

DOI:10.12113/202204016

# 普氏野马 GH 基因的克隆及生物信息学分析

郭雅男, 刘霞\*, 郑丽平, 王海芳  
(甘肃农业大学 生命科学技术学院, 兰州 730070)

**摘要:**普氏野马(*Equus przewalskii*)属国家 I 级保护动物,是现存的马中唯一的野生亚种。生长激素(Growth Hormone, GH)是大脑垂体前叶分泌的一种多肽类激素,对动物个体的生长、发育的影响极其明显。为了更好的保护普氏野马,提高其野外生存与繁殖能力,本研究利用 PCR 技术首次获得了普氏野马 GH 基因,并利用生物信息学方法对其编码的蛋白质结构和功能进行分析和预测,旨在探明普氏野马生长激素(Growth Hormone, GH)基因的结构特点以及其编码蛋白质的结构与功能。结果显示,普氏野马 GH 基因所在基因组 DNA 全长为 1 577 bp,经 BLAST 比对后,发现普氏野马与家马(GenBank: EU939446.1) GH 基因序列相似性高达 99.68%,属于同源序列。该基因编码蛋白质的氨基酸数量为 152 个,分子量为 17 638.54 Da,理论等电点为 9.01,带负电荷的残基总数(Asp+Glu)为 19 个,正电荷残基总数(Arg+Lys)为 23 个,分子式为  $C_{79}O_{1274}N_{216}O_{226}S_7$ 。普氏野马 GH 蛋白属于细胞外蛋白,含有生长激素样结构域,不具有相关跨膜结构,其含有信号肽的可能性为 0.35%。这为普氏野马 GH 基因的开发利用奠定了分子基础。

**关键词:**普氏野马;GH 基因;基因克隆;生物信息学

**中图分类号:**S821.81 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2023)02-138-08

## Cloning and bioinformatics analysis of GH gene from *Equus przewalskii*

GUO Yanan, LIU Xia\*, ZHENG Liping, WANG Haifang

(College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** *Equus przewalskii* belongs to the national first-class protected wild animals. It is the only surviving wild subspecies of horse. Growth hormone (GH) is a polypeptide hormone secreted by the anterior pituitary gland, which has an obvious effect on the growth and development of animals. In order to better protect the wild horse and improve its wild survival and breed ability, the GH gene of *Equus przewalskii* was obtained by PCR for the first time, and the structure and function of its encoded protein were analyzed and predicted by bioinformatics method, so as to explore the structural characteristics of GH gene and the structure and function of its encoded protein. Results showed that the total length of genomic DNA of GH gene of *Equus przewalskii* was 1577 bp. After BLAST comparison, it was found that the sequence similarity of GH gene between *Equus Przewalskii* and *Equus caballus* (GenBank: EU939446.1) was as high as 99.68%, indicating that they belong to homologous sequence. The number of amino acids of the protein encoded by the gene was 152, the molecular weight was 17 638.54 Da, the theoretical isoelectric point was 9.01, the total number of negatively charged residues (Asp+Glu) was 19, the total number of positively charged residues (Arg+Lys) was 23, and the molecular formula was  $C_{79}O_{1274}N_{216}O_{226}S_7$ . GH protein of *Equus przewalskii* belonged to extracellular protein, which contained growth hormone like domain and did not have relevant transmembrane structure, with a 0.35% chance of containing signal peptide. The research lays a molecular foundation for the development and utilization of GH gene in *Equus przewalskii*.

**Keywords:** *Equus przewalskii*; GH gene; Gene cloning; Bioinformatics

收稿日期:2022-04-18;修回日期:2022-06-10;网络首发日期:2022-08-25.

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.Q.20220825.0953.002.html>

基金项目:甘肃省科技厅重点研发科技项目(No.17YF1NH084);甘肃农业大学校企横向合作项目(No.032-031119;032-031120;032-031121).

\* 通信作者:刘霞,女,副教授,硕士生导师,研究方向:动物生物化学与分子生物学.E-mail:413319674@qq.com.

普氏野马 (*Equus przewalskii*) 属国家 I 级保护野生动物,是目前地球上唯一存活的野生马,保留着马的原始基因,曾栖息在从准噶尔盆地到蒙古高原西南部的荒漠草原地带,是保存马类动物遗传多样性及用于家马性状改良和育种的珍贵物种。由于捕猎和环境问题,普氏野马的野生种群已于 20 世纪 60 年代在我国灭绝。从 20 世纪 80 年代末期以来,我国陆续从欧洲引回普氏野马,在新疆卡拉麦里和甘肃武威半散放养殖。将普氏野马与家马染色体数量进行对比,由于其染色体数目 ( $2n = 66$ ) 不同于家马 ( $2n = 64$ ),一些研究者将普氏野马划分为一个独特的物种。对 GTG 显带核型的研究表明,两种马类动物的染色体都是同源的,染色体数目的差异是由于 EPR 中涉及两对端中心染色体的罗伯逊事件引起的<sup>[1-2]</sup>,由此可推测普氏野马为家马的祖先。有研究表明,野马的血液白细胞含量一般高于家马而低于斑马,血沉比家马缓慢<sup>[3]</sup>。普氏野马与家马在头骨形态上的变异,是由环境和进化的两个方面决定的。将普氏野马的头骨与家马进行比较,发现野马头长与体长之比大于家马头长与体长之比,野马脑区体积在马属动物中仅属中等程度,但脸区却明显大于家马,野马下颌骨较家马的粗大,翼肌窝较家马的深,上、下臼齿列也明显比家马长,以上特点和野马的野生习性相适应<sup>[4]</sup>。在外貌和形态上,普氏野马在体型上酷似家马,但还存在着明显的差别,通过普氏野马的额毛,鬃毛和体色就足以与家马区分出来,普氏野马和家马的行为谱基本相似,如采食,休息,运动,繁殖,玩耍等行为基本无差别。综上所述研究表明,野马和家马间不仅只有同源性,也存在一定的品种差异。现有的针对普氏野马的研究包括普氏野马肠道寄生虫以及普氏野马血液生理参数测定等<sup>[5-6]</sup>,而对于普氏野马 GH 基因的相关研究还未见报道。

生长激素 (Growth Hormone, GH) 是大脑垂体前叶分泌的一种多肽类激素,对动物个体的生长、发育的影响极其明显。除神经组织外,GH 几乎对所有组织的生长都有刺激作用,通过调节内分泌系统的激素水平,提高动物的生产性能,已成为畜牧业发展的热点。当哺乳动物身体感到压力时,下丘脑-垂体-肾上腺系统被激活<sup>[7-11]</sup>,在不同应激类型(身体或精神)和发病模式(急性或慢性)<sup>[12-14]</sup>下,都可以观察到应激反应。由于普氏野马的应激反应较大,易受外部环境影响和干扰,当其处于运输<sup>[15]</sup>或者竞赛等压力环境时其胃溃疡的发生率会明显增加<sup>[16-18]</sup>。垂体前叶分泌的催乳素和生长激素 (GH) 是应激反应中抗应激的必需激素<sup>[19]</sup>。曾有研

究表明,马可以通过运动增强催乳素和生长激素的分泌<sup>[20]</sup>。综上,生长激素不仅是生理生化指标的重要部分,其水平变化对于考量普氏野马的行为表现具有十分重要的意义。因此,本研究以普氏野马的 GH 基因为研究对象,旨在探明其基因组结构特点,预测分析编码蛋白的理化性质和结构功能特点,为利用 GH 基因的功能来研究提高普氏野马的野外生存与繁殖能力奠定分子信息基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 普氏野马全血样

采集自国家林业局甘肃濒危动物保护中心,存放于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下条件保存备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

LA Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司; DNA Marker 购自艾科瑞生物公司;血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (DP304) 购自天根生化科技(北京)有限公司;干粉引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;其他常规试剂均为进口或国产分析纯级产品;梯度 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

### 1.3 普氏野马 DNA 全基因组的提取

从超低温冰箱中取出普氏野马的全血,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴锅溶解,按照血液基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN) 说明提取普氏野马血液中的总 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA (电压  $120\text{ V}$ , 电流  $400\text{ A}$ )。

### 1.4 引物的设计与 GH 基因的扩增

参照 Gene Bank 中家马的 GH 基因序列 (Gene ID: 100034180), 设计引物, 参考序列长度为  $1\text{ }683\text{ bp}$ , 引物序列和纯化方法如表 1 所示。

PCR 反应的总体积为  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 其中含: LA Taq DNA 聚合酶  $0.2\text{ }\mu\text{L}$ ; dNTP  $3.2\text{ }\mu\text{L}$ ; LA Taq Buffer  $2\text{ }\mu\text{L}$ ; DNA 模板  $1\text{ }\mu\text{L}$ ; F、R 引物各  $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ; dd H<sub>2</sub>O  $12.6\text{ }\mu\text{L}$ 。

PCR 反应条件设置为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $4\text{ min}$ ;  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $20\text{ s}$ , 退火  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$   $15\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $30\text{ s}$ ,  $35$  个循环; 最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物用  $1\%$  的琼脂糖凝胶电泳检测分析。

表 1 引物序列和纯化方法

Table 1 Primer sequences and purification methods			
引物	引物序列 (5'---3')	碱基数目	纯化方法
F	ATGGCTGCAGGTAAGCCCTCT	22	PAGE
R	GAGGCACTGAGGAGGGTAACAGAG	25	PAGE

### 1.5 生物信息学分析

首先利用 Augustus 预测该序列的外显子和内

含子;然后再利用 NCBI 检索相关物种的氨基酸序列,用于后续序列比对;通过 MEGA7 软件构建 17 个物种的氨基酸序列系统进化树;利用 ExParam tool 在线工具预测 GH 氨基酸序列的物理化学性质;再利用 Cell-PLoc 2.0 算法进行亚细胞定位分析;利用 TMHMM Server v.2.0、SignalP-5.0 对蛋白质的跨膜结构域及信号肽进行预测;应用 SOPMA 分析蛋白质二级结构及相关功能并应用 NCBI 平台上的 CDD 进行保守结构域的分析;利用 SWISS-MODEL 进行同源建模并分析蛋白质的 3D 结构<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 GH 基因的扩增及测序结果

对普氏野马基因组进行扩增,得到 5 条特异性较高的目的条带(见图 1),PCR 扩增产物大小与预期片段大小一致,条带清晰、明亮,可用于核酸测序。将核酸测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索,比对结果表明扩增得到的序列是普氏野马 GH 基因,长度为 1 577 bp,测序结果见图 2。

### 2.2 普氏野马 GH 的序列对比

根据核酸测序结果,将普氏野马与家马(GenBank: EU939446.1)的 GH 基因及其编码的氨基酸序列利用 NCBI 上的 BLAST 进行比对,结果显示,普氏野马 GH 基因与家马的 GH 基因相似性达

到 99.68%,可推测普氏野马与家马的 GH 基因序列是同源序列,二者具有同源性。与家马相比,普氏野马 GH 氨基酸序列未发生较大改变。

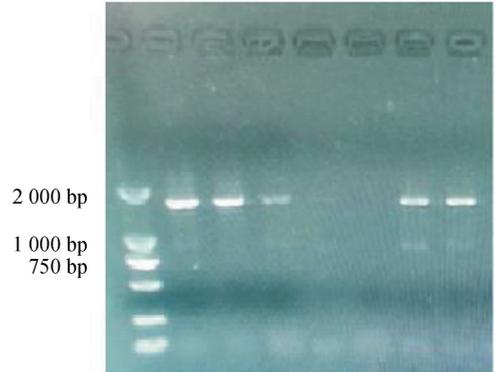


图 1 GH 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplification of GH gene

将普氏野马 GH 氨基酸序列与从 GeneBank 中获得的 16 个物种的 GH 氨基酸序列进行相似性分析,在 NCBI 上利用在线 BLAST 功能进行多序列对比并构建系统发育树,见图 3。氨基酸序列相似性分析结果表明,普氏野马与家马具有较高的同源性,其亲缘关系较密切;与人、黑猩猩、大猩猩、猕猴等动物同源性较低;与其他物种在系统发育树中距离较近,但也并非处于同一个分支。GH 氨基酸序列系统发育树与生物进化的物种树基本一致,说明 GH 基因编码区在物种间比较保守。

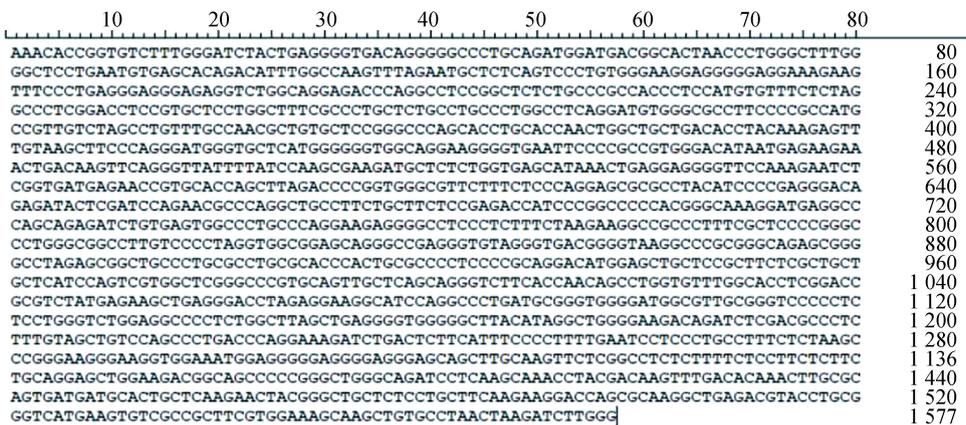


图 2 普氏野马 GH 基因的测序结果序列

Fig.2 Sequencing results of GH gene of *Equus przewalskii*

### 2.3 普氏野马 GH 基因上内含子和外显子的预测

利用 Augustus 在线分析平台来预测其外显子和内含子数目及位置,结果表明,该 DNA 序列中含有 5 个外显子和 4 个内含子,外显子长度分别介于 1-10, 318-401, 631-747, 932-1 093 和 1 366-1 577 bp,内含子长度分别介于 11-317, 402-630, 748-931 和 1 094-1 365 bp。其中,蛋白质的编码序

列如表 2 所示。

### 2.4 普氏野马 GH 蛋白质物理化学性质及结构预测

#### 2.4.1 蛋白质物理化学性质预测

利用 ExPASy ProtParam tool 在线工具对普氏野马 GH 氨基酸序列的基本性质进行理论的预测分析,结果表明,该蛋白质的氨基酸数量为 152 个,分

子量为 17 638.54 Da,理论等电点为 9.01,带负电荷的残基总数(Asp+Glu)为 19 个,正电荷残基总数(Arg+Lys)为 23 个,分子式为 C<sub>79</sub>O<sub>H</sub><sub>1274</sub>N<sub>216</sub>O<sub>226</sub>S<sub>7</sub>,消光系数以 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> 为单位,在水中测量时为 280

nm,假设所有对 Cys 残基形成胱氨酸,则其消光系数为外部系数 13 075 Abs 0.1% (= 1 g/l)0.741;假设所有 Cys 残留物都减少,外部系数 12 950 Abs 0.1% (= 1 g/l)0.734。

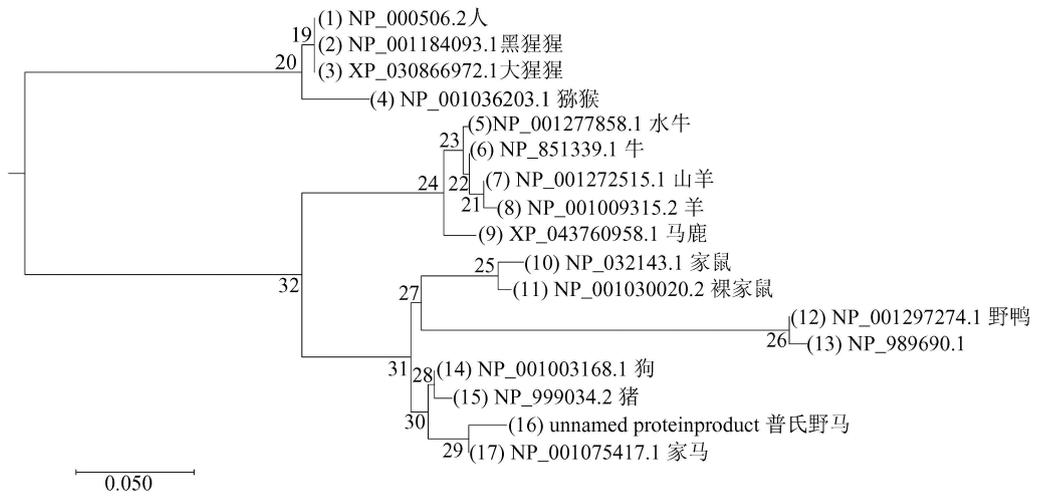


图 3 17 个物种 GH 氨基酸序列进化树

Fig.3 GH amino acid sequence phylogenetic tree of 17 species

表 2 CDS 区编码的蛋白质序列

Table 2 Protein sequences encoded by CDS region

Region	Protein sequence
CDS	MPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFDMELLRFSLLIQSWLGPVQLLSRVFTNSLVFGTSDRVYEKLRDLEEGIQ ALMRELEDGSPRAGQLKQTYDKFDTNLRSDDALLKNYGLLSCFKKQDKAETYLVRVMKCRRFVESKLCCLKIL

预测的半衰期为:所考虑序列的 N 端为 M (Met),估计半衰期为:30 h(哺乳动物网织红细胞,体外), > 20 h(酵母,体内), > 10 h(大肠杆菌,体内)。

不稳定性指数(II)为:38.57;脂肪族氨基酸指数为:101.38;总的亲水性平均系数为:-0.214;氨基酸组成为:

Ala (A)	9	5.9%	His (H)	2	1.3%	Thr (T)	7	4.6%
Arg (R)	12	7.9%	Ile (I)	4	2.6%	Trp (W)	1	0.7%
Asn (N)	4	2.6%	Leu (L)	28	18.4%	Tyr (Y)	5	3.3%
Asp (D)	10	6.6%	Lys (K)	11	7.2%	Val (V)	7	4.6%
Cys (C)	3	2.0%	Met (M)	4	2.6%	Pyl (O)	0	0.0%
Gln (Q)	8	5.3%	Phe (F)	8	5.3%	Sec (U)	0	0.0%
Glu (E)	9	5.9%	Pro (P)	3	2.0%			
Gly (G)	6	3.9%	Ser (S)	11	7.2%			

原子组成为:

Carbon	C	790	Nitrogen	N	216
Hydrogen	H	1 274	Oxygen	O	226
			Sulfur	S	7

原子总数为:2 513

#### 2.4.2 亚细胞定位分析

利用 Cell-PLoc 2.0 算法预测蛋白质的亚细胞定位,分析结果显示,普氏野马 GH 蛋白定位于细胞外。

#### 2.4.3 跨膜结构与分析

利用生物学在线软件 TMHMM Server v. 2.0 对蛋白质是否具有跨膜螺旋进行预测,分析结果表明,普氏野马 GH 蛋白并不具有相关的跨膜结构,如图 4 所示。



2.4.6 保守结构域分析

利用 NCBA 平台上的 CDD 在线生物学工具,对蛋白质的保守结构域进行预测分析。结果表明,其蛋白质分类为:Somatotropin\_like domain-containing protein,即含有生长激素样结构域的蛋白质,CDD 的分析结果以 Graphical summary 和 List of domain hits 形式显示。在图形和列表的分析结果中,均表明 GH 蛋白质含有 1 个结构域,为 somatotropin\_like --

cd10285(见图 7),受体结合面见图 8,保守结构域比对结果如图 9 所示,属于生长激素/催乳素激素家族。生长激素(GH)是垂体合成的一种肽类激素,在发育过程中介导合成代谢效应。已知 GH 通过与特定细胞受体结合激活 MAPK/ERK 和 JAK-STAT 信号通路,通过后者,它触发胰岛素样生长因子 1(主要在肝脏)的分泌。除了增加身高,生长激素还被证明有许多其他的影响。

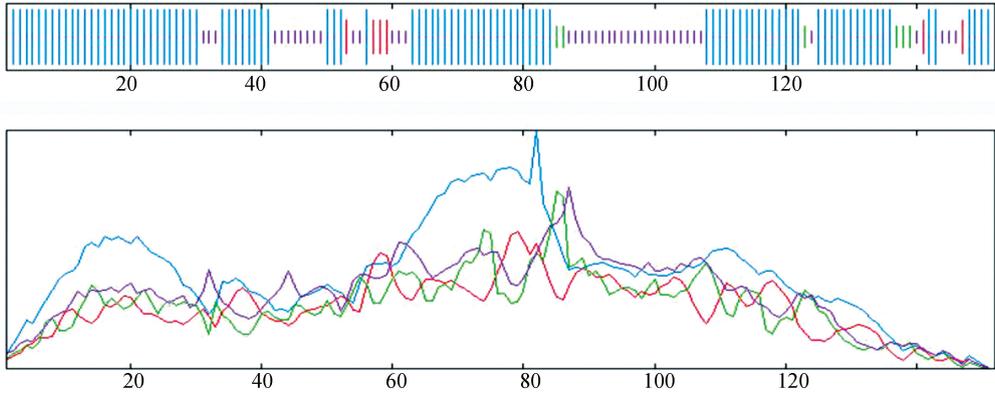


图 6 蛋白质的二级结构分析

Fig.6 Secondary structure analysis of proteins

注意:蓝色线条代表:Alpha helix (Hh); 紫色线条代表:Random coil (Cc); 绿色线条代表:Beta turn (Tt) 红色线条代表:Extended strand (Ee)

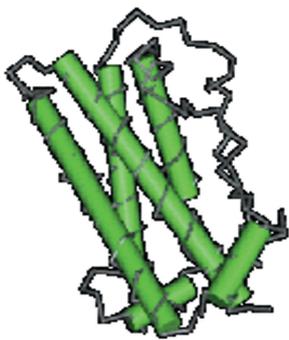


图 7 保守蛋白质结构域家族类生长激素

Fig.7 Growth hormone like family of conserved protein domains

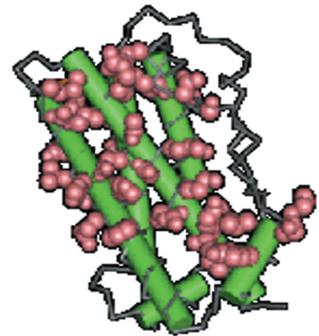


图 8 受体结合界面[多肽结合位点]

Fig.8 Receptor binding interface [ polypeptide binding site]

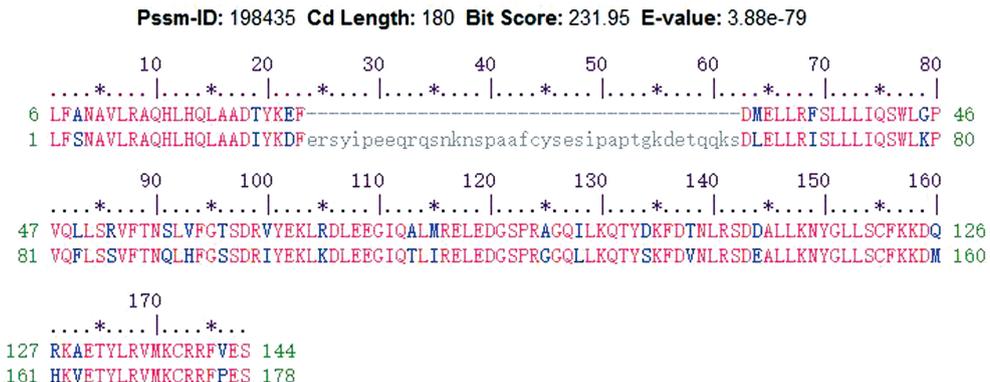


图 9 保守结构域比对结果

Fig.9 Conservative structure and comparison results

### 2.4.7 3D 结构分析

利用在线生物学工具 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org>)进行同源建模预测蛋白质 3D 结构,结果获得 GH 蛋白三级结构模型(见图 10),该结果表明普氏野马 GH 基因呈“three-over-three”三明治夹心型折叠结构,由  $\alpha$ -螺旋与无规卷曲构成,这与二级结构预测结果基本一致。

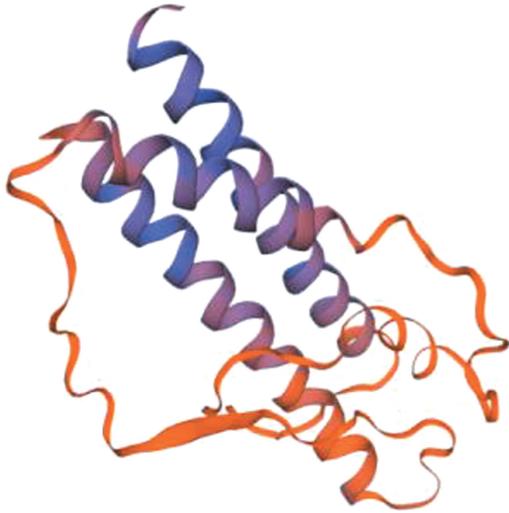


图 10 蛋白质 3D 结构  
Fig.10 Protein 3D structure

### 2.5 讨论与分析

动物的生长发育研究一直备受科学家们的关注,其适应机制十分复杂。GH 与生长关系密切,是生长可调节型表达指示器。目前,国内外对于动物的 GH 研究多见于大鼠、人、牛、绵羊、猪、猫、狗等,对于马属动物的研究相对较少,而 GH 基因在普氏野马身上表达特征的研究更是未见报道。因此本研究从 DNA 水平和蛋白质水平上分析普氏野马 GH 基因的结构与特性,为进一步研究其调控普氏野马生长发育机制的生物学作用奠定分子生物信息学基础。利用 ExPASy ProtParam tool、Cell-PLoc 2.0、TMHMM Server v. 2.0、SignalP-5.0、SOPMA、SWISS-MODEL 等生物学软件对 GH 序列结构、核苷酸组成及所编码的氨基酸进行了初步分析,并将其与多个各物种的 GH 氨基酸序列进行了 BLAST 比对,构建了包含普氏野马 GH 的系统发育进化树。普氏野马外显子数目、大小、位置与哺乳类其他物种相比,表现出高度保守性<sup>[22]</sup>。普氏野马 GH 基因外显子在编码氨基酸时,对同义密码子的使用表现有强烈的偏好性。不同物种对同义密码子使用的偏倚程度与偏好类型各不相同,也具有种属特异性。普氏野马 GH 基因所编码的蛋白质中,亮氨酸含量最高,达 18.4%;色氨酸最低,为 0.7%。此外,半胱氨酸的含量与

其他哺乳类差别不大,而且半胱氨酸的位置在不同物种中高度保守,说明半胱氨酸对维持 GH 的空间结构起到极其关键的作用<sup>[23][24]</sup>。普氏野马 GH 基因不同区段进化速率不同,外显子区域进化速率最慢;内含子序列中碱基变异频繁,进化较快。利用 NCBI 在线比对功能对 GH 编码产物进行同源性比对,并对 17 个物种 GH 氨基酸序列进行系统发育进化树分析,发现普氏野马与家马在系统发育树中距离最近,其亲缘关系最为密切。同时进化树枝显示普氏野马与人、大猩猩、猕猴等物种已形成明显的种间进化分歧。对 GH 蛋白质物理化学性质进行预测分析,结果显示 GH 蛋白具有较长的半衰期,其不稳定性指数为 38.57,可认为是稳定蛋白。蛋白质半衰期与其稳定性之间存在密切联系,一般来说,半衰期长则蛋白质稳定性高,这一特性与其生理功能的发挥是否存在某种联系有待更进一步的研究和探讨。

## 3 结 论

- 1) 普氏野马与家马(GenBank: EU939446.1) GH 基因序列相似性高达 99.68%,属于同源序列。
- 2) 普氏野马 GH 基因序列中含有 5 个外显子和 4 个内含子,编码蛋白质的氨基酸数量为 152 个,分子量为 17638.54 Da,理论等电点为 9.01,半衰期较长,且属于稳定蛋白。
- 3) 普氏野马 GH 基因编码的是含有生长激素样结构域的蛋白质,GH 蛋白质含有 1 个结构域,属于生长激素/催乳素激素家族,可对普氏野马的生长发育起调节作用。

## 参考文献(References)

- [1] ISHIDA N, OYUNSUREN N, MASHIMA S, et al. Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus *Equus* with special reference to the phylogenetic relationship between Przewalskii's wild horse and domestic horse[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, 41: 180-188.
- [2] MYKA J L, LEAR T L, HOUCK M L, et al. FISH analysis comparing genome organization in the domestic horse (*Equus caballus*) to that of the Mongolian wild horse (*E. przewalskii*) [J]. *Cytogenet Genome Research*, 2003, 102: 222-225. DOI: 10.1159/000075753.
- [3] 王墨清. 普氏野马血像值测定[J]. *动物学杂志*, 1996, 2(18): 50-52. DOI: 10.13859/j. cjz. WANG Moqing. Determination of hemogram value of *Equus przewalskii* [J]. *Journal of Zoology*, 1996, 2(18): 50-52. DOI: 10.13859/j. cjz.

- [4] 杜迨先,姚刚,魏彬,等. 普氏野马头骨观察研究[J]. 八一农学院学报, 1991, 14(3): 60-62.  
DU Daixian, YAO Gang, WEI Bin, et al. Morphologic study on skull of wild horse[J]. Journal of Bayi Agricultural College, 1991, 14(3): 60-62.
- [5] 李乔,赵建友,杜晓华,等. 普氏野马两种肠道寄生虫 ITS 序列的扩增与分析[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(7): 1277-1286. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.  
LI Qiao, ZHAO Jianyou, DU Xiaohua, et al. Amplification and analysis of ITS sequences of intestinal parasites in przewalskii's wild horse[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(7): 1277-1286. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.
- [6] 李萍,马志诚,张琳,等. 普氏野马血液生理参数测定及与家马的差异研究[J]. 生理解剖, 1995, 18(3): 42-45. DOI: 10.19711/j.cnki.issn2310-1490.  
LI Ping, MA Zhicheng, ZHANG Lin, et al. Determination of physiological reference values and comparison between *Equus przewalskii* and domestic horse [J]. Physiological Anatomy, 1995, 18(3): 42-45. DOI: 10.19711/j.cnki.issn2310-1490.
- [7] ALEXANDER S L, IRVINE C H, ELLIS M J, et al. The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor arginine vasopressin and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse [J]. Endocrinology, 1991, 128: 65-72.
- [8] HADA T, ONAKA T, TAKAHASHI T, et al. Effects of novelty stress on neuroendocrine activities and running performance in thoroughbred horses[J]. Neuroendocrinol, 2003, 15: 638-648.
- [9] KUROSAWA M, NAGATA S, TAKEDA F, et al. Effect of caffeine on performance, cardiorespiratory function and plasma hormonal responses during exhaustive treadmill exercise in the thoroughbred horse[J]. Equine Science, 1998, 9: 33-43.
- [10] KUROSAWA M, NAGATA S, TAKEDA F, et al. Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the thoroughbred horse[J]. Equine Science, 1998, 9: 9-18.
- [11] NAGATA S, TAKEDA F, KUROSAWA M, et al. Plasma adrenocorticotropin, cortisol and catecholamines response to various exercises[J]. Equine Veterinary Journal, 1999, 30: 570-574.
- [12] RIVIER C, RIVEST S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms[J]. Biology of Reproduction, 1991, 45: 523-532.
- [13] TAYA K. Stress and reproduction[J]. Clinical and Translational Medicine, 1990, 8: 27-37.
- [14] TAYA K. Stress and prolactin [J]. Hor Front Gynecol, 2011, 18: 275-283.
- [15] NAMBO Y, OIKAWA M, YOSHIHARA T, et al. Effects of transport stress on concentrations of LH and FSH in plasma of mares: a preliminary study [J]. Equine Sciences, 1996, 7: 1-5.
- [16] ENDO Y, TSUCHIYA T, SATO F, et al. Efficacy of omeprazole paste in the prevention of gastric ulcers in 2 years old T thoroughbreds [J]. Veterinary Medicine and Science, 2012, 74: 1079-1081. DOI: 10.1292/jvms.11-0545.
- [17] MURRAY M J, GRODINSKY C, ANDERSON C W, et al. Gastric ulcers in horses: a comparison of endoscopic findings in horses with and without clinical signs [J]. Equine Veterinary Journal, 1989, 7: 68-72.
- [18] MURRAY M J, SCHUSSER G F, PIPERS F S, et al. Factors associated with gastric lesions in thoroughbred racehorses[J]. Equine Veterinary Journal, 1996, 28: 368-374.
- [19] TAYA K. Stress and prolactin [J]. Hor Front Gynecol, 2011, 18: 275-283.
- [20] THOMPSON D L, DEPEW C L, ORTIZ A, et al. Growth hormone and prolactin concentrations in plasma of horses: Sex differences and the effects of acute exercise and administration of growth hormone-releasing hormone [J]. Anim Science, 1994, 72: 2911 - 2918.
- [21] 米晓钰,李乔,马睿,等. 天祝白牦牛与黄牛 NGB 蛋白三级结构比较分析[J]. 生物信息学, 2021, 19(1): 55-65. DOI: 10.12113/202004003.  
MI Xiaoyu, LI Qiao, MA Rui, et al. Comparative analysis of tertiary structure of Ngb protein between Tianzhu White Yak and yellow cattle [J]. Bioinformatics, 2021, 19(1): 55-65. DOI: 10.12113/202004003.
- [22] 张焱如,芒来. 马生长激素(GH)基因的 PCR-SSCP 研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(3): 209-213.  
ZHANG Yanru, MANG Lai. PCR-SSCP study on horse growth hormone (GH) gene [J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2007, 38(3): 209-213.
- [23] 邹思湘. 动物生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 30-55.  
ZOU Sixiang Animal biochemistry [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2015: 30-55.
- [24] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 150-180.  
WANG Jingyan, ZHU Shenggen, XU Changfa. Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 150-180.