

引文格式: 保志鹏, 涂兴调, 张自芳, 等. 牛科物种 *FEZF2* 基因分子特征、功能预测及进化分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(4): 574–586. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202203009

牛科物种 *FEZF2* 基因分子特征、 功能预测及进化分析*

保志鹏^{1#}, 涂兴调^{2#}, 张自芳¹, 谷丽娇², 范新阳²,
钱林东¹, 苗永旺^{2**}

(1. 云南农业职业技术学院 畜牧兽医学院, 云南 昆明 650212;
2. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】揭示牛科物种 *FEZF2* 基因的功能及其差异。【方法】从 NCBI 和 Ensembl 数据库下载牛科主要家畜 *FEZF2* 基因序列及用于比较的非牛科物种的同源序列, 采用生物信息学和比较基因组学方法对牛科家畜 *FEZF2* 基因的结构、编码蛋白的理化特征、氨基酸组成、基序和保守结构域、高级结构、参与的生物学路径、分子功能及进化关系进行比较分析。【结果】牛科动物间 *FEZF2* 基因转录区的结构存在差异, 表现为非翻译区和内含子的序列长度不一致, 但它们的编码序列 (coding sequence, CDS) 结构模式一致, 与非牛科动物的 CDS 结构具有共线性关系。牛科动物 *FEZF2* 蛋白都是在核内发挥生物学功能的亲水性蛋白, 无信号肽序列及跨膜结构域, 都含有 1 个 COG5048 保守的锌指结构域。预测显示: *FEZF2* 蛋白参与的生物学过程主要与神经元发育调节有关, 分子功能主要是与染色质结合、转录激活或抑制有关。牛科与非牛科哺乳动物的 *FEZF2* 序列都存在 1 个连续的甘氨酸序列重复区, 水牛、牦牛、绵羊和山羊均为 13G 型, 但普通牛和瘤牛存在 12G 和 13G 两个等位基因。各牛科物种 *FEZF2* 蛋白在氨基酸组成、序列一致性、理化特征、基序、结构域和高级结构上存在相似性, 但在牛科的不同属间存在一定差异。系统发育分析显示: 牛科同属动物的 *FEZF2* 蛋白遗传关系较近。【结论】本研究揭示牛科家畜间 *FEZF2* 基因 CDS 的结构模式高度一致; *FEZF2* 作为核内功能蛋白可能参与了牛科物种的神经元发育和机体免疫等过程的基因表达调控。

关键词: 牛科物种; *FEZF2* 基因; 分子特征; 基因功能; 生物信息学与比较基因组学分析

中图分类号: S823.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-390X (2022) 04-0574-13

Molecular Characterization, Functional Prediction and Evolutionary Analysis of *FEZF2* Gene in Species of Bovidae

BAO Zhipeng¹, TU Xingtiao², ZHANG Zifang¹, GU Lijiao²,
FAN Xinyang², QIAN Lindong¹, MIAO Yongwang²

(1. Department of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural College of Vocational Education, Kunming 650212, China; 2. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

收稿日期: 2022-03-07

修回日期: 2022-05-26

网络首发日期: 2022-07-06

*基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2018JS581); 国家自然科学基金项目 (31760659)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。保志鹏 (1983—), 女, 云南鲁甸人, 硕士, 副教授, 主要从事畜牧兽医学研究。E-mail: 171257835@qq.com; 涂兴调 (1997—), 女, 云南罗平人, 在读硕士研究生, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: 3154986138@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 苗永旺 (1964—), 男, 内蒙古通辽人, 博士, 教授, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: yongwangmiao1@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20220704.1603.006.html>



Abstract: [Purpose] To reveal the functions and differences of *FEZF2* gene in species of Bovidae family. [Methods] The sequences of *FEZF2* gene in domestic animals of Bovidae and homologous sequences of non-Bovidae species for comparison were downloaded from NCBI and Ensembl databases, the structure of *FEZF2* gene, and the physicochemical characteristics, amino acid composition, motifs and conserved domains, advanced structures, biological pathways involved, molecular functions and evolutionary relationships of its encoded proteins were compared and analyzed using the methods of bioinformatics and comparative genomics. [Results] The structure of the transcription region of *FEZF2* gene is different among species of Bovidae, which mainly shows that the sequence length of the untranslated regions and introns is inconsistent. However, the structural pattern of their coding sequence (CDS) is consistent, which displays collinearity with the CDS structure of non-Bovidae animals. *FEZF2* protein of Bovidae species is a hydrophilic protein without a signal peptide sequence and a transmembrane domain that performs biological functions in the nucleus, and contains a conserved zinc finger domain of COG5048. The prediction showed that the biological process involved in this protein is mainly related to the regulation of neuronal development, and the molecular function is mainly related to chromatin binding, transcriptional activation or inhibition. There is a continuous glycine repeat region in *FEZF2* sequences of Bovidae and non-Bovidae mammals. Buffalo, yak, sheep and goat are all 13G type, but cattle and zebu have two alleles of 12G and 13G. The amino acid composition, sequence consistency, physicochemical characteristics, motifs, domains and advanced structures of *FEZF2* protein among the species of Bovidae are similar, but there are some differences among different genera of Bovidae. Phylogenetic analysis showed that the *FEZF2* proteins of the same genus of Bovidae are closely related to each other. [Conclusion] This study reveals that the structural pattern of *FEZF2* gene CDS is highly consistent among the domestic animals of Bovidae. As a nuclear functional protein, *FEZF2* may be involved in the regulation of gene expression in neuronal development and body immunity in the species of Bovidae.

Keywords: species of Bovidae; *FEZF2* gene; molecular characteristics; gene function; bioinformatics and comparative genomics analysis

FEZ 家族锌指蛋白 2 (FEZ family zinc finger protein 2, *FEZF2*) 又称前脑胚胎锌指样蛋白 2 (forebrain embryonic zinc finger-like protein 2), 是锌指蛋白超基因家族的重要成员, 包含 6 个 C₂H₂ 锌指结构和 1 个甘氨酸重复区域^[1-5]。*FEZF2* 作为一种转录激活/抑制因子, 参与神经元发育的转录调控^[1-4]。研究发现: 动物神经元发育通过下游细胞因子的表达与机体免疫关联^[2,5-7]。奶牛乳腺炎的易感性与信号素 5A (semaphorin 5A, SEMA5A) 的转录活性下降而导致的免疫反应受损有关^[2]。乳腺炎可诱导 *FEZF2* 基因在乳腺中表达, 导致 *SEMA5A* 的表达上调, 进而诱导与机体免疫相关的 *TNF- α* 和 *IL-8* 等多个基因表达^[2]。在乳腺炎中, *FEZF2* 均能诱导 *SEMA5A* 表达上调, 但在

易感奶牛中其表达水平低于乳腺炎抗性牛^[2]。在奶牛中发现: *FEZF2* 基因编码产物的多个甘氨酸残基重复区存在 12G 重复和 13G 重复 2 种等位基因, 13G 型的 *FEZF2* 等位基因降低了 *SEMA5A* 的表达水平, 导致 13G/13G 基因型奶牛对乳腺炎易感, 发病率是 12G/12G 基因型奶牛的 2 倍^[8]。*FEZF2* 基因位于普通牛第 22 号染色体, 包含 6 个外显子和 5 个内含子, 编码序列 (coding sequence, CDS) 全长为 1380 bp (登录号: NM_001038198.2); 水牛 *FEZF2* 基因定位于第 21 号染色体, 包含 9 个外显子和 8 个内含子, CDS 全长也为 1380 bp (登录号: XM_045163982.1)。魏伟等^[5]对河流型和沼泽型水牛群体 *FEZF2* 基因的检测发现: 河流型水牛中存在 c.165G>A, 属于

同义替换，且河流型与沼泽型水牛的 *FEZF2* 基因多个甘氨酸残基重复编码区都为 13G 型。张广乐等^[6]研究发现：*FEZF2* 基因在 12 个水牛组织中都有表达，其中在大脑的表达量最高，该基因可能在水牛中作为一类核内转录因子广泛参与基因的表达调控过程。*FEZF2* 分别位于山羊的第 22 号、绵羊的第 19 号染色体上，它们都含有 5 个外显子和 4 个内含子，编码区长度与普通牛和水牛基本一致。

牛科家养动物包括普通牛、水牛、牦牛、绵羊和山羊等，具有奶用、肉用和役用等多种用途，在全球畜牧业生产中发挥着重要作用。*FEZF2* 作为一种转录因子，参与神经元的发育，可能与动物的先天免疫和奶牛的乳腺炎紧密相关^[1-4]，但目前有关牛科物种 *FEZF2* 基因的研究还十分有限。基于此，本研究从 NCBI 和 Ensembl 数据库下载牛科家畜 *FEZF2* 基因及其编码蛋白序列，并以下载的非牛科动物的同源序列为对照，采用生物信息学和比较基因组学方法，对牛科主要家畜

FEZF2 基因的结构、编码蛋白的氨基酸组成、理化特征、结构、进化关系、参与的生物学路径及分子功能等进行深入的比较分析，旨在解析牛科物种 *FEZF2* 基因的分子特征、基本功能及进化关系，为深入研究 *FEZF2* 基因调控动物免疫的机制和牛科家养动物的抗病育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 *FEZF2* 序列及其注释文件的获取

用于数据分析的水牛、普通牛、瘤牛、杂交牛、牦牛、山羊和绵羊等牛科物种的 *FEZF2* 基因及其编码蛋白序列以及用于比较分析的一些非牛科动物的同源序列，均从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Ensembl 数据库 (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 下载。经初步比较分析，过滤不完整的序列或可能存在错误的序列后，用于本研究的序列数据信息见表 1。用于数据分析的各物种基因组注释 GTF 文件由 NCBI 基因组数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)

表 1 *FEZF2* 基因序列的来源
Tab. 1 Sequence source of *FEZF2* gene

基因序列号 accession number of gene sequences	蛋白质序列号 accession number of protein sequences	物种 species	序列来源 source of sequence
XM_045163982.1	XP_045019917.1	水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	NCBI
NM_001038198.2	NP_001033287.1	普通牛 <i>Bos taurus</i>	NCBI
ENSBTAG00000020302	ENSBTAP00000027056	普通牛 <i>Bos taurus</i>	Ensembl
XM_019984262.1	XP_019839821.1	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	NCBI
JX312831.1	AFS31067.1	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	NCBI
ENSBIXG00000029646	ENSBIXP00000000579	杂交牛 <i>Bos taurus</i> hybrid	Ensembl
ENSBIXG000005030934	ENSBIXP00005045927	杂交牛 <i>Bos indicus</i> hybrid	Ensembl
ENSBGRG00000026510	ENSBGRP00000042330	牦牛 <i>Bos grunniens</i>	Ensembl
XM_005696081.3	XP_005696138.2	山羊 <i>Capra hircus</i>	NCBI
XM_004018621.5	XP_004018670.3	绵羊 <i>Ovis aries</i>	NCBI
XM_010980957.2	XP_010979259.2	单峰驼 <i>Camelus dromedarius</i>	NCBI
XM_032458017.1	XP_032313908.1	野骆驼 <i>Camelus ferus</i>	NCBI
XM_014868769.2	XP_014724255.1	驴 <i>Equus asinus</i>	NCBI
XM_023620158.1	XP_023475926.1	马 <i>Equus caballus</i>	NCBI
ENSCHYG00000014589	ENSCHYP00000021735	中亚马鹿 <i>Cervus hanglu yarkandensis</i>	Ensembl
XM_021069124.1	XP_020924783.1	猪 <i>Sus scrofa</i>	NCBI
NM_018008.4	NP_060478.3	人 <i>Homo sapiens</i>	NCBI
NM_080433.3	NP_536681.2	家鼠 <i>Mus musculus</i>	NCBI
XM_023249900.2	XP_023105668.1	猫 <i>Felis catus</i>	NCBI
XM_042927529.1	XP_042783463.1	狮子 <i>Panthera leo</i>	NCBI
XM_414411.6	XP_414411.2	鸡 <i>Gallus gallus</i>	NCBI

term=) 下载得到。

1.2 基因结构、一致性及差异分析

从 NCBI 数据库下载各物种 *FEZF2* 基因的核苷酸序列, 然后用 ORF Finder 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 通过开放阅读框 (open reading frame, ORF) 查找确定每条序列的 CDS, 进一步利用 Lasergene 软件包 (DNASTar Inc., USA) 中的 MegAlign 程序分析各物种序列的一致性; *FEZF2* 基因的碱基组成和核苷酸序列差异采用 MEGA 7^[9] 进行计算或输出。从 NCBI 数据库下载牛科家畜及常见非牛科动物的基因组注释 GTF 文件, 使用 TBtools 软件^[10] 对每个物种的 *FEZF2* 基因转录本进行信息完整化处理, 进一步使用在线软件 Gene Structure Display Server (<http://gsds.gao-ab.org/>) 对每个物种的基因转录区域结构进行可视化。

1.3 分子特征、进化关系及生物学过程和分子功能

从 NCBI 数据库下载 *FEZF2* 基因的氨基酸序列, 利用 MegAlign 程序分析各物种的序列一致性; 采用 MEGA 7^[9] 分析氨基酸序列差异并构建 *FEZF2* 蛋白氨基酸序列的系统发育树; 将 *FEZF2* 蛋白氨基酸序列提交至 MEME Suite 网站 (<https://meme-suite.org/meme/>) 获得其基序结构信息; 将各物种蛋白序列提交至 NCBI 的 Conserved Domains 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 获得保守结构域。采用 TBtools 程序整合基序和保守结构域的分析结果。序列一致性、基序和保守结构域分析所使用的序列与基因结构分析使用的序列相对应。

FEZF2 蛋白的理化特征与疏水性、信号肽和跨膜结构域采用在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)、SignalP 5.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM 2.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分别进行预测; 蛋白质亚细胞定位及其二级和三级结构分别采用在线软件 ProtComp (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)、SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 和 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行分析。与 *FEZF2* 蛋白相互作用的蛋白、*FEZF2* 参与的生物学过程和分子功能分别使用在线工具 STRING (<https://string-db.org/>) 和 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence->

[search](#)) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 牛科物种 *FEZF2* 基因序列分析

2.1.1 编码区碱基组成、序列一致性与差异

由表 2 可知: 牛科物种间 *FEZF2* 基因编码区的碱基组成相似, 与非牛科物种的编码区碱基组成差异较大。在牛科物种中, 表现为牛属和羊属动物的属内一致性更高, 水牛与牛属和羊属动物有一定差异。由表 3 和图 1 可知: 在 *FEZF2* 基因编码区序列一致性上, 牛科物种间序列一致性在 97.8%~100.0% 之间, 序列差异性较小; 牛科与非牛科哺乳动物序列一致性在 88.5%~98.2% 之间, 序列间差异相对较大; 牛科物种与鸡的序列一致性仅在 71.8%~72.1% 之间, 序列差异性最大。值得注意的是, 牛科物种 *FEZF2* 基因 CDS 第 313~351 位核苷酸之间存在 1 个编码连续甘氨酸的序列区, 该区域存在长度多态性, 有 12G (编码 12 个连续的甘氨酸) 和 13G (编码 13 个连续的甘氨酸) 2 种类型, 两者在长度上相差 1 个密码子。除鸡外, 非牛科物种在第 303 位核苷酸之后也存在这个连续编码甘氨酸的序列区, 但该区域在非牛科物种间长度差异较大, 与牛科物种也不一致。核苷酸位点 c.247A、c.480T 和 c.537T 是牛属动物与水牛和羊属动物相互区分的核苷酸位点; c.771T 是水牛与牛属动物和羊属动物相互区分的核苷酸位点。

2.1.2 基因转录区的结构

由图 2 可知: 牛科物种 *FEZF2* 基因的 CDS 长度由于在多个连续甘氨酸残基编码区存在长度多态性而略有不同。普通牛和瘤牛的 *FEZF2* 基因在该区域都存在 12G 和 13G 类型, 前者比后者少 1 个密码子, 其 CDS 长为 1377 bp; 在水牛、牦牛、山羊和绵羊中, 该区域只存在 13G 型, CDS 长度均为 1380 bp。不同物种间 *FEZF2* 基因转录区结构不同, 特别是非翻译区 (untranslated region: 5'UTR 和 3'UTR) 的长度及内含子长度不一致。在牛科物种中, 除瘤牛的 *FEZF2* 基因包含 2 个选择性剪接转录本 (它们主要在 5'UTR 存在差异) 外, 普通牛、水牛、牦牛、山羊和绵羊均只包含 1 个转录本。结合表 4 还可知: 水牛 *FEZF2* 基因与其他牛科物种的转录区组成与结构差异较大, 山羊和绵羊间的转录区组成与结构也相差较

表 2 *FEZF2* 基因编码区碱基组成

Tab. 2 Base composition in the coding region of *FEZF2* gene

物种 species	A	G	T	C	A+T	C+G
<i>Bubalus bubalis</i> _13G	21.30	28.26	16.45	33.99	37.75	62.25
<i>Bos taurus</i> _12G	21.42	28.03	16.63	33.91	38.05	61.95
<i>Bos taurus</i> _13G	21.38	28.12	16.59	33.91	37.97	62.30
<i>Bos indicus</i> _12G	21.57	27.96	16.49	33.99	38.05	61.95
<i>Bos indicus</i> _13G	21.38	28.12	16.52	33.99	37.90	62.10
<i>Bos taurus</i> hybrid_13G	21.38	28.12	16.59	33.91	37.97	62.03
<i>Bos indicus</i> hybrid_13G	21.38	28.12	16.52	33.99	37.90	62.10
<i>Bos grunniens</i> _13G	21.38	28.12	16.52	33.99	37.90	62.10
<i>Capra hircus</i> _13G	21.59	28.19	16.30	33.91	37.90	62.10
<i>Ovis aries</i> _13G	21.59	28.19	16.30	33.91	37.90	62.10
<i>Camelus dromedarius</i> _22G	21.10	28.61	16.02	34.26	37.12	62.88
<i>Camelus ferus</i> _24G	20.94	28.92	15.88	34.26	36.82	63.18
<i>Equus asinus</i> _16G	20.72	28.84	15.29	35.14	36.01	63.99
<i>Equus caballus</i> _19G	20.45	29.23	15.19	35.13	35.64	64.36
<i>Cervus hanglu yarkandensis</i> _14G	21.26	28.63	16.05	34.06	37.31	62.69
<i>Sus scrofa</i> _17G	21.35	28.32	16.49	33.84	37.84	62.16
<i>Homo sapiens</i> _16G	21.16	28.41	15.72	34.71	36.88	63.12
<i>Mus musculus</i> _7G	23.10	25.37	18.06	33.48	41.15	58.85
<i>Felis catus</i> _21G	20.57	29.46	15.41	34.55	35.99	64.01
<i>Panthera leo</i> _19G	20.81	29.16	15.48	34.56	36.29	63.71
<i>Gallus gallus</i> _0G	20.36	30.24	13.65	35.75	34.01	65.99

注：物种中文名见表1；“数字+G”表示该物种FEZF2蛋白序列中的甘氨酸重复数；下同。

Note: Chinese name of species list in Tab.1; “number+G” indicates the number of glycine repeats in the FEZF2 amino acid sequence of species; the same as below.

表 3 牛科物种 *FEZF2* 基因核苷酸序列的一致性

Tab. 3 Nucleotide sequence consistency of *FEZF2* gene between the species of Bovidae and non-Bovidae %

物种 species	<i>Bubalus bubalis</i> _13G	<i>Bos taurus</i> _12G	<i>Bos taurus</i> _13G	<i>Bos indicus</i> _12G	<i>Bos indicus</i> _13G	<i>Bos taurus</i> hybrid_13G	<i>Bos indicus</i> hybrid_13G	<i>Bos grunniens</i> _13G	<i>Capra hircus</i> _13G	<i>Ovis aries</i> _13G
<i>Bubalus bubalis</i> _13G	***	99.0	99.7	99.7	99.7	99.0	99.7	99.7	98.7	98.7
<i>Bos taurus</i> _12G	0.8	***	99.3	99.3	99.4	99.8	99.3	99.3	97.9	97.9
<i>Bos taurus</i> _13G	0.3	0.5	***	100.0	99.9	99.2	100.0	100.0	98.6	98.6
<i>Bos indicus</i> _12G	0.3	0.5	0.0	***	99.9	99.2	100.0	100.0	98.6	98.6
<i>Bos indicus</i> _13G	0.4	0.4	0.1	0.1	***	99.2	99.9	99.9	98.5	98.5
<i>Bos taurus</i> hybrid_13G	0.9	0.2	0.6	0.6	0.7	***	99.2	99.2	97.8	97.8
<i>Bos indicus</i> hybrid_13G	0.3	0.5	0.0	0.0	0.1	0.6	***	100.0	98.6	98.6
<i>Bos grunniens</i> _13G	0.3	0.5	0.0	0.0	0.1	0.6	0.0	***	98.6	98.6
<i>Capra hircus</i> _13G	1.4	2.0	1.5	1.5	1.5	2.1	1.5	1.5	***	99.9
<i>Ovis aries</i> _13G	1.4	2.0	1.5	1.5	1.5	2.1	1.5	1.5	0.1	***

注：对角线以上数值表示序列一致性，对角线以下数值代表序列分歧度。

Note: The values above diagonal line indicate the identity, the values below the diagonal indicate divergence.

大；但牛科物种间 *FEZF2* 的 CDS 区结构组成与共线性关系较为一致，与其他非牛科物种相似性也较大。

2.2 氨基酸组成、理化特征及结构分析

2.2.1 *FEZF2* 蛋白的氨基酸组成

由表 5 可知：在氨基酸组成上，牛科物种间

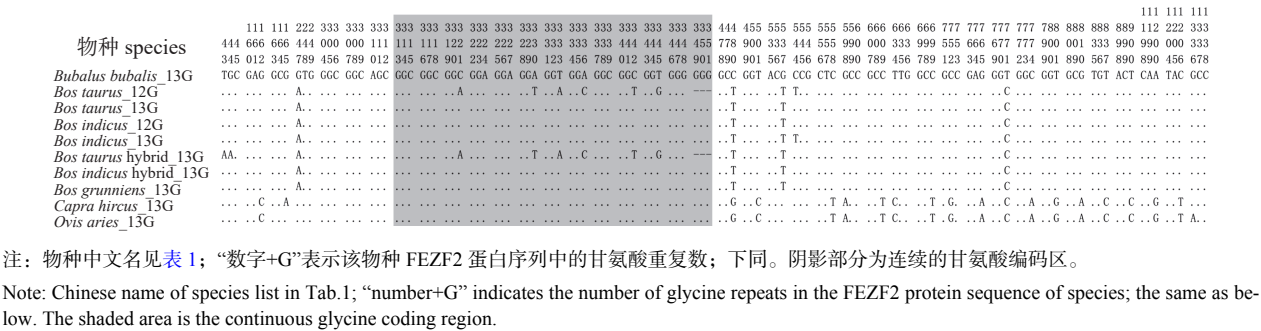


图 1 牛科物种 *FEZF2* 基因核苷酸序列差异

Fig. 1 Nucleotide sequence differences of *FEZF2* gene in species of Bovidae

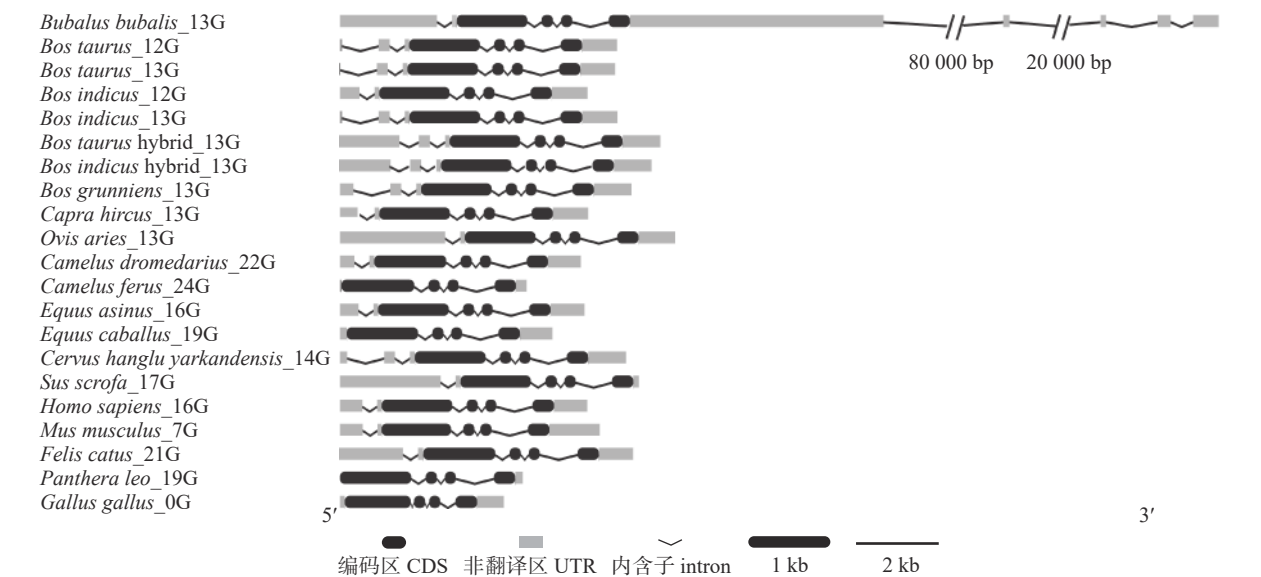


图 2 牛科物种及非牛科动物的 *FEZF2* 基因结构

Fig. 2 Structure of *FEZF2* gene in Bovidae and non-Bovidae

相似性较大, 与非牛科动物 (特别是鸡) 的差异较大。在牛科物种中, 水牛、普通牛、瘤牛和牦牛间 FEZF2 蛋白的氨基酸组成相似性较大, 它们与山羊和绵羊在丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、蛋氨酸、苏氨酸和缬氨酸等氨基酸组成上存在一定差异。

2.2.2 基本理化特征分析

由表 6 可知: 牛科物种 FEZF2 的基本理化特征基本相似, 都是亲水性蛋白质, 但水牛属、牛属与羊属动物的属间有一定差异, 主要表现在疏水性氨基酸与极性氨基酸的含量、不稳定指数和疏水性等方面。普通牛和瘤牛 FEZF2 的 12G 型和 13G 型除疏水性有一定差异外, 其他指标较一致。牛科物种 FEZF2 的基本理化特征与人和家鼠的特别是与鸡的差异较大。

2.2.3 FEZF2 蛋白的基序和结构域

由图 3 可知: 除猪和鸡的 FEZF2 蛋白含有

9 个基序外, 其他物种的 FEZF2 蛋白均含有 10 个基序。预测结果 (表 6) 显示: 牛科和非牛科动物的 FEZF2 蛋白都不含有跨膜结构和信号肽, 但都含有 1 个 COG5048 保守结构域, 由 6 个 C₂H₂ 类型的锌指结构域组成 (图 3 和图 4), 由基序 3、2、9 和 1 构成。牛科与和非牛科动物的 FEZF2 的 COG5048 保守结构域所在位置一致, 在靠近多肽链的 C 端一侧 (牛科动物在多肽链的 AA288~440 之间)。人、家鼠和猪除含有 1 个 COG5048 保守结构域之外, 在 AA385~441 之间还含有 1 个 SFP1 超家族结构域; 家鼠在 AA317~339 之间还有 1 个 zf-H2C2_2 结构域。

2.2.4 二级结构组成与三级结构分析

由表 7 可知: 水牛属和牛属动物与羊属动物的 FEZF2 氨基酸序列中形成各类二级结构的氨基酸数量有一定差异, 牛科与非牛科动物差异更大。同源建模显示: 构建牛科物种 FEZF2 蛋白的

表 4 牛科和非牛科动物 *FEZF2* 基因结构的比较

Tab. 4 Comparison of *FEZF2* gene structure between species of Bovidae and non-Bovidae

物种 species	染色体位置 chromosome location	外显子数 number of exon	内含子数 number of intron	长度/bp length													3'UTR	CDS
				5'UTR	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9					
<i>Bubalus bubalis</i> _13G	NC_059177.1	9	8	1233	1175	910	135	133	3318	79	64	160	309	3673	1380			
<i>Bos taurus</i> _12G	NC_037349.1	6	5	219	27	134	907	135	133	681				424	1377			
<i>Bos taurus</i> _13G	Ensembl	6	5	219	27	134	910	135	133	679				419	1380			
<i>Bos indicus</i> _12G	NC_032671.1	5	4	295		237	907	135	133	687				430	1377			
<i>Bos indicus</i> _13G	NC_032671.1	6	5	219	27	134	910	135	133	687				427	1380			
<i>Bos taurus</i> hybrid_13G	Ensembl	6	5	921	729	134	910	135	133	715				455	1380			
<i>Bos indicus</i> hybrid_13G	Ensembl	6	5	815	623	134	910	135	133	715				455	1380			
<i>Bos grunniens</i> _13G	Ensembl	6	5	358	166	134	910	135	133	719				459	1380			
<i>Capra hircus</i> _13G	NC_030829.1	5	4	295		237	910	135	133	688				431	1380			
<i>Ovis aries</i> _13G	NC_056072.1	5	4	1329	1271		910	135	133	702				455	1380			
<i>Camelus dromedarius</i> _22G	NC_044527.1	5	4	234		176	928	135	133	654				397	1398			
<i>Camelus ferus</i> _24G	NC_045712.1	4	3	21			897	135	133	390				133	1404			
<i>Equus asinus</i> _16G	NW_014638425.1	5	4	282		224	910	135	133	669				413	1380			
<i>Equus caballus</i> _19G	NC_009159.3	4	3	83			944	135	133	651				394	1389			
<i>Cervus hanglu</i> <i>yarkandensis</i> _14G	Ensembl	6	5	281	89	134	913	135	133	718				458	1383			
<i>Sus scrofa</i> _17G	NC_010455.5	5	4	1276	1218		907	135	133	327				70	1377			
<i>Homo sapiens</i> _16G	NC_000003.12	5	4	330		272	910	135	133	662				405	1380			
<i>Mus musculus</i> _7G	NC_000080.6	5	4	332		279	890	135	133	867				607	1368			
<i>Felis catus</i> _21G	NC_018724.3	6	5	841	778	528	402	135	133	672				415	1395			
<i>Panthera leo</i> _19G	NC_056680.1	4	3				861	135	133	348				91	1389			
<i>Gallus gallus</i> _0G	NC_045712.1	4	3	21			856	135	133	534				133	1326			

注: E1~E9分别代表外显子1~9。
Note: E1-E9 indicate exons 1-9, respectively.

表 5 牛科物种与非牛科动物 *FEZF2* 氨基酸组成

Tab. 5 Amino acid composition of *FEZF2* in species of Bovidae and non-Bovidae

%

氨基酸 amino acid	<i>Bubalus</i> <i>bubalis</i> _13G	<i>Bos</i> <i>taurus</i> _12G	<i>Bos</i> <i>taurus</i> _13G	<i>Bos</i> <i>indicus</i> _12G	<i>Bos</i> <i>indicus</i> _13G	<i>Bos</i> <i>grunniens</i> _13G	<i>Capra</i> <i>hircus</i> _13G	<i>Ovis</i> <i>aries</i> _13G	<i>Homo</i> <i>sapiens</i> _16G	<i>Mus</i> <i>musculus</i> _7G	<i>Gallus</i> <i>gallus</i> _0G
丙氨酸 Ala	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.2	8.9	10	9.7	9.3
精氨酸 Arg	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	4.3
天冬酰胺 Asn	4.1	4.1	4.1	4.4	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.2	3.9
天冬氨酸 Asp	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	2	2	1.7	1.8	1.8
半胱氨酸 Cys	4.8	4.8	4.8	4.6	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
谷氨酰胺 Gln	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.9	3.2
谷氨酸 Glu	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.7	3.7	3.9	4.0	4.3
甘氨酸 Gly	10.9	10.7	10.9	10.7	10.9	10.9	11.1	11.1	10.9	8.6	10.2
组氨酸 His	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	5.1	5.9
异亮氨酸 Ile	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.9
亮氨酸 Leu	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.5	8.6
赖氨酸 Lys	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.8	9.1
蛋氨酸 Met	1.3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4
苯丙氨酸 Phe	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.4	4.3
脯氨酸 Pro	7.8	7.6	7.8	7.9	7.8	7.8	7.8	7.8	8.3	7.9	10.2
丝氨酸 Ser	7.0	7.2	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	8.6	5.7
苏氨酸 Thr	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.9	6.1	5.0	5.7	4.1
色氨酸 Trp	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
酪氨酸 Tyr	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.5
缬氨酸 Val	4.4	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.4	4.4	4.1	4.2	3.4

表 6 牛科及非牛科物种 *FEZF2* 的基本理化特征

Tab. 6 Basic physicochemical characteristics of *FEZF2* for species of Bovidae and non-Bovidae

物种 species	<i>Bubalus</i> <i>bubalis</i> _13G	<i>Bos</i> <i>taurus</i> _12G	<i>Bos</i> <i>taurus</i> _13G	<i>Bos</i> <i>indicus</i> _12G	<i>Bos</i> <i>indicus</i> _13G	<i>Bos</i> <i>grunniens</i> _13G	<i>Capra</i> <i>hircus</i> _13G	<i>Ovis</i> <i>aries</i> _13G	<i>Homo</i> <i>sapiens</i> _16G	<i>Mus</i> <i>musculus</i> _7G	<i>Gallus</i> <i>gallus</i> _0G
氨基酸数量 number of AA	459	458	459	458	459	459	459	459	459	455	441
等电点 isoelectric point	9.52	9.52	9.52	9.55	9.52	9.52	9.52	9.52	9.52	9.52	9.59
分子量/ku molecular weight	48.88	48.84	48.91	48.86	48.91	48.91	48.88	48.91	48.81	48.93	47.62
强酸性氨基酸 (−) strongly acidic AAs	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	27
强碱性氨基酸 (+) strongly basic AAs	57	57	57	57	57	57	57	57	57	57	59
疏水氨基酸 hydrophobic AAs	138	137	137	137	137	137	136	135	139	137	127
极性氨基酸 polar AAs	124	125	124	124	124	124	125	126	121	131	106
不稳定指数 instability index	43.74	44.09	44.28	42.64	44.28	44.28	43.32	42.90	44.90	44.10	43.60
亲水性总平均值 grand average of hydropathicity	−0.324	−0.327	−0.329	−0.342	−0.329	−0.329	−0.334	−0.340	−0.328	−0.348	−0.473
脂肪族指数 aliphatic index	68.1	67.62	67.47	67.62	67.47	67.47	67.67	67.45	67.91	67.21	64.26
信号肽 signal peptide	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
跨膜区 transmembrane region	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

注：N. 无该结构。
Note: N. without the structure.

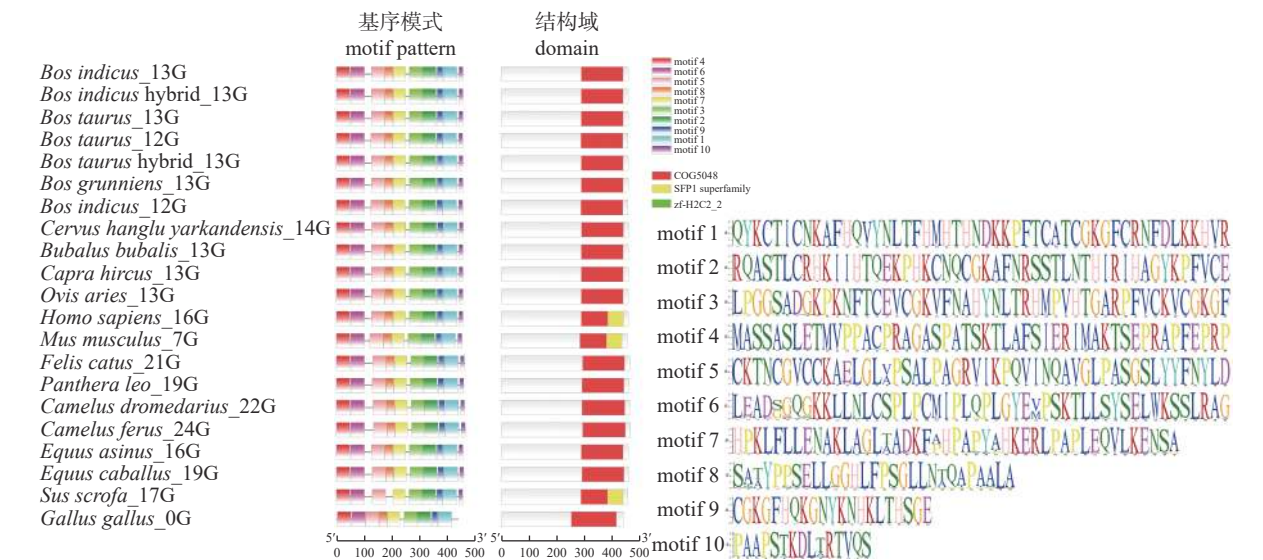
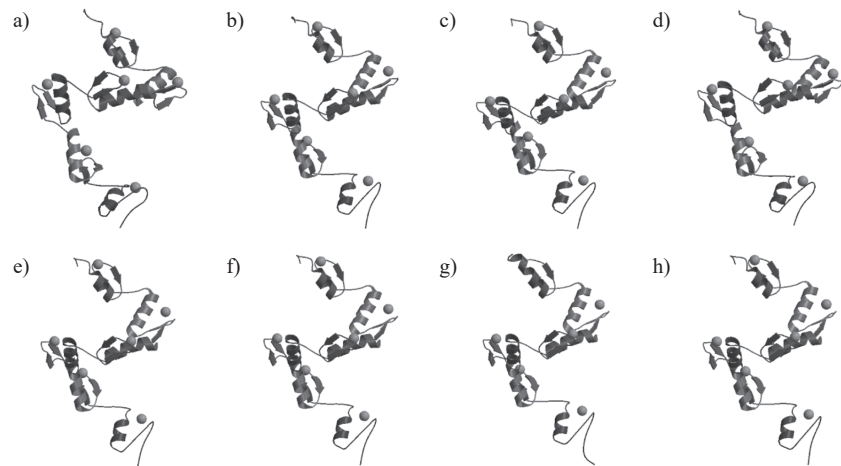


图 3 牛科和非牛科动物 *FEZF2* 的基序模式和保守域

Fig. 3 Motif patterns and conserved domains of *FEZF2* in species of Bovidae and non-Bovidae

最佳模型为鼠锌指蛋白 568 模板 (5wjq.1.C)。水牛、普通牛 (12/13G)、瘤牛 (12/13G)、牦牛和山羊的 *FEZF2* 蛋白三维结构与模板一致性为 43%，覆盖率为 37% (AA275~445 之间)；绵羊 13G 的三级结构与 5wjq.1.C 的覆盖率为 37%，一致性为 41%，缺少 1 个锌指结构；预测的模板覆盖区



注: a) 水牛_13G; b) 普通牛_12G; c) 普通牛_13G; d) 瘤牛_12G; e) 瘤牛_13G; f) 牦牛_13G; g) 绵羊_13G; h) 山羊_13G。
Note: a) *Bubalus bubalis*_13G; b) *Bos taurus*_12G; c) *Bos taurus*_13G; d) *Bos indicus*_12G; e) *Bos indicus*_13G; f) *Bos grunniens*_13G; g) *Capra hircus*_13G; h) *Ovis aries*_13G.

图 4 预测的牛科动物 FEZF2 蛋白三级结构

Fig. 4 Tertiary structure of FEZF2 protein predicted in Bovidae

表 7 形成各物种 FEZF2 蛋白二级结构的氨基酸数量占比

Tab. 7 Proportion of amino acids that form the secondary structure of FEZF2 proteins in different species

物种 species	α 螺旋 alpha helix	延伸片段 extended strand	β 折叠 beta turn	无规则卷 random coil
				%
<i>Bubalus bubalis</i> _13G	23.97	10.68	4.36	61.00
<i>Bos taurus</i> _12G	23.58	10.48	5.24	60.70
<i>Bos taurus</i> _13G	23.97	10.68	4.36	61.00
<i>Bos indicus</i> _12G	23.58	12.66	5.24	58.52
<i>Bos indicus</i> _13G	23.97	10.68	4.36	61.00
<i>Bos grunniens</i> _13G	23.97	10.68	4.36	61.00
<i>Capra hircus</i> _13G	23.09	11.55	4.79	60.57
<i>Ovis aries</i> _13G	22.22	12.85	4.79	60.13
<i>Homo sapiens</i> _16G	23.75	12.42	4.58	59.26
<i>Mus musculus</i> _7G	23.74	12.53	4.40	59.34
<i>Gallus gallus</i> _0G	24.26	13.15	4.76	57.82

域在 COG5048 保守结构域区, 三维结构显示该区域含有 6 个典型的锌指结构(绵羊含 5 个), 与结构域分析基本一致。从三维结构来看, 牛科物种的属间有一定差异; 水牛与普通牛、瘤牛的 13G 和 12G 型 FEZF2 都有差异, 但与普通牛 13G 型差异相对较小(图 4)。

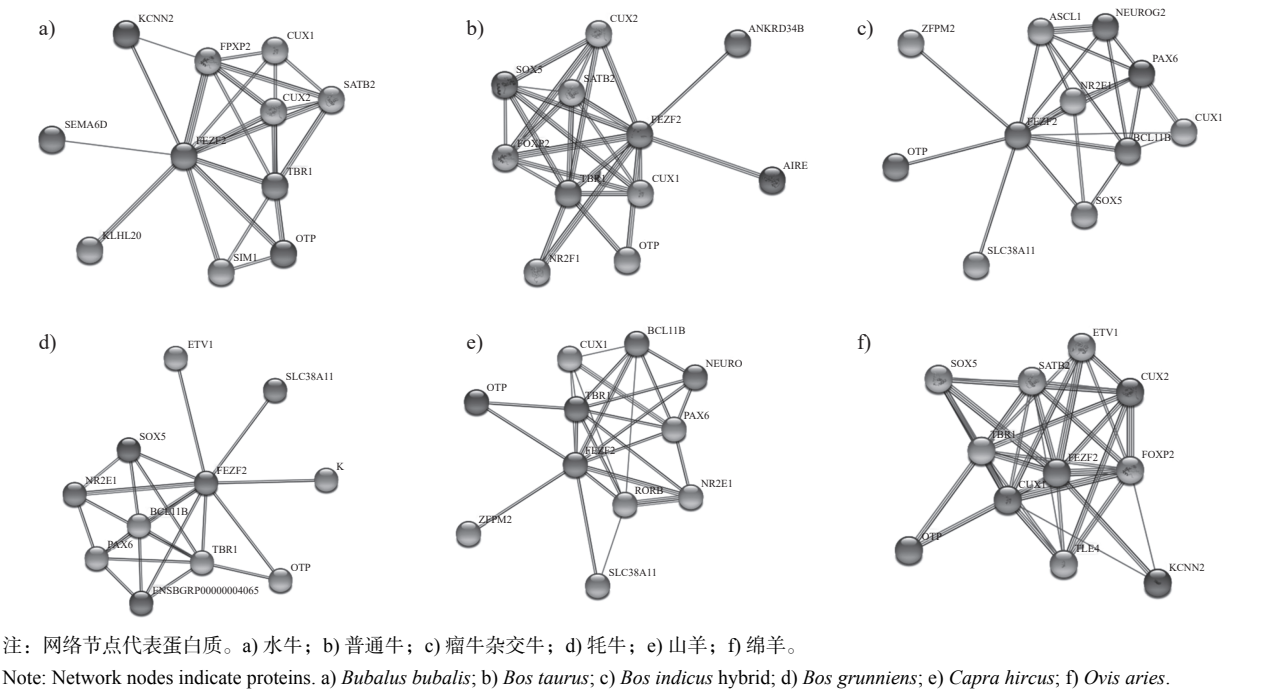
2.3 亚细胞定位、生物学过程及分子功能

亚细胞定位分析表明: 各物种 FEZF2 定位于

细胞核内的支持分数值为 10 (满分), 表明 FEZF2 蛋白为在细胞核内发挥功能作用的蛋白质。生物信息分析表明: FEZF2 蛋白主要参与轴突成束、细胞去分化、细胞群增殖的负调控、神经元分化的负调节、神经元命运的决定和神经元分化的正向调节等生物学过程。它能与染色质结合, 具有 DNA 结合转录激活或抑制因子活性, 能激活或抑制 RNA 聚合酶 II 转录的特定基因集转录; 还具有能与蛋白编码基因顺式调控序列特异性结合的功能。

2.4 蛋白质互作分析

由图 5 可知: 与各牛科物种的 FEZF2 蛋白相互作用的蛋白不完全相同, 其中共有的互作蛋白主要为 BCL11B、CUX1、CUX2、ETV1、FOXP2、KCNN2、NEUROG2、NR2E1、OTP、PAX6、SATB2、SLC38A11、SOX5、TBR1 和 ZFPM2 等, 主要为参与胸腺细胞发育过程中 T 淋巴细胞分化和存活的关键调节因子, 参与控制大脑中神经元的增殖和分化的转录因子、转录激活或抑制因子, 调节神经元的兴奋性钾离子通道, 参与神经元分化的转录调节因子, 参与调节视网膜发育核受体亚家族 2 组 E 成员, 参与下丘脑神经内分泌细胞分化的骨同源盒蛋白, 在眼睛、鼻子、中枢神经系统和胰腺的发育中起重要作用的转录因子, 在核基质或支架相关区域与 DNA 结合的蛋白, 参与软骨细胞分化和软骨形成转录因子, 参与皮质发育(包括神经元迁移、板层和区域特



注: 网络节点代表蛋白质。a) 水牛; b) 普通牛; c) 瘤牛杂交牛; d) 牦牛; e) 山羊; f) 绵羊。
Note: Network nodes indicate proteins. a) *Bubalus bubalis*; b) *Bos taurus*; c) *Bos indicus* hybrid; d) *Bos grunniens*; e) *Capra hircus*; f) *Ovis aries*.

图 5 牛科物种 *FEZF2* 蛋白质相互作用网络

Fig. 5 Interaction network of *FEZF2* protein in species of Bovidae

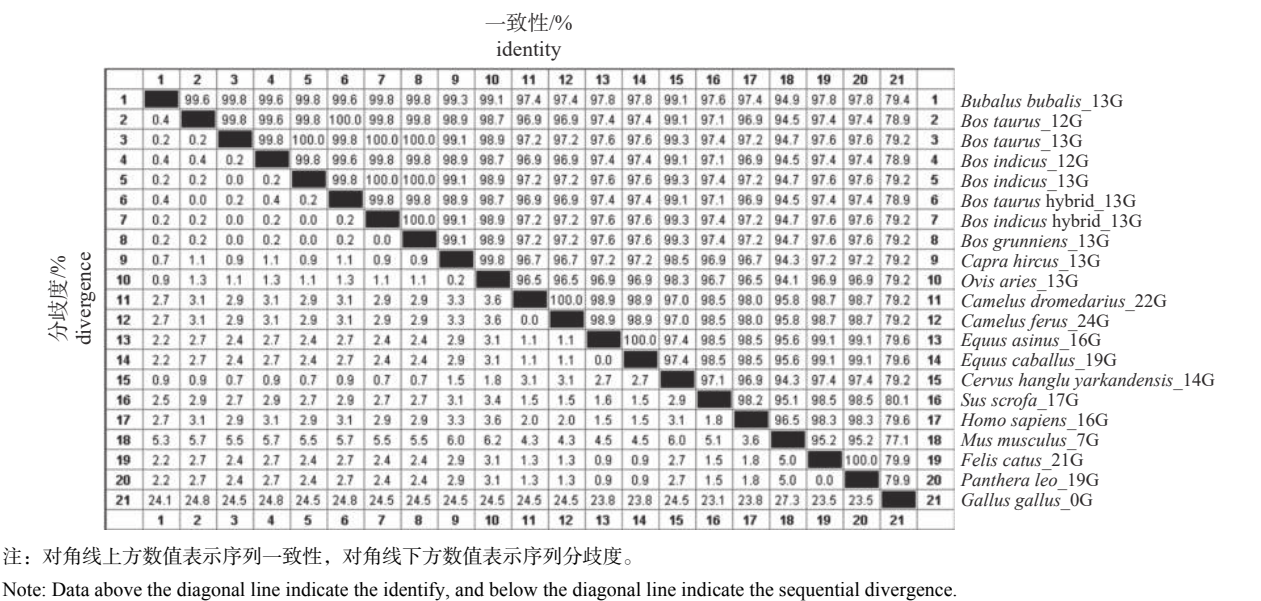
征) 以及轴突投射过程的转录抑制因子和具有锌指结构的转录调节因子等。

2.5 氨基酸序列一致性与系统发育分析

由图 6 可知: 各牛科物种 *FEZF2* 氨基酸序列的一致性在 99.7%~100.0% 之间; 它们与非牛科哺乳动物 *FEZF2* 氨基酸序列的一致性在 94.1%~99.3% 之间; 与鸡的序列一致性偏低, 在 78.9%~

79.4% 之间。各物种 *FEZF2* 氨基酸序列间的差异位点及其连续甘氨酸重复区的位置与差异见图 7。

由图 8 可知: 在系统发育树上, 普通牛、瘤牛、牦牛、中亚马鹿、水牛与山羊、绵羊等聚在一大支, 支持率为 99%; 而人、马、驴、单峰驼、野骆驼、人、家鼠、猫和狮子聚在另一支。



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 indicate the identify, and below the diagonal line indicate the sequential divergence.

图 6 牛科与非牛科物种 *FEZF2* 氨基酸序列一致性与分歧度

Fig. 6 Identify and divergence of *FEZF2* amino acid sequences between species of Bovidae and non-Bovidae

化特征、基序、保守结构域和三维结构等虽具有一定的种属间差异,但一致性非常高,与非牛科动物的一致性也较高。系统发育分析也显示:牛科 *FEZF2* 蛋白序列聚集在一大支中,表明牛科家养动物的 *FEZF2* 蛋白有着较近的遗传关系。研究表明:牛科 *FEZF2* 蛋白与非牛科哺乳动物具有相似功能,牛科家养动物间一致性更高。

有研究发现:*FEZF2* 蛋白是一种含有 C_2H_2 型锌指结构域和连续甘氨酸重复区的转录因子,它能控制单胺能神经元的发育^[1,11-12]。*FEZF2* 缺陷的小鼠呈现出过度活跃的行为,揭示 *FEZF2* 基因在神经元发育中起作用^[7]。SUGIMOTO 等^[2]报道 *FEZF2* 在普通牛大脑中强表达,在乳腺中弱表达。在泌乳期水牛中,*FEZF2* 在大脑中的表达水平最高,在小脑、垂体、心、肺、脾和肾中有较高水平的表达,在乳腺、肌肉、小肠和十二指肠组织中有适量表达^[6]。在奶牛中发现,乳腺炎能够诱导乳腺中 *FEZF2* 表达,进而上调细胞中 *SEMA5A* 表达,进一步引起与机体免疫反应相关的多个基因表达^[2,8]。因此,*FEZF2* 基因不仅与神经元发育相关,而且由于神经元发育和免疫之间存在串扰,导致其与先天免疫相关^[2,8]。本研究显示:牛科动物 *FEZF2* 蛋白都是在核内发挥功能的亲水性蛋白,无信号肽序列及跨膜结构域,都含有 1 个 COG5048 保守的锌指结构域,其参与的生物学过程主要与神经元发育调节有关,分子功能主要与染色质结合、转录激活或抑制有关^[12-13];与其相互作用的蛋白多为与神经元发育和先天免疫调节密切相关的转录因子或蛋白。结合其在序列和结构上的保守性,推测 *FEZF2* 蛋白参与牛科家养动物的神经元发育和与先天免疫相关的生物学过程。

SUGIMOTO 等^[2,8]研究表明:*FEZF2* 基因中连续甘氨酸重复区的多态性与奶牛乳腺炎抗性相关,但这种多态性对产奶量、乳中脂、蛋白和非脂肪固型物产量的估计育种值无不利影响。该区域 13G 型等位基因导致奶牛对乳腺炎易感,而 12G 型等位基因使奶牛对乳腺炎具有抗性,这是因为 12G 型抗性等位基因促进 *SEMA5A* 表达的能力显著强于易感的 13G 型等位基因,即 12G 型等位基因引起的免疫应答水平高于 13G 型的等位基因^[2,8]。进一步研究发现:易感的 13G 型 *FEZF2* 含有的甘氨酸重复区能与胰岛素样生长因子 1 受

体 (*IGF1R*) 基因 5'UTR 中较长的胞嘧啶 (C) 伸展相结合,通过促进 *IGF1R* 的表达而抑制乳腺上皮细胞的自噬过程,进而介导对乳腺炎的易感性^[3]。携带 13G 型的 *FEZF2* 与 5'UTR 中含较长 C 延伸的 *IGF1R* 的变异组合的奶牛更容易患乳腺炎^[3]。本研究通过序列比对发现:哺乳动物的 *FEZF2* 蛋白都存在连续甘氨酸重复区,但各物种间甘氨酸重复的数量有差异。在牛科家养动物中,普通牛和瘤牛的 *FEZF2* 在该区域都存在 12G 和 13G 型等位基因,而在水牛、牦牛、山羊和绵羊中,该区域只存在 13G 型等位基因。前期魏伟等^[5]对河流型和沼泽型水牛群体检测发现:这两类水牛的 *FEZF2* 都为 13G 型。在水牛、牦牛、山羊和绵羊中,*FEZF2* 蛋白只存在 13G 型,它是否会导致这些牛科物种乳腺炎易感或先天免疫应答受损有待进一步深入研究。值得注意的是,截至目前,未见沼泽型水牛、牦牛、山羊和绵羊患乳腺炎的报道;奶用河流型水牛乳腺炎的发病率仅约 4%,显著低于普通奶牛^[14-16]。本研究发现:在氨基酸序列一致性、理化特性和结构上,各牛科物种的 *FEZF2* 虽然具有较高的一致性,但仍存在一定的种属间差异,这些差异是否与水牛、牦牛、山羊和绵羊对乳腺炎的抗性有关尚不清楚,因此,有必要通过群体水平的试验观察和进一步的细胞水平功能试验予以证实。

本研究通过序列比对,发现了一些具有种属特征的核苷酸或氨基酸差异位点,这些位点不仅反映了种属间 *FEZF2* 功能的差异,而且也可作为种属间相互区分的分子标记。

4 结论

牛科物种的 *FEZF2* 基因编码蛋白在氨基酸组成、序列一致性、理化特征和结构上虽然有种属间差异,但一致性较高。在牛科中,水牛、牦牛、绵羊和山羊 *FEZF2* 序列的连续甘氨酸重复区为 13G 型,而普通牛和瘤牛的同源区有 12G 和 13G 型。牛科动物 *FEZF2* 蛋白都是在核内发挥生物学功能的亲水性蛋白,都含有 1 个由 6 个锌指结构组成的 COG5048 保守结构域,参与的生物学过程主要与神经元发育调节有关,分子功能主要与染色质结合、转录激活或抑制有关。本研究揭示 *FEZF2* 蛋白可能参与了牛科物种神经元发育和机体免疫相关基因的表达调控过程。

[参考文献]

- [1] MATSUO-TAKASAKI M, LIM J H, BEANAN M J, et al. Cloning and expression of a novel zinc finger gene, *Fez*, transcribed in the forebrain of *Xenopus* and mouse embryos[J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 93(1/2): 201. DOI: [10.1016/s0925-4773\(00\)00264-1](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00264-1).
- [2] SUGIMOTO M, FUJIKAWA A, WOMACK J E, et al. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(17): 6454. DOI: [10.1073/pnas.0601015103](https://doi.org/10.1073/pnas.0601015103).
- [3] SUGIMOTO M, SUGIMOTO Y. Variant in the 5' untranslated region of insulin-like growth factor 1 receptor is associated with susceptibility to mastitis in cattle[J]. *Genetics*, 2012, 2(9): 1077. DOI: [10.1534/g3.112.003095](https://doi.org/10.1534/g3.112.003095).
- [4] 魏伟, 苗永旺. 奶牛乳腺炎抗性候选基因多态性研究进展[J]. *中国牛业科学*, 2011, 37(6): 49. DOI: [10.3969/j.issn.1001-9111.2011.06.017](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-9111.2011.06.017).
- [5] 魏伟, 苗永旺, 李卫真, 等. 水牛前脑锌指蛋白(FEZL)基因外显子1多态性研究[J]. *家畜生态学报*, 2011, 32(6): 21. DOI: [10.3969/j.issn.1673-1182.2011.06.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-1182.2011.06.005).
- [6] 张广乐, 吉丽, 王昌全, 等. 槟榔江水牛FEZL基因分离鉴定、分子特征及泌乳期多组织差异表达分析[J]. *家畜生态学报*, 2020, 41(12): 13. DOI: [10.3969/j.issn.1673-1182.2020.12.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-1182.2020.12.003).
- [7] HIRATA T. Zinc finger gene *fez*-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons[J]. *Developmental Dynamics*, 2004, 230(3): 546. DOI: [10.1002/dvdy.20068](https://doi.org/10.1002/dvdy.20068).
- [8] SUGIMOTO M, ITOH T, GOTOH Y, et al. Short communication: enhanced clinical mastitis resistance in holsteins with a FEZF2 p. Gly105 (12_13) polymorphism[J]. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94(4): 2103. DOI: [10.3168/jds.2010-3362](https://doi.org/10.3168/jds.2010-3362).
- [9] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054).
- [10] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194. DOI: [10.1016/j.molp.2020.06.009](https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009).
- [11] LEVKOWITZ G, ZELLER J, SIROTKIN H I, et al. Zinc finger protein too few controls the development of monoaminergic neurons[J]. *Nature Neuroscience*, 2003, 6(1): 28. DOI: [10.1038/nn979](https://doi.org/10.1038/nn979).
- [12] TSYPORIN J, TASTAD D, MA X K, et al. Transcriptional repression by FEZF2 restricts alternative identities of cortical projection neurons[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(12): 109269. DOI: [10.1016/j.celrep.2021.109269](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109269).
- [13] HOBERT O, KRATSIOS P. Neuronal identity control by terminal selectors in worms, flies, and chordates[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2019, 56: 97. DOI: [10.1016/j.conb.2018.12.006](https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.006).
- [14] KAVITHA K L, RAJESH K, SURESH K, et al. Buffalo mastitis-risk factors[J]. *Buffalo Bulletin*, 2009, 28(3): 135. DOI: [10.1016/j.applanim.2009.07.007](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.07.007).
- [15] FAGIOLO A, LAI O. Mastitis in buffalo[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2010, 6(2): 200. DOI: [10.4081/ijas.2007.s2.200](https://doi.org/10.4081/ijas.2007.s2.200).
- [16] BEHESHTI R, ESHRATKHAH B, SHAYEGH J, et al. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Buffalo of the Tabriz region, Iran[J]. *Journal of American Science*, 2011, 7(5): 642.

责任编辑: 何馨成