,GG 型最小;A 为优势基因。

表 2 引物 N1 扩增片段基因频率和基因型频率

Tab.2 Genotypic frequencies and allelic frequencies of amplified primers N1 fragments

基因型 Genotype	基因型频率 Genotypic frequencies	基因频率 Allelic frequencies
GG	0.066 2	G 0.156 6
GA	0.216 9	A 0.843 4
AA	0.734 9	

通过计算得到 A261G 突变位点多态信息含量 (PIC)、杂合度 (He)、有效等位基因数 (Ne) 分别为 0.228 9, 0.264 2, 1.359 0, PIC 小于 0.25, 处于低度多态。根据卡方检验,结果说明采样群体处于哈代温伯格平衡状态。

根据得到的 3 种基因型, 将其与产羔数进行关联分析, 结果如表 3 所示。对于初产母羊 GA 型比 AA 型产羔数多 0.06 只, 比 GG 型多 0.04 只, 但差异不显著。对于经产母羊 GA 型产羔数比 AA 型多 0.35 只, 比 GG 型多 0.45 只。其中, GA 型与 AA 型产羔数差异显著, 其他基因型间的产羔数差异不显著。

表 3 引物 N1 扩增片段多态性与崂山奶山羊产羔数的关联分析

Tab. 3 Analysis of polymorphism about frequencies amplified primer N1

基因型 Genotype	初产母羊/只 Primipara ewe	经产母羊/只 Multipara ewe
AA	1.58 ± 0.078a	1.77 ± 0.083b
GA	1.64 ± 0.152a	2.12 ± 0.105a
GG	1.60 ± 0.245a	1.67 ± 0.333ab

注: 同列不同字母表示差异显著 ($0.01 < P < 0.05$); 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。表 5 同。

Note: The same column with no common means differ significantly ($0.01 < P < 0.05$); The same column with common does not mean differ significantly ($P > 0.05$). The same as Tab. 5.

2.2 *GnRHR* 基因其他引物的检测结果

GnRHR 基因除引物 *GnRHR1* 采用了 PCR-RFLP 方法外, 其他引物采用 PCR-SSCP 方法进行检测。

2.2.1 引物 PCR 结果 每对引物 PCR 结果如图 6~11 所示, 每个 PCR 产物大小与目的片段相同, 每对引物都具有良好的特异性。

2.2.2 引物 SSCP 结果 对这些引物扩增片段进行 SSCP 分析, 结果如图 12~17 所示, 只有引物 *GnRHR3* 扩增片段存在不同的条带, 说明引物 *GnRHR3* 扩增片段存在多态性。对该引物的扩增片段进行克隆测序, 测序结果如图 18, 19 所示, 不同基因型间的序列对比如图 20 所示, 在该引物第 55 位置处 G 碱基突变为 A, 突变位点定义为 G55A, 野生纯合型定义为 GG 型, 杂合型标记为 GA。并未发现 AA 型个体, 可能与样本量小有关。对这 2 个不同的基因型进行数据分析。通过群体遗传多态性检测发现群体中 GG 型为优势基因型, 碱基 G 为优势等位基因 (表 4)。多态信息含量为 0.149 6 处于低度多态, 杂合度为 0.162 8, 有效等位基因数为 1.194 5。经卡方检验, 可知群体处于哈代温伯格平衡状态。

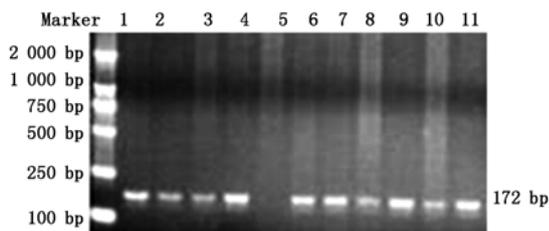


图 6 *GnRHR2* PCR 结果

Fig. 6 PCR result of primer *GnRHR2*

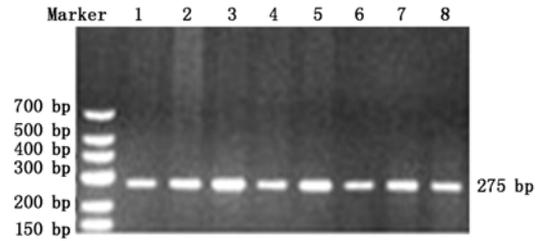


图 7 *GnRHR3* PCR 结果

Fig. 7 PCR result of primer *GnRHR3*

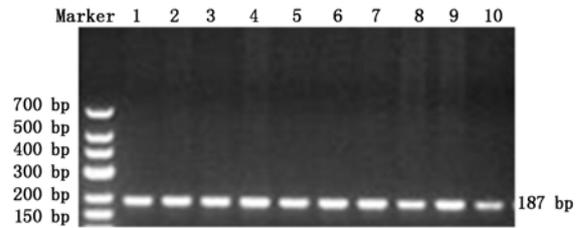


图 8 *GnRHR4* PCR 结果

Fig. 8 PCR result of primer *GnRHR4*

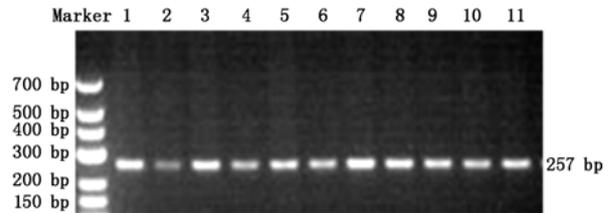


图 9 *GnRHR5* PCR 结果

Fig. 9 PCR result of primer *GnRHR5*

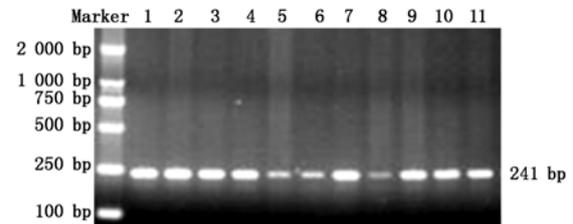


图 10 *GnRHR6* PCR 结果

Fig. 10 PCR result of primer *GnRHR6*

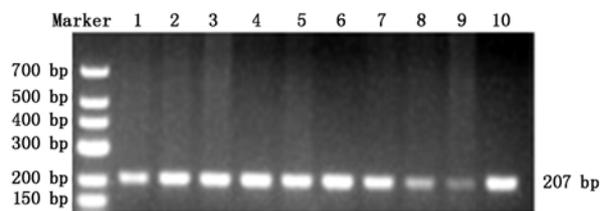


图 11 *GnRHR7* PCR 结果

Fig. 11 PCR result of primer *GnRHR7*

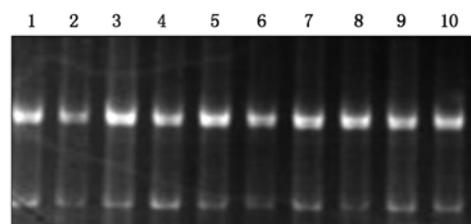


图 12 *GnRHR2* SSCP 结果

Fig. 12 SSCP result of *GnRHR2*

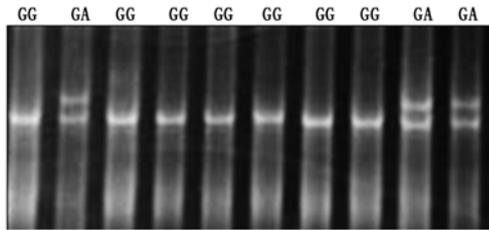


图 13 *GnRHR3* SSCP 结果

Fig. 13 SSCP result of *GnRHR3*

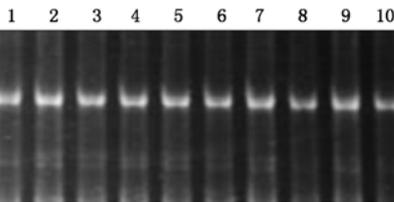


图 14 *GnRHR4* SSCP 结果

Fig. 14 SSCP result of *GnRHR4*

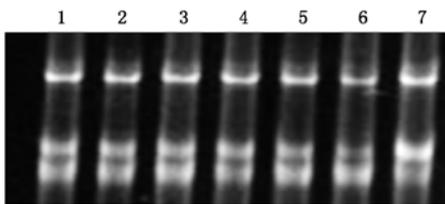


图 15 *GnRHR5* SSCP 结果

Fig. 15 SSCP result of *GnRHR5*

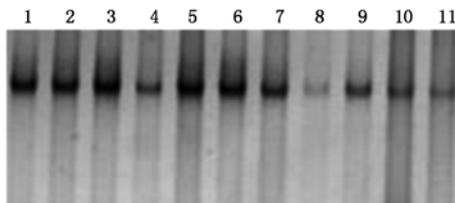


图 16 *GnRHR6* SSCP 结果

Fig. 16 SSCP result of *GnRHR6*

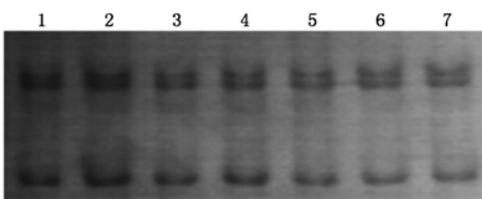


图 17 *GnRHR7* SSCP 结果

Fig. 17 SSCP result of *GnRHR7*

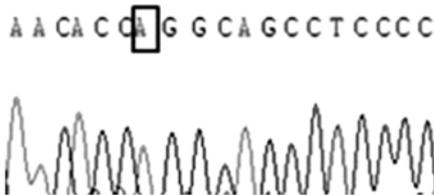


图 18 AA 型峰图

Fig. 18 Sequence map of AA type

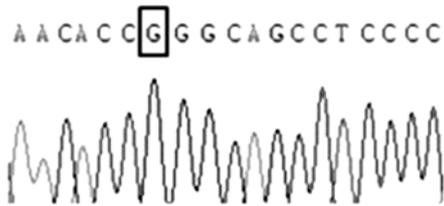


图 19 GG 型峰图

Fig. 19 Sequence map of GG type



图 20 AA 与 GG 型碱基序列对比

Fig. 20 Comparison about base sequence of AA type and GG type

表 4 引物 *GnRHR3* 扩增片段基因频率和基因型频率
Tab. 4 Genotypic frequencies and allelic frequencies of amplified primers *GnRHR3* fragments

基因型 Genotype	基因型频率 Genotypic frequencies	基因频率 Allelic frequencies
GG	0.821 2	G 0.910 6
GA	0.178 8	A 0.089 4

通过对 GG 型与 GA 型 2 种基因型与崂山奶山羊产羔数进行关联分析结果如表 5 所示。对于初产母羊 GG 型比 GA 型产羔数多 0.13 只,对于经产母羊 GG 型比 GA 型产羔数多 0.19 只,但 2 种基因型对于初产母羊与经产母羊差异均不显著。

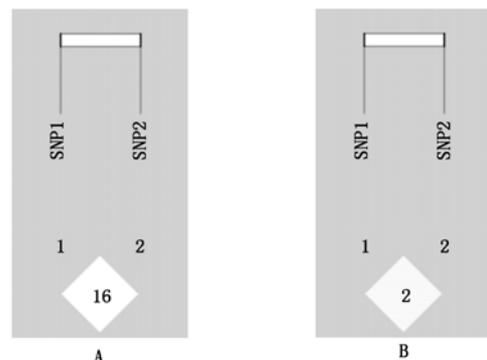
2.3 *GnRHR* 基因突变位点的连锁分析

对 *GnRHR* 基因的 2 个突变位点进行连锁分析结果如图 21 所示,可知这 2 个突变位点不存在连锁关系。

表 5 引物 *GnRHR3* 多态性与崂山奶山羊产羔数的关联分析

Tab. 5 Analysis of polymorphism about frequencies amplified primer *GnRHR3*

基因型 Genotype	初产母羊 Primipara ewe	经产母羊 Multipara ewe
GG	1.76 ± 0.090a	1.90 ± 0.069a
GA	1.63 ± 0.183a	1.71 ± 0.153a



A. 突变位点的标准化连锁不平衡系数 D' ; B. 位点相关系数 r^2 。

A. Lewontin's D' values of for polymorphic sites;

B. r^2 values of polymorphic sites.

图 21 *GnRHR* 基因突变位点的连锁分析

Fig. 21 LD analyses for the polymorphic sites of *GnRHR* gene

3 讨论

GnRH 神经元以脉冲式分泌 GnRH 进入垂体门脉系统导致垂体促性腺激素的分泌,随血液循环进入性腺引起性腺类固醇生成和配子发生而激活繁殖活动,形成下丘脑-垂体-性腺轴系,进而调控生殖器官发育和配子生成^[8-9]。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^[10]。MacColl 等^[11]通过研究发现,若某种生物的 *GnRH* 或 *GnRHR* 基因的蛋白表达受到抑制或是发生了突变,则会导致个体不育。Dunn 等^[12]在检测母鸡群体时发现 *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。*GnRHR* 基因与公猪^[13]及荷斯坦公牛^[14]的精子质量、精子活力和繁殖力相关。韩丹等^[15]在西农萨能奶山羊和布尔山羊中发现 *GnRHR* 基因存在 2 个突变位点且与产羔数相关。张育军等^[16]在研究波尔山羊和黄淮山羊 *GnRHR* 基因外显子 1 和外显子 2 的多态性时发现在 2 个山羊品种的外显子 1 内发现 A→C 突变,并且对于黄淮山羊产羔数 BB 型比 AA 型多 0.66 只,差异显著,比 AB 型多 0.39 只,差异不显著。朱广琴等^[17]在研究黄淮山羊产羔性状时发现, *GnRHR* 基因外显子 1 存在 G→A 的突变, G 为优势等位基因与本研究的突变位点相同,在黄淮山羊只找到 2 种基因型且 AA 型、AG 型产羔数多,与本研究结论相符。黄杨河等^[18]检测 *GnRHR* 基因在波尔山羊及其他 9 个地方山羊品种中的 SNP,该突变位点与本研究的 G55A 突变位点相同,并且 GG 型产羔数高于 GA 型。只是在本研究中并未发现 AA 型个体,这可能与研究的样本量小有关。综上所述, *GnRHR* 基因可能是影响崂山奶山羊产羔数的候选基因。

参考文献:

- [1] Lee H, Lee L T, Chow B K. Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the *GnRH* gene [J]. FEBS Journal, 2008, 275(22): 5458 - 5478.
- [2] Herde M K, Geist K, Campbell R E, et al. Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier [J]. Endocrinology, 2011, 152(10): 3832 - 3841.
- [3] Roland A V, Moenter S M. Prenatal androgenization of female mice programs an increase in firing activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons that is reversed by metformin treatment in adulthood [J]. Endocrinology, 2011, 152(2): 618 - 628.
- [4] Naor Z, Shacham S, Harris D, et al. Signal transduction of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor: cross-talk of Calcium, protein kinase C (PKC), and arachidonic acid [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 1995, 15(5): 527 - 544.
- [5] Casañ E M, Raga F, Bonilla-Musoles F, et al. Human oviductal gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation [J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2000, 85(4): 1377 - 1381.
- [6] Montgomery G W, Penty J M, Lord E A, et al. The gonadotropin-releasing hormone receptor maps to sheep chromosome 6 outside of the region of the *FecB* locus [J]. Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society, 1995, 6(6): 436 - 438.
- [7] Campion C E, Turzillo A M, Clay C M. The gene encoding the ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: cloning and initial characterization [J]. Gene, 1996, 170(2): 277 - 280.
- [8] 徐元青, 王建林, 宋国强, 等. *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.
- [9] 卢月娇, 胡炜, 朱作言. 鲤鱼发育早期 HPG 轴和 GH/IGF 轴相关因子的转录起始分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1126 - 1131.
- [10] 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]. Biology of Reproduction, 1984, 31(5): 1007 - 1013.
- [11] MacColl G, Quinton R, Bouloux P M. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotrophic hypogonadism [J]. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM, 2002, 13(3): 112 - 118.
- [12] Dunn I C, Miao Y W, Morris A. A study of association between genetic markers in candidate genes and reproductive traits in one Generation [J]. Heredity, 2004, 92(2): 128 - 134.
- [13] Lin C L, Ponsuksili S, Tholen E, et al. Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar [J]. Animal Reproduction Science, 2006, 92(3/4): 349 - 363.
- [14] Yang W C, Tang K Q, Yu H N, et al. Effects of *Mbo II* and *Bsp I* polymorphisms in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene on sperm quality in Holstein bulls [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(5): 3411 - 3415.
- [15] 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, 85(5): 93 - 97.
- [16] 张育军, 胡敏兰, 张子军, 等. 山羊 *GnRHR* 基因部分序列多态性及其与产羔数的关联性分析 [J]. 中国草食动物, 2010, 30(4): 13 - 16.
- [17] 朱广琴, 王庆林, 康永刚, 等. *GnRHR*、*GDF9*、*KISS1* 基因多态性与黄淮山羊产羔性状相关性的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, 6(11): 58 - 61.
- [18] 黄杨河, 王凭青, 杨力, 等. 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 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(1): 22 - 28.