

DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201709004](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709004)

大额牛和牦牛胃型 *LYZ c* 基因多态性及其对消化功能的适应性分析*

范新阳^{1#}, 张自芳^{2#}, 邱立华¹, 钱林东², 刘丽仙², 张永云³, 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)

摘要:【目的】为了阐明大额牛和牦牛胃型 *LYZ c* 基因的多态性及其对消化功能的适应。【方法】采用 PCR 产物直接测序技术, 对 35 头大额牛和 33 头牦牛样品胃型 *LYZ c* 基因完整编码区序列进行了变异检测, 并结合已发表的牛物种同源序列进行了其对消化功能的适应性分析。【结果】在大额牛群体内共发现 6 个 SNP 位点, 分别为 c.196G>A、c.267T>C、c.270C>T、c.396C>T、c.423C>T 和 c.438C>G。在牦牛群体内共发现 10 个 SNP 位点, 其中 6 个与大额牛共享, 非共享的 SNP 位点分别为 c.336G>C、c.348T>G、c.351T>C 和 c.375A>C。SNP196 和 SNP348 为异义替换, 引起 p.G66S 和 p.H116Q 氨基酸替换, 但它们对大额牛和牦牛 *LYZ c* 的功能没有影响。在大额牛 *LYZ c* 基因中, 共定义 6 种单倍型, 确定了 2 种 *LYZ c* 蛋白变异体 (Gayal 1 和 Gayal 2); 而在牦牛 *LYZ c* 基因中, 共定义 12 种单倍型, 确定了 3 种 *LYZ c* 变异体 (Yak 1~Yak 3); 变异体 Gayal 1 与 Yak 3、Gayal 2 与 Yak 1 相同, 而变异体 Yak 2 为牦牛独有。大额牛、牦牛和普通牛胃型 *LYZ c* 变异体之间在氨基酸组成、理化特性与结构上基本一致, 但大额牛和牦牛变异体 *LYZ c* 等电点比普通牛 S3 型 *LYZ c* 更低。【结论】大额牛和牦牛胃型 *LYZ c* 蛋白可能更适合胃中的酸性环境, 具有分解胃中微生物的功能。

关键词: 大额牛和牦牛; 胃型 *LYZ c* 基因; 消化酶; 序列分析; 适应性分析

中图分类号: S 823.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2018) 05-0858-09

Polymorphisms of Gayal and Yak Gastric *LYZ c* Gene and Its Adaptation to Digestive Function

FAN Xinyang¹, ZHANG Zifang², QIU Lihua¹, QIAN Lindong², LIU Lixian²,
ZHANG Yongyun³, MIAO Yongwang¹

(1. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Institute of Animal Husbandry, Yunnan Vocational and Technical College of Agriculture, Kunming 650212, China;

3. Teaching Demonstration Center of the Basic Experiments of Agricultural Majors,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To clarify the genetic polymorphisms of gayal and yak gastric *LYZ c* gene

收稿日期: 2017-09-01 修回日期: 2017-10-11 网络出版时间: 2018-10-11

*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。范新阳 (1991—), 男, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 主要从事动物分子遗传学研究。E-mail: 985402140@qq.com; 张自芳 (1970—), 女, 云南泸西人, 硕士, 副教授, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: qld721213@126.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\(n\).201709004](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709004)

and their adaptive evolution to digestion in the acid environment of stomach. [Methods] The variations in the complete coding region of gastric LYZ c gene were detected in 35 gayal and 33 yak samples by adopting the technique of PCR product direct sequencing in this study. Combined with published homologous sequences of some bovine species, the adaptive analysis of digestive function was further conducted by the methods of comparative genomics and bioinformatics. [Results] A total of 6 SNP sites were found in gayal, namely c.196G>A, c.267T>C, c.270C>T, c.396C>T, c.423C>T and c.438C>G, respectively. And 10 SNP sites were found in yak. Except 6 of which were shared with gayal, others viz. c.336G>C, c.348T>G, c.351T>C and c.375A>C were only found for yak. The SNP sites found in gayal were all shared with that of yak. The SNP196 and SNP328 were non-synonymous substitution, which result in p.G66S and p.H116Q amino acid changes. These two substitutions were presumed to have no effect on the function of stomach LYZ c. Based on the variations in gayal and yak gastric LYZ c gene, 6 haplotypes were defined in gayal from which 2 protein variants were identified in gayal, namely Gayal 1 and Gayal 2. And 12 haplotypes were defined in yak from which 3 protein variants were identified in yak, namely Yak 1–Yak 3. Among them, variant Gayal 1 and Yak 3, Gayal 2 and Yak 1 were identical, and Yak 3 is unique to yak. The amino acid compositions, physiochemical properties and structures of the gayal, yak and cattle variants are basically the same. The above characteristics of gayal and yak gastric LYZ c are very similar to those of cattle, but the isoelectric points of gayal and yak gastric LYZ c are lower than that of cattle S3. [Conclusion] The results of this study indicate that gayal and yak gastric LYZ c is more suitable for the acid environment of the stomach, and it has the function of breaking down the microbes in the stomach.

Keywords: gayal and yak; gastric LYZ c gene; digestive enzyme; sequence analysis; adaptation analysis

牛和羊等反刍动物以前肠发酵的方式从它们的食物中获取营养物质^[1]。这种以微生物进行的前肠发酵,其产生的短链脂肪酸被胃壁吸收,为反刍动物提供能量。为了从这些微生物群体中回收必需的营养物质,反刍动物必须先破坏细菌和其他微生物细胞,释放内容物,然后胃中的消化酶从内容物中提取营养物质^[2]。在前肠进行发酵的微生物对于哺乳动物的消化酶普遍具有抗性,因此反刍动物募集一种抗细菌的溶菌酶(lysozyme, LYZ)来裂解这些前肠来源的微生物^[3]。

LYZ是一种抑菌蛋白,它分布于生物体多种体液和组织中,包括禽类蛋清、动物分泌物(如人乳和眼泪)和多形核白细胞分泌物^[4]。LYZ全称为1,4-O-溶菌酶,是一种低分子量的基础蛋白,它通过裂解细胞壁肽聚糖中N-乙酰氨基葡萄糖和N-乙酰胞壁酸之间的 β -1,4-糖苷键直接溶解革兰氏阳性细菌;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]。动物LYZ分为C型、G型和I型3种,其中LYZ c

是唯一存在于脊椎动物、原索动物和无脊椎动物的类型,也是目前研究最深入的类型^[7]。

迄今,在反刍动物中已经鉴定出14种LYZ c基因,但只有9个LYZ c基因可以编码出相应的功能蛋白,它们之间具有74.8%~97.5%的同源性^[8]。胃型LYZ c基因是溶菌酶c基因家族的重要成员,它们在反刍动物的胃中高表达。普通牛胃型LYZ c基因共有4个外显子和3个内含子,编码区(coding sequence, CDS)序列全长为444 bp,编码147个氨基酸,4个外显子对应的编码区大小分别为136、165、76和67 bp。胃型和非胃型LYZ c氨基酸序列及结构虽然相似,但胃型LYZ c发生了适应性进化,等电点变低,能适应胃中的酸性环境,其作为反刍动物胃中的一种消化酶分解微生物,释放营养物质,最后被宿主胃壁吸收。

大额牛额部较宽平,两角间额顶高,故称其为“大额牛”;因其产于云南省怒江州贡山县独龙江一带又称为“独龙牛”,是一种以竹子为主食的半家养半野生珍稀物种^[9]。牦牛是生活在青藏高

原的特有牛种，主要分布于海拔 3 000 m 以上的高山和亚高山地区^[10]。牦牛适应高原特殊环境，可利用高原牧草进行动物性生产，提供优质的乳、肉、皮、绒等多种产品^[11]。胃型 *LYZ c* 在反刍动物饲料的转化中发挥重要作用，因此，探究大额牛和牦牛胃型 *LYZ c* 基因的遗传特征及功能对于了解这两个物种的消化机制及种质特征具有重要意义。本研究对大额牛和牦牛胃型 *LYZ c* 基因编码区序列进行了变异检测和群体遗传学分析，并结合牛科物种的同源序列进行了比较基因组学和生物信息学分析，揭示大额牛和牦牛胃型 *LYZ c* 基因的遗传特征及其对消化功能的适应性进化。

1 材料和方法

1.1 材料

35 份大额牛样品采自云南省贡山县，33 份牦牛样品采自云南省香格里拉市。样品均为耳组织样，个体间不存在直接血缘关系。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，TE 缓冲液稀释为 50 ng/μL，保存于 4 ℃ 备用。

1.3 PCR 引物设计和 PCR 扩增及测序

根据牦牛胃型 *LYZ c* 基因全序列 (GenBank 登录号为 NW_005394198) 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。

PCR 反应体系为 25 μL，包含 ddH₂O 19.2 μL，10×buffer (Mg²⁺)2.5 μL，上、下游引物各 0.4 μL (10 μmol/L)，dNTP 0.2 μL (2.5 mmol/L)，*Taq* 酶 (5 U/μL)0.3 μL，DNA 模板 (50 ng/μL)2.0 μL。PCR 反应程序为：94 ℃ 预变性 3 min，35 个循环 (94 ℃ 变性 30 s→退火 40 s→72 ℃ 延伸 30 s)，

72 ℃ 后延伸 5 min 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

1.4.1 核苷酸序列及变异分析

测序结果采用 DNASTar 软件包 (DNASTar Inc.) 中 SeqMan II 程序进行序列核对和组装，得到胃型 *LYZ c* 基因完整外显子拼接序列，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。将获得的编码区序列提交到 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源比对，确定为各自的胃型 *LYZ c* 基因序列。编码区 SNP 位点的数量、位置由 SeqMan II、Mega 4.0^[12] 软件确定和输出，各 SNP 位点的基因频率和基因型频率由 PopGen32 软件 (version 1.31) 计算，单倍型划分用 Phase v2.1 软件进行。采用 PANTHER 蛋白分析软件 (<http://www.pantherdb.org/>) 预测氨基酸替换对其功能的影响。

1.4.2 蛋白质理化特性及结构分析

胃型 *LYZ c* 基因编码产物的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 程序进行 *LYZ c* 蛋白的亚细胞定位；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在线服务器 SWISS-MODEL 预测 *LYZ c* 蛋白的三维结构。

2 结果与分析

2.1 外显子序列拼接及群体变异分析

采用 PCR 产物直接测序技术对大额牛、牦牛胃型 *LYZ c* 的 4 个外显子及其旁侧序列进行测序，共得到 1 014 bp 的序列。在大额牛胃型 *LYZ c*

表 1 胃型 *LYZ c* 基因分段扩增引物信息
Tab. 1 Primer information for segmented amplification of gastric *LYZ 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/℃ annealing temperature
<i>LYZ c</i> exon1F	CAGTCTGGACATTTGACTTCTCA	238	58.6
<i>LYZ c</i> exon1R	TTGCTCATTTATTCATCCTCTGTT		
<i>LYZ c</i> exon2F	GAACTGATTGGGCTATGAAGTGT	284	59.9
<i>LYZ c</i> exon2R	AGTATAACCAGATCGGGGCTGAG		
<i>LYZ c</i> exon3F	GAAAATAAAGCTGCTGAACCTA	258	56.5
<i>LYZ c</i> exon3R	TCAAACCTTTATACCGTACACCT		
<i>LYZ c</i> exon4F	GATGAACTATTTTGTCTCCCAA	234	55.2
<i>LYZ c</i> exon4R	CTTTCATTCAACTATCACTTCCT		

基因编码区中共发现 6 个 SNP 位点, 分别为 c.196G>A、c.267T>C、c.270C>T、c.396C>T、c.423C>T 和 c.438C>G; 在牦牛发现 10 个 SNP 位点, 分别为 c.196G>A、c.267T>C、c.270C>T、c.336G>C、c.348T>G、c.351T>C、c.375A>C、c.396C>T、c.423C>T 和 c.438C>G。大额牛群体内发现的 SNP 位点均与牦牛共享。在大额牛中发现的 SNP196 位点, G 等位基因趋于纯合, 处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。而牦牛编码区中的 SNP336、SNP348 和 SNP351 位点也趋向于纯合, 且处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。大额牛和牦牛的 SNP396、SNP423 和 SNP438 位点两种等位基因频率相近或相同, 均处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态; 这些位点均位于外显子 4 中。各 SNP 位点的群体遗传分析结果见表 2。

2.2 单倍型划分及比较基因组学分析

大额牛和牦牛单倍型及其频率等信息见表 3。为了揭示胃型 *LYZ c* 基因的遗传特征, 采用大额牛 *LYZ c* 单倍型序列作为查询序列在 NCBI 数据库中进行同源搜索, 获得以下牛科物种的胃型 *LYZ c* 基因序列进行比较分析: 水牛序列 1 条, 为 NM_001290888; 普通牛序列 7 条, 分别为

BG937795、BG937779、BG937730、CK971540、BG937506、DY056864 和 M26244; 瘤牛序列 1 条: XM_019960836; 野牛序列 1 条: XM_010841550; 山羊序列 1 条: KC954667。

在大额牛中共确定 6 种单倍型, 即 Gayal_hap1~hap6, 均为本研究数据确定的单倍型; Gayal_hap2 的期望频率高, 为大额牛群体优势单倍型。在牦牛群体内共确定 12 种单倍型, 即 Yak_hap1~hap12, 均为本研究数据确定的单倍型, Yak_hap5 的期望频率最高, 为牦牛群体优势单倍型。大额牛与牦牛间具有共享单倍型, 分别为 Gayal_hap2 和 Yak_hap9、Gayal_hap6 和 Yak_hap5。对已发表的其他牛科物种胃型 *LYZ c* 数据进行分析, 在普通牛中确定 7 种单倍型, 即 Cattle_hap1~hap7; 在水牛、瘤牛、野牛和山羊中均确定 1 种单倍型, 分别为 Buffalo_hap1、Zebu_hap1、Bison_hap1 和 Goat_hap1(图 1)。

各物种 *LYZ c* 基因核苷酸、编码氨基酸序列比对结果见图 1、2。各牛科物种胃型 *LYZ c* 基因序列长度相同, 均为 444 bp, 编码 147 个氨基酸。将本研究数据与已发表的序列数据合并后, 大额牛和牦牛 SNP 位点数未增加。没有发现大额

表 2 大额牛和牦牛胃型 *LYZ c* 基因的群体变异信息
Tab. 2 The variation information of gayal and yak gastric *LYZ c* gene

群体 population	变异位点 SNPs	基因频率 gene frequency		期望杂合度 H_e	卡方检验 P 值 P value of Chi-square test
		W	m		
大额牛 gayal	c.196G>A	0.935	0.065	0.109	0.758
	c.267T>C	0.565	0.435	0.474	0.001
	c.270C>T	0.919	0.081	0.135	0.017
	c.396T>C	0.557	0.443	0.501	0.000
	c.423C>T	0.557	0.443	0.501	0.000
	c.438C>G	0.557	0.443	0.501	0.000
牦牛 yak	c.196G>A	0.717	0.283	0.388	0.000
	c.267T>C	0.900	0.100	0.168	0.603
	c.270C>T	0.683	0.317	0.478	0.000
	c.336G>C	0.983	0.017	0.030	1.000
	c.348T>G	0.983	0.017	0.030	1.000
	c.351T>C	0.983	0.017	0.030	1.000
	c.375A>C	0.567	0.433	0.507	0.000
	c.396T>C	0.500	0.500	0.508	0.000
	c.423C>T	0.500	0.500	0.508	0.000
	c.438C>G	0.500	0.500	0.508	0.000

注: W 为野生型等位基因; m 为突变型等位基因; P 值为 Hardy-Weinberg 平衡检验概率。
Note: W means wild-type allele; m means mutant-type allele; P value is the probability of Hardy-Weinberg equilibrium.

表 3 由本研究数据确定的大额牛和牦牛 *LYZ c* 基因各单倍型信息

Tab. 3 Haplotypes information of gayal and yak *LYZ c* based on the data in this study

单倍型 haplotype	物种 species	频率 frequency	频率期望值 expected value of frequency	标准误 standard error
Gayal_hap1	大额牛 gayal	0.085 714	0.090 326	0.013 439
Gayal_hap2		0.471 429	0.466 813	0.013 438
Gayal_hap3		0.014 286	0.011 572	0.005 611
Gayal_hap4		0.342 857	0.335 748	0.012 175
Gayal_hap5		0.028 571	0.035 681	0.012 175
Gayal_hap6		0.057 143	0.051 928	0.010 217
Yak_hap1	牦牛 yak	0.060 606	0.060 606	0.000 000
Yak_hap2		0.060 606	0.060 606	0.000 000
Yak_hap3		0.106 061	0.114 435	0.011 464
Yak_hap4		0.136 364	0.127 989	0.011 464
Yak_hap5		0.181 818	0.169 516	0.013 534
Yak_hap6		0.142 857	0.168 185	0.013 340
Yak_hap7		0.015 152	0.011 110	0.009 981
Yak_hap8		0.015 152	0.002 416	0.005 547
Yak_hap9		0.015 152	0.008 309	0.007 540
Yak_hap10		0.136 364	0.110 709	0.041 710
Yak_hap11		0.015 151	0.040 806	0.041 710
Yak_hap12		0.090 909	0.073 629	0.033 456

牛和牦牛与其他牛科物种的种间核苷酸差异位点。普通牛和瘤牛特有的核苷酸为 c.13G 和 c.270T。大额牛中异义替换 1 个，为 p.G66S；牦牛群体中异义替换有 2 个，分别为 p.G66S 和 p.H116Q，对应的核苷酸 SNP 位点为 SNP196 和 SNP328。经采用 PANTHER 软件分析，在大额牛、牦牛群体中发现的 p.G66S 和 p.H116Q 替换对胃型 *LYZ c* 功能没有影响。

由大额牛胃型 *LYZ c* 基因 6 种单倍型确定出 2 种蛋白变异体，即 Gayal 1 和 Gayal 2。变异体 Gayal 1 对应大额牛 *LYZ c* 基因 Gayal_hap1~Gayal_hap5 单倍型，变异体 Gayal 2 则对应 Gayal_hap6 单倍型，变异体 Gayal 1 在大额牛群体中出现频率最高；而由牦牛胃型 *LYZ c* 基因 12 种单倍型确定出 3 种蛋白变异体，即 Yak 1~Yak 3。变异体 Yak 1 对应牦牛 *LYZ c* 基因 Yak_hap1~Yak_hap7 单倍型，变异体 Yak 2 则对应 Yak_hap8 单倍型，变异体 Yak 3 对应牦牛 *LYZ c* 基因 Yak_hap9~Yak_hap12 单倍型，变异体 Yak 1 在牦牛群体中出现频率最高。大额牛和牦牛有相同的变异体，分别为 Gayal 1 和 Yak 3、Gayal 2 和 Yak 1。由水牛、普通牛、瘤牛、野牛和山羊 *LYZ c* 基因单倍

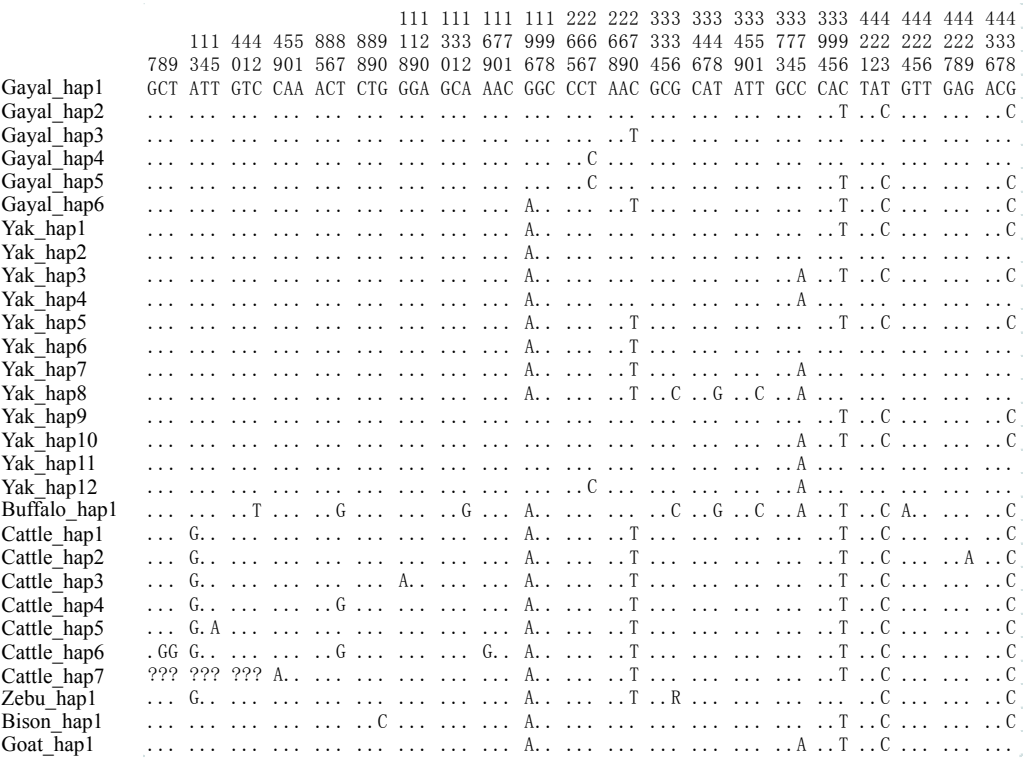


图 1 牛科物种胃型 *LYZ c* 基因单倍型序列核酸差异

Fig. 1 Nucleotide differences of haplotypes detected in gastric *LYZ c* among Bovidae species

型分别各确定了1、4、1、1和1种变异体。水牛中有特异的氨基酸 p.142I。所有物种在第66位均出现 Ser 残基。普通牛和瘤牛具有特异的氨基酸 p.5V。各牛科物种间胃型LYZ c 核苷酸序列差异位点较多,但其编码蛋白氨基酸序列差异较小(图1、2)。

	11
	145614
	35707662
Gayal 1	AIQGNHGV
Gayal 2	S..
Yak 1	S..
Yak 2	SQ.
Yak 3	
Buffalo 1	SQI
Cattle 1	.V...S..
Cattle 2	GV...DS..
Cattle 3	.V.R.S..
Cattle 4	??K...S..
Zubu 1	.V...S..
Bison 1	S..
Goat 1	S..

图2 牛科物种胃型LYZ c 变异体氨基酸差异

Fig. 2 Amino acid sequence differences among the variants of gastric LYZ c in Bovidae

2.3 LYZ c 变异体序列结构分析

大额牛和牦牛群体中的胃型LYZ c 蛋白变异

体的序列比较见图3。大额牛和牦牛胃型LYZ c 变异体均具有N端的信号肽,切割位点位于第18和第19氨基酸残基,其成熟肽包含129个氨基酸。生物信息学分析显示:它们各自的胃型LYZ c 变异体都含有1个属于类溶菌酶超家族的LYZ1保守结构域,位于第19~145氨基酸残基处,它们均不具有跨膜结构,为分泌到胞外发挥功能的亲水蛋白。通过靶模板比对,构建大额牛和牦牛胃型LYZ c 三维结构同源模型。结果表明:大额牛胃型2种LYZ c 变异体成熟肽与普通牛胃型Lysozyme C-2模板有100%的覆盖率,一致性为99.22% (Gayal 1) 和100.00% (Gayal 2),牦牛胃型3种LYZ c 变异体成熟肽与普通牛胃型Lysozyme C-2模板也有100%的覆盖率,一致性分别为100.00% (Yak 1)、99.22% (Yak 2) 和99.22% (Yak 3)。

2.4 胃型与非胃型LYZ c 变异体序列差异

将大额牛和牦牛胃型LYZ c 变异体氨基酸序列与已报道的普通牛胃型(S1、S2和S3)和非胃型(牛奶、肾、气管和小肠)LYZ c 氨基酸序列^[8] (Ensembl database ID: ENSBTAG00000011941、ENSBTAG00000026779、ENSBTAG00000000198、

Gayal 1	1	ATGAAGGCTCTCATTATTCTGGGGTTTCTCTCTCTTCTGTCGCTGTCCAAGGCAAGGCTTTGAGAGATGTGAGCTTGCCAGAACTCTGAAGAACTTGGACTGGACGGCTATAAGGGA
Gayal 2	1	ATGAAGGCTCTCATTATTCTGGGGTTTCTCTCTCTTCTGTCGCTGTCCAAGGCAAGGCTTTGAGAGATGTGAGCTTGCCAGAACTCTGAAGAACTTGGACTGGACGGCTATAAGGGA
Yak 1	1	ATGAAGGCTCTCATTATTCTGGGGTTTCTCTCTCTTCTGTCGCTGTCCAAGGCAAGGCTTTGAGAGATGTGAGCTTGCCAGAACTCTGAAGAACTTGGACTGGACGGCTATAAGGGA
Yak 2	1	ATGAAGGCTCTCATTATTCTGGGGTTTCTCTCTCTTCTGTCGCTGTCCAAGGCAAGGCTTTGAGAGATGTGAGCTTGCCAGAACTCTGAAGAACTTGGACTGGACGGCTATAAGGGA
Yak 3	1	ATGAAGGCTCTCATTATTCTGGGGTTTCTCTCTCTTCTGTCGCTGTCCAAGGCAAGGCTTTGAGAGATGTGAGCTTGCCAGAACTCTGAAGAACTTGGACTGGACGGCTATAAGGGA
		<u>M K A L I I L G F L F L S V A V Q G K V F E R C E L A R T L K K L G L D G Y K G</u>
Gayal 1	121	GTCAGCCTGGCAAACTGGTTGTGTTGACCAAAATGGGAAAGCAGTTATAACACAAAAGCTACAACTACAATCCTGGCAGTGAAGCACTGATTATGGGATATTTTCAGATCAACAGCAAA
Gayal 2	121	GTCAGCCTGGCAAACTGGTTGTGTTGACCAAAATGGGAAAGCAGTTATAACACAAAAGCTACAACTACAATCCTAGCAGTGAAGCACTGATTATGGGATATTTTCAGATCAACAGCAAA
Yak 1	121	GTCAGCCTGGCAAACTGGTTGTGTTGACCAAAATGGGAAAGCAGTTATAACACAAAAGCTACAACTACAATCCTAGCAGTGAAGCACTGATTATGGGATATTTTCAGATCAACAGCAAA
Yak 2	121	GTCAGCCTGGCAAACTGGTTGTGTTGACCAAAATGGGAAAGCAGTTATAACACAAAAGCTACAACTACAATCCTAGCAGTGAAGCACTGATTATGGGATATTTTCAGATCAACAGCAAA
Yak 3	121	GTCAGCCTGGCAAACTGGTTGTGTTGACCAAAATGGGAAAGCAGTTATAACACAAAAGCTACAACTACAATCCTGGCAGTGAAGCACTGATTATGGGATATTTTCAGATCAACAGCAAA
	41	<u>V S L A N W L C L T K W E S S Y N T K A T N Y N P G S E S T D Y G I F Q I N S K</u>
Gayal 1	241	TGGTGGTGAATGATGGCAAAACCCCTAACGCAGTTGACGGCTGTCTATGATCCTGCAGCGAATTAATGGAAAATGACATCGCTAAAGCTGTAGCGTGTGCAAGCATATTGTCAGTGAG
Gayal 2	241	TGGTGGTGAATGATGGCAAAACCCCTAACGCAGTTGACGGCTGTCTATGATCCTGCAGCGAATTAATGGAAAATGACATCGCTAAAGCTGTAGCGTGTGCAAGCATATTGTCAGTGAG
Yak 1	241	TGGTGGTGAATGATGGCAAAACCCCTAACGCAGTTGACGGCTGTCTATGATCCTGCAGCGAATTAATGGAAAATGACATCGCTAAAGCTGTAGCGTGTGCAAGCATATTGTCAGTGAG
Yak 2	241	TGGTGGTGAATGATGGCAAAACCCCTAACGCAGTTGACGGCTGTCTATGATCCTGCAGCGAATTAATGGAAAATGACATCGCTAAAGCTGTAGCGTGTGCAAGCATATTGTCAGTGAG
Yak 3	241	TGGTGGTGAATGATGGCAAAACCCCTAACGCAGTTGACGGCTGTCTATGATCCTGCAGCGAATTAATGGAAAATGACATCGCTAAAGCTGTAGCGTGTGCAAGCATATTGTCAGTGAG
	81	<u>W W C N D G K T P N A V D G C H V S C S E L M E N D I A K A V A C A K H I V S E</u>
Gayal 1	361	CAAGGCATTACAGCCTGGGTGGCATGGAAAAGTCACTGTGAGACCATGACGTCAGCAGTTATGTTGAGGGTTGCACGCTGTAA
Gayal 2	361	CAAGGCATTACAGCCTGGGTGGCATGGAAAAGTCACTGTGAGACCATGACGTCAGCAGTTACGTTGAGGGTTGCACCCCTGTAA
Yak 1	361	CAAGGCATTACAGCCTGGGTGGCATGGAAAAGTCACTGTGAGACCATGACGTCAGCAGTTACGTTGAGGGTTGCACCCCTGTAA
Yak 2	361	CAAGGCATTACAGCCTGGGTGGCATGGAAAAGTCACTGTGAGACCATGACGTCAGCAGTTATGTTGAGGGTTGCACGCTGTAA
Yak 3	361	CAAGGCATTACAGCCTGGGTGGCATGGAAAAGTCACTGTGAGACCATGACGTCAGCAGTTACGTTGAGGGTTGCACCCCTGTAA
	121	<u>Q G I T A W V A W K S H C R D H D V S S Y V E G C T L *</u>

注:阴影表示信号肽序列;下划线表示保守结构域。

Note: Signal peptide sequence is shaded. The region underlined indicates the putative conserved domain.

图3 大额牛和牦牛胃型LYZ c 变异体氨基酸序列及其对应的核苷酸序列

Fig. 3 Amino acid sequences of gastric LYZ c variants of gayal and yak and their corresponding nucleotide sequences

2个SNP位点导致了氨基酸的替换,但它们对胃型LYZ c蛋白的功能没有影响。在大额牛中确定胃型LYZ c蛋白存在2种变异体,牦牛胃型LYZ c蛋白存在3种变异体。经比较分析发现:大额牛与牦牛变异体之间在氨基酸组成上只有1~2处差异,它们在理化特性、结构上的特征基本一致,揭示它们间的功能差异较小,也提示两种牛属间LYZ c的功能差异较小。牛科物种胃型LYZ c基因编码区序列比对发现,在核苷酸水平上,水牛与牛属物种相比,该区域核苷酸差异位点较多,而牛属物种间差异位点较少;在蛋白水平上,牛科物种LYZ c氨基酸序列一致性较高,其中普通牛和瘤牛一致性更高,表明牛科物种胃型LYZ c基因具有较高的功能保守性,提示该基因在牛科物种中是由共同的祖先基因进化而来的,且受到了较高的选择压力。

本研究预测大额牛和牦牛胃型LYZ c蛋白具有LYZ 1保守结构域,揭示它具有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,消化微生物细胞壁的功能^[5]。哺乳动物典型的溶菌酶c是在中性pH环境下发挥功能,而反刍动物胃型溶菌酶c裂解胃中细菌的细胞壁,其发挥功能必须要适应酸性pH环境,并对胃中的消化酶具有抗性^[3]。在这种适应过程中,反刍动物胃型LYZ c的氨基酸序列发生了一些适应性改变。这些改变包括赖氨酸被精氨酸残基替换,从而消除了胃中消化酶潜在的裂解位点,同时还失去了天冬氨酸-脯氨酸间的酸不稳定肽键^[13-14]。胃型LYZ c的天冬氨酸残基与酰胺基的含量与非胃型LYZ c相比偏低,同时它所含有的天冬氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺等酸不稳定氨基酸残基的数量仅有18个,而非胃型LYZ c却含有20~28个,这些特征保证了胃型LYZ c能在低pH环境下维持其功能。大额牛和牦牛胃型LYZ c与牛奶和肾非胃型溶菌酶相比,其第120位的Asp被Glu替换,同时还缺失了121位的Pro,这样就失去了非胃型LYZ c蛋白原有的天冬氨酸-脯氨酸二肽,提高了它们胃型LYZ c对酸性环境的耐受力^[15]。大额牛和牦牛胃型LYZ c蛋白除了具有普通牛胃型LYZ c蛋白的特点外(酸不稳定氨基酸残基数为18个、不具有天冬氨酸-脯氨酸二肽),Yak 2变异体的第116位氨基酸为Gln,其等电点为5.65,而普通牛stomach 3在该

位点上为His,等电点为7.59;同时,Gayal 1、Gayal 2和Yak 1~Yak 3第144位氨基酸为Glu,等电点为3.22,普通牛stomach 3在该位点上为Gln。因此变异体Gayal 1、Gayal 2、Yak 1和Yak 3的等电点(pI=6.87)与变异体Yak 2的等电点(pI=6.80)比普通牛stomach 3蛋白(pI=7.55)的更低,这可能会导致大额牛和牦牛胃型LYZ c蛋白更适合酸性环境。

大额牛以竹子、芦苇、树叶等其他反刍动物较少利用的粗纤维类为食,其生存和食物条件差,但表现出很强的生存能力和较快的生长速度^[16]。牦牛于高原牧场放牧饲养,生存环境恶劣,对粗纤维食物的消化能力要比其他反刍动物强^[17]。大额牛和牦牛对粗饲料的高消化率,可能是由于瘤胃内特殊的微生物生态系统造成的。研究表明:大额牛和牦牛瘤胃内纤维分解菌数量显著高于普通牛^[18-19]。大额牛和牦牛与普通牛胃型LYZ c蛋白之间最主要的差异是等电点不同,造成这种差异的原因可能与大额牛、牦牛瘤胃内特殊的微生物生态系统有关,推测胃型LYZ c与其瘤胃内的微生物经历了长期协同进化的过程。

[参考文献]

- [1] CHAUSS M, HUME I D, HUMMEL J. Evolutionary adaptations of ruminants and their potential relevance for modern production systems[J]. *Animal*, 2010, 4(7): 979. DOI: [10.1017/S1751731110000388](https://doi.org/10.1017/S1751731110000388).
- [2] STEVEN C E, HUME I D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients[J]. *Physiological Reviews*, 1998, 78(2): 393. DOI: [10.1152/physrev.1998.78.2.393](https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.393).
- [3] 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](https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5).
- [4] JOLLÈS P, JOLLÈS J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1984, 63(2): 165.
- [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 Science*, 2002, 15(6): 895. DOI: [10.5713/ajas.2002.895](https://doi.org/10.5713/ajas.2002.895).
- [6] 张勃伟, 权富生, 赛务加浦, 等. 人溶菌酶基因真核表达载体构建及其在牛乳腺上皮细胞中的表达[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(1): 11. DOI: [10.3969/j.issn.1004-1389.2008.01.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-1389.2008.01.003).
- [7] 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](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-1336.2006.05.029).

- [8] 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](https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2015.1.1).
- [9] 毛华明, 邓卫东, 文际坤. 大额牛的生物学特征及研究开发利用潜力[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(2): 258. DOI: [10.3969/j.issn.1004-390X.2005.02.023](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-390X.2005.02.023).
- [10] 张成福, 徐利娟, 姬秋梅, 等. 西藏牦牛 mtDNA D-loop 区的遗传多样性及其遗传分化[J]. 生态学报, 2012, 32(5): 1387.
- [11] 梁春年, 邢成峰, 阎萍, 等. 牦牛 *LPL* 基因外显子 7 多态性与生长性状相关性的研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(5): 16. DOI: [10.7668/hbnxb.2010.05.003](https://doi.org/10.7668/hbnxb.2010.05.003).
- [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(24): 1596. DOI: [10.1093/molbev/msm092](https://doi.org/10.1093/molbev/msm092).
- [13] STEWART C B, SCHILLING J W, WILSON A C. Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters[J]. Nature, 1987, 330(6146): 401. DOI: [10.1038/330401a0](https://doi.org/10.1038/330401a0).
- [14] SWANSON K W, IRWIN D M, WILSON A C. Stomach lysozyme gene of the langur monkey: tests for convergence and positive selection[J]. Journal of Molecular Evolution, 1991, 33(5): 418. DOI: [10.1007/BF02103133](https://doi.org/10.1007/BF02103133).
- [15] IRWIN D M. Evolution of cow nonstomach lysozyme genes[J]. Genome, 2004, 47(6): 1082. DOI: [10.1139/g04-075](https://doi.org/10.1139/g04-075).
- [16] 杨舒黎, 苟潇, 冷静, 等. 云南大额牛的生物学特征及其瘤胃微生物特点综述[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(21): 12878. DOI: [10.3969/j.issn.0517-6611.2011.21.089](https://doi.org/10.3969/j.issn.0517-6611.2011.21.089).
- [17] 苏贵龙, 张景艳, 王磊, 等. 牦牛瘤胃微生物降解纤维素及其资源利用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(3): 695.
- [18] DENG W D, WANG L P, MA S C, et al. Comparison of gayal (*Bos frontalis*) and Yunnan yellow cattle (*Bos taurus*): rumen function, digestibilities and nitrogen balance during feeding of pelleted lucerne (*Medicago sativum*)[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2007, 20(6): 900. DOI: [10.5713/ajas.2007.900](https://doi.org/10.5713/ajas.2007.900).
- [19] 安登第. 牦牛瘤胃微生物基因组文库构建与 16SrDNA 生物多样性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.

责任编辑: 何馨成