

小尾寒羊 *LHR* 基因组织表达、多态性及其与产羔性状的关联分析

寸静宇^{1,2}, 刘秋月², 王翔宇², 狄冉², 胡文萍², 张效生³, 张金龙³, 赵永聚^{1*}, 储明星^{2*}

(1. 西南大学动物科技学院, 重庆 400715; 2. 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; 3. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300381)

摘要: 为了揭示 *LHR* 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产羔性状的作用。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术对 6 只小尾寒羊(*FecB* 十型单、多羔母羊各 3 只)的生殖及脑组织中 *LHR* 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 380 只其他品种绵羊(小尾寒羊、滩羊、苏尼特羊、策勒黑羊、湖羊和草原型藏羊)*LHR* 基因 7 个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphisms, SNPs)的多态性进行检测, 并与小尾寒羊产羔数进行关联分析。结果显示, *LHR* 基因在小尾寒羊大脑、下丘脑和卵巢中均有表达, 其中在卵巢高表达。*LHR* 基因在小尾寒羊多羔群体卵巢、大脑和下丘脑的表达均极显著高于单羔群体($P < 0.01$)。分型发现 *LHR* 基因中, 4 个 SNPs 位点的等位基因频率和基因型频率在多羔和单羔品种间差异均达到极显著水平($P < 0.01$); 7 个 SNPs 在大多数绵羊品种中均表现为中度多态($0.25 < PIC < 0.5$); 卡方适合性检验表明, 7 个 SNPs 在大多数绵羊品种中均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$); 关联分析表明, *LHR* 基因有 1 个 SNP 多态性与小尾寒羊各胎产羔数显著相关($P < 0.05$), 2 个 SNPs 多态性与小尾寒羊各胎产羔数呈极显著相关($P < 0.01$)。本研究发现, *LHR* 基因的 3 个 SNPs 位点的多态性与小尾寒羊产羔性状存在一定程度相关, 暗示其可能参与小尾寒羊多羔性状调控。

关键词: 绵羊; 多羔; *LHR* 基因; 组织表达; SNP; 关联

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)03-0495-12

Analysis of Tissue Expression, Polymorphism of *LHR* Gene and Its Association with Litter Size in Small Tail Han Sheep

CUN Jingyu^{1,2}, LIU Qiuyue², WANG Xiangyu², DI Ran²,

HU Wenping², ZHANG Xiaosheng³, ZHANG Jinlong³, ZHAO Yongju^{1*}, CHU Mingxing^{2*}

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

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

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

Abstract: This study was conducted to evaluate the expression patterns and polymorphisms of *LHR* gene in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis (HPOA) and its association with litter size in Small Tail Han sheep, and further understand its effect on lambing traits of Small Tail Han sheep. The real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) method was used to detect the ex-

收稿日期: 2018-07-16

基金项目: 国家自然科学基金(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); 重庆市社会民生科技创新专项项目(cstc2017shms-zdyfX0045)

作者简介: 寸静宇(1994-), 女, 云南大理人, 硕士生, 主要从事羊遗传育种研究, E-mail: 763949512@qq.com

* 通信作者: 赵永聚, 主要从事羊遗传育种研究, E-mail: zyongju@163.com; 储明星, 主要从事羊优异繁殖性状分子机理研究, E-mail: mxchu@

pression of the *LHR* gene in reproductive and brain tissues of 6 Small Tail Han sheep (3 polytocous and 3 monotocous ewes from the *FecB* ++ genotype) in this study. The 380 Small Tail Han sheep and total 380 sheep for Small Tail Han sheep, Tan, Sunite, Cele Black, Hu and Prairie Tibetan sheep were selected, and Sequenom MassARRAY® SNP assay was applied to detect the polymorphism of 7 single nucleotide polymorphism sites (SNPs) of *LHR* gene. Then the association between *LHR* and litter size was analyzed in Small Tail Han sheep. The results showed that *LHR* gene was expressed in the brain, hypothalamus and ovary tissues, and highly expressed in ovary. The expression of *LHR* gene in ovary, brain and hypothalamus of polytocous Small Tail Han ewes was extremely significant higher than that of monotocous ewes ($P < 0.01$). The genotype frequencies and allele frequencies of the 4 SNPs were extremely significantly different between monotocous and polytocous sheep breeds ($P < 0.01$). Population genetic analysis indicated that 7 SNPs showed moderate polymorphism in most sheep breeds ($0.25 < PIC < 0.5$); The result of chi-square test showed that 7 SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium in most sheep breeds ($P > 0.05$). Association analysis showed that the polymorphism of one SNP in the *LHR* gene were significantly correlated with litter size in Small Tail Han sheep ($P < 0.05$), and the polymorphism of 2 SNPs were extremely significantly correlated with litter size in Small Tail Han sheep ($P < 0.01$). The preliminary results of this study showed that there was a correlation between the polymorphisms of 3 SNPs of *LHR* gene and litter size in Small Tail Han sheep, and the *LHR* gene may be involved in the regulation of prolificacy in Small Tail Han sheep.

Key words: sheep; prolificacy; *LHR* gene; tissue expression; SNP; association

产羔性状是绵羊最重要的经济性状之一,提高每胎绵羊产羔数是提升生产经济效益的重要方法^[1]。目前,提高绵羊繁殖力的研究主要体现在两个方面,一个是通过应用繁殖技术,如同期发情与超数排卵;另一个是利用分子标记技术选择与产羔性状相关的基因型,而后者随着近些年科技的发展,成为了人们普遍利用的研究方法^[2]。应用基因组学是在整个基因组中筛选与绵羊繁殖性状相关的基因和分子标记,这样学者们能够更加深入地学习绵羊产羔性状的遗传机理,这对我国绵羊业的可持续发展将带来巨大的经济效益^[3]。

促黄体素(luteinizing hormone, LH)是一种糖蛋白类激素,它控制哺乳动物的生殖,由垂体前叶嗜碱性细胞分泌^[4],它由 α 和 β 2个亚基组成。LH在雌性哺乳动物中的主要作用是和FSH协同促进卵泡发育成熟,并且参与合成雌激素,诱发排卵,最终促进黄体生成^[5]。LH和促黄体素受体(luteinizing hormone receptor, LHR)的胞外功能区相结合,激活G蛋白,然后激活cAMP系统,引起甾体激素的合成与分泌,进而参与雌性哺乳动物一系列生理活动的调节^[6-7]。胡威等^[8]研究表明,在黄体期和卵泡期牦牛的卵巢、子宫、输卵管组织中*LHR*基因的

表达量存在差异,提示*LHR*在牦牛的繁殖过程中具有重要的调节作用。Wohlers-Viana等^[9]在瘤牛中观察到,通过*LHR*亚型表达模式的连续变化来调节*LHR*功能可能在优势卵泡的早期选择性差异中起重要的作用。狄冉等^[10]研究表明,在济宁青山羊中,*LHR*基因第11外显子对其性早熟和高繁殖力没有显著影响。吴井生等^[11]在小梅山猪*LHR*基因第11外显子1351 bp处发现1个SNP(C→T),并且其多态性与小梅山猪的产仔数显著相关($P < 0.05$)。

近年来,全基因组重测序是发掘功能基因最主要的方式^[12-15],本实验室前期通过对10个绵羊品种99个绵羊个体进行全基因组重测序^[16],筛选出与绵羊产羔数相关的候选基因*LHR*的g.75741060A>C、g.75747399C>G、g.75747421A>C、g.75747646C>T、g.75748150A>G、g.75748191A>T和g.75748200T>A 7个SNPs位点。另外,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*FecB*基因突变++型中产多羔和产单羔的小尾寒羊个体,并将其作为研究对象,利用实时荧光定量PCR技术检测*LHR*基因在HPOA轴相关组织的表达情况,同时对*LHR*基因7个位点的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)进

行研究,旨在探讨 *LHR* 基因表达、多态性与小尾寒羊繁殖性状之间的联系,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 周岁健康的小尾寒羊母羊 6 只(其中 3 只 *FecB* ++型多羔小尾寒羊和 3 只 *FecB* ++型单羔小尾寒羊),对 6 只小尾寒羊用孕酮阴道栓(CIDR)方法进行处理,12 d 后撤栓,撤栓后 45 h 屠宰并采集大脑、卵巢、下丘脑、垂体、小脑、子宫和输卵管 7 种组织,置于 -80 °C 冰箱保存。

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

RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司(北京);反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit)购于 TaKaRa 公司(大连);荧光定量染料(SYBR® Premix Ex Taq™ II)购于 TaKaRa 公司(大连)。

1.2 RNA 提取

使用 Trizol 和 RNA 提取试剂盒提取上述组织总 RNA。利用 Nanodrop 2000 检测总 RNA 的浓度和 OD 值,用 1.2% 的琼脂糖凝胶检测 RNA,最后置于 -80 °C 冷冻备用。

1.3 cDNA 合成

用反转录试剂盒反转录合成 cDNA,反应体系总体积为 20 μL :12 μL RNase-Free ddH₂O,1.0 μL Oligo dT Primer,1.0 μL PrimeScript RT Enzyme Mix E,1.0 μL Random 6 mers,1.0 μL RNA,4.0 μL 5 \times PrimeScript Buffer (for Real Time)。反应条件:37 °C 15 min,85 °C 5 s。将反转录后得到的产物 5 倍稀释,用持家基因 *\beta actin* 进行 PCR 检测。最终,将检测达标的 cDNA 置于 -20 °C 保存。

1.4 引物设计

使用 GenBank 提供的绵羊 *LHR* 基因 mRNA 序列(登录号为:NM_001278566.1),用 Primer Premier 6.0 软件设计引物,以 *\beta 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、序列和产物大

小见表 1。

表 1 荧光定量引物信息

Table 1 The primer information for qPCR

名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product size
<i>LHR</i>	F: ATAACCACCGTACCAGGAAA	134
	R: TTTAGCTCCAGGGAAATCAG	
<i>\beta actin</i>	F: CCAACCGTGAGAAGATGACC	97
	R: CCAGAGGCGTACAGGGACAG	

1.5 实时荧光定量 PCR

利用 Roche Light Cycler® 480 II 型荧光定量 PCR 仪进行荧光定量检测,以 *\beta actin* 基因为内参基因。反应体系总体积为 20 μL : forward primer 0.8 μL , reverse primer 0.8 μL , SYBR Premix Ex Taq II 10 μL , RNase-Free ddH₂O 6.4 μL 和 cDNA 2.0 μL 。PCR 程序:95 °C 预变性 5 s;95 °C 变性 10 s,60 °C 30 s,40 个循环。

1.6 基因分型

对 *LHR* 基因 g.75741060A>C、g.75747399C>G、g.75747421A>C、g.75747646C>T、g.75748150A>G、g.75748191A>T 和 g.75748200T>A 位点分型,采用 SequenomMassARRAY® SNP 技术对这 7 个位点进行基因型检测。分型样品为 DNA,每个样品 20 μL ,DNA 浓度 40~80 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.7 统计分析

采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 *LHR* 基因的相对表达量,用 SPSS 19.0 软件对数据进行显著性分析,用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较,用最小显著差异法(least significant difference, LSD)进行多重比较。

应用 Microsoft Excel 2016 软件统计绵羊 *LHR* 基因 g.75741060A > C、g.75747399C > G、g.75747421A>C、g.75747646C>T、g.75748150A>G、g.75748191A>T 和 g.75748200T>A 位点的有效等位基因数(N_e)、杂合度(H_e)、多态信息含量(PI_C)、基因型频率和等位基因频率,随后进行 Hardy-Weinberg 检测。

使用 $y_{ijkl} = \mu + LS_i + P_j + G_k + e_{ijkl}$ 模型进行最小二乘方差分析。其中, y_{ijkl} 为产羔数的记录值; μ 为群体平均值; LS_i 为第 i 个产羔季节的固定效应; P_j 为第 j 个胎次的固定效应; G_k 为 *LHR* 基因第 k

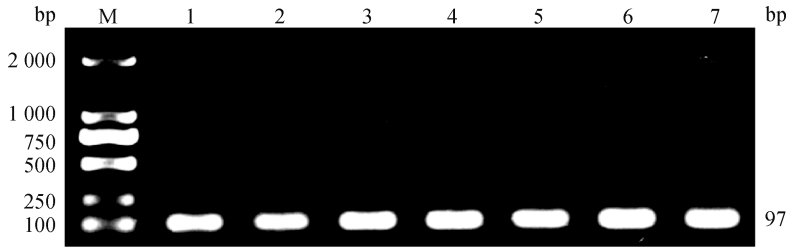
种基因型的固定效应; e_{ijkl} 为随机残差效应。用 SPSS19.0 软件中一般线性模型对小尾寒羊基因型与产羔数据进行关联分析,所有数据以“均值±标准误”表示。

2 结果

2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 RNA 提取试剂盒提取小尾寒羊各组织的

RNA,用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,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 cDNA 为模板对 $\beta actin$ 进行 sqRT-PCR 扩增,检测 cDNA 质量,结果显示,持家基因 $\beta actin$ 引物扩增效果良好(图 1),目的片段与预期的 97 bp 一致,且条带单一,cDNA 可以用于后续的荧光定量试验。



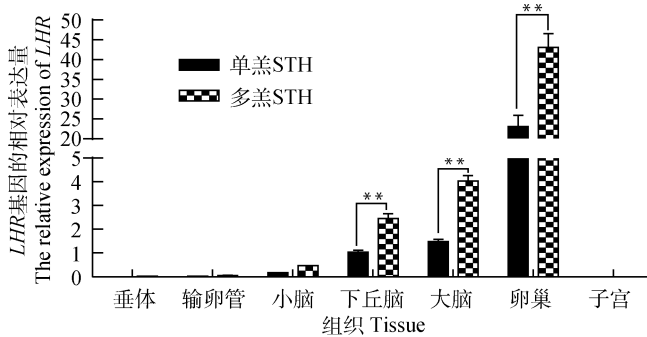
M. DNA 相对分子质量标准;1~7. 垂体、输卵管、小脑、下丘脑、大脑、卵巢、子宫
N. DL2000 DNA marker;1-7. Pituitary, oviduct, cerebellum, hypothalamus, brain, ovary, uterus

图 1 cDNA 电泳检测
Fig. 1 cDNA electrophoresis detection

2.2 LHR 基因在小尾寒羊(多羔和单羔)繁殖相关组织中的表达

利用荧光定量 PCR 技术对 LHR 基因在小尾寒羊垂体、输卵管、小脑、下丘脑、大脑、卵巢和子宫组织的表达水平进行研究,结果见图 2。LHR 基因

在卵巢组织高表达,在大脑、下丘脑低表达,在小脑、输卵管、垂体、子宫组织几乎不表达。LHR 基因在小尾寒羊多羔群体卵巢、大脑、下丘脑组织表达量均极显著高于小尾寒羊单羔群体($P<0.01$)。



* 表示差异显著($P<0.05$); * * 表示差异极显著($P<0.01$),下同
* mean significant difference($P<0.05$); * * mean extremely significant difference($P<0.01$), the same as below

图 2 LHR 基因在小尾寒羊各组织的表达
Fig. 2 Expression of LHR gene in different tissues of Small Tail Han sheep

2.3 绵羊 LHR 基因多态性分析

分型发现 LHR 基因 7 个 SNPs 位点在单、多羔品种中均存在 3 种基因型,见图 3。g. 75741060A>C 位点基因型分别为 AA、CA 和 CC;g. 75747399C>G 位点基因型分别为 CC、CG 和 GG;g. 75747421A>C

位点基因型分别为 AA、CA 和 CC;g. 75747646C>T 位点基因型分别为 TT、CT 和 CC;g. 75748150A>G 位点基因型分别为 AA、GA 和 GG;g. 75748191A>T 位点基因型分别为 AA、TA 和 TT;g. 75748200T>A 位点基因型分别为 TT、TA 和 AA。

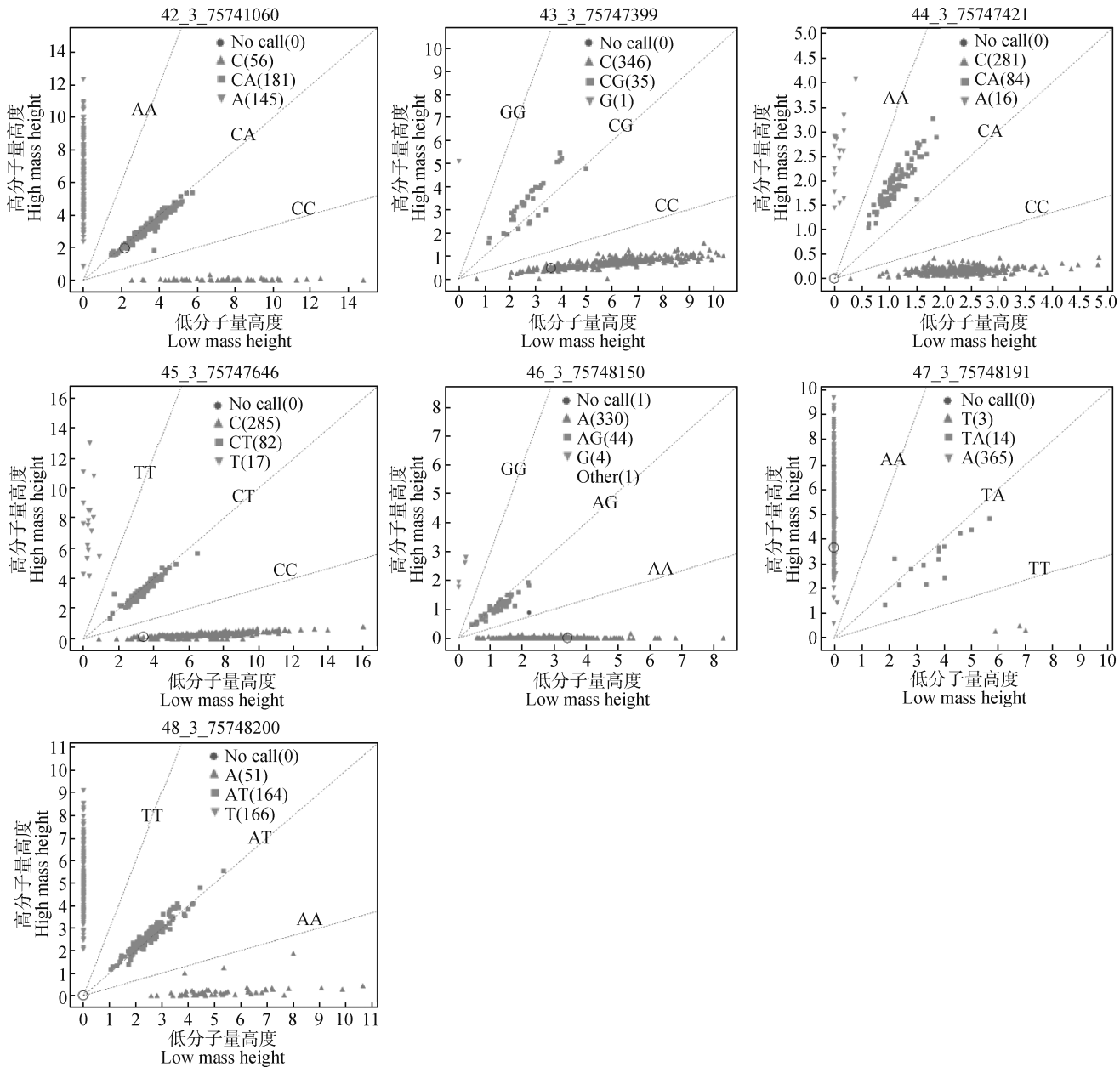


图 3 *LHR* 基因不同 SNPs 位点的分型结果

Fig. 3 Genotyping of different SNPs of *LHR* gene

LHR 基因不同位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔品种间的差异水平见表 2, *LHR* 基因 g. 75741060A>C 和 g. 75747421A>C 位点差异均不显著 ($P > 0.05$), g. 75747399C>G 位点差异达到显著水平 ($P < 0.05$), g. 75747646C > T、g. 75748150A>G、g. 75748191A>T 和 g. 75748200T>A 位点差异极显著 ($P < 0.01$)。就 g. 75747399C>G

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. 75747646C>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. 75748150A>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;就 g. 75748191A>T 位点而言,多羔品种和单羔品种中优势基因型均为 AA,优势等位基因均为 A。

表 2 *LHR* 基因不同 SNPs 位点在单、多羔绵羊品种中的基因型频率和等位基因频率Table 2 Genotype and allele frequencies of different SNPs of *LHR* gene in uniparous and multiparous sheep

位点 Loci	基因型 Genotype	多羔品种中	单羔品种中	卡方 检验 (<i>P</i> 值) χ^2 test (<i>P</i> value)	等位 基因 Allele	多羔品种中等	单羔品种中等	卡方 检验 (<i>P</i> 值) χ^2 test (<i>P</i> value)
		基因型频率 Genotype frequency in multiparous sheep	基因型频率 Genotype frequency in uniparous sheep			位基因频率 Allele frequency in multiparous sheep	位基因频率 Allele frequency in uniparous sheep	
g. 75741060A>C	AA	0.43(240)	0.38(162)	0.424	A	0.60	0.58	0.471
	AC	0.44(250)	0.46(11)		C	0.40	0.42	
	CC	0.13(72)	0.16(6)					
g. 75747399C>G	CC	0.91(512)	0.97(197)	0.030	C	0.92	0.97	0.021
	CG	0.08(48)	0.03(7)		G	0.08	0.03	
	GG	0.01(3)	0.00(0)					
g. 75747421A>C	AA	0.08(47)	0.10(21)	0.380	A	0.26	0.24	0.658
	AC	0.24(125)	0.19(39)		C	0.74	0.76	
	CC	0.68(359)	0.71(146)					
g. 75747646C>T	CC	0.65(365)	0.81(166)	0.000	C	0.73	0.84	0.001
	CT	0.30(167)	0.16(33)		T	0.27	0.16	
	TT	0.05(30)	0.03(5)					
g. 75748150A>G	AA	0.81(433)	0.94(192)	0.000	A	0.84	0.94	0.000
	AG	0.18(94)	0.06(12)		G	0.16	0.06	
	GG	0.01(10)	0.00(0)					
g. 75748191A>T	AA	0.90(508)	0.98(201)	0.001	A	0.91	0.98	0.001
	AT	0.08(47)	0.02(3)		T	0.09	0.02	
	TT	0.02(7)	0.00(0)					
g. 75748200T>A	TT	0.29(161)	0.37(75)	0.000	T	0.48	0.57	0.007
	TA	0.37(208)	0.49(99)		A	0.52	0.43	
	AA	0.34(190)	0.14(30)					

$P < 0.05$ 表示差异显著; $P < 0.01$ 表示差异极显著; $P > 0.05$ 表示差异不显著

$P < 0.05$ indicates the difference was significant; $P < 0.01$ indicates the difference was highly significant; $P > 0.05$ indicates the difference was not significant

由表 3 可知, *LHR* 基因的 g. 75741060A>C 和 g. 75748200T>A 位点在小尾寒羊、滩羊、苏尼特羊、策勒黑羊、湖羊以及草原型藏羊、g. 75747646C>T 在小尾寒羊、苏尼特羊和策勒黑羊、g. 75747421A>C 在小尾寒羊和湖羊中均表现为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$); g. 75747399C>G、g. 75748150A>G 和 g. 75748191A>T 在小尾寒羊、滩羊、苏尼特羊、策勒黑羊、湖羊以及草原型藏羊、g. 75747646C>T 在滩羊、湖羊以及草原型藏羊、g. 75747421A>C 在

滩羊、苏尼特羊、策勒黑羊以及草原型藏羊中均表现为低度多态 ($PIC < 0.25$)。另外, 卡方适合性检验结果表明, 除了小尾寒羊、策勒黑羊和滩羊在 g. 75747421A>C 位点, 藏羊在 g. 75747646C>T 位点, 策勒黑羊在 g. 75748150A>G 位点, 湖羊、小尾寒羊和策勒黑羊在 g. 75748191A>T 位点, 小尾寒羊在 g. 75748200T>A 和 g. 75747399C>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 ($P > 0.05$)。

表 3 *LHR* 基因不同 SNPs 位点在不同绵羊品种中的群体遗传学分析Table 3 Population genetic analysis of different SNPs of *LHR* gene in different sheep breeds

位点 Loci	品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)	杂合度 Heterozygosity (<i>He</i>)	有效等位 基因数 Effective number of allele(<i>Ne</i>)	卡方 检验 (<i>P</i> 值) χ^2 test (<i>P</i> value)
		AA	AC	CC	A	C				
g. 75741060A>C	湖羊 Hu sheep	0.37 (37)	0.50 (50)	0.13 (14)	0.61	0.39	0.36	0.47	1.90	0.66
	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.45 (184)	0.43 (174)	0.12 (51)	0.66	0.34	0.35	0.45	1.81	0.33
	策勒黑羊 Cele Black sheep	0.37(19)	0.50(26)	0.13(7)	0.62	0.38	0.36	0.47	1.90	0.69
	苏尼特羊 Sunite sheep	0.52 (11)	0.48(10)	0.00(0)	0.76	0.24	0.30	0.36	1.57	0.15
	滩羊 Tan sheep	0.64(14)	0.27(6)	0.09(2)	0.77	0.23	0.29	0.35	1.54	0.29
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.33(53)	0.48(78)	0.19(30)	0.57	0.43	0.37	0.49	1.96	0.89
		CC	CG	GG	C	G				
	湖羊 Hu sheep	0.83 (84)	0.16 (16)	0.01 (1)	0.91	0.09	0.15	0.16	1.19	0.81
	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.94 (387)	0.05 (21)	0.00 (2)	0.97	0.03	0.06	0.06	1.06	0.01
	策勒黑羊 Cele Black sheep	0.79 (41)	0.21 (11)	0.00 (0)	0.89	0.11	0.17	0.19	1.23	0.39
苏尼特羊 Sunite sheep	0.90 (19)	0.10 (2)	0.00 (0)	0.95	0.05	0.09	0.09	1.10	0.82	
滩羊 Tan sheep	0.91 (20)	0.09 (2)	0.00 (0)	0.95	0.05	0.08	0.09	1.10	0.82	
草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.98 (158)	0.02 (3)	0.00 (0)	0.99	0.01	0.02	0.02	1.02	0.91	
g. 75747421A>C	湖羊 Hu sheep	0.11(11)	0.34 (34)	0.55 (56)	0.28	0.72	0.32	0.40	1.67	0.11
	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.09 (33)	0.23 (86)	0.69 (259)	0.20	0.80	0.27	0.32	1.47	0.00
	策勒黑羊 Cele Black sheep	0.06 (3)	0.10 (5)	0.85 (44)	0.11	0.89	0.17	0.19	1.23	0.00
	苏尼特羊 Sunite sheep	0.76 (16)	0.24 (5)	0.00 (0)	0.88	0.12	0.19	0.21	1.27	0.54
	滩羊 Tan sheep	0.09 (2)	0.05 (1)	0.86 (19)	0.11	0.89	0.18	0.20	1.25	0.00
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.98 (1)	0.02 (33)	0.00 (127)	0.99	0.01	0.02	0.02	1.02	0.91
		CC	CT	TT	G	T				
	湖羊 Hu sheep	0.79(80)	0.20(20)	0.01(1)	0.89	0.11	0.18	0.19	1.24	0.84
	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.64(261)	0.31(127)	0.05(21)	0.79	0.21	0.27	0.33	1.49	0.29
	策勒黑羊 Cele Black sheep	0.46(24)	0.38(20)	0.15(8)	0.65	0.35	0.35	0.45	1.83	0.28

(转下页 Carried forward)

(续表 3 Continued)

位点 Loci	品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency	等位基因频率 Allele frequency	多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)	杂合度 Heterozygosity (He)	有效等位 基因数 Effective number of allele(Ne)	卡方 检验 (P 值) χ^2 test (P value)			
g. 75748150A>G	苏尼特羊 Sunite sheep	0.57(12)	0.33(7)	0.10(2)	0.74	0.26	0.39	1.63	0.53	
	滩羊 Tan sheep	0.73(16)	0.27(6)	0.00(0)	0.86	0.14	0.24	1.31	0.46	
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.86(138)	0.12(20)	0.02(3)	0.92	0.08	0.15	1.17	0.04	
		AA	AG	GG	A	G				
	湖羊 Hu sheep	0.74(75)	0.24(24)	0.02(2)	0.86	0.14	0.24	1.31	0.96	
	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.82(314)	0.17(65)	0.02(6)	0.90	0.10	0.18	1.22	0.22	
	策勒黑羊 Cele Black sheep	0.86(44)	0.10(5)	0.04(2)	0.91	0.09	0.16	1.19	0.01	
	苏尼特羊 Sunite sheep	0.86(18)	0.14(3)	0.00(0)	0.93	0.07	0.13	1.15	0.72	
	滩羊 Tan sheep	0.91(20)	0.09(2)	0.00(0)	0.95	0.05	0.09	1.10	0.82	
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.96(154)	0.04(7)	0.00(0)	0.98	0.02	0.04	1.04	0.78	
		AA	AT	TT	A	T				
	g. 75748191A>T	湖羊 Hu sheep	0.94(95)	0.05(5)	0.01(1)	0.97	0.03	0.07	1.07	0.01
小尾寒羊 Small Tail Han sheep		0.90(369)	0.09(36)	0.01(4)	0.95	0.05	0.10	1.11	0.01	
策勒黑羊 Cele Black sheep		0.85(44)	0.12(6)	0.04(2)	0.90	0.10	0.17	1.21	0.02	
苏尼特羊 Sunite sheep		1.00(21)	0.00(0)	0.00(0)	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	
滩羊 Tan sheep		1.00(22)	0.00(0)	0.00(0)	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00	
草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep		0.98(158)	0.02(3)	0.00(0)	0.99	0.01	0.02	1.02	0.91	
		TT	TA	AA	T	A				
湖羊 Hu sheep		0.62(63)	0.30(30)	0.08(8)	0.77	0.23	0.35	1.54	0.12	
小尾寒羊 Small Tail Han sheep		0.19(77)	0.38(153)	0.43(176)	0.38	0.62	0.47	1.89	0.00	
策勒黑羊 Cele Black sheep		0.40(21)	0.48(25)	0.12(6)	0.64	0.36	0.46	1.85	0.72	
苏尼特羊 Sunite sheep		0.62(13)	0.33(7)	0.05(1)	0.79	0.21	0.34	1.51	0.96	
滩羊 Tan sheep		0.23(5)	0.59(13)	0.18(4)	0.52	0.48	0.50	2.00	0.39	
草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.35(57)	0.49(79)	0.16(25)	0.60	0.40	0.48	1.92	0.78		

$P > 0.05$ 表示位点在该品种中处于哈代-温伯格平衡状态

$P > 0.05$ indicates the locus is in Hardy-Weinberg equilibrium

2.4 绵羊 *LHR* 基因多态位点与小尾寒羊产羔数的关系

由表 4 可知,*LHR* 基因 g.75741060A>C 的多态性与小尾寒羊第 3 胎产羔数显著相关 ($P < 0.05$);g.75747421A>C 的多态性与小尾寒羊第 2 胎产羔数极显著相关 ($P < 0.01$),g.75748150A>G 的多态性与小尾寒羊第 1、2 胎产羔数极显著相关 ($P < 0.01$),而 g.75747399C>G、g.75747646C>T、

g.75748191A>T 和 g.75748200T>A 的多态性与小尾寒羊各胎产羔数均没有显著相关 ($P > 0.05$)。g.75741060A>C、g.75747421A>C、g.75747646C>T 和 g.75748200T>A 位点突变纯合型的产羔数大多数都高于野生纯合型,而 g.75747399C>G、g.75748150A>G 和 g.75748191A>T 位点突变纯合型的产羔数低于野生纯合型,杂合子的产羔数基本位于二者之间或最高。

表 4 *LHR* 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 4 Least square means and standard errors of litter size of individuals with different genotypes at different SNPs of *LHR* gene in Small Tail Han sheep

位点 Loci	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.75741060A>C	AA	157	2.15±0.08	150	2.34±0.07	59	2.76±0.14 ^a
	CC	40	2.25±0.13	40	2.38±0.14	13	3.46±0.30 ^b
	CA	155	2.12±0.07	145	2.29±0.08	60	2.73±0.14 ^a
g.75747399C>G	CC	331	2.15±0.05	316	2.33±0.05	122	2.82±0.10
	CG	20	2.15±0.19	14	2.29±0.22	9	2.89±0.36
	GG	1	2.00±0.84	1	2.00±0.91	0	0
g.75747421A>C	AA	12	1.75±0.24	11	2.00±0.28 ^A	3	2.33±0.64
	CC	259	2.23±0.05	246	2.38±0.06 ^A	104	2.90±0.11
	CA	45	1.98±0.13	42	1.93±0.14 ^B	13	2.46±0.31
g.75747646C>T	CC	224	2.10±0.06	212	2.32±0.06	80	2.74±0.12
	CT	111	2.23±0.08	106	2.34±0.09	46	2.96±0.16
	TT	17	2.12±0.20	16	2.06±0.23	7	2.86±0.41
g.75748150A>G	AA	288	2.21±0.05 ^A	273	2.41±0.05 ^A	112	2.88±0.10
	AG	42	1.83±0.13 ^B	40	1.90±0.14 ^B	15	2.47±0.27
	GG	4	1.50±0.42 ^A	4	1.75±0.45 ^A	1	2.00±1.06
g.75748191A>T	AA	321	2.17±0.04	304	2.36±0.05	122	2.87±0.10
	TT	1	1.00±0.84	1	2.00±0.89	0	
	TA	30	1.93±0.15	29	1.93±0.17	9	2.22±0.37
g.75748200T>A	AA	66	2.32±0.10	67	2.37±0.11	27	2.56±0.21
	AT	136	2.15±0.07	128	2.38±0.08	54	2.83±0.15
	TT	148	2.09±0.07	137	2.24±0.08	52	2.94±0.15

a、b 表示差异显著 ($P < 0.05$); A、B 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

a, b indicates the significant difference ($P < 0.05$); A, B indicates the highly significant difference ($P < 0.01$)

3 讨论

3.1 *LHR* 基因的表达

哺乳动物的生殖活动主要受下丘脑、垂体、性腺轴相关激素的调节, GnRH 通过刺激促性腺激素细胞分泌合成 FSH, FSH 与其受体相结合发挥作用, 诱导促黄体素(LH)合成与释放并与 *LHR* 相结合, 从而促进卵泡的发育和成熟, 这一过程对动物繁殖性状的调控起着重要作用^[17]。因此, 阐明 *LHR* mRNA 在生殖器官的相对表达量对研究绵羊多羔机制有十分重要的意义。在人^[18]、小鼠^[19]和狗^[20]中, *LHR* 已经被证实在卵巢组织的膜细胞和排卵前卵泡的颗粒细胞中表达。而 Wei 等^[21]和 Wohlrres-Viana 等^[9]对绵羊和瘤牛的研究也表明, *LHR* 的表达水平会影响卵泡的发育, 从而影响动物的繁殖性能。本研究发现, 在小尾寒羊中, *LHR* 基因在卵巢组织中高表达, 与之结果相一致, 暗示 *LHR* 基因在卵巢组织的高表达对小尾寒羊的产羔性状有一定的调控作用。另外, Chen 等^[22]、Huo 等^[23]和胡威等^[8,24]的研究发现, *LHR* 除了在牦牛传统的性腺靶位点(如卵巢)表达, 还在性腺外组织有一定的表达, 并推测其可能参与调控牦牛的繁殖性能。本研究发现, *LHR* 在小尾寒羊的大脑和下丘脑中有一定的表达, 和 Chen 等^[22]、Huo 等^[23]和胡威等^[8,24]的研究结果相一致, 但是 *LHR* 基因在脑组织中的表达是否也会影响绵羊的繁殖性状, 还需要后续的研究证明。*LHR* 基因在垂体、输卵管、小脑组织中几乎不表达, 与 Chen 等^[22]、Huo 等^[23]和胡威等^[8,24]不一致, 说明在不同的物种、不同的组织中, *LHR* 的表达模式也有一定的差异。*LHR* 基因在小尾寒羊多羔群体卵巢、下丘脑、大脑组织表达都极显著高于小尾寒羊单羔群体($P < 0.01$), 说明 *LHR* 基因是影响小尾寒羊产多羔的主效基因, 它对绵羊的繁殖活动有着深刻的影响。

3.2 *LHR* 基因与绵羊产羔数之间的关系

在 *LHR* 基因多态与繁殖性状相关性方面, 王利红等^[25]在湖羊群体中检测到 *LHR* 基因有 2 个 SNPs 位点, 但不同基因型个体间产羔数差异不显著。张善文^[26]在长白猪和大白猪中检测到 *LHR* 基因在 exon 8 上的多态位点与繁殖性状不存在关联。Kathiravan 等^[27]在 buffaloes 牛中检测到 *LHR* 基因的 exon 11 的多态位点与繁殖性状没有显著相关性。本研究中, *LHR* 基因 g. 75741060A > C 和

g. 75747421A > C 位点的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($P > 0.05$); g. 75747399C > G 位点差异达到显著水平($P < 0.05$); g. 75747646C > T、g. 75748150A > G、g. 75748191A > T 和 g. 75748200T > A 位点差异极显著($P < 0.01$), 初步表明这些位点与绵羊的繁殖性状有一定的关联; 这 7 个位点中, 发现不同位点在不同绵羊品种中的选择强度并不一致, 可能是由于某些绵羊品种遗传多样性贫乏或选择的各品种数量不同的原因造成。另外, g. 75741060A > C、g. 75747399C > G、g. 75747421A > C、g. 75747646C > T、g. 75748150A > G、g. 75748191A > T 和 g. 75748200T > A 位点在大部分绵羊品种中都处于哈代温伯格平衡状态($P > 0.05$), 说明经过长期的进化选择, 这 7 个位点在适应性方面有相对的遗传优势; 值得注意的是, g. 75748191A > T 位点在滩羊和苏尼特羊中没有任何突变型, 可能是与突变型适应性较差、因突变致死或选择的这两种羊的样本数量少有关。关联分析发现, *LHR* 基因 g. 75741060A > C 的多态性与小尾寒羊第三胎产羔数显著相关($P < 0.05$); g. 75747421A > C 的多态性与小尾寒羊第二胎产羔数极显著相关($P < 0.01$), g. 75748150A > G 的多态性与小尾寒羊第一、二胎产羔数差异极显著相关($P < 0.01$), 而 g. 75747399C > G、g. 75747646C > T、g. 75748191A > T 和 g. 75748200T > A 的多态性与小尾寒羊各胎产羔数均没有显著相关($P > 0.05$)。值得注意的是, g. 75741060A > C 和 g. 75747421A > C 都是突变纯合型的产羔数高于野生纯合型; 而 g. 75748150A > G 是野生纯合型的产羔数高于突变纯合型, 说明这个位点的野生纯合在一定程度上增强了绵羊的产羔能力, 而突变纯合则对产羔能力有一定的削弱; g. 75747399C > G、g. 75747646C > T、g. 75748191A > T 和 g. 75748200T > A 位点的各基因型与产羔数之间的关联均不显著, 推测这 4 个位点可能并不是影响绵羊产羔数的关键位点。

4 结论

本研究发现, *LHR* 基因的 3 个 SNPs 位点的多态性与小尾寒羊各胎产羔数显著关联, 表明其可能参与了小尾寒羊多羔性状调控, 深入探究该基因功能对小尾寒羊繁殖性状的选育具有一定的参考意义。

参考文献 (References):

- [1] 程美玲,赵素梅,黄英,等.云岭黑山羊 *FSH* 基因表达量与其产羔数相关性研究[J].云南农业大学学报,2010,25(6):807-810.
CHENG M L,ZHAO S M,HUANG Y,et al. Study on correlation between the expression level of *FSH* gene and lambing number in Yunling black goat[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2010, 25(6):807-810. (in Chinese)
- [2] 顾祝荣,郭海燕,王强,等.湖羊 *GDF9* 基因多态性和产羔性能的关系[J].安徽农业科学,2018,46(6):87-89,185.
GU Z R,GUO H Y,WANG Q,et al. The relationship between *GDF9* gene polymorphism and lambing performance in the Hu sheep[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(6):87-89, 185. (in Chinese)
- [3] 张军霞,乐祥鹏,王维民,等.绵羊 *KITLG* 基因的表达及其多态性与产羔性状关联分析[J].农业生物技术学报,2017,25(6):893-900.
ZHANG J X,LE X P,WANG W M,et al. Expression and polymorphisms of *KITLG* gene and their association with litter size in sheep (*Ovis aries*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(6):893-900. (in Chinese)
- [4] MARSHALL J C,KELCH R P. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction[J]. *N Engl J Med*, 1986, 315(23): 1459-1468.
- [5] 孙明亮,马金成. *FSHR* 与 *LHR* 的研究进展[J].黑龙江动物繁殖,2008,16(4):1-3.
SUN M L,MA J C. Research progress of *FSHR* and *LHR* [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Reproduction*, 2008, 16(4):1-3. (in Chinese)
- [6] PATEL H,BHARTIYA D,PARTE S,et al. Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternately spliced receptor variant *FSH-R3* [J]. *J Ovarian Res*, 2013, 6:52.
- [7] ZHANG R,ZHANG S Z,ZHU X,et al. Follicle-stimulating hormone receptor (*FSHR*) in Chinese alligator, *Alligator sinensis*: Molecular characterization, tissue distribution and mRNA expression changes during the female reproductive cycle [J]. *Anim Reprod Sci*, 2015, 156:40-50.
- [8] 胡威,崔燕,潘阳阳,等.黄体生成素受体基因在牦牛发情周期不同阶段生殖系统中的表达模式[J].生物技术通报,2015,31(9):232-237.
HU W,CUI Y,PAN Y Y,et al. Analysis of expression pattern of *LHR* gene in the reproductive system of yak during the estrous cycle [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(9):232-237. (in Chinese)
- [9] WOHLRES-VIANA S, ARASHIRO E K N, MACHADO M A,et al. Intrafollicular oestradiol production, expression of the LH receptor (*LHR*) gene and its isoforms, and early follicular deviation in *Bos indicus* [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2017, 29(10): 1958-1970.
- [10] 狄冉,冯涛,储明星,等.山羊促黄体素受体基因 (*LHR*) 外显子 11 的 PCR-SSCP 分析[J].农业生物技术学报,2009,17(4):614-620.
DI R,FENG T,CHU M X,et al. PCR-SSCP analysis on exon 11 of luteinizing hormone receptor (*LHR*) gene in goats [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17(4):614-620. (in Chinese)
- [11] 吴井生,张跟喜,王金玉.小梅山猪 *LHR* 基因第 11 外显子 PCR-RFLP 多态性及其与产仔数的关联分析[J].中国兽医学报,2012,32(8):1239-1243.
WU J S,ZHANG G X,WANG J Y. Polymorphism of PCR-RFLP in exon 11 of *LHR* gene and its relationship with litter size in Xiaomeishan pigs [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(8): 1239-1243. (in Chinese)
- [12] 宋娜娜,钟金城,柴志欣,等.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,et al. The whole genome data analysis of Sanjiang cattle [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(1): 183-194. (in Chinese)
- [13] 潘章源,贺小云,刘秋月,等.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,et al. 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)
- [14] 汪文强,赵生国,马利青,等.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,et al. The research progress and application of resequencing based on animal genomics [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(10):1947-1953. (in Chinese)

- [15] AI H S, FANG X D, YANG B, et al. Adaptation and possible ancient interspecies introgression in pigs identified by whole-genome sequencing[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(3):217-225.
- [16] 曾滔, 赵福平, 王光凯, 等. 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, et al. 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)
- [17] 何晶, 耿仁德, 计红, 等. 海兰褐蛋鸡卵巢与输卵管 *FSHR* 及 *LHR* 基因定量的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2015, 27(2):27-31, 45.
- HE J, GENG R D, JI H, et al. Genetic quantitative research of *FSHR* and *LHR* in ovary and oviduct of Hy-line brown laying hens [J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2015, 27(2):27-31, 45. (in Chinese)
- [18] THEMME A P N, HUHTANIEMI I T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function [J]. *Endocr Rev*, 2000, 21(5):551-583.
- [19] PAKARAINEN T, ZHANG F P, NURMIL, et al. Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse Graafian follicles[J]. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(10):2591-2602.
- [20] DE LOS REYES M, PALOMINO J, PARRAGUEZ V H, et al. Analysis of *LH* receptor in canine ovarian follicles throughout the estrous cycle[J]. *Theriogenology*, 2017, 93:71-77.
- [21] WEI S, SHEN X, GONG Z, et al. *FSHR* and *LHR* expression and signaling as well as maturation and apoptosis of cumulus-oocyte complexes following treatment with *FSH* receptor binding inhibitor in sheep [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2):660-669.
- [22] CHEN H, CUI Y, YU S. Expression and localization of *FSHR*, *GHR* and *LHR* in different tissues and reproductive organs of female yaks[J]. *Folia Morphol*, 2018, 77(2):301-309.
- [23] HUO S D, CHEN S E, LONG R J, et al. Protein and mRNA expression of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor during the oestrus in the yak (*Bos grunniens*) [J]. *Reprod Domest Anim*, 2017, 52(3):477-482.
- [24] 胡威, 陈虹, 潘阳阳, 等. *LHR* 在牦牛肾和卵巢中表达情况的研究[J]. 中国兽医科学, 2015, 45(2):212-216.
- HU W, CHEN H, PAN Y Y, et al. Study on expression of luteinizing hormone receptor in the kidney and ovary of yak [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(2):212-216. (in Chinese)
- [25] 王利红, 张伟, 高勤学, 等. 湖羊促黄体素受体基因 (*LHR*) 外显子 11 多态性与繁殖性能相关性研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(5):675-679.
- WANG L H, ZHANG W, GAO Q X, et al. The polymorphisms on exon 11 of luteinizing hormone receptor (*LHR*) gene and their correlation to production performance in Hu sheep [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2011, 38(5):675-679. (in Chinese)
- [26] 张善文. 猪 *LHR* 和 *PGR* 基因的遗传变异及其与繁殖性状的相关性研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- ZHANG S W. Genetic variation of porcine *LHR* and *PGR* gene and their association with reproductive traits [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [27] KATHIRAVAN R S, CHITRA R, MURALI N, et al. Monomorphism of luteinizing hormone receptor (*LHR*) gene in buffaloes by restriction fragment length polymorphism [J]. *J Entomol Zool Stud*, 2018, 6(2):2010-2012.

(编辑 郭云雁)