

小尾寒羊GnRHR基因组织表达与产羔性状关联分析

寸静宇 龚 蕾*

大理农林职业技术学院 云南大理 671000

摘要: 为了揭示GnRHR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。本研究采用实时荧光定量PCR技术对6只小尾寒羊(FecB ++型单、多羔母羊各3只)的生殖组织及脑组织中GnRHR基因的表达谱进行分析。结果显示, GnRHR基因在大脑、小脑、下丘脑、卵巢、子宫和垂体组织中均有表达,其中在垂体高表达。在小尾寒羊多羔群体中, GnRHR基因在小脑、下丘脑、卵巢、子宫和垂体的表达均极显著高于单羔群体($P < 0.01$)。本研究发现, GnRHR基因的表达水平与小尾寒羊产羔数之间存在一定程度相关,暗示其可能参与了小尾寒羊多羔性状调控。

关键词: 绵羊; 多羔; GnRHR基因; 组织表达; 关联

Correlation analysis of GnRHR gene expression and lambing characters in small tailed Han sheep

Jingyu Cun, Lei Gong*

Dali Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Dali, Yunnan 671000, China

Abstract: This study aimed to investigate the expression patterns, polymorphisms, and their relationship with lambing number of the GnRHR gene in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis (HPOA) of small-tailed Han sheep, in order to gain insight into its effect on the multiple lambing trait. Real-time quantitative PCR was used to analyze the expression profiles of the GnRHR gene in reproductive tissues and brain tissues of 6 small-tailed Han sheep (3 single-lambing and 3 multiple-lambing FecB ++ ewes). The results showed that the GnRHR gene was expressed in the brain, cerebellum, hypothalamus, ovary, uterus, and pituitary tissues, with higher expression in the pituitary. In the multiple-lambing group, the expression of the GnRHR gene in the cerebellum, hypothalamus, ovary, uterus, and pituitary was significantly higher than that in the single-lambing group ($P < 0.01$). This study found a correlation between the expression level of the GnRHR gene and lambing number in small-tailed Han sheep, suggesting that it may be involved in the regulation of the multiple-lambing trait.

Keywords: Sheep; Prolificacy; GnRHR gene; tissue expression; association

促性腺激素释放激素受体是G蛋白偶联受体家族的一员,其特征是通过七个跨膜结构域连接形成的细胞外和细胞内封闭环。GnRHR是由丘脑下部神经内分泌细胞合成的一种十肽,是下丘脑-垂体-性腺轴的关键神经内分泌调节因子^[1]。GnRH与其受体的相互作用是生殖内分泌控制中的关键事件。在垂体中, GnRH通过G蛋白偶联结合促性腺激素细胞表面上的GnRHR发挥作用,诱导受体与异源三聚体G蛋白的相互作用并催化G蛋白 α 亚基上的GTP-GDP交换,随之激发信号通路,促使卵泡刺激素和促黄体生成素的合成与释放,进而参与动物机体的繁殖调控。国内外研究者发现, GnRHR的多态性与西非矮山羊、贵州黑山羊^[2]、波尔山羊、萨能奶山羊、和伊拉克绵羊的繁殖性状都有关联。

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基因突变++型中产单羔和产多羔的个体,并以此为研究对象,使用实时荧光定量PCR技术检测GnRHR基因在生殖轴相关组织中的表达情况,以探讨GnRHR基因表达与小尾寒羊产羔数之间的关系,为小尾寒羊多羔性状的机理研究提供参考。

一、材料与方法

1.1 实验样品及主要试剂随机选取健康状况良好、通过孕酮阴道栓处理过的小尾寒羊母羊6只(FecB ++型单羔3只和多羔3只)。在撤栓后45 h内屠宰羊并立即采集性腺轴上的7种组织, -80 °C冰箱保存备用。

RNA提取试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量染料(SYBR®Premix Ex Taq™ II)。

1.2 RNA提取用RNAprep pure动物组织总RNA提取试剂盒和Trizol提取上述组织总RNA,放置于-80 °C冰箱备用。

1.3 cDNA合成利用反转录试剂盒合成cDNA,反转录产物进行5倍稀释,用管家基因 β -actin进行PCR检测。将符合标准的cDNA放置于-20 °C冰箱保存,备用。

1.4 定量引物设计根据GenBank提供的绵羊GnRHR基因mRNA序列(登录号为: NM_001009397.1),利用Primer Premier 6.0软件进行跨外显子引物设计,以 β -actin(NM_001009784.2)作为内参基因。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。引物名称和序列以及扩增片段大小见表1。

表1 荧光定量引物信息

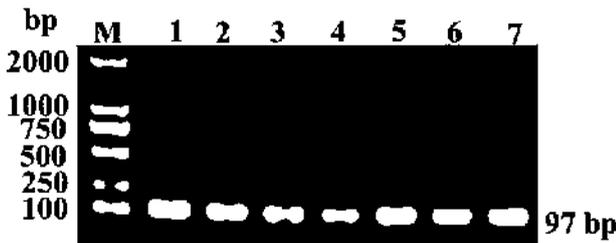
名称	引物序列 (5' →3')	产物大小 (bp)
<i>GnRHR</i>	F: AGCTGCCTCTTCATCATC	139
	R: GCCGAGCTTGTGGTATATTG	
<i>β-actin</i>	F: CCAACCGTGAGAAGATGACC	97
	R: CCAGAGGCGTACAGGGACAG	

1.5 实时荧光定量PCR 用Roche Light Cycler®480 II 型荧光定量PCR仪进行荧光定量检测, 以持家基因 *β-actin* 为内参基因。

1.6 统计分析 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量; 使用SPSS 19.0进行统计学分析数据差异显著性; 采用单因素方差分析进行组间比较, 用最小显著差异法进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

二、结果与分析

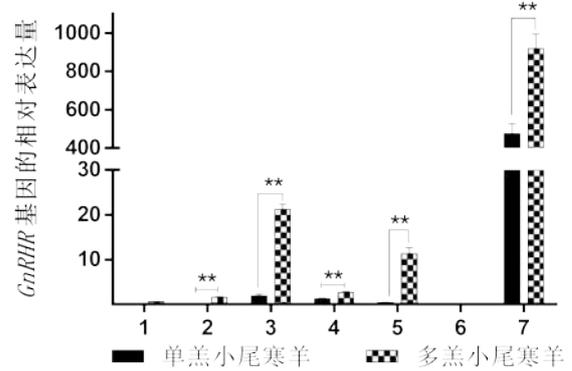
2.1 总RNA提取与cDNA合成 所提取的小尾寒羊各组织的RNA完整度好, 且无降解和污染; 以反转录之后的cDNA为模板对 *β-actin* 进行RT-PCR扩增, 设计的 *β-actin* 引物扩增效果良好(图1), 目的片段与预期的97bp一致, 可以用于后续的荧光定量试验。



M. DL2000 DNA marker; 1-7 代表小脑、大脑、卵巢、下丘脑、子宫、输卵管、垂体, 下同。

图1 cDNA电泳检测

2.2 绵羊 *GnRHR* 基因在小尾寒羊不同群体中繁殖相关组织的表达 利用荧光定量PCR技术对 *GnRHR* 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: *GnRHR* 基因在垂体组织高表达, 在下丘脑和子宫组织次之, 在小脑和卵巢组织表达量最低, 在大脑和输卵管组织几乎不表达。在小尾寒羊多羔群体中, *GnRHR* 基因在垂体、子宫、卵巢、下丘脑和小脑组织表达量均极显著高于单羔群体 ($P < 0.01$)。



**表示差异极显著 ($P < 0.01$)

图2 *GnRHR* 基因在小尾寒羊的组织表达

三、讨论

3.1 *GnRHR* 基因表达 哺乳动物生殖活动的内分泌调节靠下丘脑-垂体-性腺轴完成, 下丘脑发育成熟后, 脉冲式释放GnRH, 与垂体上GnRHR蛋白具有高度亲和力, GnRHR通过正中隆起与垂体前叶的内分泌细胞作用, 以此促进FSH和LH的合成和分泌, 通过血液循环调节性腺活动。GnRHR通过旁分泌或自分泌作用于HPG, 所以GnRHR应该存在于HPG轴上的每个器官^[3]。龙海威等在南江黄羊^[4]和贵州地方山羊^[5]中发现, *GnRHR* 在子宫、卵巢、下丘脑、垂体和输卵管中有表达, 其中在子宫和垂体中表达量最高。葛闻博等^[6]对高原甘加藏羊研究发现, *GnRHR* 基因在垂体和卵巢皆有表达, 并在不同的发情期有不同的表达。本研究表明, *GnRHR* 基因在小尾寒羊的大脑、小脑、子宫、卵巢、下丘脑和垂体组织有表达, 与以上研究者的结果相一致。本试验 *GnRHR* 基因在垂体组织表达量较高, 这可能是垂体存在某些调节因子结合相应的调节元件参与调节 *GnRHR* 基因的转录。但是, 本试验发现 *GnRHR* 在输卵管中不表达, 与龙海威^[22]的研究结果不同, 可能是由于两个物种的不同, 或是因为本实验室采样没有采到 *GnRHR* 在输卵管发挥作用的部位。另外, *GnRHR* 基因在小尾寒羊的多羔群体当中发现: 垂体、卵巢、子宫、下丘脑和小脑组织表达量均极显著高于小尾寒羊单羔群体 ($P < 0.01$), 说明 *GnRHR* 基因在性腺轴中的表达量对提高繁殖率具有重要意义。

四、结论

本研究发现 *GnRHR* 基因的表达与小尾寒羊产羔性状可能存在一定程度的正相关。

参考文献:

[1]龙开旭,王英群,刘德玉,等.摩拉、尼里/拉非种公牛促性腺激素释放激素受体(*GnRHR*)基因序列多态性检测及基因型分析[J].黑龙江畜牧兽医,2016,(17):46-49+288-289.
[2]张劲松,龙威海,许厚强,等.贵州黑山羊 *GnRHR* 基因与繁殖性状相关性的研究[J].中国畜禽种业,2015,11(8):44-45.

[3]韩有胜. FSH/LH/GnRH及受体基因对巴美肉羊繁殖力的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.

[4]龙威海,冯文武,丁玫,等. 南江黄羊不同组织FSHR和GnRHR mRNA表达水平研究[J].中国畜牧杂志,2015,51(13):15-19.

[5]龙威海,张劲松,许厚强,等. 贵州地方山羊不同组织GnRHR mRNA表达水平研究[J].生物技术,2015,25(1):52-55.

[6]葛闻博,何玉琴,华道才让,等. 高原甘加藏羊发情周期GnRH R基因在垂体和卵巢表达规律的研究[J].中国兽医科学,2018,48(6):756-765.

通讯作者: 龚蕾, 女, 汉族; 出生年月:1993年7月-; 民族:汉族; 籍贯:云南大理; 学历:硕士研究生; 职称:助教; 研究方向:动物防疫检疫方向

[中图分类号]

[文献标志码]A

[文章编号]