

GDF9 下调转基因小鼠模型对繁殖与生长的影响

习欠云, 焦莉, 肖敏, 张永亮*

(华南农业大学动物科学学院, 广州 510642)

摘要: 本研究旨在对转 *GDF9* shRNA 基因小鼠进行扩群繁殖, 统计分析转基因小鼠的产仔数及增重, 检测 *GDF9* shRNA、*GDF9* 表达水平以及血清中 FSH 和 GH 的水平, 以观察 *GDF9* 的下调对转基因小鼠繁殖性能及生长发育的影响。通过 RT-PCR 方法, 分别检测了 *GDF9* shRNA 在体内的表达, 以及下丘脑、垂体和卵巢中 *GDF9* mRNA 表达水平; 同时用 ELISA 检测了血液中 FSH 和 GH 水平。结果表明, 扩群后得到 16 只 *GDF9* shRNA 阳性小鼠, 转基因 *GDF9* shRNA 在小鼠体内广泛表达, 转基因小鼠的产仔数与野生型小鼠相比差异显著 ($P < 0.05$); 转 *GDF9* shRNA 阳性小鼠的体重比阴性小鼠高, 且在第 7 周差异显著 ($P < 0.05$), 而母鼠间体重无显著差异; 与阴性小鼠相比, 转 *GDF9* shRNA 阳性小鼠 *GDF9* 基因的表达量在下丘脑、垂体中分别下降 35.4% 和 39.8%, 差异显著 ($P < 0.05$), 在母鼠卵巢中表达水平差异不显著 ($P > 0.05$); 阳性母鼠血液中 FSH 水平比阴性母鼠高 55%, 差异极显著 ($P < 0.01$)。结果表明, *GDF9* 基因下调可以提高动物繁殖性能, 为提高大型牲畜繁殖力提供了有利的素材和靶点参考。

关键词: *GDF9*; RNA 干涉; 繁殖; 转基因小鼠

中图分类号: S814.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)07-1157-06

The Effect of Transgenic Mice Model Down-regulated *GDF9* on Reproduction and Growth

XI Qian-yun, JIAO Li, XIAO Min, ZHANG Yong-liang*

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This experiment aims to detect the effect of down-regulation of *GDF9* on reproduction and growth in *GDF9* shRNA transgenic mice through statistical analysis of the litter size and weight gain of transgenic mice and detection of biomolecular and blood biochemical indexes such as *GDF9* shRNA, *GDF9* and serum FSH and GH level after reproduction. The levels of *GDF9* shRNA and *GDF9* mRNA expression were detected in hypothalamus, pituitary and ovary via RT-PCR, and serum FSH and GH level were examined using ELISA. The results showed that 16 *GDF9* shRNA transgenic mice obtained were positive, and *GDF9* shRNA in transgenic mice was widely expressed in various tissues. Litter sizes between transgenic and wild mice were significantly different ($P < 0.05$); Body weight of transgenic male mice was higher than that of control mice with significant difference ($P < 0.05$) in the seventh week, and body weight of female mice did not show significant difference. Compared with the negative mouse, *GDF9* gene expression in transgenic mice in hypothalamus and pituitary were decreased by 35.4% and 39.8% ($P < 0.05$), respectively. In transgenic female mice, *GDF9* expression in ovaries was not significantly decreased ($P > 0.05$), but its serum FSH level was 55% higher than the control ($P < 0.01$). The present study showed down-regulation expression of *GDF9* gene can improve the ability of animal reproduction. It may provide a favorable material and molecular target for producing transgenic

收稿日期: 2014-11-26

基金项目: 国家科技重大专项(2013ZX08007003-004); 转基因重点专项(2014ZX08009-48B); 广东省自然科学基金(S2013010013215)

作者简介: 习欠云(1973-), 男, 江西樟树人, 博士, 副教授, 主要从事动物生物化学与营养研究, E-mail: xqy0228@163.com; Tel: 020-85284937

* 通信作者: 张永亮, 教授, 博导, 主要从事动物生物化学与营养研究, E-mail: zhangyl@scau.edu.cn

large livestock with high reproduction.

Key words: *GDF9*; RNAi; reproduction; transgenic mice

GDF9 为转化生长因子 β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族成员, 由两个外显子和一个内含子组成。TGF- β 超家族由一类结构、功能相关的多肽生长因子亚家族组成, 其中包括 TGF- β 、活化素 (Activin)、骨形态发生蛋白 (BMP)、生长分化因子 (*GDF*) 等。TGF- β 除了影响细胞的增殖、分化, 同时在胚胎发育、胞外基质形成、骨的形成和重建等方面也起着重要作用。近来研究发现 TGF- β 超家族中的两个成员 *GDF9* 在促进卵泡发育过程中起到了非常关键的作用^[1]。

GDF9 主要在卵泡中表达^[2], 同时也在非性腺组织中也有表达, 能促进始基卵泡的发育, 抑制促黄体生成激素 (LH) 受体的表达, 与 FSH 协同刺激卵泡生长, 主要调控卵泡的生长发育和生殖功能。研究牛早期卵泡发育时, 发现较小的卵泡中 *GDF9* 的表达高于稍大的卵泡, 所以推测卵泡和颗粒细胞分泌的 *GDF9* 可显著地促进卵泡膜细胞的增殖, 同时又防止卵泡膜内层过早的分化^[3]。D. I. Vage 等^[4] 发现, 挪威白羊 *GDF9* 基因中, c. 1111G>A SNP 表现出比其他任何单个 SNP 都有较高的产仔数, 人工授精公羊纯合子 c. 1111A 会产生后代比野生型多 0.46~0.57 的羔羊数。研究表明, *GDF9* 刺激胸苷掺入颗粒细胞从窦前期到排卵前卵泡, 从而促进颗粒细胞增殖, 抑制 FSH 刺激孕酮和雌二醇生成, 同时也可促进卵泡膜细胞的分化^[5-6]。*GDF9* 的重要靶细胞是颗粒细胞, 其可刺激颗粒细胞的增殖, 进而促进窦前卵泡的发育, 亦能调节 FSH 在颗粒细胞中的作用^[7]。本研究拟通过 RNA 干涉的方法, 制备 *GDF9* shRNA 转基因小鼠模型, 检测下调 *GDF9* 基因的表达对动物繁殖性能的影响, 为进一步探讨提高大型牲畜的繁殖性能提供有利的素材和途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转 *GDF9* 基因 shRNA 的 FVB 小白鼠, 4 只 F0 代公鼠, 4 周龄, 健康无特定病原体 (Specific pathogen free, SPF), 由广州赛业生物科技有限公司制备。饲养房饲养, 每天光照 12 h, 黑暗 12 h, 温度 21 °C, 同一饲料 (南方医科大学动物中心), 自由饮水。

其中转基因公鼠与野生型母鼠采取 1:3 进行扩群繁殖; 对这 4 只 F0 代公鼠、1 只 F1 代母鼠 (来自 1 号 F0 代公鼠) 和 2 只 F2 代母鼠和 1 只 F2 代公鼠的后代, 每只母鼠所产的前两胎仔鼠数目进行记录, 每周称重, 统计分析; 3 周龄时对仔鼠进行 PCR 检测, 确定阴性或阳性。3~7 周龄, 进行数据处理与分析, 绘制生长曲线。7 周龄时将上述仔鼠眼球采血, 置于高压灭菌过 1.5 mL 离心管, 4 °C 静置 2~3 h, 3 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 15 min, 分离血清, -20 °C 保存。小鼠采血完后, 立即颈椎脱臼处死, 迅速取出卵巢、睾丸、下丘脑、垂体、心、肝、脾、肺、肾及肌肉, 投入液氮中, 然后置于 -80 °C 保存, 备用。

1.2 G1 小鼠鼠尾基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

利用 Primer Premier 5.0 软件根据生产转基因小鼠时构建的载体设计一对引物 GFP, 检测转基因是否为阳性, 根据小鼠内参基因和目的基因的序列设计 PCR 的引物。由上海生工生物公司合成。所用的引物序列见表 1。采用 Omega 组织 DNA 提取试剂盒提取。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 2 μ L, 10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.5 μ L, 上下游引物 GFP (10 μ mol·L⁻¹) 各加 0.5 μ L, 基因组 DNA 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U· μ L⁻¹) 0.2 μ L, 补加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。分别取 5 μ L PCR 产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检查目的基因扩增效果。

1.3 GDF9 shRNA cDNA 模板的制备及实时荧光定量 PCR

采用 Trizol 法提取组织总 RNA, 质量和浓度检测后, 稀释成 1 μ g· μ L⁻¹ 备用。按反转录试剂盒 miScript Reverse Transcription Kit 合成 cDNA (QIAGEN), universal Tag 的 Oligo-dT 作为反转录引物。针对转入鼠体内的 *GDF9* 的 shRNA 设计特异性引物: 5'-AAGTCAGTCTTGCTATATACT-3', 并由生工合成。Oligo-dT 为通用引物, 以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲液 2 μ L, 10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.2 μ L, 上下游引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.2 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, Dream Taq 酶 (5 U· μ L⁻¹) 0.2 μ L, 补加 ddH₂O 至 20 μ L。反应程序: 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 58 °C 15

s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。以 β actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

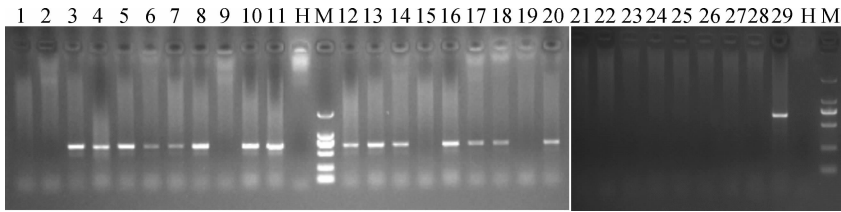
1.4 血清中 FSH 和 GH 的测定

血清中 FSH 和 GH 的测定应用 ELISA 试剂盒 (武汉华美公司), 具体操作按试剂盒说明进行。

表 1 引物序列

Table 1 List of primer sequences

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequences	退火温度/°C Annealing temperature	扩增长度/bp Products length
β -actin	S: TAAGGCCAACCGTGAAAAGATGAC A: ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	58	428
GDF9	S: GGTCTCCTTTCCCCTCTCTT A: GGTGGCTTCTGTTGGATTTA	58	151
GFP	S: CTACGGCTTCTACCACTTCG A: GCAGCGTATCCACATAGCGT	58	235



H. H₂O; M. DL 2000 marker; 3~8, 10~14, 16~18, 20, 29. 小鼠检测为阳性; 其他小鼠检测为阴性
H. H₂O; M. DL 2000 marker; 3-8, 10-14, 16-18, 20, 29. Mice are positive; other mice are negative

图 1 G1 代小鼠的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR results of electrophoresis for G1 mice

2.2 GDF9-shRNA 转基因鼠产子数及体重的统计分析

8 只亲代鼠, 对每只前 2 胎转基因小鼠的产仔数进行了统计分析, 结果如图 2 所示。GDF9-shRNA 转基因小鼠产仔数比野生型小鼠的产仔数高 27.5%, 差异显著 ($P < 0.05$); 对小鼠各周的体重数据按性别进行分析, 结果如表 2 所示。阴性母鼠与阳性母鼠的体重在各周龄均无差异; 阴性公鼠在各周龄体重均比阳性公鼠高, 且在第 7 周时高 6.7%, 差异显著 ($P < 0.05$)。各组小鼠的生长率也几近相同。转基因小鼠未出现体重异常。

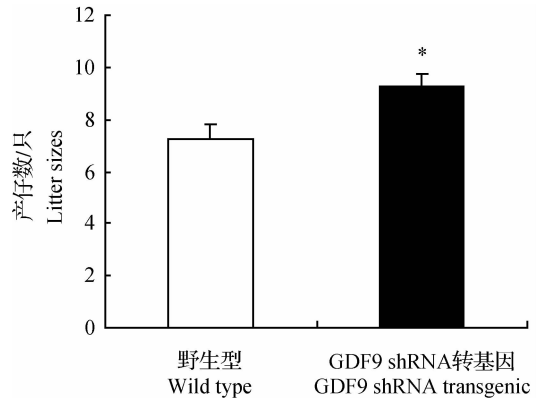
2.3 GDF9-shRNA 在小鼠组织中的 RT-PCR 检测

RT-PCR 检测 GDF9-shRNA 小鼠各组织样表达情况, 结果如图 3 所示。各组织均有 83 bp 的目的条带, 该片段胶回收产物与 pMD18T 载体连接、转化, 挑取单克隆, 测序正确。表明 GDF9 shRNA

2 结果

2.1 G1 代转基因小鼠的 PCR 阳性检测

G1 代小鼠通过 PCR 检测确定阴性或阳性, 用于体重分析及分子检测。在 29 只小鼠中 PCR 检测结果如图 1, 其中阳性小鼠 16 只, 阴性小鼠 13 只。



*. 差异显著 ($P < 0.05$), 下同。n=8

*. Significant difference ($P < 0.05$), The same as below. n=8

图 2 转 GDF9 shRNA 小鼠产仔数统计分析

Fig. 2 Statistical analysis of litter size of GDF9 shRNA transgenic mice

在体内成功表达, 且分布广泛。

表 2 *GDF9* shRNA 转基因小鼠体重的统计分析

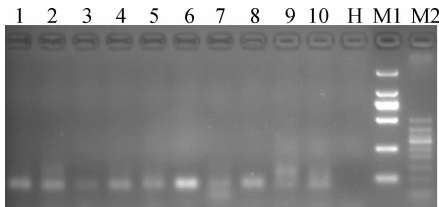
Table 2 Analysis of body weight of *GDF9* shRNA transgenic mice

g

周龄 Weeks	阴性母鼠(♀) Negative female mice	阳性母鼠(♀) Positive female mice	阴性公鼠(♂) Negative male mice	阳性公鼠(♂) Positive male mice
3	6.757 5±0.154 3	7.220 0±0.170 0	7.232 5±0.189 0	7.272 5±0.188 5
4	9.692 5±0.176 3	9.495 0±0.015 0	10.245 0±0.174 3	9.635 0±0.306 3
5	12.192 5±0.240 4	11.800 0±0.040 0	13.305 0±0.271 0	12.547 5±0.398 3
6	12.007 5±0.358 6	12.145 0±0.185 0	13.272 5±0.294 0	12.817 5±0.203 0
7	15.555 0±0.347 5	16.105 0±0.025 0	18.745 0±0.233 4 ^a	17.570 0±0.380 9 ^b

阳性 13 只(7♂, 6♀); 阴性 14 只(8♂, 6♀), 同行肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Positive mice are 13 (7 ♂ and 6 ♀); Negative mice are 14 (8 ♂ and 6 ♀), respectively. Value with different small letter super-script means significant difference ($P < 0.05$)



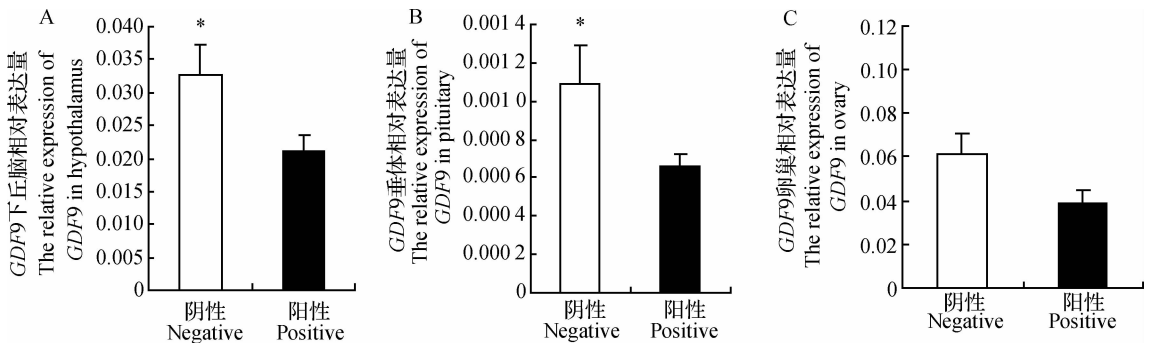
H. H₂O; M1. DL 2000 marker; M2. DL 50 marker; 1. 心; 2. 肝; 3. 脾; 4. 肺; 5. 肾; 6. 下丘脑; 7. 垂体; 8. 肌肉; 9. 卵巢; 10. 睾丸
H. H₂O; M1. DL 2000 marker; M2. DL 50 marker; 1. Heart; 2. Liver; 3. Spleen; 4. Lung; 5. Kidney; 6. Hypothalamus; 7. Pituitary; 8. Muscle; 9. Ovary; 10. Testis

图 3 *GDF9* shRNA 在不同组织中的 RT-PCR 检测

Fig. 3 RT-PCR analysis of *GDF9* shRNA expression in different tissues

2.4 *GDF9* mRNA 在小鼠下丘脑、垂体、卵巢中的表达水平检测

卵巢 *GDF9* 与 FSH 的分泌有关, 且 *GDF9* 在下丘脑、垂体中也有表达量。通过 RT-PCR 检测这些组织中 *GDF9* 的表达量。结果显示, 在下丘脑中的 *GDF9* 的表达量, 阳性小鼠与阴性小鼠相比下降 35.4% (图 4A), 差异显著 ($P < 0.05$); 在垂体中 *GDF9* 的表达量, 阳性小鼠与阴性小鼠相比下降 39.8%, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 4B); 在卵巢中 *GDF9* 的表达量, 阳性母鼠比阴性母鼠低, 但差异不显著 ($P = 0.153$) (图 4C)。



A. 下丘脑, $n = 11$; B. 垂体, $n = 6$; C. 卵巢, $n = 6$

A. Hypothalamus, $n = 11$; B. Pituitary, $n = 6$; C. Ovary, $n = 6$, respectively

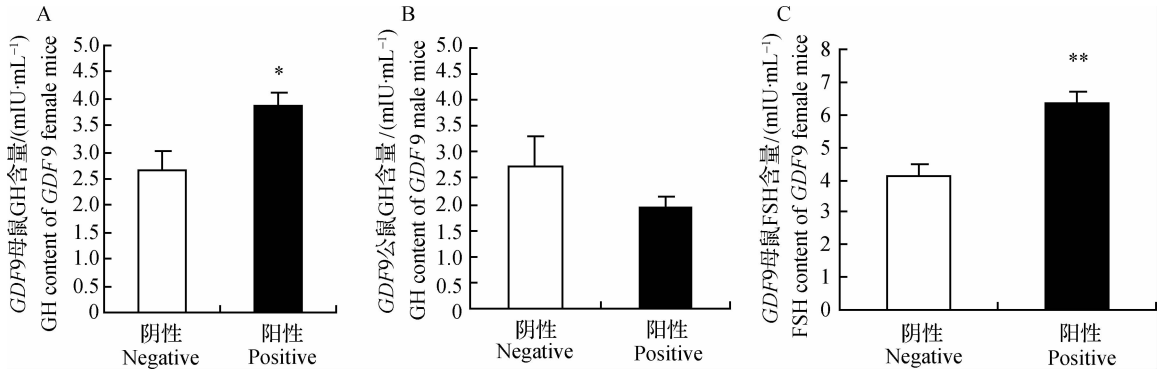
图 4 *GDF9* 在不同组织相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *GDF9* in different tissues

2.5 小鼠血液中 GH 和 FSH 的水平检测

利用试剂盒检测血液中 GH 和 FSH 的水平。结果表明, 阳性母鼠比阴性母鼠高 45.9%, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 5A); 阳性公鼠 GH 水平比阴性公

鼠低 28.4%, 差异不显著 ($P > 0.05$) (图 5B); 阳性母鼠 FSH 水平比阴性母鼠高 55%, 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 5C)。



* *. 差异极显著 ($P < 0.01$), 阳性与阴性样本数均为 13 只 (6♂, 7♀)

* *. Extreme significant difference ($P < 0.01$), positive and negative samples are all 13 (6♂, 7♀), respectively

图 5 血清中 GH 和 FSH 水平的检测

Fig. 5 Detection of GH and FSH levels in serum

3 讨论

RNA 干扰技术在活体水平应用广泛。D. A. Rubinson 等^[8]将表达 siRNA 的慢病毒载体通过显微注射的方法成功地建立了 CD8 和 p53 下调转基因小鼠,这两种转基因小鼠其体内相应基因的表达都显著降低。M. A. Carmell 等^[9]通过转基因的方法将 siRNA 整合到基因组中稳定表达,成功地沉默了转基因小鼠中 GFP 的表达。本实验室针对 *GDF9* 与繁殖性能的相关性,利用 RNA 干扰技术,筛选并构建了 *GDF9* 基因最佳慢病毒干扰质粒,并成功制备转基因小鼠模型。在此基础上,本研究通过转基因小鼠的扩繁及分析,探讨 *GDF9* 基因下调对动物生长繁殖的影响。

首先,通过 PCR 对转 *GDF9* shRNA 的小鼠及子代进行检测。结果表明 *GDF9* shRNA 成功整合到小鼠基因组,转基因小鼠模型成功建立。RT-PCR 结果也表明在转基因小鼠的各个组织中均有 shRNA 表达。本研究中表达 shRNA 的载体为慢病毒干涉载体,表明该载体具有良好的转移外源基因的能力。这与已有报道结果一致。慢病毒载体对分裂和非分裂的细胞均具有高效感染能力,并将外源基因有效地整合到宿主染色体上,进而可以持久表达^[8]。B. Dieckhoff 等利用慢病毒载体在制备的转基因猪中,也检测到 shRNA 在猪的心、肝、脾、肺、肾、肌肉组织中都有表达^[10]。其次,为了检测 shRNA 在活体水平上对 *GDF9* 的干扰效果,本研究检测了与 FSH 分泌相关的卵巢,*GDF9*-shRNA 水平较高的下丘脑以及垂体中 *GDF9* 的表达量。

结果显示,与阴性小鼠相比,转基因小鼠下丘脑中 *GDF9* 的表达量下降 35.4%,差异显著($P < 0.05$);垂体中 *GDF9* 的表达量下降 39.8%,差异显著($P < 0.05$);卵巢中 *GDF9* 的表达量稍有下调,但差异不显著($P > 0.05$)。表明 shRNA 在不同组织表达量不同,对 *GDF9* 的干扰效果也可能不同。由于 RNAi 技术只是下调特定的基因表达,并不是完全敲除靶基因。M. Semaan 等^[11]对慢病毒载体介导的 PERV shRNA 转基因猪的研究中,同样发现,shRNA 在不同个体及同一个体的不同的组织器官中表达量也是不同的。A. Nagao 等^[12]为了提高 shRNA 对 XPA 基因的干扰效率,将多个针对该基因的 shRNA 串联在同一表达载体,其干扰效果与稳定性显著增加。O. Ter Brake 等^[13]针对 HIV-1 的不同区域构建了新的由 4 个 shRNA 串联的慢病毒载体,比只有 1 个 shRNA 的慢病毒载体对 HIV-1 的抑制效应强。

研究发现,*GDF9* 纯合缺失的雌性小鼠早期卵泡发育停止导致不育,但是雄性小鼠无影响^[14]。*GDF9* 的 FecGH 突变(G8 突变)同样能提高杂合绵羊的排卵率^[15]。本研究转基因小鼠繁殖性能结果显示,*GDF9* shRNA 转基因小鼠产仔数显著高于阴性小鼠($P < 0.5$),而且小鼠出生后并未出现异常现象,这与 *GDF9* 在卵巢、垂体、下丘脑表达量下降结果一致。同时,在第 7 周龄阳性公鼠体重显著低于阴性公鼠($P < 0.5$);而阳性母鼠与阴性母鼠体重在各周龄均无显著差异。目前对 *GDF9* 基因研究主要还是在繁殖方面,对后期个体生长增重方面尚未见相关报道。由于 *GDF9* 基因在下丘脑、垂体中也表达,shRNA 下调 *GDF9* 基因的表达可能对动物

生长轴的调控造成影响,并具有一定的性别依赖性。针对该现象的原因,在后续试验中还需要做深入探讨。

动物生长繁殖是一个复杂的调控过程,受遗传、激素、营养、环境等多因素的影响。本研究通过筛选最优干涉效果的 *GDF9* shRNA 序列,在小鼠模型上获得验证。综上所述,*GDF9* 基因下调可以提高动物繁殖能力,为今后提高大型动物的繁殖性能提供了良好的素材和途径。

参考文献 (References):

- [1] KNIGHT P G, GLISTER C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development[J]. *Anim Reprod Sci*, 2003, 78 (3-4): 165-183.
- [2] MCGRATH S A, ESQUELA A F, LEE S J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9 [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(1):131-136.
- [3] SPICER L J, AAD P Y, ALLEN D T, et al. Growth differentiation factor-9 (*GDF9*) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells; influence of follicle size on responses to *GDF9*[J]. *Biol Reprod*, 2008, 78(2):243-253.
- [4] VAGE D I, HUSDAL M, KENT M P, et al. A missense mutation in growth differentiation factor-9 (*GDF9*) is strongly associated with litter size in sheep[J]. *BMC Genet*, 2013, 14:1.
- [5] VITT U A, MCGEE E A, HAYASHI M, et al. *In vivo* treatment with *GDF-9* stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(10):3814-3820.
- [6] MAZERBOURG S, KLEIN C, ROH J, et al. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5[J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(3):653-665.
- [7] KOBAYASHI N, ORISAKA M, CAO M, et al. Growth differentiation factor-9 mediates follicle-stimulating hormone-thyroid hormone interaction in the regulation of rat preantral follicular development[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(12):5566-5574.
- [8] RUBINSON D A, DILLON C P, KWIATKOWSKI A V, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(3):401-406.
- [9] CARMELL M A, ZHANG L, CONKLIN D S, et al. Germline transmission of RNAi in mice [J]. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(2):91-92.
- [10] DIECKHOFF B, PETERSEN B, KUES W A, et al. Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs [J]. *Xenotransplantation*, 2008, 15 (1):36-45.
- [11] SEMAAN M, KAULITA D, PETERSEN B, et al. Long-term effects of PERV-specific RNA interference in transgenic pigs [J]. *Xenotransplantation*, 2012, 19 (2):112-121.
- [12] NAGAO A, ZHAO X, TAKEGAMI T, et al. Multiple shRNA expressions in a single plasmid vector improve RNAi against the XPA gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370(2):301-305.
- [13] TER BRAKE O, T HOOFT K, LIU Y P, et al. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(3):557-564.
- [14] DONG J, ALBERTINI D F, NISHIMOREI K, et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis [J]. *Nature*, 1996, 383 (6600):531-535.
- [15] HANRAHAN J P, GREGAN S M, MULSANT P, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*) [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70 (4):900-909.

(编辑 程金华)