

李隐侠, 张俊, 钱勇, 等. 山羊 *Kiss-1* 基因克隆、表达模式和 SNPs 筛选[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 151-157.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.023

## 山羊 *Kiss-1* 基因克隆、表达模式和 SNPs 筛选

李隐侠, 张俊, 钱勇, 孟春花, 王慧利, 钟声, 曹少先  
(江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** *Kiss-1* 在雌性动物生殖过程中发挥重要的作用。为了探讨其在山羊中的功能, 本研究以波尔山羊、苏淮山羊新品系和海门山羊为研究对象, 通过 PCR 扩增、测序和序列拼接获得 *Kiss-1* 基因编码区序列, 利用生物信息学软件分析山羊 *Kiss-1* 基因序列特征, RT-PCR 试验鉴定其在山羊中的组织表达模式, 采用 DNA 池测序筛选 *Kiss-1* 基因编码区 SNPs 位点。结果发现 3 种山羊 *Kiss-1* 基因编码区序列长度均为 408 bp, 编码 135 个氨基酸残基; 海门山羊与苏淮山羊新品系 *Kiss-1* 核苷酸序列一致性为 100%, 与波尔山羊的一致性为 98.80%; 系统进化发育分析发现海门山羊与苏淮山羊新品系首先聚在一起, 然后再与波尔山羊聚在一起; 组织表达谱显示 *Kiss-1* 基因在肺脏中表达量相对较高, 在其他内脏和肌肉组织中表达量很少; DNA 池测序发现 2 个 SNPs 位点, 其中 A175C 位点突变引起了苏氨酸到脯氨酸的突变, G256A 位点突变引起了丙氨酸到苏氨酸的改变。研究结果为进一步研究山羊 *Kiss-1* 基因的进化、功能及其与生产性能特别是繁殖性能的关系提供一定的理论依据。

**关键词:** 山羊; *Kiss-1*; 基因克隆; 组织表达; SNPs

**中图分类号:** S827 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0151-07

## Sequence cloning, expression pattern and SNPs screening of *Kiss-1* gene in goat

LI Yin-xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Jun<sup>1,2</sup>, QIAN Yong<sup>1,2</sup>, MENG Chun-hua<sup>1,2</sup>, WANG Hui-li<sup>1,2</sup>, ZHONG Sheng<sup>1,2</sup>, CAO Shao-xian<sup>1,2</sup>

(*Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

**Abstract:** *Kiss-1* gene plays an important role in reproduction process of female animals. In order to investigate its function in goats, two exons' sequences of *Kiss-1* in Boer goat, Haimen goat and the new breed of Suhuai goat were amplified by PCR, and these sequences were spliced using DNASTar software and blasted with its corresponding sequences of other species. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *Kiss-1* coding sequence in three goats breeds were screened based on DNA pool. The results showed that the full length of CDS region of *Kiss-1* was 408 bp in three goats encoding 135 amino acids. The nucleotide sequence of Haimen goats shared 100.00% homology with that of new breed of Suhuai goats and 98.80% similarity with that of Boer goats. Phylogenetic tree revealed that Haimen goat and the new breeding of Suhuai goat were clustered together and then clustered with Boer goat. Two SNPs were found in *Kiss-1* coding region of three goats

breeds, among which, G256A mutation was in Haimen goats and the new breed of Suhuai goats, and A175C mutation was in Boer goats and the new breed of Suhuai goats. *Kiss-1* showed a higher expression level in lung than in muscle and other internal organs.

**Key words:** goat; *Kiss-1*; gene clone; expression pattern; SNPs

收稿日期: 2015-04-07

基金项目: 江苏省农业自主创新基金项目 [CX(13)3072]

作者简介: 李隐侠 (1978-), 女, 河南固始人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。(Tel) 025-84390095; (E-mail) liyxmh@126.com

通讯作者: 曹少先, (Tel) 025-84390352; (E-mail) caoshaoxian@163.com

基因 *Kiss-1* 是 1996 年被发现<sup>[1]</sup>, 定位于人类染色体 1q32-41<sup>[2]</sup>。Kisspeptin 是 *Kiss-1* 基因的编码产物<sup>[3]</sup>, Kisspeptins 的同源受体为 GPR54 (G-protein coupled receptor 54)。Kiss-1 是一个编码孤儿 G 蛋白偶联受体基因<sup>[4]</sup>。近年来的研究结果表明 Kiss-1/GPR54 系统参与人和牛、羊、猪、鼠等下丘脑-垂体-性腺轴功能的调节<sup>[5-7]</sup>。在人及大鼠中, 基因 *Kiss-1* 与其受体 (GPR54) 的突变或者缺失可引起性腺功能的衰退, 从而导致繁殖功能的丧失<sup>[8-10]</sup>。相反, 在脑中注射 Kisspeptin 后, 后备母猪初情日龄提前<sup>[11]</sup>。在山羊中, Cao 等<sup>[12]</sup>克隆得到济宁青山羊 *Kiss-1* 基因编码区序列, 发现开放阅读框 408 bp, 编码 135 个氨基酸残基, 其中包含一个 17 个氨基酸的信号肽, 同时发现了 1 个碱基突变位点 (G3433A)。本研究以波尔山羊、苏淮山羊新品系和海门山羊为研究对象, 扩增山羊 *Kiss-1* 基因编码区序列, 比较 *Kiss-1* 基因在不同山羊中的序列特征, 考察其组织表达模式, 同时筛选其在不同山羊中的单核苷酸多态性 (SNPs) 位点, 为山羊的分子育种提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

在江苏省农业科学院六合动物实验基地选择健康、体况良好的苏淮山羊新品系母羊 3 只, 屠宰后采集心脏、肝脏、肾脏、肺脏、卵巢和肌肉等组织样, 立即置于液氮冻藏, -70 °C 冰箱保存, 用于提取

总 RNA。

苏淮山羊新品系和波尔山羊耳组织样采自江苏省农业科学院六合动物实验基地, 海门山羊耳组织采自海门种羊场, 样品置于冰盒中带回实验室。采用传统的苯酚-氯仿法提取羊耳组织样 DNA, TE buffer 溶解后 -20 °C 保存备用。

### 1.2 组织总 RNA 提取与反转录

采用 TRIzol Reagent 试剂盒 (Invitrogen, USA) 并按照说明书提取组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测组织总 RNA 质量, 用随机引物对总 RNA 进行反转录, 反转录产物在 -20 °C 冰箱中保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

根据 GenBank 数据库中山羊 *Kiss-1* 基因序列 (序列号为 GU142847), 采用 primer premier5.0 软件设计引物 P1 和 P2, 分别扩增山羊 *Kiss-1* 基因第 1 外显子和第 2 外显子序列。以山羊基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 以济宁青山羊编码区序列 (GU142847) 为模板, 设计 *Kiss-1* 基因 RT-PCR 引物 P3, P4 为内参 GAPDH 引物, 各引物的退火温度和片段长度见表 1。PCR 反应总体积 20 μl, 含模板 DNA 60 ng, Taq 聚合酶 (5 U/μl) 0.2 μl, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μl, 引物 (100 μmol/L) 各 0.5 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.4 μl, 10×缓冲液 2 μl, 添加灭菌双蒸水至 20 μl。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

表 1 引物序列及 PCR 反应参数

Table 1 Primer sequences and the parameters of PCR reaction

	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	产物长度 (bp)	用途
P1	TCCTCCCTCTCTCTGTCT TTTGCATCAATTCAGTGCTC	56	213	序列扩增
P2	TTGTTGAGGGTGTGGAGCAC AGGTCACACGAGAGGATTC	61	980	序列扩增
P3	GAATCCTAGAACACAGGCT CGAAGGAGTTCCAGTTGTAG	57	260	RT-PCR (目的基因)
P4	ACTTTGGCATCGTGGAGG GAAGAGTGAGTGTGCTGTTG	58	379	RT-PCR (内参)

#### 1.4 序列分析与系统发育树的构建

使用 DNAMAN6.0、DNASTar 软件进行序列比对、拼接、核苷酸序列的翻译和与其他动物的核苷酸和氨基酸序列进行比对。使用 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 进行 *Kiss-1* 基因开放阅读框的预测,在 NCBI BLAST 服务器上 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 同源序列的搜索。氨基酸序列组分及蛋白质理化性质分析使用 ExPASy 数据库在线工具 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)。可能的信号肽用 SignalP3.0 Server 在线工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP>) 分析,蛋白质跨膜螺旋区预测采用 TMPred Server 软件 ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))。利用 NCBI BLAST 服务器从 GenBank 中挑选 8 个来源于不同动物的 *Kiss-1* 所编码的氨基酸序列(表 2),利用 DNASTar 软件进行多序列比对分析和编辑校正,采用 MEGA5.1 软件包中的邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,自举分析(Bootstrap test)采用 1 000 次重复抽样检验获得置信度(BP)。

#### 1.5 SNPs 筛选

PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶后用 DNA 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段,直接送往上海美吉生物公司测序。根据序列峰图,筛选出 SNPs。

表 2 部分哺乳动物 *Kiss-1* 氨基酸序列信息

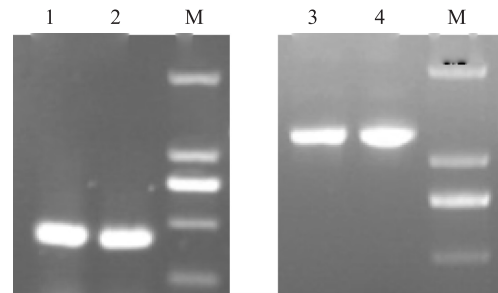
Table 2 The amino acid sequences information of *Kiss-1* in different mammals

物种	GenBank 登录号	氨基酸长度(aa)
人 ( <i>Homo sapiens</i> )	NP_002247	138
黑猩猩 ( <i>Pan troglodytes</i> )	XP_009439440	138
猕猴 ( <i>Macaca mulatta</i> )	XP_001098284	138
牛 ( <i>Bos Taurus</i> )	XP_002693949	135
猪 ( <i>Sus scrofa</i> )	NP_001128436	138
大鼠 ( <i>Rattus norvegicus</i> )	NP_859043	130
家鼠 ( <i>Mus musculus</i> )	NP_839991	126
斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )	NP_001106961	116
济宁青山羊	GU142847	135
波尔山羊		135
苏淮山羊新品系		135
海门山羊		135

## 2 结果

### 2.1 山羊 *Kiss-1* 基因序列扩增

1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测发现 2 对引物在苏淮山羊新品系、波尔山羊和海门山羊中扩增效果良好(图 1),测序结果显示扩增片段长度与预期结果一致。将扩增获得的 2 段序列与引物源序列进行比对,得到山羊 *Kiss-1* 基因的 2 个外显子序列,将 2 个外显子序列拼接后得到 3 个山羊品种(系) *Kiss-1* 基因编码区全序列。



1 和 2 表示第 1 显子引物扩增片段; 3 和 4 表示第 2 外显子引物扩增片段; M 表示 Marker。

图 1 苏淮山羊新品系 *Kiss-1* 基因外显子扩增电泳图

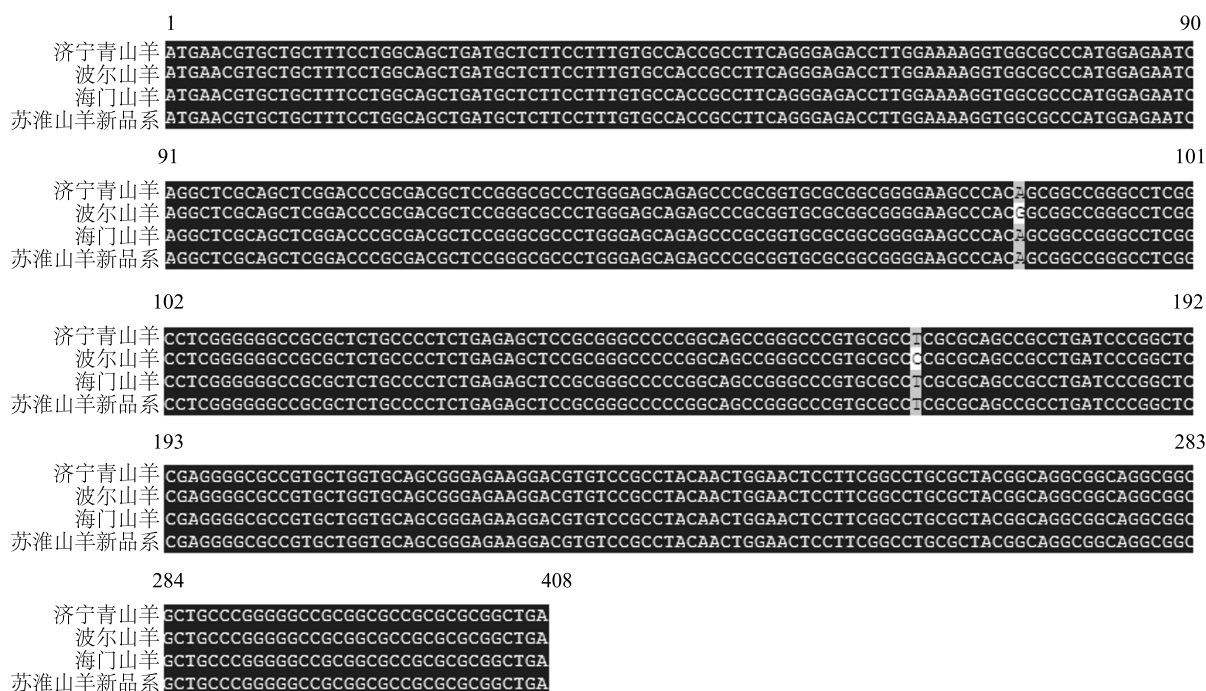
Fig.1 Profile of *Kiss-1* gene exons in new breed of Suhuai goat by PCR

### 2.2 山羊 *Kiss-1* 基因编码区核苷酸序列特征

ORF Finder 在线软件预测发现测定的序列含有山羊 *Kiss-1* 基因完整的开放阅读框,长度为 408 bp(图 2)。通过 DNAMAN 比对发现 3 个不同品种(系)山羊 *Kiss-1* 基因编码区核苷酸序列的一致性为 99.12%,其中苏淮山羊新品系与海门山羊的一致性为 100.00%,与波尔山羊的一致性为 98.80%。另外,苏淮山羊新品系、海门山羊 *Kiss-1* 基因编码区核苷酸序列与哺乳动物中人和牛的一致性分别为 75.88% 和 95.22%,而与斑马鱼的一致性为 31.87%,说明哺乳动物 *Kiss-1* 基因序列比较保守。3 个不同品种(系)山羊 *Kiss-1* 基因序列中 A、T、C、G 4 种碱基的平均含量分别为 12.7%、13.5%、36.5% 和 37.3%,其中 A+T 为 26.2%,G+C 为 73.8%,可见 A、T 含量远远低于 G、C 含量。

### 2.3 山羊 *Kiss-1* 蛋白氨基酸序列特征

3 个山羊品种(系) *Kiss-1* 基因均编码一个含有 135 个氨基酸残基的蛋白质,氨基酸序列的一致性为 97.76%,其中苏淮山羊新品系和海门山羊氨基酸序列的一致性为 100.00%,苏淮山羊新品系、海门山羊 *Kiss-1* 蛋白质氨基酸序列与波尔山羊的一致

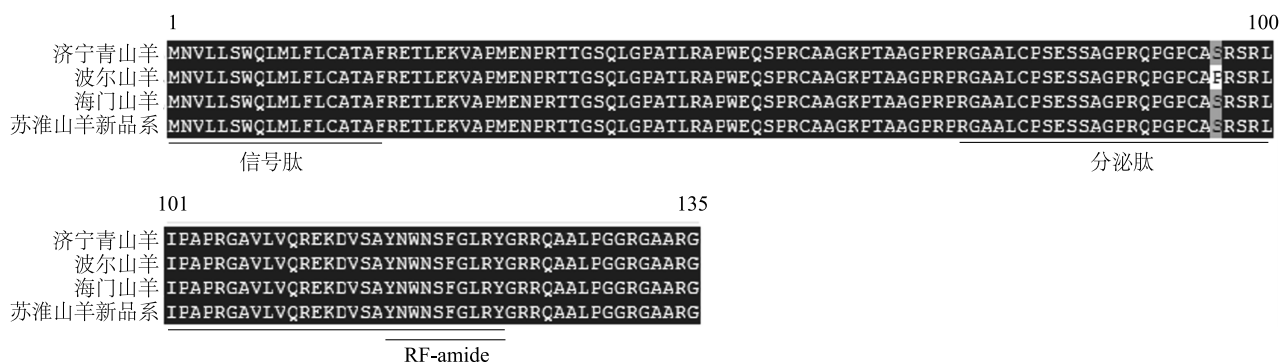
图2 不同山羊品种(系) *Kiss-1* 基因核苷酸一致性比较Fig.2 Alignment of nucleotide sequences of *Kiss-1* from different goat breeds

性为 97.24%(图 3)。另外,苏淮山羊新品系、海门山羊 *Kiss-1* 蛋白质氨基酸序列与哺乳动物中人和牛的一致性分别为 60.81%和 90.34%,而与斑马鱼的一致性为 25.85%,说明哺乳动物 *Kiss-1* 基因序列比较保守。3 个山羊品种(系) *Kiss-1* 编码蛋白质氨基酸序列中丙氨酸(Ala, A)的频率最高,均为 14.8%,其次为精氨酸(Arg, R)(11.9%)和脯氨酸(Pro, P)(海门山羊和苏淮山羊新品系为 11.1%,波尔山羊为 11.9%),而组氨酸(His, H)的频率为 0(图 4)。

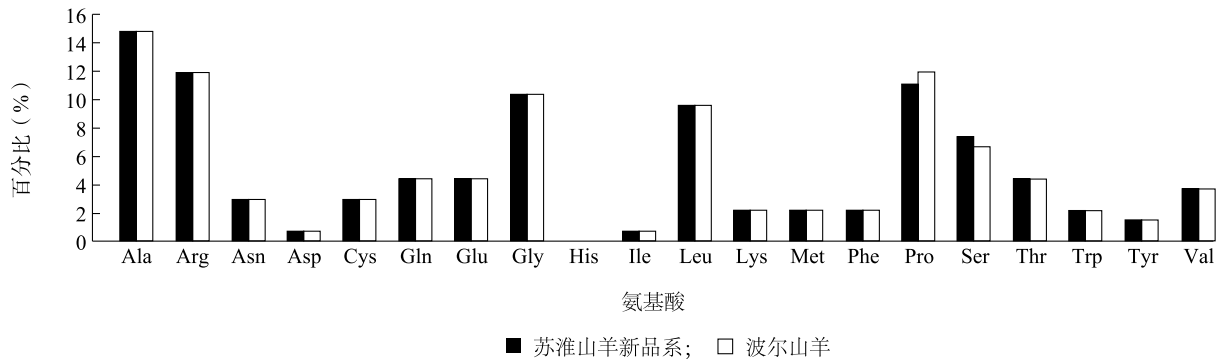
## 2.4 山羊 *Kiss-1* 蛋白理化性质

山羊 *Kiss-1* 基因编码的蛋白质预测相对分子量

为 14 380,理论等电点为 11.23。预测蛋白质正电荷氨基酸残基数为 19 个,负电荷氨基酸残基数为 7 个,体外半衰期为 30 h,蛋白质的不稳定系数为 41.81,说明 *Kiss-1* 基因编码的蛋白质不稳定。山羊 *Kiss-1* 基因编码的蛋白质氨基酸残基亲疏水性总和(GRAVY)为-0.410,说明该蛋白质的亲水性较强。山羊 *Kiss-1* 基因编码的蛋白质存在一个 17 个氨基酸的信号肽(图 3),是分泌性蛋白质。在山羊 *Kiss-1* 基因编码的蛋白质中还发现一个从内向外(1 aa~18 aa)的跨膜区,说明该蛋白质是跨膜蛋白质。同时在 3 个山羊品种(系) *Kiss-1* 基因编码的氨基酸序列中也发现了经典的 RF-amide 结构域(图 3)。

图3 不同山羊品种(系) *Kiss-1* 基因编码蛋白的氨基酸序列一致性比较Fig.3 Alignment of amino acid sequences of *Kiss-1* from different goats breeds



图4 苏淮山羊新品系和波尔山羊 *Kiss-1* 基因编码蛋白的氨基酸组成Fig.4 The composition of amino acid encoded by *Kiss-1* gene in Suhuai and Boer goats

## 2.5 哺乳动物 *Kiss-1* 系统发育分析

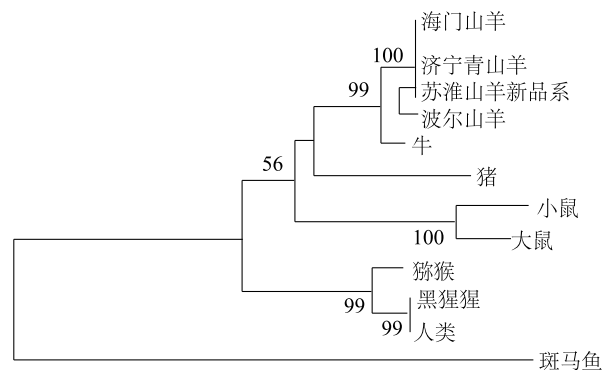
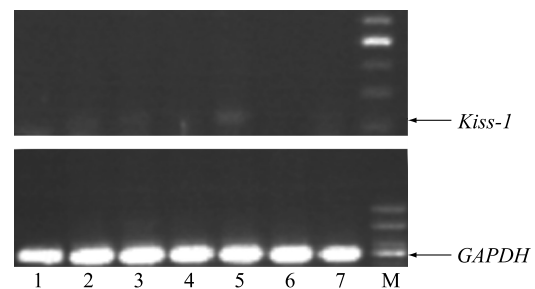
以鱼类(斑马鱼)为外类群,采用 MEGA 5.1 软件中的 NJ 法构建了哺乳动物 *Kiss-1* 基因编码蛋白的系统发育树(图 5),发现聚类结果与经典分类学结果基本一致。4 个山羊品种(系)与 7 个哺乳动物聚在一起,而外类群(鱼类)自成一类;在哺乳动物中,偶蹄目中的 4 个山羊品种(系)与牛、猪聚为一类,啮齿目中的大鼠和小鼠聚为一类( $BP=100\%$ ),而灵长目中的人类、黑猩猩和猕猴聚为另一类( $BP=99\%$ )。在偶蹄目中,牛科中的 4 个山羊品种(系)与牛聚为一类( $BP=99\%$ ),猪科中的猪单独聚为一类。在灵长目中,人科中的人和黑猩猩聚为一类( $BP=99\%$ ),猕猴科的猕猴自成一类。在牛科中,3 个中国地方山羊海门山羊、苏淮山羊新品系和济宁青山羊首先聚在一起,然后和波尔山羊聚为一类,最后与牛科中的牛聚为一类。

## 2.6 山羊 *Kiss-1* 基因在山羊中的组织表达谱

以苏淮山羊新品系为研究对象,考察了 *Kiss-1* 基因在山羊各个内脏组织及肌肉中的组织表达模式。结果发现在山羊的心脏、肝脏、肾脏、肺脏、小肠、卵巢和肌肉 7 个组织中,*Kiss-1* 基因仅在肺脏组织中有一定的表达量,在其他 6 个组织中表达量很少甚至没有(图 6)。

## 2.7 山羊 *Kiss-1* 基因编码区 SNPs 筛选和分析

分别以波尔山羊、苏淮山羊新品系和海门山羊的 DNA 池为模板,利用引物 P1 和 P2 对 *Kiss-1* 基因编码区进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测回收后直接进行测序。根据测序峰图,在 3 个山羊品种(系)*Kiss-1* 基因编码区中共发现 2 个 SNP

图5 12 个物种 *Kiss-1* 基因编码区的蛋白质氨基酸序列 NJ 系统发育树Fig.5 Phylogenetic tree of twelve mammals constructed by NJ method based on the amino acid sequence deduced from *Kiss-1*

1: 小肠; 2: 卵巢; 3: 肌肉; 4: 肾脏; 5: 肺脏; 6: 心脏; 7: 肝脏; M: marker。

图6 苏淮山羊新品系 *Kiss-1* 基因组织表达谱Fig.6 The tissue expression pattern of *Kiss-1* in new breed of Suhuai goat

位点(A175C 和 G256A)(图 7),其中 A175C 位点突

变引起苏氨酸到脯氨酸的突变, *G256A* 位点突变引起丙氨酸到苏氨酸的改变。 *A175C* 位点的单核苷酸, 海门山羊群体均为 A, 而苏淮山羊新品系和波尔

山羊群体均表现出多态(图 7A)。 *G256A* 位点的单核苷酸波尔山羊群体均为 G, 而苏淮山羊新品系和海门山羊群体均表现出多态(图 7B)。

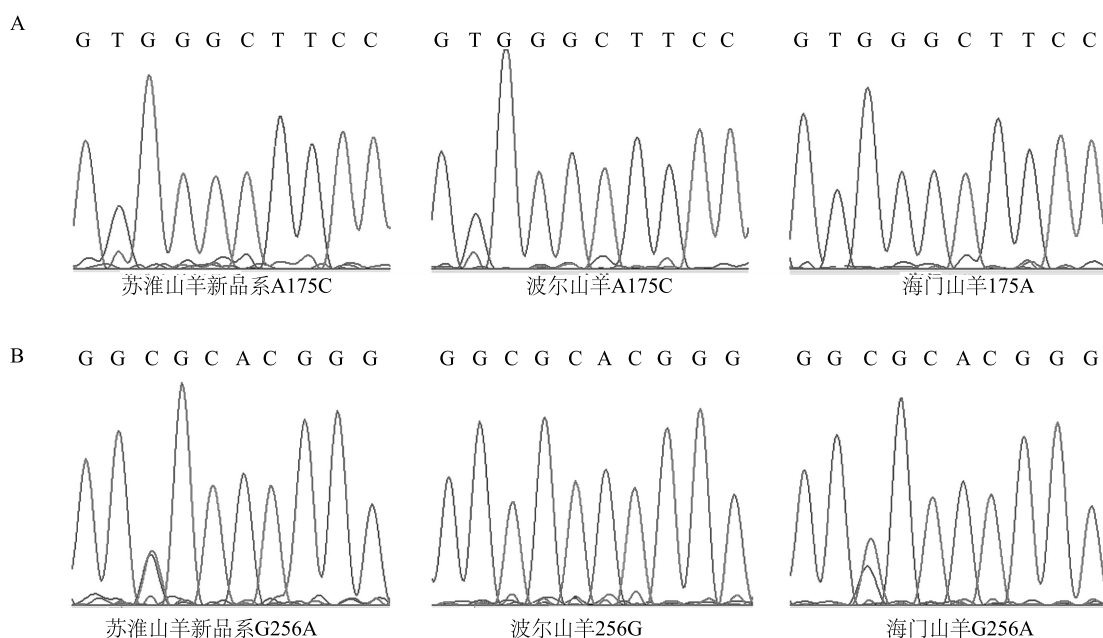


图 7 山羊群体中 *Kiss-1* 基因编码区 SNPs 位点测序图  
Fig.7 SNPs of *Kiss-1* cds in three different goat breeds

### 3 讨论

*Kiss-1* 基因在雌性动物生殖过程中发挥着重要的作用<sup>[13-14]</sup>, 研究发现 *Kiss-1* 基因部分内含子 SNPs 与山羊的繁殖性能显著关联<sup>[12,15-16]</sup>, 但是目前关于山羊 *Kiss-1* 基因编码区序列的研究较少, 关于其编码区 SNPs 的研究未见报道。本研究以 3 个山羊品种(系)(苏淮山羊新品系、海门山羊和波尔山羊) *Kiss-1* 基因为研究对象, 分离其编码区全序列, 结果发现 3 个山羊品种(系) *Kiss-1* 基因编码区长度均为 408 bp, 编码 135 个氨基酸残基, 这与在济宁青山羊中的研究结果一致<sup>[12]</sup>。比对分析发现 3 个中国山羊品种(系)(海门山羊、苏淮山羊新品系和济宁青山羊) *Kiss-1* 基因编码区核苷酸和编码氨基酸序列完全一致, 而与波尔山羊的一致性分别为 98.80% 和 97.24%, 同时聚类分析也发现中国 3 个山羊品种(系)首先聚在一起, 然后再与波尔山羊聚在一起, 这是因为波尔山羊是国外引进品种<sup>[17]</sup>, 所以与中国本地的海门山羊和济宁青山羊的亲缘关系较远。

研究表明 Kisspeptins 是下丘脑-垂体-性腺轴最有效的激活剂, 在促性腺激素释放激素神经元中表达, 直接调控 GnRH 神经元的活动, 从而对垂体和性腺活动产生影响, 进而调控动物的生殖活动<sup>[5]</sup>。Kisspeptins 通过一个 G 蛋白偶联受体 GPR54 刺激 GnRH 的释放从而调控动物的生殖<sup>[18]</sup>, 进一步的研究结果表明 *Kiss-1* 基因的 C 末端 RF-amide (Arg-Phe-N H<sub>2</sub>) 是结合和激活 G 蛋白偶联受体 (GPR) 54 的保守位点。本研究发现山羊 *Kiss-1* 基因编码蛋白质的氨基酸序列中也存在经典的 C 末端 RF-amide 结构域, 同时存在信号肽和分泌肽, 这与在其他物种中的研究结果一致<sup>[19]</sup>, 表明 *Kiss-1* 基因编码的蛋白质在进化上具有高度的保守性, 同时也反映了其结构上的稳定性对生物体功能的重要性。

Stafford 等研究小鼠 *Kiss-1* 基因组织表达模式时发现, *Kiss-1* 基因在所有的组织中都弱表达, 仅在肺脏和 15 d、17 d 小鼠胚胎中有比较高的表达水平<sup>[20]</sup>。Muir 等研究 *Kiss-1* 基因在人类各个组织中

的表达模式,发现其主要在胎盘中表达,在其他内脏组织和肌肉组织中表达水平非常低,但是在神经组织中均有表达<sup>[4]</sup>。本研究发现 *Kiss-1* 基因在山羊的组织中表达水平也很低,只有在肺脏组织里有相对较高的表达水平,在其他内脏组织和肌肉中的表达水平很低,其结果与前人的研究结果一致<sup>[4,20]</sup>。

本研究发现苏淮山羊新品系、海门山羊和波尔山羊的 *Kiss-1* 基因均有 SNPs 位点存在,其中在苏淮山羊新品系和海门山羊群体中的 *G256A* 位点处于 *Kiss-1* 编码蛋白质的分泌肽区,但是关于突变对于蛋白质结构、功能及山羊繁殖性能的影响还有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] LEE J H, MIELE M E, HICKS D J, et al. *Kiss-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [2] OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S, et al. Metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. Nature, 2001, 411: 613-617.
- [3] KOTANI M, DETHEUX M, VANDEBOGAERDE A, et al. The metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54[J]. J Biol Chem, 2001, 276(37): 34631-34636.
- [4] MUIR A, CHAMBERLAIN L, ELSHOUBAGY N, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide *Kiss-1* [J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 28969-28975.
- [5] 张伟,王世银,甘尚权,等. Kisspeptins/GPR54 神经内分泌系统对哺乳动物生殖活动的调控[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(8): 1200-1206.
- [6] 荀文娟,侯冠彧,周汉林,等. *Kiss-1*/GPR54 系统在不同发育阶段五指山猪下丘脑中的表达[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(2): 11-14.
- [7] NAVARRO V M, CASTELLANO J M, FERNANDEZ-FERNANDEZ R, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of *Kiss-1* and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of *Kiss-1* peptide [J]. Endocrinology, 2004, 145(10): 4565-4574.
- [8] DE ROUX N, GENIN E, CAREL J, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(19): 10972-10976.
- [9] D'ANGLEMONT D E, TASSIGNY X, FAGG L A, DIXON J P, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss-1* gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(25): 10714-10719.
- [10] MESSAGER S, CHATZIDAKI E, M A D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(5): 1761-1766.
- [11] LENTS C, HEIDORN N, BARB C, et al. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts[J]. Biol Reprod, 2008, 135(6): 879-887.
- [12] CAO G L, CHU M X, FANG L, et al. Analysis on DNA sequence of *Kiss-1* gene and its association with litter size in goats[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(8): 3921-3929.
- [13] DEDES I. Kisspeptins and the control of gonadotrophin secretion [J]. Syst Biol Reprod Med, 2012, 58(3): 121-128.
- [14] ROA J, CASTELLANO J M, NAVARRO V M, et al. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents[J]. Peptides, 2009, 30(1): 57-66.
- [15] AN X, MA T, HOU J, et al. Association analysis between variants in *KISS1* gene and litter size in goats [J]. BMC Genet, 2013, 14: 63.
- [16] 李隐侠,张俊,钱勇,等. *Kiss-1* 基因多态性与苏淮山羊新品系产羔数的关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(12): 1917-1923.
- [17] 刘铮铸,巩元芳,张传生,等. 波尔山羊 *MyoG* 基因的鉴定和序列特征分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(10): 1337-1341.
- [18] SHAHED A, YOUNG K A. Differential ovarian expression of *Kiss-1* and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) [J]. Mol Reprod Dev, 2009, 76(5): 444-452.
- [19] PASQUIER J, LAFONT A G, ROUSSEAU K, et al. Looking for the bird kiss: evolutionary scenario in sauropsids[J]. BMC Evolutionary Biology, 2014, 14(1): 30.
- [20] STAFFOD L J, XIA C Z, MA W B, et al. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor kiss1 and its G-protein-coupled receptor [J]. Cancer Research, 2002, 62: 5399-5404.

(责任编辑:陈海霞)