

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201708028

槟榔江水牛胃型 *LYZ C* 基因分离鉴定及 功能生物信息学分析*

黄 静^{1#}, 保志鹏^{2#}, 范新阳¹, 张永云³, 杜 平⁴, 康定富⁴, 苗永旺^{1**}

- (1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201;
2. 云南农业职业技术学院 畜牧兽医学院, 云南 昆明 650212;
3. 云南农业大学 农科专业基础实验教学示范中心, 云南 昆明 650201;
4. 腾冲市巴福乐槟榔江水牛良种繁育有限公司, 云南 腾冲 679118)

摘要:【目的】溶菌酶是一种由动物产生的抗微生物酶, 构成动物体先天免疫系统的一部分, 在反刍动物的皱胃中还具有消化功能。迄今, 普通牛溶菌酶 C 基因家族的分子遗传特征已被深入解析, 但有关水牛溶菌酶 C 的研究报道较少。【方法】采用 PCR 产物直接测序技术, 对槟榔江水牛胃型溶菌酶 C 基因编码区进行了分段扩增测序、序列组装和开放阅读框的确定, 并结合已发表的其他牛科物种同源序列进行了生物信息学分析。【结果】序列分析表明: 水牛胃型溶菌酶 C 基因编码区长 444 bp, 编码 1 个由 147 个氨基酸残基组成的多肽, 包含 1 个 N 端信号肽和 1 段由 129 个氨基酸组成的成熟肽。水牛胃型溶菌酶 C 成熟肽分子量为 14.41 ku, 等电点为 6.32, 含有 1 个 alpha-lactalbumin/lysozyme C 保守结构域 (19~145AA), 不含有跨膜结构域, 为亲水蛋白, 在胞外发挥生物功能; 在三维结构上与普通牛的溶菌酶模板 (2z2f.1.A) 有 99.22% 的一致性; 在基于氨基酸序列构建的系统树上, 水牛与普通牛、瘤牛、野牦牛和野牛聚在一起, 且有较高的支持率 (88%)。【结论】槟榔江水牛与其他牛科物种的胃型溶菌酶具有相似的功能。

关键词: 槟榔江水牛; 溶菌酶 C 基因; 皱胃; 生物信息学分析; 基因功能

中图分类号: S 823.832 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2018) 04-0640-07

Solation, Identification and Functional Bioinformatics Analysis of Gastric *LYZ C* Gene in Binglangjiang Buffalo

HUANG Jing¹, BAO Zhipeng², FAN Xinyang¹, ZHANG Yongyun³,
DU Ping⁴, KANG Dingfu⁴, MIAO Yongwang¹

- (1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Department of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural College of Vocational Education, Kunming 650212, China; 3. Teaching Demonstration Center of the Basic Experiments of Agricultural Majors, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 4. Tengchong Co., Ltd. of Fine Variety Breeding of Binglangjiang Buffalo, Tengchong 679118, China)

Abstract: [Purpose] Lysozyme is an antibacterial enzyme produced by animals that forms part of

收稿日期: 2017-08-12 修回日期: 2017-10-11 网络出版时间: 2018-07-12

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460582, 31760659); 云南省应用基础研究重点项目 (2014FA032, 2007C0003Z)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。黄静 (1993—), 女, 湖南桑植人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: 605853050@qq.com; 保志鹏 (1983—), 女, 云南鲁甸人, 硕士, 讲师, 主要从事畜牧兽医领域的教学、科研工作。E-mail: 171257835@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 苗永旺 (1964—), 男, 内蒙古通辽人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: yongwangmiaol@126.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201708028](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201708028)

the innate immune system. It also has digestive function in the abomasum of ruminants. Up to now, the lysozyme C gene family of cattle has been characterized at the molecular level deeply, but the studies on the lysozyme C gene in water buffalo are few. [Methods] In this study, the sequences of Binglangjiang buffalo gastric lysozyme C gene were amplified and sequenced by using PCR product direct sequencing, then the sequences were assembled and the open reading frame was determined. Combined with published homologous sequences of other bovine species together, the data obtained was analyzed using bioinformatics method. [Results] Sequence analysis revealed that the CDS of Binglangjiang buffalo gastric lysozyme C gene encodes a peptide of 147 amino acid residues which was presumed to have a 18 AA signal peptide at N-terminus signal peptide and a 129 AA mature peptide. The mature peptide with a deduced molecular weight of 14.41 ku and a PI of 6.32 is a hydrophilic protein without transmembrane domains and exert its function in the outside plasma membrane with high reliability. In addition, the mature peptide has a conserved domain of Alpha-lactalbumin/lysozyme C (19-145AA) which belongs to lysozyme-like superfamily, and its 3-D structure has 99.22% identical to the lysozyme template of cattle (2z2f.1.A). Phylogeny analysis based on the sequence of lysozyme C showed that water buffalo gather together with *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos mutus*, *Bison bison bison*. [Conclusion] The results of this study reveal that the stomach lysozyme of Binglangjiang buffalo has similar function to that of other bovine species.

Keywords: Binglangjiang buffalo; lysozyme C gene; abomasum; bioinformatics analysis; gene function

溶菌酶 (lysozyme, LYZ) 是一种由动物产生的蛋白水解酶, 它分布于动物的乳汁、血液、眼泪、黏液和一些动物的胃液中; 也存在于动物巨噬细胞和多形核嗜中性粒细胞的细胞质颗粒中; 在禽蛋的蛋清中也发现存在大量的溶菌酶^[1-4]。LYZ 通过裂解革兰氏阳性细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4-糖苷键来破坏细菌细胞壁的完整性, 导致细菌裂解。同时, 在分泌型免疫球蛋白 A 和补体的参与下, 也可以间接溶解革兰氏阴性细菌^[5-6]。有研究发现, 血清中 LYZ 活性与奶牛对乳腺炎的抗性相关^[7]。近年在反刍动物的皱胃中发现溶菌酶具有消化作用, 它能消化分解前胃来源的微生物作为动物自身的营养成分^[6, 8-9]。

LYZ C 与 α -乳白蛋白在氨基酸序列和蛋白结构上密切相关, 使它们成为同一基因家族的组成部分^[3]。LYZ C 基因家族在现存的各种反刍动物中至少包含 10 个成员 (*LYZ1-10*)^[9]。在普通牛中已发现 14 个 LYZ C 基因家族成员, 其中 5 个为假基因, 这些成员均位于普通牛第 5 染色体上^[9]。普通牛 LYZ C 基因主要在牛奶、气管、肾脏、肠和皱胃等处表达^[8-9]。在普通牛胃中表达的 LYZ

C 基因主要参与消化作用, 存在 *LYZ5/LYZ6/LYZ7* 三个成员, 它们编码序列之间的一致性约为 97%^[8-9]。与典型的哺乳动物 LYZ C 基因的结构相一致, 普通牛 LYZ C 基因家族主要成员均由 4 个外显子和 3 个内含子组成^[8, 10-11]。其中消化型 LYZ C 基因编码区 (coding sequence, CDS) 序列全长为 444 bp, 编码 147 个氨基酸, 其中包括 1 段由 18 个氨基酸构成的 N-末端信号肽和 1 段由 129 个氨基酸构成的成熟肽。在普通牛胃中表达的 LYZ C 基因 (ENSBTAG00000026088) 4 个外显子的大小分别为 244、165、76 和 556 bp。

水牛在热带和亚热带地区农业生产中发挥重要作用, 主要为役用、乳用和肉用。近年由于高档乳制品的市场拉动, 水牛乳业得到了迅猛发展, 水牛奶已经成为世界上第二大奶供应来源^[12]。相比于荷斯坦奶牛, 水牛耐粗饲, 对粗纤维的消化能力更强, 其乳及乳制品营养价值高^[13]。目前对水牛 LYZ C 基因的了解较少, 开展水牛消化型 LYZ C 基因的研究, 对于了解水牛的消化机制具有重要意义。本研究以中国首例本土河流型奶用水牛——槟榔江水牛为研究对象, 对水牛胃型 LYZ C 基因进行了分离鉴定及功能生物信息学分

析,以揭示槟榔江水牛胃型LYZ的理化特性和生物学功能,为水牛消化型LYZ的功能和进化的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究采集槟榔江水牛耳组织样 10 份,个体间无直接血缘关系,样品保存于酒精中低温带回实验室,置于-80℃冰箱保存。

1.2 基因组 DNA 提取

采用酚/氯仿法提取基因组 DNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测其纯度和浓度,用 TE 缓冲液稀释为 50 ng/μL,于 4℃保存备用。

1.3 引物设计、PCR 及测序

根据普通牛LYZ C基因全序列(ENSBTAG00000026088)使用Primer premier 5 软件设计引物(表 1),分别扩增该基因的 4 个外显子及其旁侧序列。

表 1 分段扩增水牛LYZ C基因引物信息
Tab. 1 Primer information for segmented amplification of buffaloLYZ C gene

引物名称 primer ID	引物序列(5'→3') primer sequence	产物长度/bp products length	退火温度/℃ <i>T</i> _m
LYZ C_exon1F	CAGTCTGGACATTGACTTCTCA	238	58.6
LYZ C_exon1R	TTGCTCATTATTTCATCCTCTGTT		
LYZ C_exon2F	GAAGTGAATGGGCTATGAAGTGT		
LYZ C_exon2R	AGTATAACCAGATCGGGGCTGAG	284	59.9
LYZ C_exon3F	GAAAATAAAGCCTGCTGAACCTA		
LYZ C_exon3R	TCAAACCTTTATACCGTACACCT	258	56.5
LYZ C_exon4F	GATGAAGTATTTTGTCTCCCAA		
LYZ C_exon4R	CTTTCATTCAACTATCACTTCCT	234	55.2

PCR 反应体系为 25 μL,包含 ddH₂O 18.5 μL,10×buffer (Mg²⁺) 2.5 μL,上、下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L),dNTPs 1.0 μL (2.5 mmol/L),*Taq* 酶 (5 U/μL) 0.2 μL,DNA 模板 (50 ng/μL) 2.0 μL。PCR 反应程序为:94℃预变性 3 min,然后 94℃变性 30 s→退火 40 s→72℃延伸 30 s,35 个循环后,于 72℃后延伸 5 min,4℃终止反应。退火温度与延伸时间依引物而异(表 1)。PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。产物经胶回收纯化后,进行双向测序,测序引物与 PCR 引物相同。

1.4 数据分析

采用上述引物分别对水牛LYZ C基因 4 个外显子及旁侧序列进行扩增和测序,测序结果采用Lasergene 软件包(DNAstar Inc.)进行序列核对和组装,得到LYZ C基因完整编码区拼接序列。拼接好的序列经ORF Finder 程序(<http://www.ncbi.nlm.gov/gorf/>)确定开放阅读框(open reading frame,ORF),并翻译成蛋白序列。相对分子质量和等电点、疏水性、跨膜区和信号肽采用在线软件Compute pI/Mw tool、ProtParam tool、ProtScale、TMHMM server 2.0 和 SignalP 4.1 Server 进行预测分析;采用ProtComp 9.0 进行LYZ C的亚细胞定位;利用SOPMA 在线程序预测蛋白质

的二级结构;通过NCBI 数据库预测蛋白质的保守结构域;基于同源建模法利用SWISS-MODEL 在线服务器预测LYZ C蛋白的三维结构。

2 结果与分析

2.1 PCR 及产物检测

采用 PCR 法分段对LYZ C基因进行扩增,各段 PCR 产物见图 1。经测序获得该基因各区段序列。

2.2 外显子序列拼接及核酸序列分析

通过 PCR 产物直接测序技术对槟榔江水牛LYZ C的 4 个外显子及其旁侧序列进行测序,得到共 1 014 bp 的序列,通过与已发表的牛物种LYZ 基因序列比较,确定槟榔江水牛该基因完整编码区结构。序列分析显示,水牛LYZ 基因外显子 1 到外显子 4 编码序列长度分别为 136、165、76 和 67 bp,完整的 CDS 长度为 444 bp,编码 147 个氨基酸残基(图 2)。编码序列由 29.28%A、26.58%G、24.55%T 和 19.59%C 碱基组成。其 A+T 含量为 53.83%;C+G 含量为 46.17%。槟榔江水牛LYZ C基因 CDS 序列已提交到 NCBI 数据库中,获得的序列号为 MF996677。

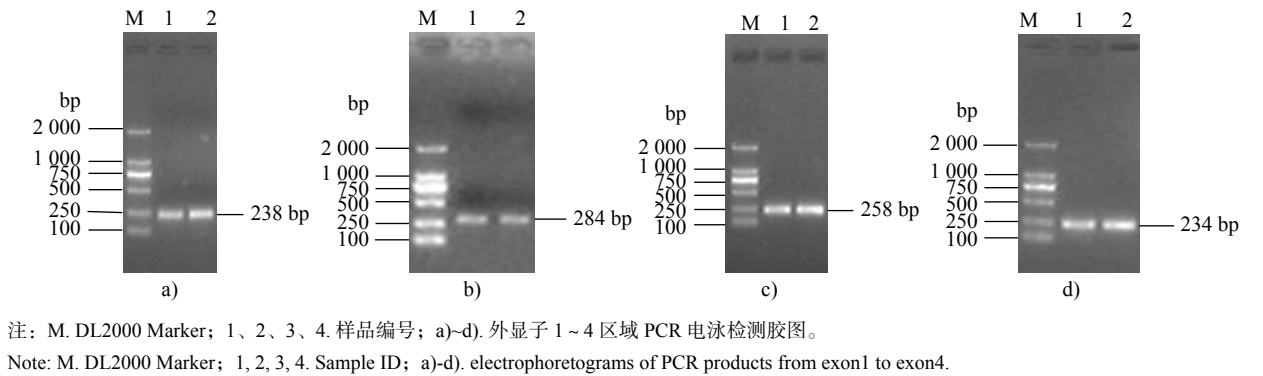


图 1 槟榔江水牛 *LYZ C* 基因外显子 1~4 区域 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of Binglangjiang buffalo *LYZ C* gene covered from exon 1 to exon 4

1	ATGAAGACTCTCATTATTCGGGGTTCTCTCTTCTGTGCTGTCCAAGGCAAGGCTCTTGAGAGATGT
1	M K T L I I L G F L F L S V A V Q G K V F E R C
73	GAGCTTGCCAGAACGCTGAAGAACTTGGACTGGACGGCTATAAGGGAGTCAGCCTGGCGAAGTGGTGTGT
25	E L A R T L K K L G L D G Y K G V S L A N W L C
145	TTGACCAAAATGGGAAAGCAGTTATAACACAAAAGCTACAACTACAATCCTAGCAGTGAAAGCACTGATTAT
49	L T K W E S S Y N T K A T N Y N P S S E S T D Y
217	GGGATATTTACAGTCAACAGCAAATGGTGGTGAATGATGGCAAAACCCCTAACGCAGTTGACGGCTGTGAT
73	G I F Q I N S K W W C N D G K T P N A V D G C H
289	GTATCTGCAGCGAATTAATGGAAAATGACATCGCTAAAGCTGTAGCCTGTGCAAGCAGATCGTCAGTGAG
97	V S C S E L M E N D I A K A V A C A K Q I V S E
361	CAAGGCATTACAGCATGGGTGGCATGGAAAAGTCACTGTCGAGACCATGACGTCAGCAGTTACGTTGAGGGT
121	Q G I T A W V A W K S H C R D H D V S S Y V E G
433	TGCACGCTGTAA
145	C T L *

注: 信号肽用方框框出, 溶菌酶超家族保守结构域序列用阴影标出; “*”表示终止密码子。

Note: Signal peptide sequence is marked by a box and the domain of Lysozyme_ like superfamily is highlighted as shaded regions; “*” the stop codon.

图 2 槟榔江水牛 *LYZ C* 基因 CDS 全序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The full CDS of Binglangjiang buffalo *LYZ C* gene and its deduced amino acid sequence

2.3 水牛 *LYZ C* 蛋白的信号肽及成熟肽的基本理化特征

信号肽预测揭示槟榔江水牛 *LYZ C* 具有 N-端的信号肽序列, 切割位点位于第 18 和第 19 氨基酸残基之间。预测的槟榔江水牛 *LYZ C* 成熟肽的基本理化特征见表 2。

2.4 *LYZ C* 成熟肽的结构与特征

槟榔江水牛 *LYZ C* 的第 19~145AA 残基属于 α -lactalbumin/lysozyme C 保守结构域 (图 3), 构成其成熟肽的主体部分。其成熟肽不具有跨膜结构。疏水性分析表明: 水牛 *LYZ* 成熟肽亲水性平均值 (GRAVY) 为 -0.398, 表明水牛 *LYZ C* 属于亲水性的蛋白质 (图 4)。亚细胞定位分析表明: *LYZ C* 具有 100% 的可能性分泌到胞外发挥功能。

二级结构预测揭示水牛 *LYZ C* 成熟肽包含 36.43% 的 α 螺旋、39.53% 的无规卷曲、16.28% 的伸展链和 7.75% 的 β 转折, 而普通牛的成熟肽包含 38.76% 的 α 螺旋、38.76% 的无规卷曲, 14.73% 的延伸链和 7.75% 的 β 转角 (图 5)。基于

表 2 槟榔江水牛 *LYZ C* 成熟肽的基本理化特征

Tab. 2 Basic physical and chemical characteristics of the mature peptide of Binglangjiang buffalo *LYZ C*

基本理化特征 basic physical and chemical properties	预测结果 predicted results
编码的氨基酸数 number of amino acids	129
成熟肽等电点 isoelectric point (PI)	6.32
成熟肽分子量/ku molecular weight	14.41
强酸性氨基酸残基 strongly acidic amino acids (D, E)	15
强碱性氨基酸残基 strongly basic amino acids (K, R)	14
疏水性氨基酸 hydrophobic amino acids (A, I, L, F, W, V)	41
极性氨基酸 polar amino acids (N, C, Q, S, T, Y)	45
三种氨基酸含量 (D+N+Q)	19
分子式 formula	$C_{631}H_{970}N_{172}O_{197}S_9$
不稳定系数 instability index (II)	28.87
平均疏水性 grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.398
脂肪系数 aliphatic index (AI)	70.31

用槟榔江水牛 LYZ C 蛋白全序列作为查询序列在 NCBI 数据库中进行同源序列搜索共得到 6 条不同物种的同源序列。槟榔江水牛及其他

6 个物种 (群体) *LYZ C* 成熟肽序列一致性见表 3。由表 3 可知: 水牛与其他牛属物种胃型 *LYZ C* 成熟肽序列一致性在 99% 以上, 但与鼠的一致性较低 (60%)。

基于槟榔江水牛 *LYZ C* 成熟肽及其同源序列构建的系统树见图 7。系统树上普通牛、野牦牛、瘤牛、野牛和水牛聚在一起, 且有较高的支持率 (88%)。

表 3 槟榔江水牛与其他物种 *LYZ C* 序列一致性与分歧度

Tab. 3 Percent identity/divergence of Binglangjiang buffalo *LYZ C* sequence with that of other species

物种 species	槟榔江水牛 BLJ buffalo	野牦牛 <i>Bos mutus</i>	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	野牛 <i>Bison bison bison</i>	普通牛 <i>Bos taurus</i>	藏羚羊 <i>Pantholops hodgsonii</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>
槟榔江水牛 BLJ buffalo	—	99.2	99.2	99.2	99.2	96.9	60.0
野牦牛 <i>Bos mutus</i>	0.8	—	100.0	100.0	100.0	97.7	60.0
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	0.8	0.0	—	100.0	100.0	97.7	60.0
野牛 <i>Bison bison bison</i>	0.8	0.0	0.0	—	100.0	97.7	60.0
普通牛 <i>Bos taurus</i>	0.8	0.0	0.0	0.0	—	97.7	60.0
藏羚羊 <i>Pantholops hodgsonii</i>	3.1	2.3	2.3	2.3	2.3	—	60.8
小鼠 <i>Mus musculus</i>	56.6	56.6	56.6	56.6	56.6	55.0	—

注: 对角线上方数值表示序列一致性 (%), 对角线下方数值表示序列分歧度 (%).

Note: Data above the diagonal line represents the percent identity and below the diagonal line represents the sequential divergence.

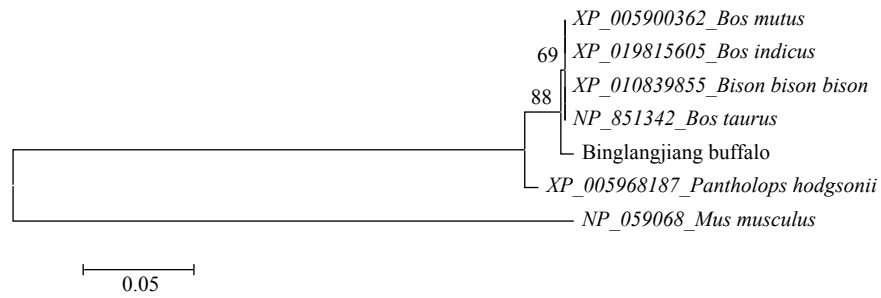


图 7 基于 7 个物种 *LYZ C* 序列构建的系统树

Fig. 7 Phylogeny derived from the *LYZ C* sequences of 7 species.

3 讨论

通过分段扩增测序, 本研究拼接获得了槟榔江水牛 *LYZ C* 基因的编码区序列。通过与普通牛同源比对分析确定为水牛消化型 *LYZ C* 基因的序列 (accession No. MF996677)。槟榔江水牛 *LYZ C* 基因编码区序列长为 444 bp, 与普通牛胃中表达的 *LYZ C* 基因编码区序列长度相同, 与普通牛 *LYZ5* 序列一致性为 97.3%, 与普通牛 *LYZ6*、*LYZ7* 序列一致性均为 96.8%。该基因编码 1 个由 147 个氨基酸残基构成的多肽, 其前 18 肽为 N-端信号肽, 成熟肽由之后的 129 个氨基酸残基构成。生物信息学分析显示: 水牛消化型 *LYZ C* 成熟肽为亲水蛋白, 在胞外发挥生物功能, 无跨膜结构域, 含有 1 个 alpha-lactalbumin/lysozyme C 保守结构域。其二级结构与普通牛近似, 在三维结构上与普通牛的溶菌酶模板 (2z2f.1.A) 有

99.22% 的一致度。以上揭示本研究分离的水牛 *LYZ C* 成熟蛋白与普通牛消化型 *LYZ C* 的基本理化性质和结构特征基本一致。通过与普通牛 3 种消化型 *LYZ C* 基因序列比较, 确定本研究分离的水牛 *LYZ C* 基因相当于普通牛 *LYZ 5*。经序列比较发现: 本研究水牛与普通牛、野牦牛、瘤牛和野牛 *LYZ C* 蛋白序列一致性在 99% 以上; 在聚类树上, 水牛与普通牛、野牦牛、瘤牛和野牛聚在一起, 且有较高的支持率 (88%)。这也表明水牛与其他牛科物种的消化型 *LYZ C* 基因的结构和功能基本一致。

LYZ C 是一类在脊椎动物中广泛存在的溶菌酶类型, 该酶通过裂解细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰氨基葡萄糖和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -1, 4-糖苷键分解细菌的细胞壁, 从而杀死细菌, 它在动物体对抗外源微生物入侵上发挥重要的作用^[11]。近年发现 *LYZ C* 在一些反刍动物的皱胃中也扮演消

化酶的角色。反刍动物为一类具有特殊前肠消化方式的哺乳动物,在其瘤胃中共生着各类微生物,能将其吃进的植物纤维转化成可被宿主吸收利用的短链脂肪酸。但这些微生物消耗了反刍动物食物中大约 10% 的碳、80% 的氮和 60% 的磷成分用于繁衍自身^[1]。在反刍动物的胃中进化出能够消化微生物的 LYZ,用以消化分解前肠来源的微生物,是这类动物回收其食物营养素的重要方式^[1]。LYZ 蛋白在反刍动物中演化出新的消化功能,有人研究认为与 LYZ 基因的重复和替换事件有关^[3]。目前发现 *LYZ C* 基因家族在各种反刍动物的基因组中都含有多个成员,通常消化型 *LYZ C* 基因在胃中是高表达的,以适应消化的需要^[8]。反刍动物皱胃内为酸性环境,存在各种消化酶的作用。为此,消化型 LYZ 与非胃型的 LYZ 相比在进化过程中发生了氨基酸组成和结构上的适应性变化,导致其等电点下降 (6.32 ~ 7.0),最适 pH 范围变窄 (pH 5 左右),增加了其对酸性环境的适应性和对胃消化酶的抗性^[6,8]。在普通牛中,发现消化型溶菌酶相比于其他 C 型溶菌酶,在进化过程中出现了 Lys 被 Arg 所取代现象,这消除了胃中各种消化酶对其的酶解作用的潜在位点^[4,8-9,11]。本研究,水牛 LYZ C 成熟肽中 Arg 仅占 2.3%,而 Lys 占 8.5%,与普通牛 LYZ C 相一致 (ENSBTAG00000026088)。与其他 C 型溶菌酶相比较发现,在普通牛中消化型溶菌酶第 120 位的 Asp 被 Glu 所替代,并且缺失 121 位上的 Pro,使其缺失 Asp 与 Pro 间的酸不稳定肽键,在氨基酸组成上也减少了 Asp、Asn 和 Gln 三种酸不稳定氨基酸数量 (消化型溶菌酶为 17~18 个,其他 C 型溶菌酶 18~27 个),从而提高了胃溶菌酶对酸性环境的耐受能力^[1,4,8-9]。普通牛胃溶菌酶与非胃溶菌酶相比,在其适应性进化过程中,发生 6 处氨基酸替换 (第 14 位 Lys/Glu、第 21 位 Lys/Glu、第 50 位 Glu、第 75 位 Asp、87 位 Asn、第 125 位 Lys/Glu),这样的替换在非胃组织溶菌酶中较少出现^[4,8-9]。这导致了胃溶菌酶酸性氨基酸数目增加,而碱性氨基酸数目减少,等电点下降。本研究中,水牛 LYZ C 中同样缺失 120~121 位氨基酸间的 Asp-Pro 酸不稳定肽键,Asp、Asn 和 Gln 三种酸不稳定氨基酸数量为 19 个。本研究水牛 LYZ C 出现 5 处氨基酸替换 (第 14 位 Lys/Glu、第 21 位 Lys/Glu、第 50 位 Glu、第 75 位 Asp、87 位 Asn),与普通牛 3 型

胃 LYZ C (其编码基因为 *LYZ5*) 相一致,水牛 LYZ C 成熟肽等电点为 6.32,比普通牛 (6.42) 稍低。本研究结果表明: 槟榔江水牛与普通牛的胃型 LYZ C 蛋白具有相近的氨基酸组成和结构特征,揭示了该蛋白在胃中具有生物学活性并发挥消化微生物的功能,也提示它们可能是在反刍动物进化早期伴随其食物消化方式而起源的。

[参考文献]

- [1] IRWIN D M. Evolution of the bovine lysozyme gene family: changes in gene expression and reversion of function[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, 41(3): 299.
- [2] 孙国庆, 哈福, 苗永旺, 等. 动物溶菌酶基因的研究进展[J]. *中国牛业科学*, 2012, 38(3): 51. DOI: 10.3969/j.issn.1001-9111.2012.03.018.
- [3] IRWIN D M, BIEGEL J M, STEWART C B. Evolution of the mammalian lysozyme gene family[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2011, 11(1): 10. DOI: 10.1186/1471-2148-11-166.
- [4] 邓霄禹, 胡明军, 江明锋. 反刍动物胃溶菌酶的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(9): 143. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7236.2012.09.036.
- [5] PRIYADARSHINI S, KANSAL V K. Lysozyme activity in buffalo milk: effect of lactation period, parity, mastitis, season in India, pH and milk processing heat treatment[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2002, 15(6): 895. DOI: 10.5713/ajas.2002.895.
- [6] 张鹏, 江明锋, 王永. 反刍动物溶菌酶研究进展[J]. *四川动物*, 2013, 32(2): 308. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.2013.02.035.
- [7] OSMAN K M, HASSAN H M, IBRAHIM I M, et al. The impact of staphylococcal mastitis on the level of milk IL-6, lysozyme and nitric oxide[J]. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 2010, 33(1): 85. DOI: 10.1016/j.cimid.2008.08.009.
- [8] IRWIN D M. Evolution of cow nonstomach lysozyme genes[J]. *Genome*, 2004, 47(6): 1082. DOI: 10.1139/g04-075.
- [9] IRWIN D M. Genomic organization and evolution of ruminant lysozyme *c* genes[J]. *Zoological Research*, 2015, 36(1): 1. DOI: 10.13918/j.issn.2095-8137.2015.1.1.
- [10] CALLEWAERT L, MICHIELS C W. Lysozymes in the animal kingdom[J]. *Journal of Biosciences*, 2010, 35(1): 127. DOI: 10.1007/s12038-010-0015-5.
- [11] MICHELIZZI V N, DODSON M V, PAN Z A, et al. Water buffalo genome science comes of age[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2010, 6(4): 333.
- [12] 徐定人. 大力发展水牛奶加速我国奶业发展[J]. *中国乳业*, 2002(1): 6. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4393.2002.01.004.
- [13] 刘梅, 张士瑾. 溶菌酶 C 及其生物学功能[J]. *生命的化学*, 2006, 26(5): 465. DOI: 10.3969/j.issn.1000-1336.2006.05.029.

责任编辑: 何承刚